
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

ALDO ROSSI

**Osservazioni preliminari sulle capacità di
differenziamento in vitro dello strato esterno della
placca neurale pluristratificata di Bufo bufo (L.)**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 36 (1964), n.4, p. 572–577.*
Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1964_8_36_4_572_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. — *Osservazioni preliminari sulle capacità di differenziamento in vitro dello strato esterno della placca neurale pluristratificata di Bufo bufo (L.)* (*). Nota di ALDO ROSSI, presentata (**) dal Corrisp. A. STEFANELLI.

In un precedente lavoro (Rossi e Nista 1963 [1]) si è osservato che lo strato esterno della placca neurale pluristratificata di *Rana esculenta* (allo stadio di fine gastrula-inizio del sollevamento delle pieghe neurali) trapiantata sul fianco di un portatore della stessa specie, è capace di svilupparsi in una struttura neurale con evidente organizzazione bilaterale, in cui si sono differenziate cellule endodermali, cellule dei plessi corioidei, neuroblasti e cellule nervose con caratteri di differenziamento generale.

Nel presente lavoro sono stati eseguiti espianti in soluzione fisiologica dello strato esterno della placca neurale di *Bufo bufo*, allo scopo di valutare le capacità di differenziamento dello strato esterno neuroperietodermico al di fuori delle influenze del portatore.

Dalla rassegna bibliografica risulta che fin ora non sono state fatte ricerche sul valore prospettico dei due strati della placca neurale pluristratificata degli Anfibi anuri. Ruffini (1925 [2]) per primo ha chiaramente messo in evidenza negli Anfibi urodela e precisamente nel *Triton*, che la placca neurale è costituita da un solo ordine di cellule, mentre negli Anfibi anuri e in particolare nella *Rana esculenta*, si possono distinguere due parti fondamentali nella placca neurale: uno strato esterno o *perietoderma* e uno strato profondo formato da più ordini di cellule o *strato sensitivo*.

In precedenti lavori (Rossi 1960 e 1961 [3-4]) si è dimostrato che l'ablazione dello strato esterno della placca neurale di *Bufo bufo*, di *Bufo viridis* e di *Rana esculenta*, provoca in un primo tempo la formazione di cervelli più o meno pieni, i quali in un secondo tempo presentano delle cavità rivestite da cellule endodermali, che in alcuni punti si sono differenziate in cellule dei plessi corioidei.

Anche in successive ricerche (Rossi e Nista, 1963, op. cit.) si è osservato che trapiantando parti dello strato profondo della placca neurale di *Rana esculenta*, previamente private dello strato esterno, si sviluppano strutture neurali le cui cavità sono tappezzate da cellule endodermali.

Complessivamente dalle personali precedenti ricerche risulta che tanto le cellule dello strato esterno che quelle dello strato interno della placca neurale degli Anfibi anuri presi in esame e in particolare la *Rana esculenta*, sono ambedue totipotenti a differenziarsi in cellule endodermali, in cellule dei plessi corioidei e in neuroblasti che possono evolversi in cellule nervose.

(*) Lavoro eseguito nell'Istituto di Anatomia comparata «G. B. Grassi» dell'Università di Roma, con i mezzi del Centro di Studio di Neuroembriologia del C.N.R.

(**) Nella seduta dell'11 aprile 1964.

MATERIALE E METODO.

Lo strato esterno della placca neurale è stato prelevato da embrioni di *Bufo bufo* allo stadio di fine gastrula-inizio del sollevamento delle pieghe neurali. Lo strato esterno è stato asportato totalmente dai 2/3 anteriori della placca neurale. Il tessuto asportato è stato quindi coltivato in soluzione fisiologica di Niu e Twitty (1953 [5]) in capsule Petri. Gli espianti sono stati coltivati per 4-7 giorni (vedi fig. 1).

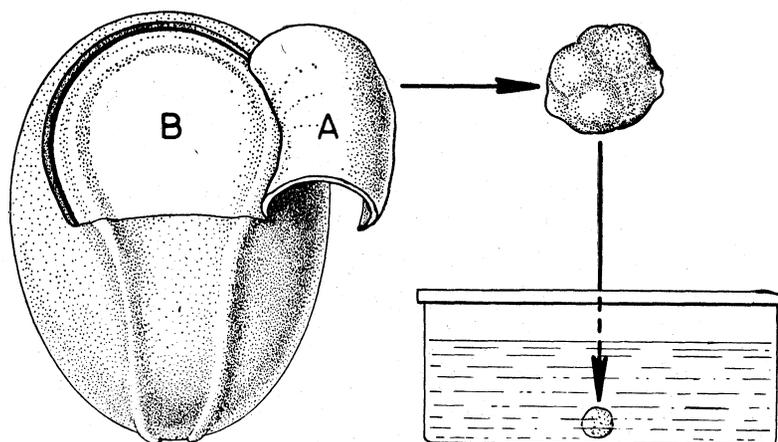


Fig. 1. - Schema dell'esperienza dell'espianzione dello strato esterno della placca neurale di *Bufo bufo*.

A = strato esterno della placca neurale; B = strato interno della placca neurale.

La soluzione fisiologica di Niu-Twitty e le operazioni sono state allestite sterilmente. Al momento dell'operazione sono state aggiunte 50 U. di penicillina G. sodica cristallizzata per ml di soluzione fisiologica. Gli espianti sono stati fissati in Bouin acetico. Le sezioni seriate di 10 μ sono state colorate con emallume di Mayer ed eosina.

DESCRIZIONE DEI RISULTATI.

Come è noto lo strato esterno della placca neurale degli Anfibii anuri, riveste, dopo la chiusura del tubo neurale, le pareti interne del sistema nervoso neoformato.

Questo strato, quando viene espianato in soluzione fisiologica si appallottola similmente ad un pezzo di ectoderma banale in cultura, cioè si avvolge su se stesso in modo da racchiudere verso l'interno la superficie cellulare che si trovava a contatto con lo strato profondo della placca neurale. Quindi lo strato esterno della placca neurale in cultura si viene a trovare in contatto

con la soluzione fisiologica, con quella superficie cellulare che nel normale sviluppo si trova nella cavità ventricolare del neurasse.

Da osservazioni attualmente in corso, risulta invece che pezzi abbastanza grandi dello strato profondo della placca neurale di *Rana esculenta* (previamente privati dello strato esterno) espianati in soluzione fisiologica, si appallottolano prima piegandosi a doccia, poi fondendo le pieghe neurali, con un meccanismo simile a quello che avviene durante la neurulazione della placca neurale.

Complessivamente sono stati eseguiti 18 espianati di strato esterno della placca neurale di *Bufo bufo* di cui solo 9 sono sopravvissuti fino al giorno della fissazione (dopo 4-7 giorni di cultura).

In tutti i casi l'espianato risulta delimitato da uno strato esterno formato da uno a tre ordini di cellule. In sei di questi casi si è formato internamente una struttura neurale, che presenta una tendenza alla simmetria bilaterale. La volta di queste strutture neurali è rappresentata da una sottile membrana a forma di ampolla delimitata da un solo ordine di cellule.

Nelle parti inspessite di tali strutture neurali non si è ancora avuto un chiaro differenziamento dei veri tipi cellulari; solo in alcuni punti è visibile il differenziamento dello strato mantellare periferico.

In nessun caso si è avuto un chiaro sviluppo dell'occhio; tuttavia in un caso si osserva che al materiale neurale è associato un gruppo di cellule il cui aspetto e disposizione, lascia pensare ad una organizzazione di materiale di tipo oculare. Probabilmente tale materiale non si è potuto perfettamente organizzare in un occhio dato il troppo breve periodo di tempo di cultura degli espianati.

Negli espianati, non si è avuto il differenziamento di organi né di tipo mesodermico né di tipo spino-caudale. Abbondanti sono le cellule mesenchimali e le cellule con granuli di melanina.

DISCUSSIONE.

In un precedente lavoro (Rossi e Nista, 1963, op. cit.) è stato dimostrato che dallo strato esterno della placca neurale (o periectoderma neurale di Ruffini, 1925, op. cit.) di *Rana esculenta*, si sviluppa una struttura neurale, a simmetria bilaterale, in cui si differenziano cellule endodermali, cellule dei plessi corioidei, neuroblasti e cellule nervose con caratteri di differenziamento generale. Dal trapianto dei vari territori dello strato interno dei 2/3 anteriori della placca neurale, con il sottostante entomesoderma, si sono formate delle strutture morfologicamente differenti, in cui sono riconoscibili cellule endodermali, neuroblasti e cellule nervose.

Dai dati delle presenti ricerche, risulta che anche in condizioni di espianato una parte delle cellule dello strato esterno della placca neurale di *Bufo bufo* è capace di organizzarsi in una struttura neurale la cui organizzazione tende alla simmetria bilaterale.

Tali strutture neurali sono morfologicamente simili alle strutture neurali ottenute trapiantando lo strato esterno della placca neurale della *Rana esculenta* sul fianco di un portatore della stessa specie (Rossi e Nista, 1963, op. cit.). Nella precedente ricerca si è frequentemente osservato che insieme alle strutture neurali si differenzia anche un occhio, la cui presenza farebbe pensare che tali strutture neurali siano del tipo archiencefalico. Tuttavia l'organizzazione morfologica delle strutture neurali ottenute, sia trapiantando che espiantando lo strato esterno della placca neurale, è poco specifica per cui è difficile poter affermare che esse siano sicuramente delle strutture di tipo archiencefalico.

Data l'aspecificità di tali strutture si può avanzare l'ipotesi che lo strato esterno della placca neurale di *Bufo bufo* al momento dell'espianto (stadio di fine gastrula—inizio del sollevamento delle pieghe neurali) abbia avuto solo una determinazione neurale generica. Questa ipotesi è motivata dalle attuali conoscenze sui processi di induzione del sistema nervoso. Yamada (1950) [6], Nieuwkoop (1952 [7]) e Toivonen e Saxen (1955 [8]) ritengono che durante il processo di induzione del neurasse degli Urodeli, l'organizzatore (il tetto dell'archenteron) agisca prima in senso neuralizzante (attivante o dorsalizzante) e poi in senso mesodermizzante (trasformante o caudalizzante). Toivonen e Saxen (1955, op. cit.) ritengono che queste due azioni siano dovute all'attività induttrice di due gruppi di sostanze, che avendo una differente grandezza molecolare si diffondono con differente velocità dal tetto dell'archenteron: ovvero le sostanze neuralizzanti avrebbero una piccola molecola e si diffonderebbero più rapidamente mentre quelle mesodermizzanti sarebbero macromolecolari e la loro diffusibilità sarebbe più lenta.

È noto che le sostanze induttrici diffondono e agiscono a distanza, senza che vi sia un diretto contatto cellulare fra tessuto induttore e tessuto indotto (Saxen 1961 [9]). Data la costituzione pluristratificata dell'ectoderma prospettico neurale degli Anfibi anuri, si può pensare che lo strato esterno e quello interno non vengano indotti contemporaneamente dall'entomesoderma. Pertanto è verosimile che quando gli strati profondi della placca neurale attivati risentono l'azione trasformante (o mesodermizzante) delle sostanze macromolecolari, lo strato esterno cominci a sentire gli effetti dell'azione attivante (o neuralizzante) delle sostanze micromolecolari.

Poiché il primo stimolo induttore (cioè quello attivante o neuralizzante) induce nell'ectoderma neurale prospettico degli Urodeli la capacità di differenziarsi in struttura archiencefalica (Yamada, 1950; Nieuwkoop 1952; Toivonen e Saxen, 1955, op. cit.; Sala, 1956 [10]) si può pensare che lo strato esterno della placca neurale di *Bufo bufo* abbia invece acquisito allo stadio in cui è stata eseguita la sua ablazione, solamente una capacità di differenziamento più generica di quella archiencefalica, per cui esso si evolve in una struttura neurale aspecifica.

Nelle presenti esperienze si sono potute fare solo scarse osservazioni istologiche per valutare i vari tipi di cellule che si sarebbero potuti differenziare dallo strato esterno della placca neurale di *Bufo bufo* espiantato. Ciò è dovuto al fatto che troppo breve è stato il tempo di cultura di tale strato, per poter

ottenere il differenziamento dei vari tipi cellulari. In queste esperienze infatti gli espianti sono stati presi in esame dopo 4-7 giorni di cultura, mentre nelle precedenti esperienze, i trapianti dello strato esterno della placca di *Rana esculenta*, sono stati presi in esame da 30 a 80 giorni dopo l'operazione e si è potuto osservare che nelle strutture neurali si sono differenziate cellule ependimali, cellule dei plessi corioidei, neuroblasti e cellule nervose.

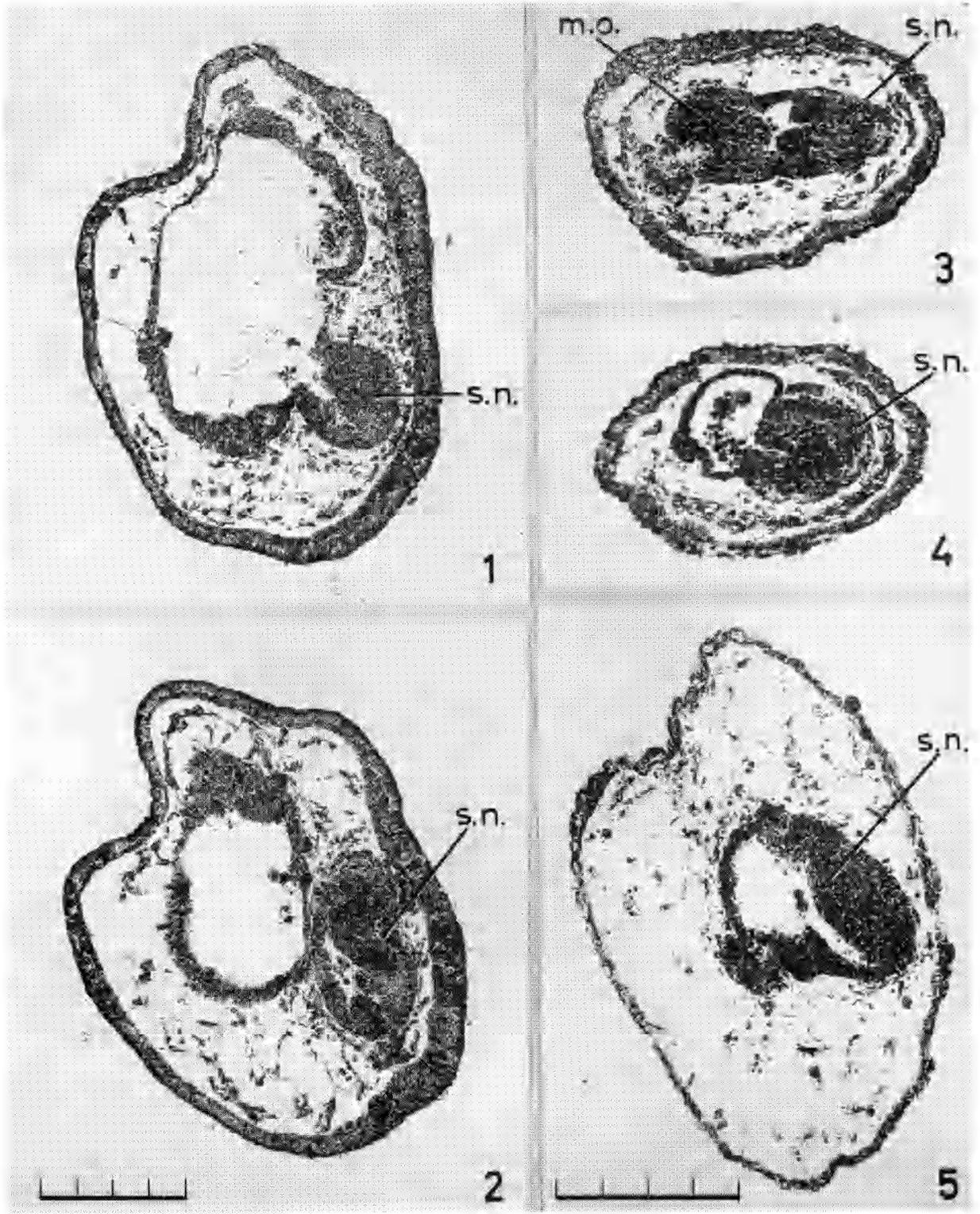
Nelle presenti ricerche invece si è potuto constatare che le strutture neurali sono formate essenzialmente da neuroblasti e che in qualche punto si sta formando della sostanza bianca. In prossime ricerche ci si ripropone di allungare il periodo di cultura degli espianti al fine di stabilire il grado di differenziamento degli elementi cellulari delle strutture neurali che si sviluppano dallo strato esterno della placca neurale.

CONCLUSIONE.

Le presenti ricerche hanno dimostrato che espiantando in soluzione fisiologica lo strato esterno perineurodermico della placca neurale di *Bufo bufo*, si formano delle strutture neurali con differenziamento istologico generale, la cui struttura tende alla simmetria bilaterale. Tale risultato conferma le osservazioni fatte nelle precedenti ricerche di trapianto e cioè che anche lo strato esterno della placca neurale di *Rana esculenta* è capace di svilupparsi in una struttura neurale aspecifica a simmetria bilaterale, le cui cellule si sono differenziate in cellule ependimali, cellule dei plessi corioidei, neuroblasti e cellule nervose con caratteri di differenziamento generale.

BIBLIOGRAFIA.

- [1] A. ROSSI e A. NISTA, *Analisi sperimentale della placca neurale pluristratificata di Rana esculenta*, « Rend. Ist. Sci. Camerino », 4, 53 (1963).
- [2] A. RUFFINI, *Fisiogenia - La biodinamica dello sviluppo ed i fondamentali problemi morfologici dell'embriologia generale*, Casa Editrice F. Vallardi, Milano (1925).
- [3] A. ROSSI, *Esperienze di asportazione dell'ependima presuntivo in embrioni di Anfibi anuri*, « Rend. Acc. Naz. Lincei » (ser. 8^a), 29, 438 (1960).
- [4] A. ROSSI, *Nuove esperienze sull'asportazione dello strato dell'ependima presuntivo in embrioni di Anfibi anuri*, « Rend. Acc. Naz. Lincei » (ser. 8^a), 30, 565 (1961).
- [5] M. C. NIU and V. C. TWITTY, *The differentiation of gastrula ectoderm in medium conditioned by axial mesoderm*, « Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Washington », 39, 985 (1953).
- [6] T. YAMADA, *Regional differentiation of the isolated ectoderm of the Triturus gastrula induced through a protein extract*, « Embryologia », 1, 1 (1950).
- [7] P. D. NIEUWKOOP et al., *Activation and organization of the central nervous system in Amphibians. - I. Induction and activation. - II. Differentiation and organization. - III. Synthesis of a new working hypothesis*, « J. Exp. Zool. », 120, 1-108 (1952).
- [8] S. TOIVONEN and L. SAXÉN, *The simultaneous inducing action of liver and bone-marrow of the guinea-pig in implantation and explantation experiments with embryos of Triturus*, « Exp. Cell. Res. », suppl. 3, 346 (1955).
- [9] L. SAXEN, *Transfilter neural induction of amphibian ectoderm*, « Dev. Biol. », 3, 140 (1961).
- [10] M. SALA, *Caudalizzazione di materiale neurale prosencefalico indotta dall'area posteriore della placca neurale in Anfibi Urodeli*, « Rend. Acc. Naz. Lincei » (ser. 8^a), 19, 485 (1956).



SPIEGAZIONE DELLA TAVOLA I

Figg. 1 e 2. – Microfotografie di due sezioni seriate di uno stesso espianto dello strato esterno della placca neurale di *Bufo bufo*. Si nota all'interno dell'espianto la formazione di una struttura neurale la cui organizzazione tende alla simmetria bilaterale.

Figg. 3 e 4. – Microfotografie di due sezioni seriate di uno stesso espianto dello strato esterno della placca neurale di *Bufo bufo*. Nella fig. 3, si osserva che insieme alla struttura neurale vi è del materiale mostrante una organizzazione di tipo oculare. Nella fig. 4, si nota che la struttura neurale ha una organizzazione a simmetria bilaterale.

Fig. 5. – Microfotografia di una sezione seriatata di un espianto dello strato esterno della placca neurale di *Bufo bufo*. La struttura neurale che si è differenziata nell'espianto ha una organizzazione strutturale che tende alla simmetria bilaterale.

m.o. = materiale oculare; s.n. = struttura neurale.

Ogni unità delle scale in calce alle microfotografie 2 e 5 corrisponde a 50μ .