



COMUNE DI BERGAMO

ASSESSORATO ALLA PUBBLICA ISTRUZIONE ED ATTIVITA' CULTURALI

R I V I S T A
DEL
MUSEO CIVICO DI SCIENZE NATURALI «E.CAFFI»



Vol. 1° (1980)

Publicato col contributo della Regione Lombardia - Assessorato ai Beni e alle Attività Culturali



GIOVANNI VAILATI (*)

Azione di un pesticida (trifenil acetato di stagno) sullo sviluppo embrionale dello Xenopus laevis

RIASSUNTO. - Vengono descritti i risultati del trattamento con Brestan (trifenil acetato di stagno) su embrioni di Xenopus laevis a diversi stadi di sviluppo.

Si osserva soprattutto irregolarità dell'estremità cefalica e degli occhi, dilatazioni del pronefro e della cavità celomatica, edemi diffusi e proliferazioni dell'epidermide.

SUMMARY. - The results of the Brestan treatment (triphenylacetate of tin) of the embryo of Xenopus laevis in the different stages of development.

The irregularity of the cephalic extremity and of the eyes, dilation of the pronephros and of the coelomatic cavity, widespread oedema and proliferation of the epidermis have been observed.

RESUME. - On a décrit les résultats du traitement avec Brestan (triphénylacétate d'étain) sur des embrions de Xenopus laevis avec différents stades de développement.

On a surtout observé l'irrégularité de l'extrémité céphalique et des yeux, des dilatations du pronefro et de la cavité célomatique, des œdèmes et des proliférations de l'épiderme.

ZUSAMMENFASSUNG. - Es werden die Ergebnisse der Behandlung mit Brestan (trifenilacetato von Zinn) auf Embryo von Xenopus laevis in verschiedenen Entwicklungsstadien beschrieben.

Man beobachtet vor allem Unregelmäßigkeiten der Extremitäten der Kopfes und der Augen, Erweiterungen der "pronefro" und der Vertiefung "celomatica", Ausbreitung der Oedeme und Vermehrung der Epidermis.

(*) Istituto di Zoologia dell'Università di Milano.

INTRODUZIONE.- Questa indagine fa parte delle ricerche in corso presso l'Istituto di Zoologia dell'Università di Milano intese alla conservazione dell'ambiente acquatico.

Mentre per molte sostanze inquinanti sono state condotte ricerche tendenti a verificarne l'effetto su diverse forme di vita acquatica, sia appartenenti al mondo animale che vegetale, per alcuni pesticidi invece scarseggiano i dati riguardanti il loro effetto sugli animali acquatici e in particolare sul loro sviluppo embrionale.

Per colmare tale lacuna si è voluto studiare l'effetto di un pesticida sullo sviluppo embrionale di un anfibio d'acqua dolce, poichè tra i Vertebrati di risaia gli Anfibi costituiscono la componente più numerosa. Come animale da esperimento è stato scelto lo Xenopus laevis, anfibio anuro largamente usato nelle ricerche di embriologia.

Il Brestan (trifenilacetato di stagno) è un pesticida che si presta benissimo a tale scopo dato il suo largo impiego e la sua potente azione antialgale anche a piccole dosi. Una indagine condotta in tal senso oltre a verificare l'effetto di questa sostanza può servire a comprendere meglio l'azione che alcuni metalli esercitano sulle funzioni vitali di certi organismi acquatici. Infatti gli ioni metallici sono importanti come componenti cationici dei sistemi che regolano i fenomeni osmotici all'interno di cellule e tessuti, e ugualmente lo sono le loro funzioni come costituenti di trasportatori d'ossigeno e di biocatalizzatori come coenzimi ed enzimi. Infatti una grande varietà di metalli, sia del gruppo principale che dei metalli di transizione, ha un significato essenziale per il funzionamento particolare dei sistemi biocatalitici. Si ricorda l'intervento del ferro, rame, vanadio, nei sistemi di trasporto dell'ossigeno nel sangue dei Vertebrati, Invertebrati e Tunicati rispettivamente. Inoltre si può ricordare la presenza di magnesio nel pigmento fotosintetico della clorofilla, di zinco nell'enzima anidrasi carbonica e di cobalto in cobalamina (Vitamina B12). D'altra parte si sa che molti ioni metallici sono più o meno tossici per gli organismi viventi e che esercitano un'azione inibitoria per le reazioni enzimatiche sia in vivo che in vitro.

MATERIALI E METODI.- Embrioni di Xenopus laevis agli stadi 9 - 13 - 22 secondo Nieuwkoop e Faber, corrispondenti rispettivamente agli stadi di tarda blastula, giovane neurula, larva di 10 somiti, sono stati posti a sviluppare in diverse concentrazioni di Brestan in soluzione acquosa.

Le concentrazioni usate sono state le seguenti:

1 - 0,3 - 0,15 mg/l di prodotto attivo

e il trattamento, interrotto a stadi opportuni, ha avuto una durata minima di 2,5 ore e massima di 2 giorni. Al termine del trattamento gli embrioni venivano ripetutamente lavati e lasciati sviluppare per circa 5 giorni in acqua di rete fino allo sta

dio 41 (larva di 7 mm circa). Successivamente i trattati insieme a individui di controllo venivano fissati in liquido di Bouin, disidratati in alcool, inclusi in paraffina secondo le consuete tecniche istologiche; per l'analisi microscopica sono state allestite sezioni trasversali di 10 micron di spessore, colorate con ematossilina di Ehrlich ed eosina.

RISULTATI.- La tossicità del Brestan si è dimostrata elevatissima anche a basse concentrazioni; infatti è sufficiente un trattamento di 2,5 ore con 1 mg/l per causare la morte del 50% degli individui. Data l'alta tossicità si sono ridotte le concentrazioni e si sono potuti così prolungare relativamente i tempi di trattamento fino anche a 66 ore; si è visto che la mortalità è ben correlata alla durata della permanenza degli embrioni nel tossico in questione e raggiunge il 100% nel caso in cui siano rimasti 66 ore ad una concentrazione di 0,15 mg/l. A tempi inferiori (2 giorni) la mortalità è stata del 33%. Con 0,3 mg/l per 18 ore si ha una mortalità del 20% e tale valore aumenta fino al 60% per 41 ore di trattamento.

Un fattore determinante per la mortalità si è rivelato la temperatura; infatti dopo 2 giorni di trattamento con una concentrazione di 0,15 mg/l passando da 14° C a 19° C la mortalità sale dal 33% al 96%. Usando una concentrazione di 0,3 mg/l alle stesse temperature dopo 30 ore di trattamento la mortalità sale da circa il 40% all'80%.

Prima di passare in rassegna le varie alterazioni riscontrate mediante l'analisi istologica, si descrivono brevemente le caratteristiche esterne delle larve più malformate. Solitamente esse si presentano meno sviluppate dei controlli ed il loro aspetto è tozzo, non pisciforme, con rigonfiamento a volte notevole della zona ventrale; sono frequenti larve "a virgola". Gli occhi spesso sono piccoli e in qualche caso l'estremità cefalica appare ridotta. In qualche caso la massa del tuorlo ventralmente non è ricoperta dall'epidermide.

OSSERVAZIONI ISTOLOGICHE.- I dati sotto esposti si riferiscono ad un totale di 280 embrioni trattati, di cui 102 sezionati. In quelli più malformati a volte si è avuta la difficoltà nell'identificare i vari organi data l'arretratezza dell'istogenesi, la persistenza in seno ai tessuti di una notevole quantità di tuorlo e la loro anatomia profondamente alterata.

Gli organi che più sembrano risentire dell'azione del Brestan sono gli occhi ed il pronefro, inoltre si osservano frequentemente edemi più o meno diffusi e irregolarità a carico dell'epidermide.

Occhi: il 52% dei trattati presenta malformazioni; queste consistono per lo più in casi di microftalmia (45%), del resto già rilevabili all'osservazione esterna. Gli occhi si presentano notevolmente più piccoli dei controlli con coppa retinica poco sviluppata, sia dal punto di vista anatomico che istologico, spesso a contatto con un cristallino di piccole dimensioni (fig. n° 3).

Altre irregolarità riguardano la retina (16%) e consistono in ripiegature più o meno ampie (colobomi), interruzioni nella regolare distribuzione degli strati (rosette) e incompleta formazione della coppa retinica nella parte ventrale (fig. n° 5). In alcuni casi l'anatomia di questo organo è talmente compromessa che riesce difficile distinguerne le varie parti.

Pronefro: nel 32% dei casi si osservano dilatazioni, a volte notevoli, dei tubuli del pronefro; sembra tuttavia che tale reperto non si accompagni ad alterazioni delle cellule che costituiscono le pareti (fig. n° 2).

Edemi: è un fenomeno molto frequente (47%) e si osserva sia come dilatazione diffusa degli spazi connettivali (30%), sia come dilatazione della cavità pericardica (8%) e celomatica (16%) (fig. n° 2). Potrebbero rientrare in questo gruppo anche le dilatazioni delle otocisti (fig. n° 4) e dei vasi sanguigni osservate in alcuni casi.

Epidermide: sia pure con una frequenza relativamente bassa (10%) alcune larve presentano proliferazioni dello strato esterno con qualche rara vescicola (fig. n° 7).

Accanto alle alterazioni descritte sopra se ne possono riscontrare altre meno frequenti anche se ugualmente significative. Ad esempio si possono osservare casi di occlusione del tubo neurale sia a livello dell'encefalo che del midollo spinale. Di regola il tessuto nervoso contiene ancora numerosi granuli di tuorlo non demolito, segno di un metabolismo rallentato. Questo fenomeno è ben visibile anche nella corda dorsale, nei somiti e in genere in tutti gli altri tessuti. Come già riferito precedentemente la massa del tuorlo in alcuni casi è aperta ventralmente ed è rivestita solo dalla splancopleura.

Questi dati si riscontrano indifferentemente in tutti i lotti di trattamento; infatti si è visto che concentrazioni basse per tempi prolungati provocano gli stessi effetti di concentrazioni elevate per tempi brevi.

1) Trattamento con 1 mg/l per 2,5 ore allo stadio 9 (tarda blastula)- In questo lotto si è avuta una mortalità del 10% e gli embrioni sopravvissuti presentano nel 52% dei casi malformazioni consistenti prevalentemente in casi di microftalmia e di microcefalia. Tali malformazioni non sono però molto imponenti.

2) Trattamento con 1 mg/l per 2,5 ore allo stadio 13 (giovane neurula).- A questo stadio il trattamento ha provocato una mortalità del 48% e una frequenza di malformazioni del 76%. Contrariamente al caso precedente ci si trova qui di fronte a malformazioni a volte imponenti, che interessano soprattutto gli occhi e il pronefro. L'aspetto esterno dei sopravvissuti si presenta tozzo e non pisciforme come nei controlli in quanto le larve sono ingrossate soprattutto ventralmente. Tale reperto trova riscontro all'analisi istologica con la presenza di edemi diffusi e dilatazione della cavità celomatica.

- 3) Trattamento con 1 mg/l per 2,5 ore allo stadio 22 (10 somiti).- A questo stadio gli embrioni risentono meno di un trattamento breve anche se con una concentrazione relativamente alta. Infatti la mortalità è nulla e le malformazioni per altro poco numerose (14%) riguardano due casi di microftalmia, di embrioni edematosi e un caso di dilatazione del pronefro.
- 4) Trattamento con 0,3 mg/l per 18 ore allo stadio 9 (tarda blastula).- Durante questo trattamento gli embrioni hanno compiuto la gastrulazione e, infatti, al termine del trattamento avevano raggiunto lo stadio 13. La mortalità è bassa (10%), ma gli embrioni sopravvissuti presentano al 100% notevoli malformazioni riguardanti soprattutto gli occhi (microftalmia, irregolarità a carico della retina). Le cavità pericardica e celomatica sono dilatate come pure il pronefro e vi è presenza di edemi diffusi.
- 5) Trattamento con 0,3 mg/l per 18 ore allo stadio 13 (giovane neurula).- Durante questo periodo gli embrioni hanno raggiunto lo stadio 20 (circa 6 somiti). La mortalità è relativamente bassa (20%), ma anche in questo caso il numero dei malformati è alto (75%). Tuttavia si tratta di malformazioni meno accentuate di quelle riscontrate negli embrioni a partire dallo stadio 9. Si tratta per lo più di casi di edemi, di microftalmia e di dilatazione del pronefro.
- 6) Trattamento con 0,3 mg/l per 40 ore allo stadio 9 (tarda blastula).- Questo tipo di trattamento, durante il quale gli embrioni hanno raggiunto lo stadio 13 (giovane neurula), è stato condotto a una temperatura di 14° C, di 4° C inferiore rispetto al trattamento n° 4 e questo spiega il perchè abbiano raggiunto gli stessi stadi malgrado una durata di trattamento più che doppia. Anche in questo caso la mortalità è stata bassa (8%) e gli embrioni malformati hanno raggiunto una percentuale notevole (60%). Come nei casi precedenti si tratta di casi di microftalmia, di dilatazione del pronefro, della cavità celomatica e di presenza di edemi diffusi.
- 7) Trattamento con 0,3 mg/l per 40 ore allo stadio 13 (giovane neurula).- Stadio raggiunto 24 (15 somiti); tutti gli embrioni sopravvissuti a questo trattamento (che sono il 40%) si presentano molto malformati. Si osservano in questo caso ispessimenti delle pareti del tubo neurale, soprattutto a livello del diencefalo, che comportano una notevole riduzione del lume del tubo stesso. L'epidermide presenta proliferazione nella parte ventrale dell'embrione e in alcuni casi non giunge a ricoprire completamente la massa ventrale del tuorlo. La cavità pericardica è spesso dilatata. Gli occhi di tutti gli embrioni sono malformati. Otocisti e pronefro presentano casi di enormi dilatazioni.
- 8) Trattamento con 0,15 mg/l per 2 giorni dallo stadio 13 allo stadio 25.- Mortalità relativamente alta (33%) e altissima fre

quenza di malformati (87%). Anche in questo lotto di trattamento oltre alle solite malformazioni si verificano casi di occlusione del tubo neurale e di irregolarità a carico dell'epidermide.

Si sono provati alcuni trattamenti più prolungati (3 e 4 giorni) con la minima concentrazione (0,15 mg/l) sia a stadi precoci, che a stadi più avanzati, ma gli embrioni non sono sopravvissuti. Si può quindi concludere che anche con la minima concentrazione il trattamento limite è di circa 2 giorni e mezzo.

CONSIDERAZIONI.- Analizzando i risultati sopraesposti, si può vedere come dal punto di vista della mortalità lo stadio più sensibile sia la giovane neurula. Infatti i valori raggiunti dalla mortalità nei trattati a questo stadio, superano decisamente, a parità di concentrazione e di durata del trattamento i valori riscontrati nei trattati sia allo stadio 9 che allo stadio 22. Ciò è valido anche per la frequenza delle malformazioni. Questo fatto si può spiegare considerando che a tale stadio ha inizio l'organogenesi e che da questo momento in poi l'embrione, che fino al termine della gastrulazione aveva mantenuto le dimensioni dell'uovo, inizia ad accrescersi assumendo dall'esterno una maggiore quantità di acqua e quindi una maggiore quantità di tossico. L'alta frequenza delle malformazioni riscontrate, anche dopo trattamenti di breve durata, a questo stadio, è certamente imputabile alla notevole complessità degli eventi in corso durante l'organogenesi, periodo in cui i principali organi dell'embrione iniziano a formarsi. Ad esempio è significativo il fatto che nei trattati per 40 ore a questo stadio con 0,3 e 0,15 mg/l gli occhi sono malformati in tutti gli embrioni sopravvissuti al trattamento, poichè la malformazione di tale organo è una delle più complesse. Anche Schowing e Boverio (1979) ottengono alte percentuali di occhi malformati in embrioni di Xenopus trattati con bicloruro di mercurio.

Altra considerazione va fatta a proposito della durata del trattamento. Gli embrioni infatti sembrano sopportare meglio un breve trattamento sia pure a forte concentrazione (1 mg/l per 2,5 ore), mentre invece trattamenti più prolungati con 0,15 mg/l si sono rivelati fortemente tossici. Questo dato è molto importante se si considera che il Brestan resta attivo nelle risaie per circa 15 giorni e che solitamente viene usato anche in concentrazioni di 1,0 mg/l, valore sei volte superiore alla minima concentrazione usata nella nostra ricerca.

Un'altra riflessione va fatta sul tipo di malformazioni che sono per lo più comuni a tutti i lotti di trattamento. Se si eccettua il caso di maggior incidenza di malformazioni degli occhi, come si è prima accennato, nei trattati prevalgono malformazioni a carico del pronefro e presenza di edemi. Quest'ultima anomalia è comprensibile se si pensa al ruolo che gli ioni metallici esercitano come componenti cationici dei sistemi che re

golano i fenomeni osmotici all'interno di cellule e tessuti. Infatti come si è accennato nell'introduzione, i metalli pesanti sono importanti nella regolazione osmotica in quanto modificano la permeabilità delle membrane. Fenomeni simili sono stati descritti anche da Bancroft R. e Prahlad K. V. (1973) in embrioni di Xenopus trattati con etilenebisditiocarbamato di sodio e di manganese e da Imberti R. e Vailati G. (1974) in embrioni di Xenopus trattati con acque contenenti sali di cadmio e zinco. Anche in Anfibi adulti (Pacces Zaffaroni, Arias, Capodanno e Zavanella, 1978) l'etilenebisditiocarbamato di manganese provoca edemi diffusi che gli autori in questione attribuiscono ad una alterazione dell'osmoregolazione. Tuttavia altre sostanze, quali ad esempio l'ammoniaca non ionizzata e i tensioattivi (es.: LAS) sono in grado di provocare vescicole da edema nell'epidermide ed edemi diffusi sembre in embrioni di Xenopus (Vailati G., dati in corso di pubblicazione).

Per quanto riguarda il pronefro, le dilatazioni da esso presentate potrebbero essere dovute ad una semplice dilatazione di organo cavo causata dallo squilibrio osmotico accennato riguardo agli edemi, oppure potrebbe essere una risposta specifica dell'apparato escretore per ripristinare il più possibile le condizioni normali. Probabilmente si verificano entrambi i casi in quanto circa il 30% di queste dilatazioni non si accompagna alla presenza di edemi o dilatazioni di altri organi cavi.

Riguardo le altre alterazioni osservate (dilatazione dei vasi, cellule giovanili nella corda, proliferazione dell'epidermide, ecc.) esse furono descritte anche da Ranzi S. e collaboratori (1946) e da Leone V. (1953) in embrioni di Anfibi trattati con urea e solfocianato, per cui potrebbero essere considerate risposte aspecifiche dell'embrione ad una qualsiasi sostanza inquinante in grado di interferire con i processi metabolici e morfogenetici e quindi probabilmente non sempre riferibili a meccanismi d'azione particolari. Del resto poichè un organo non può subire che un numero necessariamente ristretto di malformazioni, l'identità di questi reperti con quelli causati da sostanze aventi natura chimica ben diversa, è abbastanza giustificabile.

Relativamente bassa è qui la frequenza delle alterazioni a livello dell'epidermide (10%), che si è dimostrata invece molto sensibile alla presenza di sostanze inquinanti quali: detersivi, ammoniaca e metalli pesanti (cadmio, zinco) (Imberti R. e Vailati G., 1974; Calamari, Marchetti R. e Vailati G., 1977; Vailati G., in corso di stampa).

BIBLIOGRAFIA

BANCROFT R. e PRAHLAD K.V. (1973) - "Effect of Ethylenebis (dithiocarbamic acid) disodium salt (nabam) and Ethylenebis (dithiocarbamate) manganese (maneb) on Xenopus laevis Development", Teratology, vol. VII, Wistar Inst. Press.

- CALAMARI D., MARCHETTI R. e VAILATI G. (1977) - "Effetti di trattamenti prolungati con ammoniaca su stadi di sviluppo del Salmo gairdneri", Nuovi Annali di Igiene e Microbiologia 28, 333.
- IMBERTI R. e VAILATI G. (1974) - "Effetto di alcune sostanze inquinanti sullo sviluppo embrionale di Xenopus", Acc.Naz. Lincei (Rend. Sc.) 56, 635.
- LEONE V. (1953) - "Sull'azione dell'urea nello sviluppo embrionale degli Anfibi", Ist. Lomb. Rend. Sc., 86, 351.
- NIEUWKOOP P. e FABER J. (1956) - "Normal table of Xenopus laevis", North Holland Publ. Co Amsterdam.
- PACCES ZAFFARONI N., ARIAS E., CAPODANNO G. e ZAVANELLA T. (1978) - "The toxicity of Manganese Ethylenebisdithiocarbamate to the adult newt, Triturus cristatus", Bull. Environm. Contam. Toxicol., 20, 261-267.
- RANZI S., TAMINI E. e STORARI OFFER E. (1946) - "Alterazioni dello sviluppo embrionale di Anfibi prodotto da solfocianato e da altre sostanze", Ist. Lomb. Rend. Sc., 79, 161.
- SCHOWING J. e BOVERIO A. (1979) - "Influence teratogène du bichlorure de mercure sur le developpement embryonnaire de l'amphibien Xenopus laevis Daud", Acta Embr. Exp 1, 39.
- SIJPESTELIN A.K., LULITEN J.G.A. e VAN DER KERN G.J.M. (1969) "Organometallic Fungicides", in Fungicides vol. II, Acad. Press, New York.
- VAILATI G. - "Effetti teratogeni di acque variamente inquinate", Rivista di Biologia, in corso di stampa.

FIGURE

- n° 1 - Larva di controllo. Sezione trasversale condotta a livello dei tubuli del pronefro (↗) (x70);
- n° 2 - Larva trattata con 0,3 mg/l di Brestan allo stadio di tarda blastula per 40 ore. Il pronefro e la cavità celomatica (↗) sono enormemente dilatati (x70);
- n° 3 - Particolare dell'occhio di larva trattata con 0,3 mg/l allo stadio di giovane neurula per 40 ore. L'occhio è poco sviluppato; la retina, i cui strati non sono differenziati, è a contatto con il cristallino (x170);
- n° 4 - Trattamento come nel caso precedente. Sezione trasversale condotta a livello delle otocisti, delle quali una è molto dilatata (x115);
- n° 5 - Trattamento con 0,3 mg/l di Brestan allo stadio di tarda blastula per 18 ore. Sezione condotta a livello del diencefalo che è completamente occluso; l'occhio è piccolo e la retina è incompleta nella parte inferiore (x140);
- n° 6 - Particolare dell'epidermide di una larva di controllo (x460);
- n° 7 - Epidermide di una larva trattata con 0,15 mg/l per 2 giorni dallo stadio di giovane neurula. Si notano proliferazioni dello strato esterno (x460).



