
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

CRISTINA SOTGIA GROSSI, UMBERTO FASCIO

**Induzione di organo adesivo in espianti ectodermici
di *Xenopus laevis* ad opera di NaSCN ed urea**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 66 (1979), n.5, p. 435–440.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1979_8_66_5_435_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/>

SEZIONE III

(Botanica, zoologia, fisiologia e patologia)

Zoologia. — *Induzione di organo adesivo in espianti ectodermici di Xenopus laevis ad opera di NaSCN ed urea* (*). Nota di CRISTINA SOTGIA GROSSI e UMBERTO FASCIO, presentata (**) dal Socio S. RANZI.

SUMMARY. — *Sucker induction in Xenopus: Xenopus laevis* embryos, at late blastula stage, were cut in order to separate the blastocelic roof from the other parts of the embryo (Fig. 1). Ectoderm cell explants obtained in this way were cultured in Holtfreter's solution for 100 hours at 18 °C; we called these explants controls. Treated explants were cultured for 18 hours at 18 °C in Holtfreter's solution containing 25 mM NaSCN or 50 mM urea, and then they were transferred and left for 82 hours more in Holtfreter's solution. After 100 hours of culture, control explants developed atypical epidermis and only 11.6 % of them showed very small suckers (Table I, Figs 4, 5); on the contrary 48 % of treated explants, at the end of the culture period, formed large suckers (Table I, Figs 6, 8), even bigger than those of the embryos of the same age (Table I, Fig. 2). The bigger volume of treated explant suckers was due to an increase in cell number. The suckers formed in treated explants are well developed, even if their cells are not so elongated as the control ones, and not so well differentiated (Table I, Figs 3, 7, 9). We conclude that it is possible to obtain sucker induction using NaSCN or urea which are both well-known neural inducers. Similar results were obtained (Picard, 1975) in ectodermic cell explants from *Xenopus* gastrula by treatment with 10^{-4} M NH_4Cl .

L'azione del NaSCN e dell'urea sui primi stadi dello sviluppo embrionale di vari animali è stato oggetto di numerose ricerche. È stata messa in evidenza l'azione animalizzante delle due sostanze e in particolare, in ricerche effettuate su Anfibi, è stata dimostrata la capacità del NaSCN e dell'urea di indurre la formazione di masse, anche ben organizzate, di tessuto nervoso in espianti ventrali di gastrule iniziali di axolotl (Ranzi e Tamini, 1940) e di *Rana esculenta* (Leone, 1952).

Nelle presenti ricerche abbiamo voluto saggiare le azioni induttive di NaSCN e urea su espianti di embrioni di *Xenopus laevis*. Nell'ambito di questi studi abbiamo trattato espianti di volta del blastocele da embrioni allo stadio di blastula avanzata con NaSCN o urea a varie concentrazioni, per vari tempi a diverse temperature. In queste prove effettuate sullo *Xenopus* per azione delle due sostanze sugli stadi e alle concentrazioni usate non abbiamo

(*) Ricerche eseguite nell'Istituto di Zoologia dell'Università statale di Milano con un contributo del C.N.R. (CT 77.10463.04).

(**) Nella seduta del 12 maggio 1979.

osservato formazione di strutture nervose; gli espianti trattati e sopravvissuti non mostrano infatti in tal senso differenze notevoli rispetto ai controlli. L'effetto delle sostanze usate, tuttavia, è ben riscontrabile se si considera il differenziamento dell'organo adesivo.

Sono state utilizzate uova di *Xenopus laevis* Daudin ottenute mediante iniezione di gonadotropina corionica (Pregnyl Organon O.SS.). I maschi ricevevano una quantità totale di 300 U.I. in due somministrazioni, le femmine una quantità di 300 U.I. in un'unica somministrazione: con questo stimolo ormonale avveniva l'accoppiamento e la deposizione di uova fecondate. Le uova ottenute venivano liberate manualmente dagli involucri gelatinosi, lavate ripetutamente in soluzione di Holtfreter sterile contenente 100 mg/l di streptomicina e 200.000 U.I./l di penicillina, e lasciate a sviluppare fino allo stadio desiderato di tarda blastula, stadio 9 secondo le tavole di Nieuwkoop e Faber (1956).

Gli embrioni allo stadio 9 da tagliare per gli espianti, venivano posti in vaschetta Syracuse con fondo di paraffina annerita con nerofumo; con pinze da orologiaio a punte affilate venivano tolti i resti della capsula gelatinosa, la membrana vitellina e quindi l'embrione veniva tagliato con bisturi da oculistica con lama sottile; i frammenti così ottenuti venivano aspirati con sottili pipette sterili e trasferiti delicatamente in capsule di Petri sterilizzate contenenti soluzione di Holtfreter sterile per i controlli, oppure soluzione di Holtfreter sterile con NaSCN 25 mM oppure urea 50 mM per i trattati. Il taglio veniva eseguito in modo da separare la volta del blastocoele dalle restanti parti dell'embrione (fig. 1).

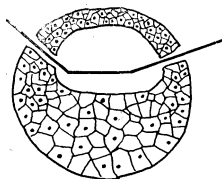


Fig. 1. - Schema di operazione: espianto della volta del blastocoele di embrione allo stadio 9.

Gli espianti ectodermici così ottenuti venivano lasciati sviluppare per 100 ore, calcolate partendo dal momento del taglio, in soluzione di Holtfreter sterile con penicillina 200.000 U.I./l e streptomicina 100 mg/l in camera a 18 °C, per i controlli; per i trattati, invece, gli espianti venivano posti in soluzione di Holtfreter con le stesse quantità di penicillina e streptomicina e NaSCN 25 mM a pH 8.5 o urea 50 mM a pH 8.5 per 18 ore a 18 °C quindi lavati e lasciati, fino a raggiungere le 100 ore totali, in soluzione di Holtfreter. Trascorso questo periodo, dopo l'osservazione «in vivo», gli espianti venivano fissati in liquido di Bouin, inclusi in paraffina, tagliati in sezioni seriate di 10 μ e colorati con ematossilina - eosina.

Controlli: Espianti ectodermici allevati in soluzione di Holtfreter si sviluppano in masserelle sferoidali che all'esame «in vivo» mostrano attivissimi movimenti ciliari e raramente una scarsa quantità di secrezione mucosa in rapporto a piccoli organi adesivi. All'esame istologico si osserva che le masserelle sono costituite prevalentemente da cellule ectodermiche di forma cubica, disposte senza ordine, o in cordoni raggomitolati; solo le cellule alla superficie degli espianti tendono ad avere una disposizione più regolare senza

essere però organizzate in epidermide tipica. Spesse volte nella zona interna dell'espianto le cellule sono sofferenti, con nuclei picnotici e si trovano ammassi di granuli di vitello non digerito e cavità contenenti detriti cellulari. Per queste osservazioni sono stati utilizzati 120 espianti; solo nel 11,6 % di essi si è sviluppato un piccolo organo adesivo formato da poche cellule di forma cilindrica con nucleo alla base, con citoplasma vacuolizzato e granuli di pigmento; tali cellule, sebbene non perfettamente differenziate, hanno le caratteristiche e la disposizione tipica delle cellule dell'organo adesivo (Tav. I, figg. 2, 3, 4, 5) quale descritto da Camatini e Lanzavecchia (1965) e da Picard (1975).

L'aspetto degli espianti ectodermici di *Xenopus laevis* è cioè simile a quello degli espianti di altri Anfibi anuri, ma, come già ha evidenziato Picard (1975) e come risulta anche dai nostri dati, l'ectoderma isolato di *Xenopus* ha scarsa tendenza a formare organo adesivo, mentre in altri Anfibi anuri *Rana fusca* (Holtfreter, 1938), *Rana vulgaris* (Holtfreter, 1938), *Rana esculenta* e *Rana temporaria* (Gulinati, 1965), *Rana nigromaculata* (Yamada, 1933) l'ectoderma isolato forma organo adesivo con frequenza molto maggiore, cioè nel 50 % circa dei casi.

Trattati: Espianti ectodermici sono stati allevati per 18 ore a 18 °C in soluzione di Holtfreter sterile cui è stato aggiunto NaSCN 25 mM in modo che la forza ionica della soluzione restasse invariata oppure urea 50 mM; il pH delle due soluzioni era 8.5.

Si è preferito scegliere concentrazioni piuttosto basse per tempi lunghi perchè le uova di *Xenopus* tagliate risultano essere molto sensibili alle due sostanze che, usate a concentrazioni maggiori, anche per tempi molto più brevi, provocano un'altissima mortalità. Trascorse le 18 ore di trattamento la soluzione è sostituita con Holtfreter sterile.

«In vivo» gli espianti trattati hanno un aspetto simile a quello dei controlli, sono però un po' più turgidi e i movimenti ciliari meno attivi; in molti espianti si vede una abbondante secrezione mucosa in rapporto a ben evidenti organi adesivi.

Le cellule ectodermiche indifferenziate che formano questi espianti sono simili a quelle già descritte per i controlli: differenze notevoli si riscontrano però a livello dell'organo adesivo. La percentuale di formazione di organo adesivo negli espianti trattati con NaSCN è del 47,5 % calcolato su 62 espianti e nei trattati con urea è del 48,5 % calcolato su 63 espianti. L'organo adesivo, che si forma dopo trattamento con NaSCN o urea, è di maggiori dimensioni, perchè costituito da un numero maggiore di cellule, rispetto a quello dei controlli, e in molti casi raggiunge e supera le dimensioni dell'organo adesivo dell'embrione coetaneo. Ciò risulta da conteggi del numero dei nuclei degli organi adesivi dei trattati, dei controlli e dell'embrione coetaneo. Questi conteggi mostrano che il numero medio dei nuclei degli espianti trattati è molto superiore a quello degli espianti di controllo e significativamente superiore a quello degli embrioni di età corrispondente. È stato inoltre calcolato, per ognuno dei gruppi, l'errore standard e si è potuto constatare che

è minore nei piccoli organi degli espianti non trattati ed è invece maggiore quando la formazione di esso è provocata dal trattamento con le due sostanze (fig. 10).

Dall'osservazione istologica risulta evidente che le cellule degli organi adesivi indotti non riescono a raggiungere un completo differenziamento; infatti sono poco allungate, povere di pigmento e sono disposte poco ordinatamente; l'organo adesivo nell'insieme risulta però ben riconoscibile e funzionante (Tav. I, figg. 6, 7, 8, 9).

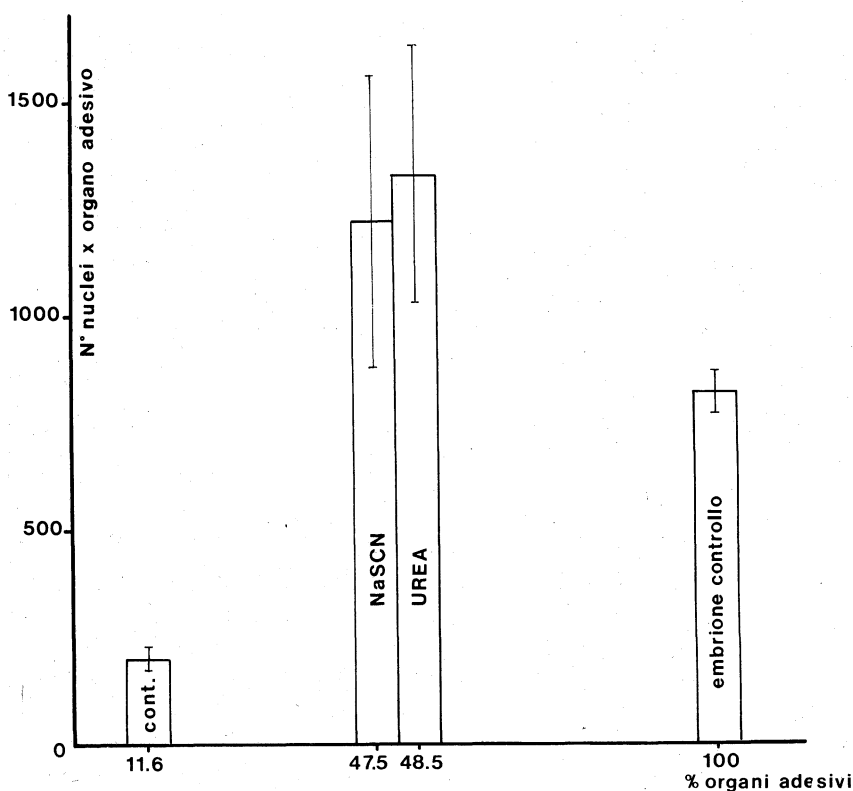


Fig. 10. - Grafico ottenuto riportando in ascisse le percentuali di formazione dell'organo adesivo negli espianti, e in ordinate il numero medio di nuclei per organo adesivo.

Negli espianti trattati con urea spesso volte l'organo adesivo, apparentemente unico, risulta formato da due o tre porzioni fuse e si vedono gruppi di cellule secernenti separate da piccole cellule tondeggianti (Tav. I, figg. 8, 9).

Senza influenza sono apparse variazioni di pH del liquido di coltura, portato a pH 5 con acido citrico o a pH 10 con KOH; privi di azione sono apparsi anche LiCl e benzilamina che, agendo sullo sviluppo, determinano processi di vegetalizzazione.

Discussione: Dai nostri esperimenti risulta che NaSCN e urea provocano la stessa modificazione delle cellule ectodermiche. Il differenziamento dell'ectoderma in organo adesivo era già stato ottenuto da Picard mediante trattamento con NH_4Cl 10^{-4}M . L'effetto del NH_4Cl è molto evidente; infatti l'autore citato ottiene organi adesivi in alta percentuale, circa 80 %, e gran parte del territorio espianato subisce tale trasformazione.

La formazione di organo adesivo in espianti e trapianti di ectoderma presuntivo di alcuni Anfibi è già stata oggetto di studi da parte di molti autori (Schotté, 1940; Raunich, 1941, 1942; Gulinati, 1964), i quali avevano concluso che la formazione di organo adesivo era imputabile a una azione induttrice piuttosto che alla capacità intrinseca organo-formativa di un territorio già labilmente determinato. I dati ottenuti sullo *Xenopus* sembrano confermare questa ipotesi; infatti, come abbiamo già detto, l'ectoderma isolato di *Xenopus*, forma spontaneamente organo adesivo solo in una minima percentuale di casi, tale struttura compare invece in una buona percentuale di espianti dopo stimolazione con sostanze con potere inducente.

Le nostre ricerche sembrano pertanto indicare che, come avviene per l'induzione del sistema nervoso, l'induzione dell'organo adesivo prodotta da NaSCN e urea sia in rapporto a una denaturazione di qualche molecola proteica che libera un principio in qualche maniera attivo.

LAVORI CITATI

- CAMATINI M. e LANZAVECCHIA G. (1965) - Osservazione sull'ultrastruttura dell'epidermide in embrioni e larve di *Rana esculenta* L., « Rend. Acc. Naz. XL », (4) 15, 1-18.
- GULINATI A.M. (1964) - Osservazioni sul differenziamento dell'organo adesivo negli Anfibi anuri, « Boll. Zool. », 31, 1157-1164.
- HOLTFRETER J. (1938) - *Differentierungspotenzen isolierter Teile der Anurengastrula*, « Wilhelm Roux Arch. EntwMech Org. », 138, 658-738.
- LEONE V. (1952) - Effetti di trattamento con urea su espianti ventrali di gastrule di *Rana esculenta* L., « Rend. Acc. Naz. Lincei, (Sc. fis.) » (8), 12, 195-199.
- NIEUWKOOP P.D. and FABER J. (1956) - Normal table of *Xenopus laevis* (Doudin), « North Holland Publ. Co. », Amsterdam.
- PICARD J. J. (1975) - *Xenopus laevis* cement gland as an experimental model for embryonic differentiation. I. « in vitro » stimulation of differentiation by ammonium chloride, « J. Embr. Exp. Morph. », 33, 957-966.
- PICARD J. J. (1975) - *Xenopus laevis* cement gland as an experimental model for embryonic differentiation. III. Histochemical and ultrastructural studies on cement glands differentiated « in vitro », « Arch. de Biol. », 86, 129-138.
- RANZI S. e TAMINI E. (1940) - Azione di NaSCN sullo sviluppo di embrioni di Anfibi. II. Azione su espianti ventrali di gastrule iniziali di Axolotl, « R. Ist. Lombardo Sc. Lett., Rend. Sc. », 75, 525-543.
- RAUNICH L. (1941) - Risultati sperimentali su espianti ectodermici di Anfibi anuri, « La Ricerca Scientifica », 12, 1284-1292.
- RAUNICH L. (1942) - Contributo alla conoscenza della determinazione dell'organo adesivo negli Anfibi anuri, « Monit. Zool. Ital. », 55, 17-26.
- SCHOTTÉ O. and MACEDDS (1940) - Xenoplastic induction of *Rana pipiens* adhesive discs on balancer site of *Amblystoma punctatum*, « J. Exp. Zool. », 84, 199-218.
- YAMADA T. (1933) - Ueber die Determination der Haftdrüsen bei *Rana nigromaculata*, « J. Fac. Sc. Tokyo Univ. Sect. IV, Zool. », 3, 239-254.

SPIEGAZIONE DELLA TAVOLA I

Fig. 2. - Sezione di organo adesivo di *Xenopus laevis* stadio 35 ($\times 125$).

Fig. 3. - Stesso organo adesivo della fig. 2 ($\times 325$).

Fig. 4. - Sezione di organo adesivo di espianto allevato per 100 ore in soluzione di Holtfreter ($\times 125$).

Fig. 5. - Stesso organo adesivo della fig. 4 ($\times 325$).

Fig. 6. - Sezione di organo adesivo indotto da NaSCN 25 mM in espianto allevato per 100 ore ($\times 125$).

Fig. 7. - Stesso organo adesivo della fig. 6 ($\times 325$).

Fig. 8. - Sezione di organo adesivo indotto da urea 50 mM e allevato per 100 ore ($\times 125$).

Fig. 9. - Stesso organo adesivo della fig. 8 ($\times 325$).

