

## Storia di una rana

Francesca Buoninconti

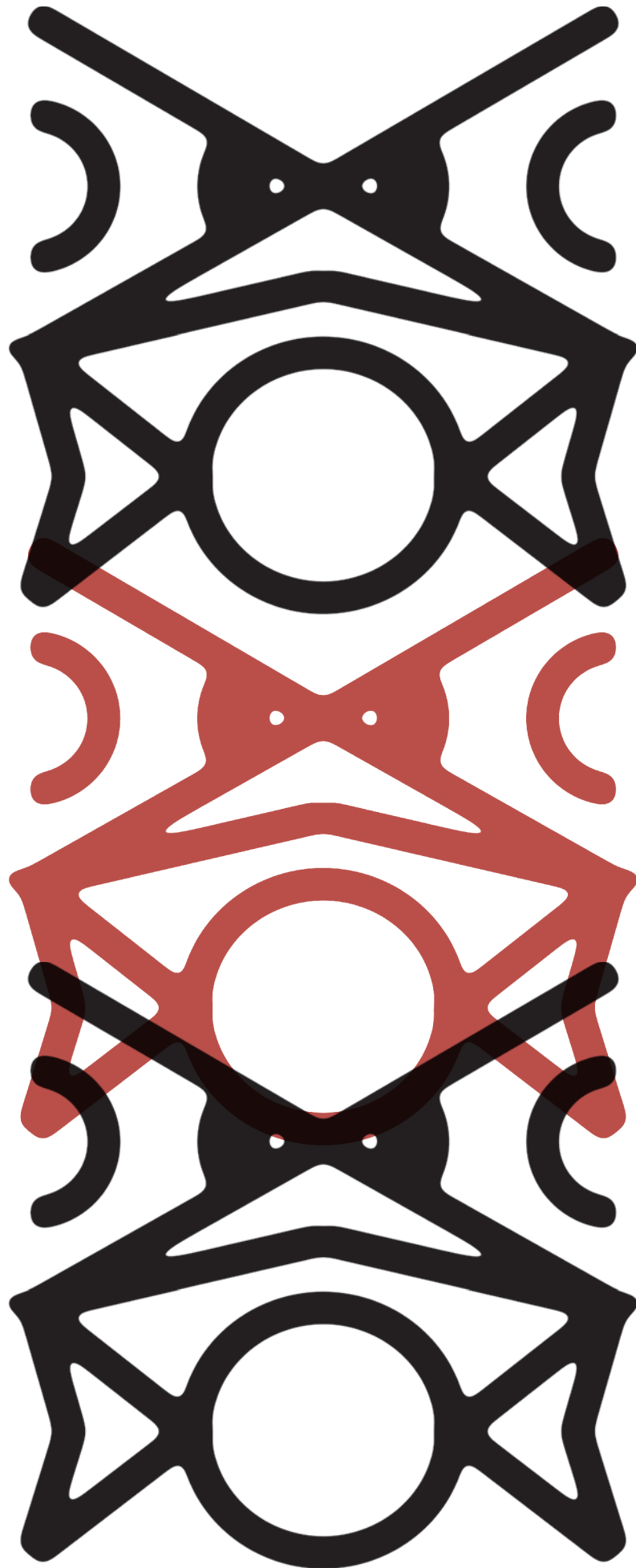
La scienza è continuamente contraddistinta dalla ricerca degli strumenti più adatti per affrontare l'indagine scientifica: dai piselli di Mendel, al riccio di mare passando per l'assone gigante del calamaro. Tra questi la rana artigliata africana si è ritagliata pagine importanti nei libri di medicina e biologia



Se dovessimo immaginare una vita esaltante e piena di avventure, probabilmente ci immagineremmo quella di un astronauta. O di uno scienziato che ha ricevuto il premio Nobel per le sue scoperte. O ancora di un importante diplomatico. E perché no, potremmo immedesimarci in qualche personaggio del passato, che ha lasciato un segno nella storia. Di sicuro a nessuno verrebbe in mente che tutto questo potrebbe essere racchiuso nella storia di un animale, o meglio di una specie che è diventata protagonista della ricerca medica, ha viaggiato in lungo e in largo per i continenti, è stata tra i precursori degli esperimenti di clonazione e sulle cellule staminali e addirittura è riuscita a imbarcarsi a bordo di uno Space Shuttle.

Di chi stiamo parlando? Della rana artigliata africana *Xenopus laevis*, conosciuta anche come xenopo liscio e appartenente alla famiglia dei Pipidi. Un anfibio completamente acquatico e che per la sua forma particolare sembra uscito direttamente dal disegno di un bambino. Ha zampe posteriori grosse e palmate, mentre quelle anteriori mancano del patagio e hanno dita molto lunghe. Il corpo è appiattito e la testa triangolare, con occhi grandi e vicini, e manca di lingua e di denti. *Xenopus laevis*, però, nella sua brillante "carriera", non ha collezionato solo successi: è anche riuscita a cambiare per sempre e in modo tremendo la storia degli anfibii. È infatti la principale responsabile della diffusione di un'epidemia che ha messo in seria difficoltà gli anfibii di tutto il mondo: la chitridiomicosi.

Ma cominciamo dall'inizio. La rana artigliata africana è una specie originaria dell'Africa meridionale, diffusa dall'Angola al Sudafrica. Ed è sempre rimasta lì, praticamente indisturbata, fino agli inizi degli anni Trenta del Novecento, fino a quando, cioè, ha risvegliato l'interesse di un gruppo di scienziati che lavorava in Sudafrica: l'inglese Lancillotto Thomas Hogben e i sudafricani Hillel Abbe Shapiro e Herry Zwarenstein. Saranno loro a rendere lo xenopo liscio famoso in tutto il mondo nel giro di qualche anno. È infatti l'ottobre del 1933 quando, in un rapporto alla Royal Society del Sudafrica, Shapiro e Zwarenstein annunciano che il mese precedente hanno condotto con successo ben 35 test di gravidanza utilizzando le rane artigliate africane. Il test messo a punto è molto semplice: basta iniettare un po' di urina di una donna sottopelle, nel sacco linfatico dorsale di una femmina di xenopo liscio e aspettare. Se dopo 8-12 ore la rana depone le uova, la donna è sicuramente incinta. Un metodo rapido e indolore, affidabile e ripetibile infinite volte. Fino ad allora, infatti, i test di gravidanza erano condotti sui topi, che però venivano uccisi e sezionati e, dunque, il test poteva essere fatto una sola volta. Il nuovo test, invece, aveva tutti i vantaggi possibili: non solo lo xenopo non doveva essere sacrificato, ma poteva vivere fino a 30 anni. Insomma, Shapiro e Zwarenstein avevano fatto centro. Inoltre il loro metodo è all'avanguardia, ha solidissime basi scientifiche e si avvale delle più recenti conoscenze di fisiolo-



gia dell'epoca: gli ormoni. Appena qualche anno prima, nel 1926, gli scienziati tedeschi Selmar Aschheim e Bernhard Zondek avevano scoperto le gonadotropine. Tra queste c'era ovviamente la gonadotropina corionica, detta hCG: un ormone prodotto dall'embrione all'inizio della seconda settimana di sviluppo e rilevabile nelle urine delle donne incinte appena 10 giorni dopo il concepimento. Ebbene, proprio l'hCG stimola l'ovulazione e l'ovodeposizione delle femmine di xenopo liscio. Ormai è fatta: Shapiro e Zwarenstein hanno messo a punto un test praticamente infallibile e soprattutto rapidissimo. Il loro metodo viene pubblicato il 19 maggio del 1934 su *Nature*<sup>1</sup> e l'ignaro xenopo liscio viene in pratica consacrato come un test di gravidanza vivente.

Da questo momento la rana artigliata africana viene richiesta in tutti i laboratori del mondo, inizia a viaggiare per i continenti: viene esportata in Europa, negli Stati Uniti, fino in Australia. Ben presto, però, Lancillotto Thomas Hogben rivendica la paternità del test accusando Shapiro, suo ex studente, di avergli rubato l'idea. Negli anni Venti, infatti, Hogben insegnava zoologia all'Università di Città del Capo e aveva iniziato a usare lo xenopo liscio come modello animale per alcuni esperimenti con gli ormoni nel suo laboratorio. Si era accorto che, iniettando degli ormoni ipofisari del bue in uno xenopo, quest'ultimo deponeva le uova. Nel



**Fino agli anni Sessanta la rana artigliata africana è stata l'organismo modello principe per studi di biologia**

1930, però, Hogben era di nuovo a Londra, proprio mentre Shapiro e Zwarenstein elaboravano lo *Xenopus*-test, che, secondo il genetista Francis Albert Eley Crew, doveva invece essere chiamato "Hogben test". Inizia così un botta e risposta che si sposta poi sulle pagine del *British Medical Journal*: Hogben<sup>2</sup> rivendica i suoi diritti, mentre Shapiro e Zwarenstein<sup>3</sup>, forti della pub-



blicazione su *Nature*, non ci pensano proprio a mollare la presa. La diatriba sarà definitivamente chiarita molti anni più tardi, quando, nel 2003<sup>4</sup>, il premio Nobel John B. Gurdon e Nick Hopwood daranno definitivamente il merito a Shapiro e Zwarenstein in un articolo pubblicato sull'*International Journal of Developmental Biology* dove a pagina 45 si legge: “sebbene Hogben, nella sua comunicazione del 1930<sup>5</sup>, aveva dimostrato in linea di principio che *Xenopus* poteva essere usato per testare la presenza di gonadotropine nelle urine di una donna in gravidanza, né questi, né l'intero rapporto ha mai menzionato i test di gravidanza. Sembra che inizialmente Hogben (ndr.) avesse avuto altre priorità, ed era tutt'altro che chiaro che sarebbe stato possibile fare di *Xenopus* l'animale perfetto per un test di gravidanza”.

Comunque sia andata, lo xenopo liscio diventa in pochissimo tempo la rana più ricercata in tutti i laboratori del mondo e si diffonde a macchia d'olio. Dal 1934 fino agli anni sessanta sarà l'organismo modello principe utilizzato per i test di gravidanza, ma ben presto ci si accorge che quella rana africana ha embrioni grandi e facilmente manipolabili, non richiede grosse cure e

ha una vita media molto lunga: circa 30 anni. È praticamente perfetta per studi di biologia dello sviluppo, di biologia cellulare, di tossicologia, neurobiologia e tanto altro.

È così che dall'Africa meridionale *Xenopus laevis* finisce per attirare le attenzioni del britannico John Gurdon, futuro Sir e premio Nobel. Sono gli anni Cinquanta e Gurdon è uno studente venticinquenne alle prese con gli esperimenti della sua tesi di dottorato nel laboratorio dell'Università di Oxford, intento a manipolare alcuni embrioni di quella rana così speciale arrivata dall'Africa. Sta provando a ottenere un adulto di *Xenopus laevis* trasferendo in una cellula uovo enucleata (a cui cioè è stato tolto il nucleo), il nucleo di una cellula somatica. Gurdon, insomma, si interessa alla clonazione e sta ampliando l'esperimento condotto qualche anno prima da Robert Briggs e Thomas J. King sulla rana leopardo (*Lithobates pipiens*). Briggs e King avevano prelevato il nucleo di una cellula embrionale di rana allo stadio di blastula e lo avevano trasferito in una cellula uovo enucleata: il 60% di tutti i nuclei trasferiti si svilupparono fino allo stadio di girino. Questi esperimenti erano iniziati per



rispondere a una serie di domande, come “il nucleo contiene l’intero corredo genetico?” o ancora “una cellula può essere riprogrammata?”. John Gurdon si era quindi inserito in questo filone di ricerca con i suoi xenopi lisci. Preleva alcune cellule intestinali, ne estrae il nucleo e lo trasferisce in altre cellule uovo enucleate. Ripete questa operazione centinaia di volte, ma dei 726 nuclei trasferiti solo 10 si svilupparono fino allo stadio di girino. L’esperimento ha successo e nel luglio del 1958 il suo studio viene pubblicato su *Nature*<sup>6</sup>. Per Gurdon è solo l’inizio di una carriera che lo porterà a Stoccolma nel 2012 per ricevere il premio Nobel per la fisiologia e la medicina, insieme a Shin’ya Yamanaka. Gurdon, infatti, sarà premiato per aver scoperto che le cellule mature, già differenziate, possono essere riprogrammate per diventare pluripotenti, che la specializzazione delle cellule è quindi reversibile e il destino di una cellula può essere “riavvolto”. I suoi studi su *Xenopus laevis*, condotti a cavallo tra il 1958 e il 1962, hanno dato vita ad una rivoluzione che nel 1997 ha portato all’annuncio del primo grande mammifero clonato a partire da una cellula adulta: la pecora Dolly.

Ma l’avventura dello xenopo liscio nei laboratori di medicina e fisiologia non finisce qui. E anzi, a dirla tutta, il premio Nobel del 2012 non è il primo a essere ottenuto conducendo esperimenti su *Xenopus laevis*. Negli stessi anni in cui Gurdon lavorava sugli embrioni di *Xenopus laevis* a Oxford, dall’altra parte dell’oceano il neurobiologo Roger Wolcott Sperry è assorto in tutt’altre domande. La sua vita in quegli anni ruota tra l’Università di Harvard e lo Yerkes Primate Research Center di Orange Park, in Florida: è qui che inizia a condurre una serie di esperimenti sui nervi ottici di salamandre e rane artigliate afri-



**Ancora oggi *Xenopus laevis* è un organismo modello per lo studio dei meccanismi dell’apoptosi**

cane. Sperry disegna un esperimento semplice ed elegante, in cui associa l’osservazione del comportamento allo studio dell’anatomia cerebrale: taglia i nervi ottici di uno xenopo liscio e li ruota di 180° per capire se e come la vista della rana si sarebbe modificata. Il risultato? Al malcapitato

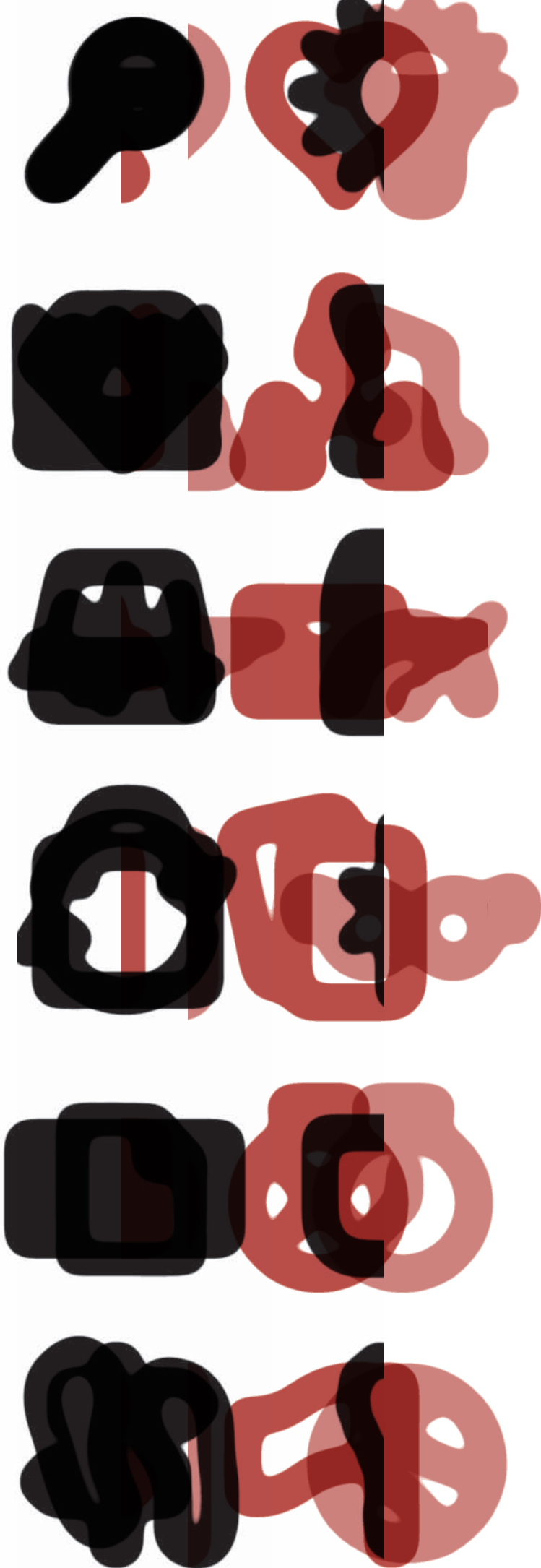
xenopo viene invertita la vista: se gli si presenta un insetto in alto, tenta di acciuffarlo come se fosse in basso, e viceversa. Sperry conclude così che il destino dei neuroni e delle loro connessioni è determinato geneticamente e che i neuroni stabiliscono con i loro obiettivi delle connessioni basate su specifici marcatori molecolari: formula l'ipotesi della chemioaffinità. Qualche anno più tardi, continuando sulla scia di questi esperimenti e adottando anche altri organismi modello, tra cui l'uomo, Sperry scopre che alcune funzioni cerebrali o processi cognitivi tendono a essere dominati da uno solo dei due emisferi del cervello. E per questo, nel 1981, riceve a Stoccolma il premio Nobel per la fisiologia e la medicina.

Dunque, nel giro di mezzo secolo la rana artigliata africana ha viaggiato in lungo e in largo per i continenti, è la beniamina nei laboratori di ricerca, è diventata famosa anche al grande pubblico per il suo successo con i test di gravidanza, è stata la protagonista degli esperimenti di due scienziati che di lì a poco avrebbero ricevuto il Nobel. Eppure, qualcuno ha in serbo per questo strano anfibio ancora qualche avventura: a volerla con sé, stavolta, è la NASA. Venerdì 11 settembre 1992, sui giornali di tutto il globo, spunta di nuovo "la rana più fertile del mondo" e questa volta riguardo a una missione spaziale. Infatti, per le 10.23 del giorno successivo (le 16.30 ora italiana), era previsto il lancio dello *Space Shuttle Endeavour* da Cape Canaveral, in Florida, per la missione *Spacelab*, in collaborazione con i Giapponesi, che sarebbe durata poco più di una settimana. Quel giorno lo *Space Shuttle* assomigliava forse più a un'arca di Noè del futuro: a bordo con i sette astronauti c'erano 180 vespe orientali, 7600 moscerini della frutta, due carpe giapponesi, 30 uova di gallina fecondate e ben quattro rane artigliate africane. Tutto per capire come funziona lo sviluppo embrionale in condizioni di microgravità. Così, *Xenopus laevis* era finito a bordo di

uno shuttle per la sua prima missione spaziale e i quattro esemplari scelti sarebbero stati affidati alla prima donna astronauta afroamericana della storia, Mae Jamison. Ancora oggi *Xenopus laevis* è un organismo modello per lo studio dei meccanismi dell'apoptosi, ovvero della morte cellulare programmata, in particolare nella metamorfosi degli anfibii. Grazie a questa specie, per esempio, si studia l'evoluzione del loro sistema nervoso e la morte programmata delle cellule delle branchie e della coda tipiche dello stadio larvale di girino. Ci si è poi anche impegnati per sequenziare il genoma di questa rana: nel 2016 una collaborazione internazionale ha pubblicato il genoma della rana artigliata africana su *Nature*<sup>7</sup>.

Sfortunatamente, però, la storia avventurosa di *Xenopus laevis* che ha girato tutti i laboratori del mondo e ha persino viaggiato in orbita, a circa 300 chilometri di altezza, non è tutta rosa e fiori. Oltre a cambiare per sempre la storia della medicina, lo xenopo liscio ha cambiato per sempre anche la storia degli anfibii. Sarebbe infatti proprio lei, la rana artigliata africana, la responsabile della diffusione della chitridiomicosi: la malattia provocata dal fungo chitride *Batrachochytrium dendrobatidis*, che attacca la cute sensibilissima degli anfibii con conseguenze letali. Scoperto nel 1998<sup>8</sup> in Centro America e in Australia, il *Batrachochytrium dendrobatidis* ha già colpito e devastato centinaia di specie di anfibii in tutto il mondo: a causa sua si sarebbero estinte 90 specie di anfibii, mentre altre 500 avrebbero subito un drastico calo demografico stando agli ultimi dati pubblicati su *Science*<sup>9</sup>.

Ebbene, tutte le prove raccolte finora portano sul banco degli imputati *Xenopus laevis*: l'origine del fungo sarebbe africana e lo xenopo liscio è il vettore ideale, praticamente un portatore sano che è stato diffuso in tutto il mondo. Uno studio uscito nel 2004<sup>10</sup>, ha esaminato infatti 697 esemplari di *Xenopus laevis* raccolti tra il 1879 e



il 1999 in Africa meridionale, e il triste risultato è che il primo caso di chitridiomicosi sarebbe stato riscontrato proprio su uno *Xenopus laevis* del 1938. Non solo, la chitridiomicosi, prima di diventare un'epidemia mondiale, sarebbe stata confinata in Africa meridionale per 23 anni. Quando, negli anni Trenta, l'anfibio africano è balzato agli onori delle cronache come “test di gravidanza vivente” ed è entrato in tutti i laboratori del mondo, ha portato con sé, silenziosamente, la malattia all'epoca ancora sconosciuta agli scienziati e a cui però sembra resistere bene<sup>11</sup>. E il rilascio in natura, accidentale o volontario, di alcuni esemplari avrebbe fatto il resto. Per quanto allo xenopo liscio vadano tributati molti meriti scientifici, sul suo “curriculum” ha ormai una macchia indelebile.

#### Riferimenti bibliografici

<sup>1</sup>Shapiro H. A. e Zwarenstein H., (1934) “A Rapid Test for Pregnancy on *Xenopus laevis*”, *Nature*, 133, (3368): 762.

<sup>2</sup>Hogben L. T., (1946) “History of the Hogben Test”, *British Medical Journal*, 2(4475): 554; Hogben L. T., (1946) “The Hogben Test”, *British Medical Journal*, 2(4485): 962–963.

<sup>3</sup>Shapiro H. A. e Zwarenstein H., (1946) “The *Xenopus* Test for Pregnancy”, *British Medical Journal*, 2(4480): 752.

<sup>4</sup>Gurdon J. B. e Hopwood N., (2003) “The introduction of *Xenopus laevis* into developmental biology: of empire, pregnancy testing and ribosomal genes”, *International Journal of Developmental Biology*, 44

<sup>5</sup>Hogben L. T., (1930) “Some remarks on the relation of the pituitary gland to ovulation and skin secretion in *Xenopus laevis*”, *Proceeding of the Royal Society of South Africa*, 22: pt. 2, xvii-xviii.

<sup>6</sup>Gurdon J. B. et al., (1958) “Sexually Mature Individuals of *Xenopus laevis* from the Transplantation of Single Somatic Nuclei”, *Nature*, 182, 64–65.

<sup>7</sup>Session A. et al., (2016) “Genome evolution in the allotetraploid frog *Xenopus laevis*”, *Nature*, 538(7625): 336–343.

<sup>8</sup>Berger L. et al., (1998) “Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America”, *Proceeding of the National Academy of Science USA*, 95(15): 9031–9036.

<sup>9</sup>Scheele B. C. et al., (2019) “Amphibian fungal panzootic causes catastrophic and ongoing loss of biodiversity”, *Science*, 363(6434), 1459–1463.

<sup>10</sup>Weldon C. et al., (2004) “Origin of the Amphibian Chytrid Fungus”, *Emerging Infectious Disease*, 10(12)

<sup>11</sup>Vredenburg V. T. et al., (2013) “Prevalence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in *Xenopus* Collected in Africa (1871–2000) and in California (2001–2010)”, *Plos One*, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063791>