
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

SERGIO FILONI, MARIA GIUSEPPINA CAMPANINI, VITO MARGOTTA

Rigenerazione del tetto ottico in larve di *Xenopus laevis* trattate con 4(6)—Propil—2—tiouracile

Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 64 (1978), n.4, p. 397–403.
Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1978_8_64_4_397_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. — *Rigenerazione del tetto ottico in larve di Xenopus laevis trattate con 4(6)-Propil-2-tiouracile* (*). Nota di SERGIO FILONI, MARIA GIUSEPPINA CAMPANINI e VITO MARGOTTA, presentata (**) dal Socio A. STEFANELLI.

SUMMARY. — In order to establish if the antithyroid substance 4(6)-propyl-2-thiouracil (PTU) directly affects the regenerative process of the optic tectum, larval *Xenopus laevis* at stage 48 (according to Nieuwkoop and Faber, 1956) were submitted to ablation of the right optic lobe and reared in 0.01% PTU solution.

The regenerative process of the optic tectum were compared with controls reared in water.

The results obtained demonstrated that the PTU has no direct effect either on the proliferative phase or on the differentiative phase of the regenerative process.

INTRODUZIONE

Dai numerosi studi, effettuati nel nostro Istituto, sulla capacità rigenerativa del sistema nervoso centrale degli Anfibi anuri, è emerso che, contrariamente a quanto si riteneva fino a qualche tempo fa, questo ordine degli Anfibi manifesta, durante il periodo larvale, notevoli potenzialità rigenerative a livello di varie regioni encefaliche.

In particolare, lo *Xenopus laevis*, specie sulla quale si è accentrata la maggior parte delle ricerche, presenta un elevato potere rigenerativo del telencefalo, del mesencefalo e del cervelletto.

L'analisi del processo rigenerativo del mesencefalo e soprattutto del tetto ottico dello *Xenopus*, regione encefalica che per la sua complessa organizzazione del tipo corticale si presta particolarmente bene per uno studio approfondito della citoarchitettura del rigenerato, ha rivelato che negli stadi larvali precoci (stadi 48-50, sec. Nieuwkoop e Faber, 1956) la restituzione morfologica ed istologica delle parti asportate è completa (Filoni, 1969; Filoni Margotta e Gibertini, 1971).

Tuttavia, man mano che procede lo sviluppo larvale, tale potere rigenerativo diminuisce gradualmente fino allo stadio 55 per poi subire un netto decremento e, a partire dallo stadio 56, divenire estremamente ridotto. Tale decremento non solo determina una riduzione volumetrica del rigenerato, ma altresì provoca anomalie strutturali a carico del tetto ottico neoformato via via più cospicue fino alla completa scomparsa di ogni stratificazione (Filoni e Gibertini, 1969).

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

(**) Nella seduta dell'8 aprile 1978.

Poiché la netta flessione del potere rigenerativo è riscontrabile proprio nel periodo larvale immediatamente prossimo a quello in cui la larva subisce le più profonde trasformazioni metamorfiche (allo stadio 55 il periodo prometamorfico sta per terminare e dopo alcuni giorni inizia il *climax* metamorfico), abbiamo ritenuto interessante studiare quale relazione intercorresse fra decremento del potere rigenerativo e metamorfosi. In particolare, poiché le trasformazioni metamorfiche sono il risultato dell'azione dell'ormone tiroideo, abbiamo analizzato l'influenza di tale ormone sul processo rigenerativo del mesencefalo.

Pertanto il nostro lavoro si è indirizzato verso due linee di ricerca: da un lato abbiamo studiato l'effetto di dosi di tiroxina tali da provocare profonde trasformazioni metamorfiche in larve precoci di *Xenopus* sottoposte all'asportazione unilaterale del tetto ottico e dall'altro abbiamo analizzato la potenzialità rigenerativa di larve tardive che avevano anch'esse subito l'asportazione unilaterale del tetto ottico ed inibite nella metamorfosi in seguito a tiroidectomia chimica.

I risultati del primo tipo di ricerche hanno dimostrato che il netto decremento del potere rigenerativo, riscontrabile alla fine del periodo larvale, non è attribuibile al particolare stato critico che l'individuo attraversa durante la metamorfosi, poiché larve operate a stadi precoci ed indotte a metamorfosare manifestano un'elevata capacità rigenerativa, addirittura superiore ai controlli (Filoni, Margotta e Gibertini, 1974). Tali risultati sono stati interpretati come la conseguenza dell'effetto della tiroxina sugli elementi responsabili del processo rigenerativo i quali, dopo essersi attivamente moltiplicati, subiscono un precoce differenziamento.

Gli esperimenti riguardanti la seconda linea di ricerca sono stati effettuati utilizzando il propil-tiouracile (PTU), potente farmaco antitiroideo gozzigeno.

Affinché questo ultimo gruppo di esperimenti fosse valido, era necessario accertare preliminarmente che il PTU, oltre ad inibire la metamorfosi, non esercitasse alcun effetto diretto sul processo rigenerativo.

Tale controllo, essenziale per la validità di tutto l'esperimento, è stato eseguito su larve operate nei primi stadi della premetamorfosi (stadio 48), periodo in cui il livello di tiroxina è molto basso e, come si è detto, si manifestano le più elevate capacità rigenerative.

I risultati riguardanti l'azione del PTU sulla rigenerazione del lobo ottico di larve operate a stadi tardivi sono in via di elaborazione.

In questa Nota esponiamo i risultati concernenti l'effetto del PTU sulla rigenerazione del lobo ottico di larve operate negli stadi precoci (stadio 48).

MATERIALE E METODO

Sono state utilizzate larve di *Xenopus laevis* allo stadio 48 (sec. Nieuwkoop e Faber, 1956), ottenute da una sola coppia inoculata con ormoni gonadotropi ("Pregnyl" della Organon).

Tali larve sono state operate di asportazione del lobo ottico destro, secondo la stessa tecnica da noi usata in precedenti ricerche, quindi suddivise in due Lotti sperimentali:

Lotto I: costituito da 30 larve allevate in acqua.

Lotto II: costituito da 30 larve allevate in una soluzione di 4 (6)-Propil-2-tiouracile (PTU) allo 0,01 %.

La soluzione di PTU è stata rinnovata ogni 3 giorni.

Le larve dei due Lotti sono state tenute alla temperatura di 23-24 °C, nutrite (a partire dal secondo giorno post-operatorio) con polvere di ortica bollita e sacrificate, mediante fissazione in liquido di Bouin, dopo 5, 10, 15, 30 gg dall'intervento (vedi Tabella I).

TABELLA I

LOTTO	STADIO	N. totale operati	N. fissati dopo gg.			
			5	10	15	30
I	48	30	5	5	5	10
II	48	30	5	5	5	10

Le sezioni istologiche seriate e trasversali di 10 μ di spessore sono state colorate con emallume-eosina.

In entrambi i Lotti è stata calcolata l'attività mitotica presente sia nel lobo ottico intatto (sinistro) che in quello rigenerante (destro) dopo 5, 10, 15 gg. dall'intervento.

I computi mitotici, eseguiti su tre individui per ogni stadio di fissazione, sono stati effettuati su sezioni alterne, per eliminare un eventuale doppio conteggio. L'attività mitotica, presente in ciascun lobo ottico, è stata espressa come numero di mitosi ependimali per ogni 10.000 μ^2 di superficie ventricolare del corrispondente lobo ottico:

$$\frac{\text{numero mitosi}}{10.000 \mu^2}$$

Tale superficie è stata calcolata moltiplicando il valore medio di quella porzione del perimetro ventricolare, sottostante a ciascun lobo ottico, per lo spessore ed il numero delle sezioni. Il perimetro ventricolare medio è stato determinato con un curvimetro, su disegni, eseguiti alla camera lucida, di sezioni alterne.

DESCRIZIONE DEI RISULTATI

LOTTO I: *larve operate di asportazione del lobo ottico destro ed allevate in acqua.*

Dopo 5 gg. dall'operazione: in tutti i casi esaminati il tetto ottico in rigenerazione è già notevolmente ispessito ed è costituito da numerosi elementi neurali indifferenziati, strettamente addossati gli uni agli altri, e da un esile strato di fibre neoformate disposte alla periferia (Tav. I, fig. 1).

Dopo 10 gg. dall'operazione: a questo stadio del processo rigenerativo, il tetto ottico destro oltre ad avere raggiunto un volume considerevolmente più elevato rispetto al quinto giorno post-operatorio, in seguito alla notevole attività mitotica e all'aumentato apporto di fibre neoformate, presenta una struttura più complessa (Tav. I, fig. 3).

Infatti, in tutti i 5 casi esaminati, è iniziata la formazione degli strati 9-8-7 (rispettivamente: *stratum opticum*, *stratum fibrosum et griseum superficiale*, *stratum album centrale*, Capanna, 1961).

Dopo 15 gg. dall'operazione: in tutti i casi esaminati, in corrispondenza della regione cefalica del tetto ottico in rigenerazione, il processo di stratificazione è in una fase avanzata. Infatti, in tale regione, oltre agli strati 9-8-7, si è costituito lo strato 6 (*stratum griseum centrale*), separato dalla restante sostanza grigia, ancora non organizzata in strati, dalle fibre del 5° strato (*stratum medullare profundum*) (Tav. II, fig. 5).

Nella parte medio-posteriore del tetto ottico rigenerante, la struttura non differisce sostanzialmente da quella osservata al decimo giorno post-operatorio.

Dopo 30 gg. dall'operazione: al trentesimo giorno post-operatorio, il processo di stratificazione del tetto ottico neoformato si è completato ed il lobo ottico rigenerato è sovrapponibile a quello contralaterale sia per volume che per complessità strutturale (Tav. II, fig. 7).

LOTTO II: *larve operate di asportazione del lobo ottico destro ed allevate in una soluzione di PTU.*

In tutti i casi esaminati e per ogni stadio di fissazione, il tetto ottico rigenerante degli individui di questo Lotto risulta, sia dal punto di vista volumetrico che strutturale, sovrapponibile a quello dei rispettivi controlli allevati in acqua (Lotto I) (Tav. I, figg. 2, 4; Tav. II, figg. 6, 8).

Anche l'analisi dell'attività mitotica presente a livello dello strato ependimale, sia del lobo ottico intatto che di quello rigenerante, non ha rivelato - nell'intervallo compreso fra il quinto ed il quindicesimo giorno post-operatorio (periodo caratterizzato da un'intensa proliferazione cellulare) - differenze significative fra i due Lotti (Tabella II).

TABELLA II

Densità mitotica (n. mitosi ependimali per ogni 10.000 μ^2 di superficie ventricolare nel lobo ottico sinistro (intatto) e nel lobo ottico destro (rigenerante) di larve di Xenopus laevis allevate in acqua (Lotto I) ed in PTU (Lotto II).

gg. operazione ⁽¹⁾	5		10		15	
	I	II	I	II	I	II
	⁽²⁾					
Lobo ottico sinistro	19,0 \pm 2,7	18,3 \pm 2,7	10,3 \pm 0,7	12,7 \pm 2,6	15,0 \pm 1,0	17,0 \pm 1,5
Lobo ottico destro	21,0 \pm 3,2	22,7 \pm 1,5	13,0 \pm 1,2	15,0 \pm 2,1	15,0 \pm 0,6	16,7 \pm 0,3

(1) Per ogni stadio di fissazione ed in entrambi i Lotti, il conteggio delle mitosi è stato eseguito su tre individui.

(2) $S\bar{x}$ = errore standard.

DISCUSSIONE

La maggior parte degli studi sull'influenza degli antitiroidei sull'attività proliferativa e sulla capacità rigenerativa nelle larve degli Anuri sono state soprattutto compiute utilizzando la tiourea.

Ghidoni (1948) in larve di *Rana catesbeiana* e *Rana pipiens*, sottoposte all'amputazione della coda, osservò che il trattamento con tiourea provocava un ritardo della rigenerazione a partire dal sesto giorno post-operatorio, mentre non influenzava le prime fasi del processo rigenerativo.

In larve di *Rana pipiens*, Peadon (1953) studiò la rigenerazione dell'arto dopo trattamento con tiourea. L'Autore osservò che l'effetto dell'antitiroideo sul processo rigenerativo dipendeva dal momento in cui era iniziato il trattamento. Infatti, se la tiourea era somministrata quando l'arto veniva amputato si aveva un leggero ritardo del processo rigenerativo, ritardo che si manifestava sulla fase di differenziamento. Se, invece, il trattamento con tiourea iniziava dieci giorni prima dell'amputazione e poi era sospeso, si notava una più precoce formazione del blastema rigenerativo.

Kielbówna (1964), studiando la rigenerazione della coda di larve di *Bufo bufo* trattate con metiltiouracile, ha rilevato che l'influenza dell'antitiroideo sull'inibizione della secrezione tiroidea e sul processo rigenerativo dipendeva dalle concentrazioni usate.

Reynolds (1966) constatò un'inibizione dell'attività mitotica nella regione lombosacrale del midollo spinale di larve di *Rana pipiens*, trattate con tiourea, specie a livello della porzione ventrale extraependimale.

El-Halim Kamel e Nabih Walash (1970), studiando l'influenza di vari antitiroidei (tiourea, tiouracile, propiltiouracile) sulla rigenerazione

della coda e degli arti di larve di *Bufo regularis*, hanno osservato che l'effetto di questi composti sulla rigenerazione dipendeva, oltre che dalla concentrazione dell'antitiroideo usato, anche dal periodo di somministrazione.

Nel confrontare e nell'interpretare i risultati ottenuti con gli antitiroidei sulle capacità rigenerative delle larve degli Anuri, oltre a considerare il momento di inizio del trattamento con l'antitiroideo rispetto all'intervento, è di fondamentale importanza tenere conto dello stadio larvale, in cui l'intervento è stato eseguito e della velocità dello sviluppo larvale della specie studiata.

Poiché, come è noto, il livello dell'ormone tiroideo varia durante la vita larvale e la tiroide da una condizione di ipoattività, caratteristica del periodo premetamorfico, passa, attraverso il periodo prometamorfico, alla massima attività del *climax*, è evidente che l'effetto indiretto sul processo rigenerativo dell'antitiroideo, in quanto inibitore dell'ormone stesso, sarà tanto meglio valutabile quanto maggiore è l'attività della tiroide dei controlli pari stadio.

Inoltre, i vari antitiroidei, oltre ad esercitare un effetto indiretto, potrebbero avere un effetto diretto sul processo rigenerativo, non mediato dalla tiroide.

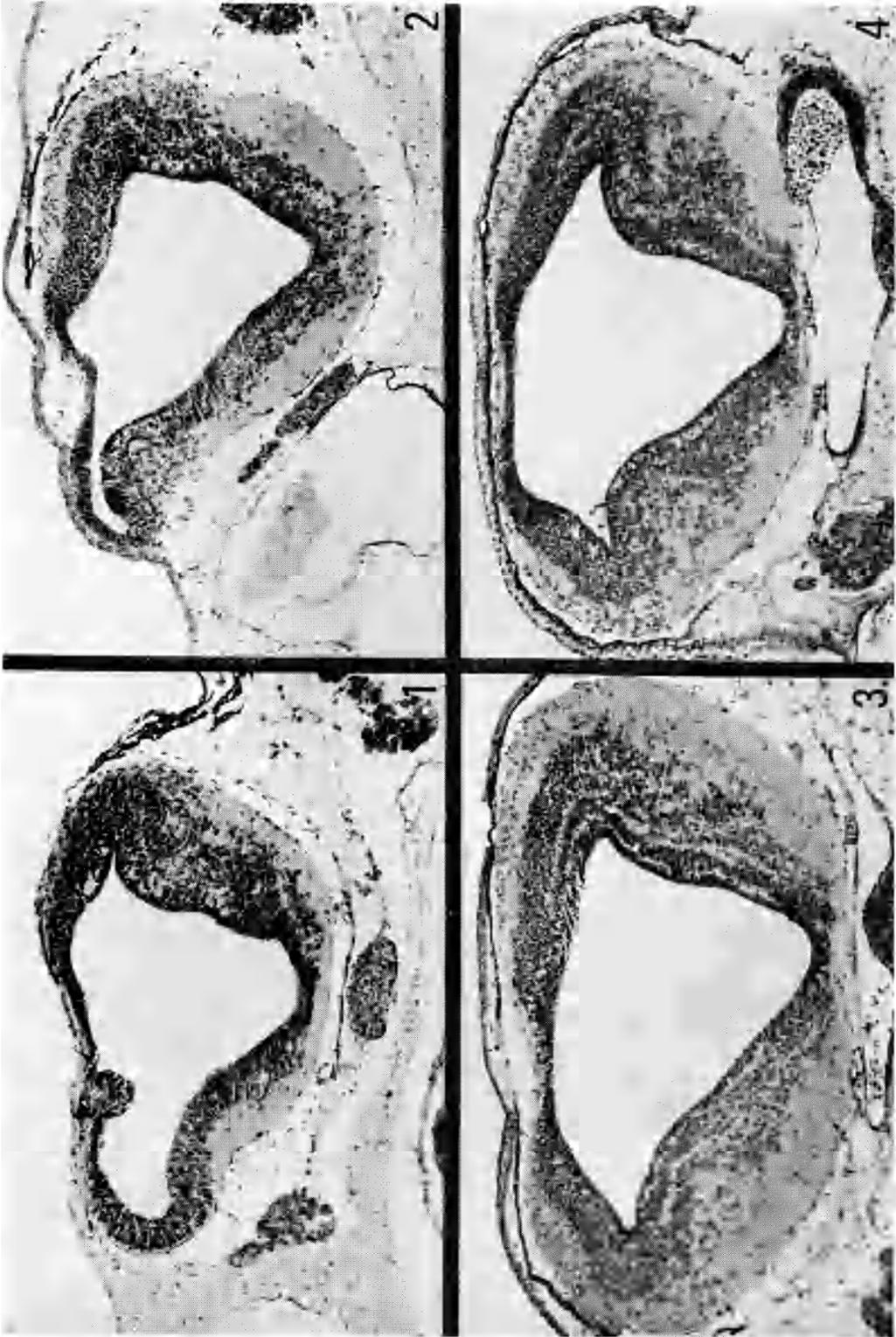
I dati ottenuti nella presente ricerca, desunti dal confronto dell'andamento del processo rigenerativo del tetto ottico dello *Xenopus laevis* fra larve operate allo stadio 48 ed allevate in acqua e larve operate allo stesso stadio, ma allevate in PTU, consentono di valutare soprattutto quale sia l'effetto diretto esercitato da questo antitiroideo. Infatti, nel presente esperimento, il processo rigenerativo del tetto ottico inizia e si completa durante il periodo premetamorfico, periodo caratterizzato da ipotiroidismo fisiologico (Steinmetz, 1954; Saxén, Saxén, Toivonen e Salimäki, 1957a, 1957b; Kaye, 1961).

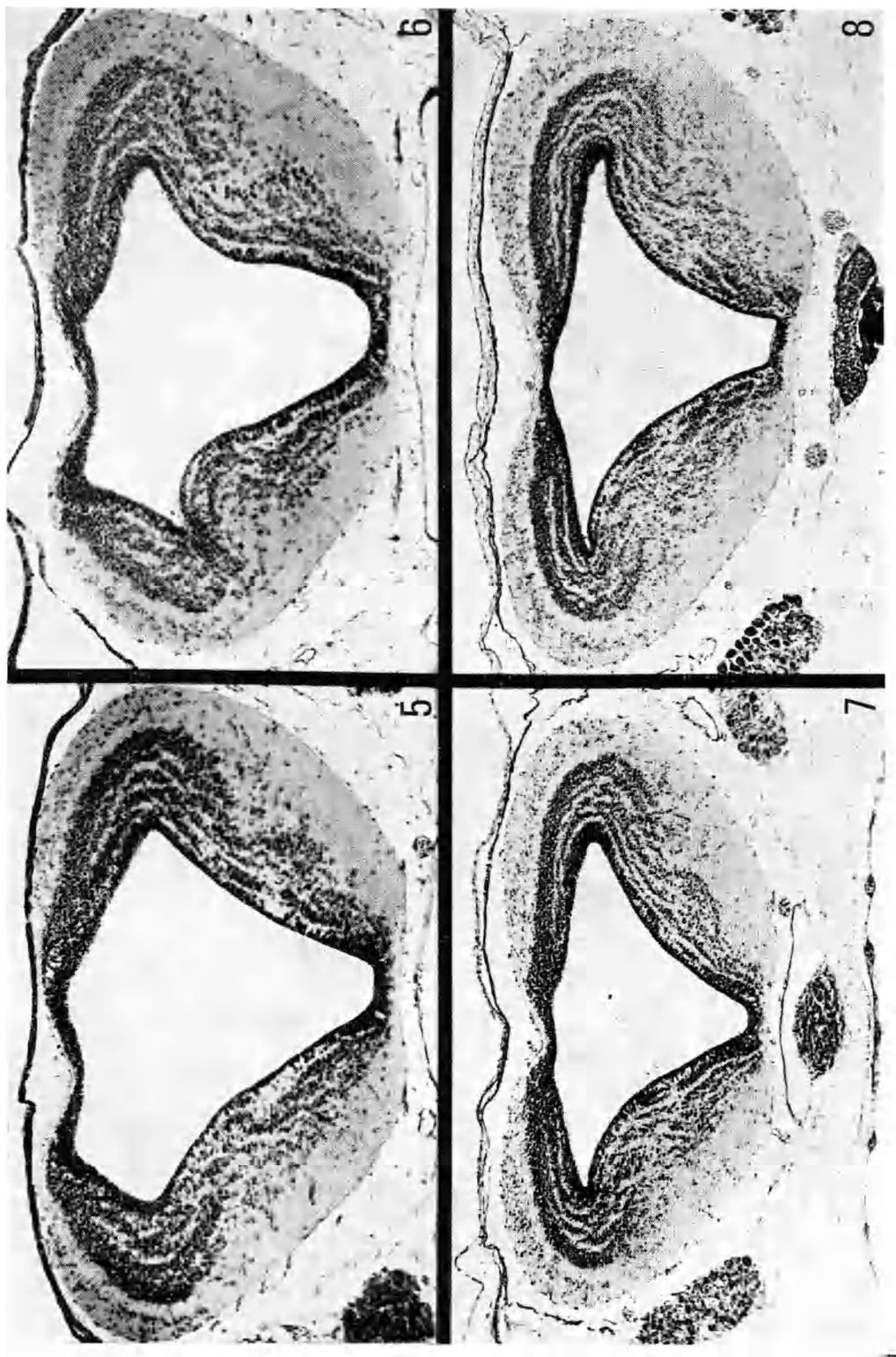
I risultati ottenuti dimostrano che nelle larve trattate con PTU l'evoluzione del processo rigenerativo è sovrapponibile ai controlli sia a livello della fase proliferativa che a quello della successiva fase di differenziamento dei vari strati tectali e consentono di concludere che, alla concentrazione usata, sufficiente per bloccare la metamorfosi (Goos, De Knecht e De Vries, 1968), il PTU non esercita un effetto diretto sulla rigenerazione del tetto ottico.

Tali risultati sono in accordo con quelli recentemente ottenuti sulla rigenerazione del midollo spinale caudale di larve di *Xenopus* trattate con PTU (Filoni, Bosco e Carlizzi, 1978) e pongono in luce la validità di questo antitiroideo per lo studio dell'influenza della metamorfosi sul potere rigenerativo del sistema nervoso centrale delle larve degli Anuri.

BIBLIOGRAFIA

- CAPANNA E. (1961) - « Rend. Acc. Naz. Lincei », ser. VIII, 30, 292.
EL-HALIM KAMEL A. e NABIH WALASH M. (1970-1971) - « Zool. Soc. Egypt. Bull. », 23, 102.
FILONI S. (1969) - « Arch. Ital. Anat. e Embriol. », 74, 89.
FILONI S., BOSCO L. e CARLIZZI C. (1978) - « Rend. Acc. Naz. Lincei », ser. VIII, in corso di stampa.





- FILONI S. e GIBERTINI G. (1969) - « Arch. Biol. », 80, 369.
FILONI S., MARGOTTA V. e GIBERTINI G. (1971) - « Rend. Acc. Naz. Lincei », ser. VIII, 50, 807.
FILONI S., MARGOTTA V. e GIBERTINI G. (1974) - « Acta Embryol. Experim. », 19.
GHIDONI M. (1948) - « Growth », 12, 181.
GOOS H. J. TH., DE KNECHT A.-M. e DE VRIES J. (1968) - « Z. Zellforsch. », 86, 384.
KAYE N. (1961) - « Gen. Comp. Endocrinol. », 1, 1.
KIELBÓWNA L. (1964) - « Zool. Pol. », 14, 19.
NIEUWKOOP P. D. e FABER J. (1956) - *Normal table of Xenopus laevis (Daudin)*. - Amsterdam, North Holland Publ. Co.
PEADON A. M. (1953) - « Growth », 17, 21.
REYNOLDS W. A. (1966) - « Gen. Comp. Endocrinol. », 6, 453.
SAXÉN L., SAXÉN E., TOIVONEN S. e SALIMÄKI K. (1976 a) « Endocrinology », 61, 35.
SAXÉN L., SAXÉN E., TOIVONEN S. e SALIMÄKI K. (1976 b) « Ann. Zool. Soc. Zool. Botan. Fennicae Vanamo », 18, 1.
STEINMETZ C. H. (1954) - « Physiol. Zool. », 27, 28.

SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE I-II

TAVOLA I

- Fig. 1. - Larva operata di asportazione del lobo ottico destro allo stadio 48, allevata in acqua e fissata dopo 5 gg. dall'intervento ($\times 100$).
Fig. 2. - Larva operata di asportazione del lobo ottico destro allo stadio 48, allevata in PTU e fissata dopo 5 gg. dall'intervento ($\times 100$).
Fig. 3. - Larva operata di asportazione del lobo ottico destro allo stadio 48, allevata in acqua e fissata dopo 10 gg. dall'intervento ($\times 100$).
Fig. 4. - Larva operata di asportazione del lobo ottico destro allo stadio 48, allevata in PTU e fissata dopo 10 gg. dall'intervento ($\times 100$).

TAVOLA II

- Fig. 5. - Larva operata di asportazione del lobo ottico destro allo stadio 48, allevata in acqua e fissata dopo 15 gg. dall'intervento ($\times 100$).
Fig. 6. - Larva operata di asportazione del lobo ottico destro allo stadio 48, allevata in PTU e fissata dopo 15 gg. dall'intervento ($\times 100$).
Fig. 7. - Larva operata di asportazione del lobo ottico destro allo stadio 48, allevata in acqua e fissata dopo 30 gg. dall'intervento ($\times 70$).
Fig. 8. - Larva operata di asportazione del lobo ottico destro allo stadio 48, allevata in PTU e fissata dopo 30 gg. dall'intervento ($\times 70$).