

---

ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI  
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI  
**RENDICONTI**

---

ROSALBA MACI, VINCENZO G. LEONE

**Attività teratogena del glicerol-formale nell'embrione  
di pollo**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,  
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 67 (1979), n.5, p. 359–362.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<[http://www.bdim.eu/item?id=RLINA\\_1979\\_8\\_67\\_5\\_359\\_0](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1979_8_67_5_359_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.** — *Attività teratogena del glicerol-formale nell'embrione di pollo* (\*). Nota (\*\*) di ROSALBA MACI e VINCENZO G. LEONE, presentata dal Socio S. Ranzi.

SUMMARY. — Glycerol formal, a fluid currently used as a drug solvent in toxicity testing has proved to be teratogenic when injected into pregnant rats.

In chick embryos, employed *in ovo* at a final concentration of 0.001%, it induces more severe and generalized malformations (excephaly, anophthalmia or microphtalmia, coelosomia, ectopia viscerorum; beak and limbs are also frequently malformed and the heart is enlarged). Chick blastoderms developed *in vitro* (New's technique) and treated with the same substance show an open nerve tube, irregular somites, a hyperemic blood island and a greatly enlarged heart.

Il glicerol-formale, sostanza ottenuta dalla condensazione della glicerina con la formaldeide ed usata come solvente di numerosi farmaci, era stata studiata da Sanderson (1959) dal punto di vista tossicologico su ratti adulti e sulla base di tali studi è stata comunemente usata per la bassa tossicità e la buona tollerabilità. Recentemente Aliverti *et al.* (1977) hanno invece dimostrato che se somministrata a ratte gravide provoca nei feti gravi malformazioni ai grossi vasi ed al cuore, ed in particolare l'incompleto sviluppo del setto interventricolare.

Abbiamo ritenuto interessante studiare gli effetti di tale sostanza sull'embrione di pollo per poterne verificare l'azione in assenza dell'interferenza che nei Mammiferi possono interporre le trasformazioni metaboliche da parte dell'organismo materno e il filtro placentare.

Sull'embrione di pollo sono stati eseguiti due tipi di trattamento: *in ovo* ed *in vitro*.

### *Trattamento in ovo.*

Nel guscio di uova fecondate di pollo non incubate viene praticato un piccolo foro attraverso il quale viene asportato, mediante siringa, 1 ml di albume fluido; che viene sostituito come segue: 0,9 ml di albume fluido con 0,1 ml di soluzione fisiologica nei controlli nel caso dei trattati invece 0,9 ml di albume fluido con 0,1 ml di una soluzione di glicerol-formale in modo da avere una concentrazione finale 0,001% della sostanza. La concentrazione di glicerol-formale usata è proporzionale a quella impiegata nella sperimentazione farmacotossicologica sul ratto; si è visto infatti che concentrazioni superiori provocano la morte di tutti gli embrioni; sono stati impiegati 140 uova nei lotti di controllo e 190 uova nei trattati.

In un'altra serie di ricerche abbiamo somministrato glicerolformale nella stessa concentrazione (0,001%) ad uova incubate per 36 ore.

(\*) Ricerche eseguite nell'Istituto di Zoologia dell'Università Statale di Milano.

(\*\*) Pervenuta all'Accademia il 26 ottobre 1979.

Le uova dopo il trattamento vengono richiuse con un vetrino coprioggetto e poste ad incubare in termostato a 38,5 °C per 12 giorni. Si è ritenuto opportuno incubare le uova per 12 giorni perché il setto interventricolare, a livello del quale si è osservata nel ratto la malformazione, è completamente formato nel pollo intorno all'8<sup>o</sup>-9<sup>o</sup> giorno e quindi si voleva essere sicuri che anche nel caso di ritardi di sviluppo la struttura interessata fosse completamente formata. Alla fine dell'incubazione le uova vengono aperte e gli embrioni dopo un accurato esame fissati in Bouin e fotografati.

TABELLA I.

	CONTROLLI 140	TRATTATI 190
SVILUPPATI . . . . .	121 (87,1%)	160 (84,2%)
a) NORMALI . . . . .	92 (76,3%)	6 ( 3,7%)
b) MALFORMAZIONI		
esencefalia . . . . .	0	56 (35,0%)
occhi . . . . .	0	32 (20,0%)
becco . . . . .	8 (8,5%)	48 (30,0%)
celosomia . . . . .	0	48 (30,0%)
arti . . . . .	8 (8,5%)	24 (15,0%)
c) MORTI NEI PRIMI SEI GIORNI DI INCUBAZIONE . . . . .	21 (15,2%)	98 (61,3%)

I risultati ottenuti sono schematizzati nella Tabella I. Comparando i dati ottenuti negli embrioni dei lotti di controllo con quelli dei lotti trattati con glicerol-formale si vede che in entrambi i casi circa il 15 % degli embrioni non si sviluppa per cause imputabili al trattamento (inquinamento, etc.). Degli embrioni di controllo solo il 15,2 % va incontro a morte precoce (2-6 giorni) mentre nel caso dei trattati tale percentuale sale al 61,3 %; il 35 % degli embrioni trattati riesce a portare a termine lo sviluppo ma presenta gravi malformazioni, il restante 3,7 % è normale.

Malformazioni specifiche si riscontrano a carico di strutture diverse: Tavola I.

1) Esencefalia, cioè mancata ossificazione della volta cranica, spinta alcune volte fino al punto da lasciare completamente scoperto l'encefalo.

2) Microftalmia: riduzione degli occhi ed in alcuni casi presenza di un solo occhio o assenza totale di essi.

3) Sviluppo abnorme del becco che appare più lungo nella parte mandibolare; in altri casi si ha incrociamiento della parte mandibolare con quella mascellare e in altre ancora la metà superiore è ripiegata ad uncino.

4) Celosomia di vario grado; in alcuni casi si ha una ectocopia totale dei visceri.

5) Il cuore appare notevolmente ingrossato soprattutto a livello degli atri: non si sono tuttavia riscontrate malformazioni all'interno di esso e contrariamente a quanto osservato nel ratto il setto interventricolare è sempre completamente formato. I grossi vasi presentano normale morfologia e struttura. A livello degli altri organi non si è notata alcuna malformazione.

Nella serie, in cui il glicerol-formale era aggiunto a uova già incubate, gli embrioni andavano incontro a precoce degenerazione.

#### *Trattamento in vitro.*

Per poter meglio completare il quadro degli effetti teratogeni del glicerol-formale sul pollo abbiamo ritenuto opportuno allestire espianti di blastoderma per vedere la risposta diretta dell'embrione alla sostanza che nel trattamento in « ovo » poteva essere in un certo senso modificata dalla presenza del tuorlo.

A tale scopo abbiamo, espiantato « in vitro » allo stadio di linea primitiva (L.P.) e coltivato secondo la tecnica di New 69 embrioni, di cui 44 sono stati trattati con glicerol-formale alla concentrazione finale dello 0,001 %; 25 non trattati hanno costituito i controlli. Gli espianti sono stati incubati successivamente per 24-48 ore. I risultati sono riportati nella Tabella II.

TABELLA II.

	CONTROLLI 25	TRATTATI 44
SVILUPPATI . . . . .	21 (84,0%)	32 (72,7%)
a) NORMALI . . . . .	16 (76,2%)	0
b) MALFORMATI . . . . .	0	22 (68,8%)
c) MORTE PRECOCE . . . . .	5 (23,8%)	10 (31,2%)

Degli embrioni trattati il 72,7 % si sono sviluppati di essi il 31,2 % è andato incontro a morte precoce, mentre il 68,8 % sono apparsi vivi dopo 24-48 ore ma con gravi malformazioni: il tubo neurale non si è chiuso, in alcuni casi mancano le vescicole ottiche, i somiti sono mal sviluppati; il cuore è pulsante ma notevolmente ingrossato e spesso l'embrione è notevolmente iposomico (Tav. I e II).

La comparazione dei dati ottenuti per gli embrioni trattati « in ovo » e « in vitro » dimostra che i risultati sono del tutto sovrapponibili e che indub-

biamente la sostanza in esame provoca notevoli effetti teratogeni, evidenti soprattutto a livello dei derivati ectodermici. Il sistema nervoso appare particolarmente colpito: il tubo neurale resta aperto, gli occhi sono sviluppati in modo abnorme per eccesso o per difetto (in alcuni casi assenti). Anche a livello del sistema cardiocircolatorio si notano delle anomalie; i vasi sono allargati ed il cuore è ingrossato soprattutto a livello degli atri. Non abbiamo tuttavia riscontrato alcuna alterazione a livello del setto interventricolare, che, come si è detto, è una malformazione costante nel ratto.

Il fatto che l'azione teratogena di una sostanza sia diversa nei vari gruppi animali non è nuovo ed è dimostrato da diversi Autori. Leone (1963) sperimentando la talidomide sull'embrione di pollo non ha mai riscontrato la focomeilia tipica dei Mammiferi, anche se sono stati notati difetti agli arti.

I fattori che possono influenzare questi risultati sono diversi primi fra tutti l'ambiente in cui l'embrione si sviluppa.

Nel Mammifero infatti tutte le sostanze prima di giungere all'embrione devono passare attraverso la madre, successivamente attraverso la placenta. Questo percorso obbligato implica una trasformazione ed una diluizione della sostanza che pertanto giungerà all'embrione modificata. Nel caso dell'embrione di pollo l'impatto della sostanza come tale è invece diretto.

Questi fattori possono giustificare a nostro avviso la maggior sensibilità dell'embrione di pollo all'azione teratogena del glicerol-formale.

Per quello che concerne il meccanismo d'azione non abbiamo dati precisi tuttavia la presenza di alcune malformazioni, quali ingrossamento del cuore, potrebbero far pensare ad un'azione che avrebbe come conseguenza una modificazione della permeabilità e quindi una ritenzione di liquidi. Tale ipotesi trova supporto nel fatto che spesso gli embrioni appaiono rigonfi ed edematosi. Le mutate condizioni chimico-fisiche porterebbero in stadi precoci ad una variazione dei rapporti o della mobilità delle cellule, fenomeno che potrebbe spiegare la genesi di alcune malformazioni ad esempio la mancata chiusura del tubo neurale.

Non sembra però di poter escludere effetti della sostanza su sistemi enzimatici, dovuti soprattutto alla formaldeide.

#### LAVORI CITATI

- [1] V. ALIVERTI, L. BONANOMI, P. DI TRAPANI, E. GIAVINI, V. G. LEONE e L. MARIANI (1977) - *Effetti del glicerol-formale sullo sviluppo embrionale del ratto*. « Archi. Sc. Biol. », 61, 89-95.
- [2] V. G. LEONE (1953) - *Contributo allo studio degli effetti della talidomide sullo sviluppo embrionale del pollo*. « Ist. Lomb., Rend. Sc. », (B), 97, 366-372.
- [3] D. A. T. NEW (1966) - *The culture of vertebrate embryos*. Academic Press.
- [4] D. M. SANDERSON (1959) - *The dietary toxicity of glycerol formal in the rat* « J. Pharm. Pharmacol. », 11, 446.
- [5] D. M. SANDERSON (1959) - *A note on glycerol-formals as a solvent in toxicity testing*. « J. Pharm. Pharmacol. », 11, 150.



Fig. 1. - Controllo: incubazione 12 giorni.

Figg. 2-3-4-5. - Embrioni trattati *in ovo* con glicerol-formale 0,001% ed incubati per 12 giorni.

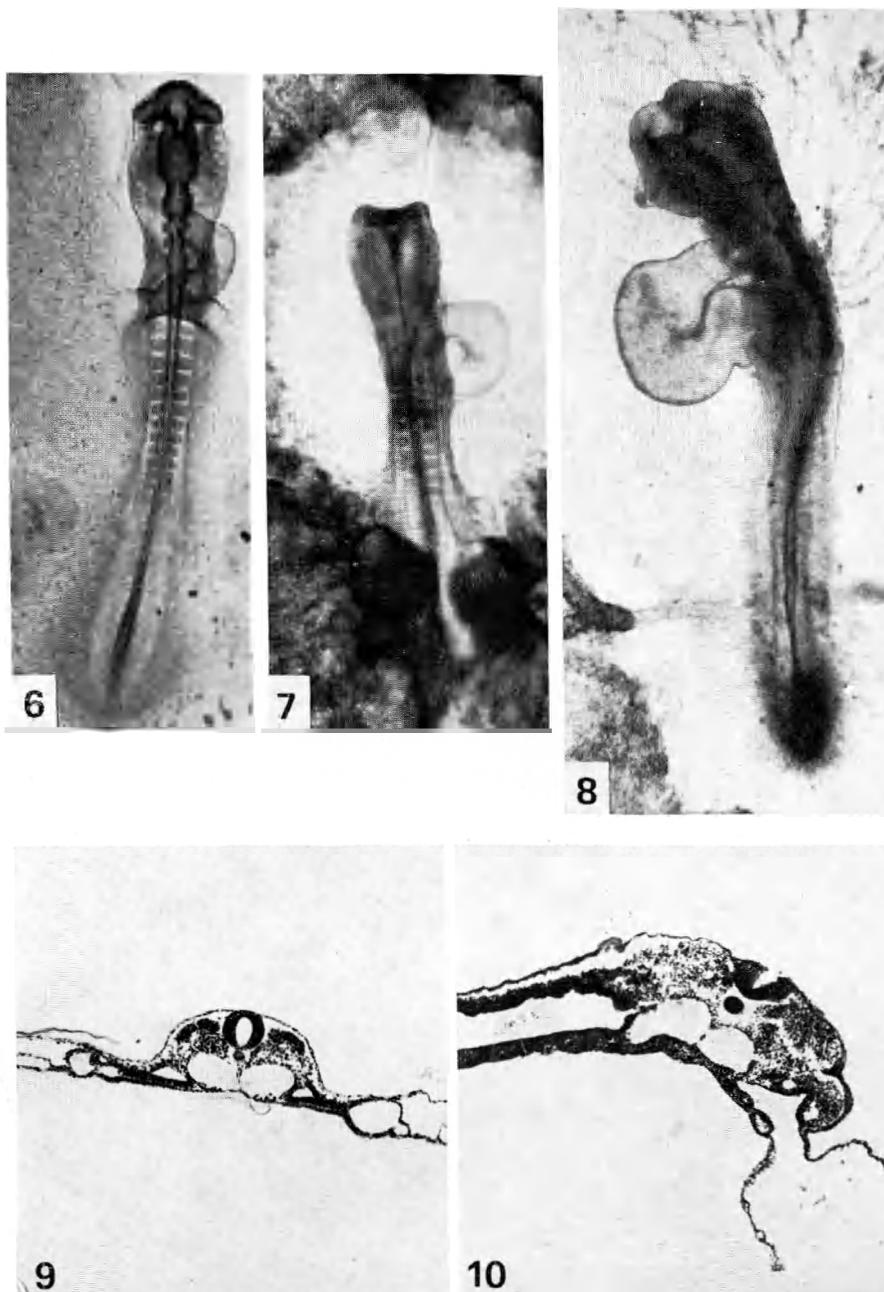


Fig. 7. - Controllo: espianto L' P. incubazione 24 ore.

Fig. 8. - Embrione trattato in vitro a L. P. con 0,001% di glicerol formale per 24 ore.

Fig. 9. - Embrione trattato in vitro a L. P. con 0,001% di glicerolformale per 48 ore.

Fig. 10. - Controllo: sezione trasversale; espianto L. P.; incubazione 24 ore ( $\times 130$ ).

Fig. 11. - Embrione trattato: sezione trasversale; espianto L. P. incubazione 24 ore con glicerol-formale 0,001% ( $\times 130$ ).