
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

GUIDO PALLADINI, VITO MARGOTTA, ANTONIO
CAROLEI, AURORA CAPPIELLO-VALCAMONICA, MARIA
CRISTINA HERNANDEZ

Studio sulla sensibilità allo zinco del sistema nervoso di *Dugesia gonocephala* s.l. Confronto con l'azione del rame e di altri metalli pesanti

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 63 (1977), n.5, p. 447–453.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1977_8_63_5_447_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 allo zinco del sistema nervoso di Dugesia gonocephala s.l. Confronto con l'azione del rame e di altri metalli pesanti* ⁽¹⁾. Nota di GUIDO PALLADINI ⁽²⁾, VITO MARGOTTA ⁽³⁾, ANTONIO CAROLEI ⁽⁴⁾, AURORA CAPPIELLO-VALCAMONICA ⁽²⁾ e MARIA CRISTINA HERNANDEZ ⁽²⁾, presentata ⁽⁵⁾ dal Socio A. ROSSI-FANELLI.

SUMMARY. — Behavioural and morphological observations have been conducted in specimens of flatworms (*Dugesia gonocephala s.l.*) treated with different ions such as zinc, lead, gold and silver.

A copper-like activity of lead, gold and silver can be excluded; zinc-treated specimens show loss of motility comparable to the akinetic-end-phase described during copper exposure; the initial stage of copper-induced hyperkinesias probably depends upon a dopamine-like stimulation, specific to this ion.

INTRODUZIONE

Barbeau e Donaldson (1974) hanno dimostrato la presenza, nel sistema nervoso centrale (SNC) del ratto, di alcuni cationi, non uniformemente distribuiti.

La presenza di tracce di Cu^{2+} , Zn^{2+} e Mn^{2+} nel SNC dei Vertebrati rende estremamente interessante lo studio dei possibili rapporti tra questi cationi divalenti ed il metabolismo delle amine biogene.

In una precedente Nota abbiamo dimostrato che il Cu^{2+} si fissa elettivamente in talune cellule del sistema nervoso della planaria *Dugesia gonocephala s.l.* (Palladini *et al.*, 1976), determinandone un peculiare comportamento motorio.

L'azione del Cu^{2+} è stata da noi ricondotta alla capacità del metallo di interagire con la popolazione neuronale dopaminergica con effetto patoclitico specifico a risultante dopamino-agonista in fase iniziale e neuro-lesiva in fase terminale. Ciò è parso logicamente deducibile dalle osservazioni comportamentali che hanno permesso di rilevare ipercinesie con spiralizzazione a significato dopamino-agonista e dalle alterazioni del quadro istochimico.

(1) La ricerca è stata eseguita nell'Istituto di Biologia e Zoologia generale della Facoltà di Medicina e Chirurgia dell'Università di Roma.

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

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

(4) I Clinica Neurologica dell'Università di Roma.

(5) Nella seduta del 18 novembre 1977.

La possibilità di dimostrare nel sistema nervoso della planaria effetti dopamino-agonisti (Carolei *et al.*, 1975; Margotta *et al.*, 1975), in analogia con quanto osservato da Butcher e Fox (1968) e confermato da Palladini *et al.* (1975) nel contingente dopaminergico nigro-striatale del ratto, rende lo stesso sistema particolarmente vantaggioso per saggiare l'azione dello zinco, un metallo a collocazione vicina al rame (periodo 4) nel sistema periodico degli elementi.

In aggiunta e per controllo abbiamo voluto saggiare l'azione dell'argento e dell'oro, appartenenti allo stesso sottogruppo del rame, e del piombo, un metallo pesante appartenente ad altro gruppo (IV), la cui tossicità per il sistema nervoso è ben nota.

MATERIALI E METODI

Sono state impiegate planarie della specie *Dugesia gonocephala s.l.* (Platyhelminthes, Turbellaria, Tricladida), forma agama scissipara, provenienti dai nostri allevamenti di esemplari in principio prelevati in località Rovine Canale Monterano (Roma) lungo il corso del fiume Mignone.

Per tutta la durata della sperimentazione, le planarie sono state tenute in appositi contenitori di vetro, in camera termostatica a 18 °C ed a luce attenuata.

Gli esemplari sono stati trattati con soluzioni di $ZnCl_2$, $Pb(CH_3COO)_2$, $HCl(AuCl_3)$ e $AgNO_3$ sciolti in acqua distillata alle concentrazioni indicate nella Tabella I.

Esemplari di controllo sono stati trattati con soluzioni di sali di sodio ($NaCl$, $5.1 \cdot 10^{-5} M$, pari a 3 mg/l di sale, cioè 1.8 mg/l dell'anione Cl^- ; $NaCH_3COO$ $1.73 \cdot 10^{-3} M$, 236 mg/l di sale, cioè 118.0 mg/l dell'anione acetato; $NaNO_3$ $2.10 \cdot 10^{-5} M$, 1.1 mg/l di sale, cioè 0.8 mg/l dell'anione nitrate) concentrazioni anioniche quindi uguali o superiori alle concentrazioni anioniche delle soluzioni saline impiegate nell'esperimento. Altre planarie di controllo sono state trattate con tampone acetato a pH 4.3 (tampone acetato $4 \cdot 10^{-5} M$).

È stata data la preferenza alle concentrazioni di sali che permettevano una sopravvivenza di almeno 18 ore.

Le osservazioni comportamentali degli esemplari di controllo e trattati sono state effettuate, per l'intera durata della sperimentazione, al microscopio binoculare Wild, da un medesimo osservatore che non era a conoscenza del trattamento effettuato.

Planarie trattate con le diverse soluzioni sono state fissate, viventi ed integre, parte in Bouin per la colorazione secondo Nissl (Windle *et al.*, 1943), parte in alcool 70° saturo di H_2S per la rivelazione dei metalli pesanti secondo Timm (Ganther e Jolles, 1969).

Tutti gli esemplari così trattati, 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 istologici seriat.

TABELLA I.

	Molarità	mg/l	mg/l Catione	mg/l Anione	pH	Sopravvivenza max.
$Pb(CH_3COO)_2$	$4.86 \cdot 10^{-4}$	184.40	Pb^{2+}	$57.38 \text{ } CH_3COO^-$		7 ore
	$2.43 \cdot 10^{-4}$	92.20		28.69		7 ore
	$1.23 \cdot 10^{-4}$	46.10		14.35	5.40	fissate dopo 18 ore
$ZnCl_2$	$1.54 \cdot 10^{-4}$	21.00	Zn^{2+}	$10.92 \text{ } Cl^-$		7 ore
	$7.70 \cdot 10^{-5}$	10.50		5.46		17 ore
	$7.70 \cdot 10^{-6}$	1.05		0.55		13 ore
	$3.80 \cdot 10^{-6}$	0.53		0.27	5.64	fissate dopo 24 ore
$HCl \cdot AuCl_3$	$5.07 \cdot 10^{-5}$	20.91	Au^{3+}	$7.20 \text{ } Cl^-$		5 ore
	$2.54 \cdot 10^{-5}$	10.45		3.60		23 ore
	$1.27 \cdot 10^{-5}$	5.23		1.80	4.30	fissate dopo 48 ore
	$6.35 \cdot 10^{-6}$	2.61		0.90	4.40	fissate dopo 48 ore
$AgNO_3$	$9.26 \cdot 10^{-5}$	15.74	Ag^+	$5.75 \text{ } NO_3^-$		1 ora
	$4.63 \cdot 10^{-5}$	7.87		2.87		12 ore
	$2.32 \cdot 10^{-5}$	3.94		1.44		72 ore
	$1.16 \cdot 10^{-5}$	1.96		0.72	5.30	fissate dopo 120 ore

DESCRIZIONE DEI RISULTATI

Osservazioni comportamentali ed osservazioni istologiche.

Planarie trattate con $ZnCl_2$.

Gli esemplari posti in soluzioni a concentrazione decrescente di $ZnCl_2$ divengono rapidamente immobili, mostrando un certo grado di attività motoria solo se stimolati.

In nessun caso sono stati osservati movimenti spiraliformi.

La colorazione di Nissl ha permesso di evidenziare alterazioni a livello delle strutture nervose del « cervello », le cui cellule appaiono in parte ipercromatiche ed in parte rigonfie e vacuolizzate.

Istochimicamente il metallo impregna le cellule nervose sia a livello del corpo cellulare che dei prolungamenti (Tav. I, fig. 1).

L'aspetto istologico è paragonabile al quadro evidenziato in esemplari trattati con rame e fissati nelle identiche condizioni (Palladini *et al.*, 1976).

Planarie trattate con $Pb(CH_3COO)_2$.

Gli esemplari trattati con concentrazioni decrescenti di $Pb(CH_3COO)_2$ non hanno mostrato alcuna variazione della normale attività motoria.

Alla colorazione di Nissl le cellule nervose non appaiono alterate (Tav. I, fig. 2).

Numerose sottili fibre nervose mostrano una intensa basofilia non osservabile in nessuno degli esemplari di controllo.

Anche istochimicamente il metallo impregna soprattutto le fibre nervose, mentre sono scarsi i corpi cellulari che hanno fissato il metallo (Tav. I, fig. 3).

Planarie trattate con $HCl(AuCl_3)$.

Alle concentrazioni di 10 e 5 mg/l di Au^{3+} si osservano movimenti spasmodici di estensione e contrazione degli esemplari, accompagnati da violente contrazioni che rapidamente si attenuano fino a scomparire. Residua una condizione di paralisi con contrazione degli esemplari in senso latero-mediato (*a barilotto*) (fig. 1).

Alle concentrazioni inferiori, la fase di violente contrazioni non si verifica, mentre si osserva costantemente uno stato di immobilità cui fa seguito, dopo 5 ore, degenerazione per diffluenza dell'estremità cefalica in circa la metà degli esemplari.

Negli esemplari mantenuti alla concentrazione di 2.5 mg/l di Au^{3+} si osserva iperbasofilia delle cellule nervose e delle fibre.

Con la concentrazione più bassa (1.25 mg/l di Au^{3+}) la basofilia è esclusivamente a carico delle fibre ed i corpi cellulari non mostrano alterazioni evidenti.

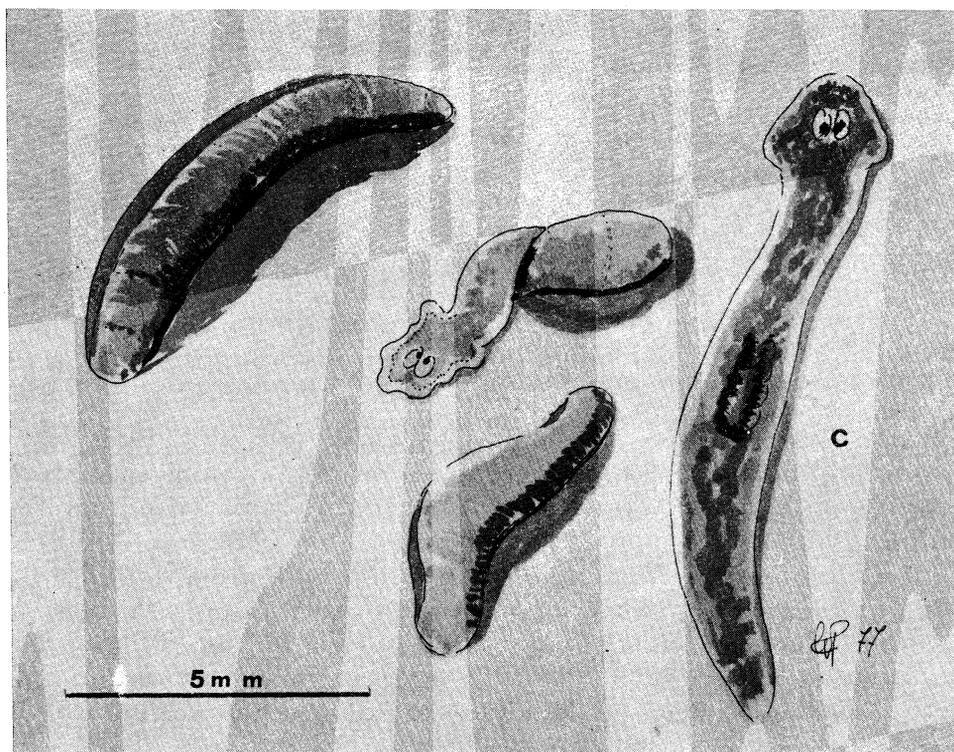


Fig. 1. - Disegno al microscopio binoculare di planarie della specie *Dugesia gonocephala* s.l. trattate con sali d'oro (2.5 mg/l Au^{3+}); atteggiamento « a barilotto»; C: planaria normale.

Planarie trattate con AgNO_3 .

Con nessuna concentrazione di AgNO_3 si sono presentate ipercinesie con spiralizzazione. Tutti gli esemplari hanno mostrato una situazione di immobilità con contrazione « a barilotto » simile a quella osservata nella fase terminale del trattamento con sali d'oro.

Entro 24 ore le estremità cefaliche degli esemplari sono andate incontro a degenerazione con diffidenza del parenchima.

Taluni esemplari sono sopravvissuti anche diverse ore, dopo l'inizio di questo fenomeno.

Le cellule nervose hanno mostrato iperbasofilia e figure picnotiche con basofilia dei prolungamenti (Tav. I, fig. 4).

Istochimicamente è rilevabile una selettiva impregnazione delle cellule e delle fibre nervose (Tav. I, fig. 5).

Planarie trattate con NaCl , NaCH_3COO , NaNO_3 .

Al fine di escludere l'eventuale azione degli anioni dei sali impiegati (Jones, 1941), le planarie sono state trattate con soluzioni di cloruro, nitrato ed acetato di sodio a concentrazioni tali da avere molarità anionica eguale o superiore a quella delle soluzioni dei sali impiegati nell'esperimento.

Nessuno degli esemplari trattati ha mostrato alterazioni comportamentali o istologiche.

Planarie trattate in tampone acetato $4 \cdot 10^{-5} M$.

L'esposizione delle planarie a tampone acetato ($4 \cdot 10^{-5} M$) a vario pH fino al più basso impiegato nell'esperienza (4.30), non ha provocato alcuna alterazione né comportamentale né istologica.

DISCUSSIONE

In analogia a quanto ottenuto da Jones (1937, 1940, 1941) (vedi anche Kenk, 1974) in altri Tricladi, gli ioni zinco, piombo, oro ed argento hanno mostrato una tossicità rilevante verso la *Dugesia gonocephala s.l.* (cfr. Tabella I).

I controlli eseguiti sia con soluzioni di cloruro, nitrato ed acetato di sodio aventi concentrazioni di anioni pari o superiori a quelle presenti nelle soluzioni dei metalli impiegate, sia mediante tamponi a vario pH, hanno dimostrato che le alterazioni comportamentali ed istologiche osservate nel nostro materiale devono essere riportate esclusivamente all'azione specifica dei cationi sperimentati.

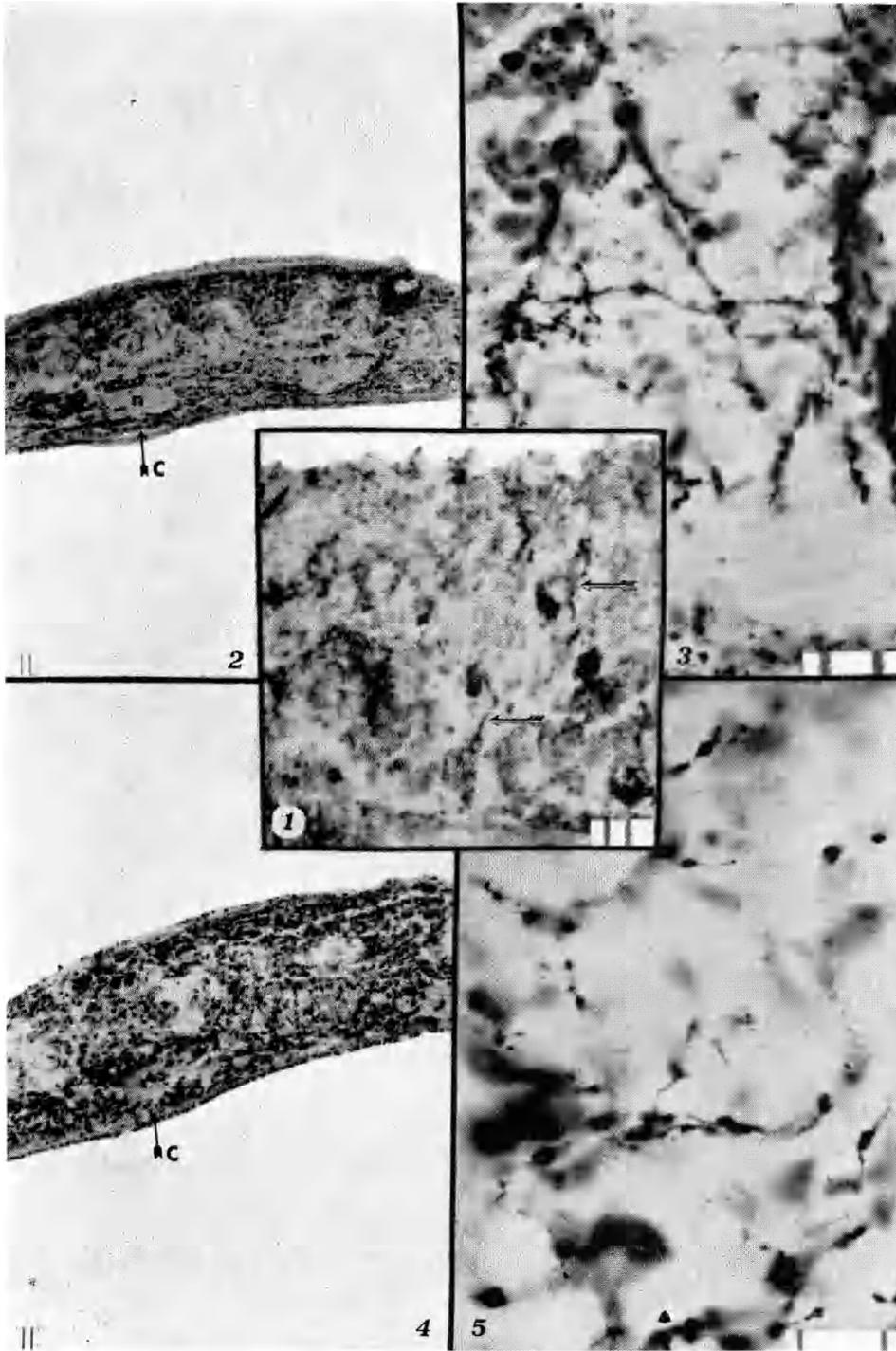
È da notare che le alterazioni istologiche osservate nelle planarie (iperbasofilia dei corpi cellulari e dei prolungamenti, picnosi, etc.) in evidente rapporto topografico con la localizzazione istochimica del metallo, sono riconducibili, pur nella loro aspecificità, a quanto si osserva nei Vertebrati superiori, uomo compreso (Smith, 1976).

A differenza di quanto osservato con il Cu^{2+} (Palladini *et al.*, 1976) sullo stesso materiale, né l' Au^{3+} , né l' Ag^{+} o il Pb^{2+} hanno mostrato alcun effetto comportamentale riconducibile ad una azione dopamino-mimetica; tale dato si sovrappone, avvalorandole, ad osservazioni analoghe eseguite da uno di noi (Palladini *et al.*, 1975) sullo striato di ratto per inoculazione intracranica di soluzioni di questi metalli.

Sul piano comportamentale, lo Zn^{2+} ha determinato una immobilizzazione delle planarie, paragonabile a quella che si osserva nella fase terminale, *acinetica*, dell'esposizione al Cu^{2+} (Palladini *et al.*, 1976).

L'osservazione istologica di questi esemplari ha mostrato vacuolizzazione e « swelling » delle cellule nervose, lesioni sovrapponibili a quanto osservato sia nella planaria che nel ratto in corso di intossicazione del sistema nervoso da rame (Palladini *et al.*, 1975, 1976).

Entrambi gli ioni, Cu^{2+} e Zn^{2+} , hanno una forte azione inibitrice sulla ATPasi $Na^{+} - K^{+}$ dipendente (Peters, 1966; Donaldson *et al.*, 1971) ed hanno in comune sia il quadro istopatologico sia la fase acinetica terminale nel nostro materiale sperimentale. Le lesioni potrebbero, in analogia a quanto si osserva



nei Vertebrati (cfr. Palladini *et al.*, 1965), essere riportate a tale comune meccanismo patogenetico; lo Zn^{2+} è però incapace di produrre le caratteristiche ipercinesie iniziali da Cu^{2+} che pertanto dovrebbero avere una patogenesi diversa.

BIBLIOGRAFIA

- BARBEAU A. e DONALDSON J. (1974) - « Arch. Neurol. » (Chic.), 30, 52.
 BUTCHER L. L. e FOX S. S. (1968) - « Science », 160, 1237.
 CAROLEI A., MARGOTTA V. e PALLADINI G. (1975) - « Neuropsychobiology », 1, 355.
 DONALDSON J., ST. PIERRE T., MINNICH J. e BARBEAU A. (1971) - « Canad. J. Biochem. », 49, 1217.
 GANTHER P. e JOLLES G. (1969) - *Histochemie normale et pathologique*, Gauthers-Villars, Paris.
 JONES J. R. E. (1937) - « J. Exp. Biol. », 14, 351.
 JONES J. R. E. (1940) - « J. Exp. Biol. », 17, 408.
 JONES J. R. E. (1941) - « J. Exp. Biol. », 18, 170.
 KENK M. (1974) - *Flatworms*. In: *Pollution ecology of fresh water invertebrates* (C. W. Hart and S. L. H. Fuller eds.), Academic Press, New York, p. 67.
 MARGOTTA V., PALLADINI G., CAROLEI A. e CONFORTI A. (1975) - « Rend. Acc. Naz. Lincei », ser. VIII, 59, 201.
 PALLADINI G., VENTURINI G. e BORCHI F. (1965) - « Boll. Zool. », 32, 311.
 PALLADINI G., PISTONE A. e ZELAZEK S. (1975) - « Rend. Acc. Naz. Lincei », ser. VIII, 58, 64.
 PALLADINI G., MARGOTTA V. e CAROLEI A. (1976) - « Rend. Acc. Naz. Lincei », ser. VIII, 60, 523.
 PETERS R. A. (1966) - *A study of the toxic action of copper on brain*. In: *The Biochemistry of copper* (J. Peisach *et al.* eds.), Academic Press, New York, p. 175.
 SMITH W. T. (1976) - *Intoxications, poisons and related metabolic disorders*. In: *Greenfield's Neuropathology* (W. Blackwood *et al.* eds.), E. Arnold, London, p. 148.
 WINDLE W. F., RHINES R. e RANKIN J. (1943) - « Stain Techn. », 18, 77.

SPIEGAZIONE DELLA TAVOLA I

- Fig. 1. - Planaria trattata con sali di zinco. Sezione trasversa del neuropilo: evidente impregnazione delle fibre nervose (freccette). Metodo di Timm.
 Fig. 2. - Planaria trattata con sali di piombo. Sezione trasversa a livello di un « occhio » (a destra in alto): ben evidente il « cervello anteriore » (C) ed il relativo neuropilo (n). Colorazione Nissl.
 Fig. 3. - Planaria trattata con sali di piombo. Sezione trasversa del neuropilo a forte ingrandimento: bene evidente la netta impregnazione dei prolungamenti nervosi da parte del metallo. Metodo di Timm.
 Fig. 4. - Planaria trattata con sali d'argento. Sezione trasversa: iperbasofilia e picnosi delle cellule nervose a livello del « cervello anteriore » (C). Colorazione Nissl.
 Fig. 5. - Planaria trattata con sali d'argento. Sezione trasversa del neuropilo a forte ingrandimento: evidente l'impregnazione selettiva di fibre e cellule. Metodo di Timm.

Il tratto in calce alle fotografie vale 10 μ .