

---

ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI  
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

# RENDICONTI

---

MARINA CAMATINI, GIULIO LANZAVECCHIA

## Rilievi ultrastrutturali sulle branchie dei Pesci. Nota I. L'epitelio di rivestimento

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,  
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 40 (1966), n.4, p. 679–685.*  
Accademia Nazionale dei Lincei

<[http://www.bdim.eu/item?id=RLINA\\_1966\\_8\\_40\\_4\\_679\\_0](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1966_8_40_4_679_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.** — *Rilievi ultrastrutturali sulle branchie dei Pesci.*  
Nota I. *L'epitelio di rivestimento.* Nota (\*) di MARINA CAMATINI e GIULIO LANZAVECCHIA, presentata (\*\*) dal Corrisp. S. RANZI.

SUMMARY. — *Ultrastructural findings in Fish Gills.* The ultrastructure of the secondary lamella is observed in gills of the following Fishes: *Scyliorhinus stellaris* L., *Salmo irideus* Gibb., *Anguilla anguilla* L., *Carassius auratus* L. The secondary or respiratory lamella consists of an epithelial layer covering a vascular axis. Contrary to the current opinions, the epithelium appears to be double layered. The cells of the two layers have a different morphological aspect and their nuclei are arranged in two lines; therefore it seems possible to exclude that the double layered appearance is a consequence of a cytoplasmic strips superimposition. Besides the covering cells, there are mucous cells and "chloride cells". The former are round shaped, and their cytoplasm contains a very developed ergastoplasm, and numerous vesicles full of an electron-transparent, probably mucopolysaccharidic, substance. The "chloride cells" show a large nucleus, numerous mitochondria and a complex tubular tridimensional system of the smooth endoplasmic reticulum. The function of these cells is probably to secrete sodium and potassium chloride.

L'anatomia microscopica dei foglietti branchiali dei Pesci è stata oggetto di numerose ricerche (Bietrix 1895, Plehn 1901, Vialleton 1911, Acrivo 1936) ed è attualmente ben nota: meno complete risultano invece le conoscenze sulla struttura della lamella respiratoria, ed in particolare sull'epitelio di rivestimento, sull'asse vascolare e sui rapporti che queste due parti prendono tra di loro. Si è pertanto cercato di risolvere questi problemi mediante osservazioni condotte per mezzo del microscopio elettronico.

#### MATERIALI E METODI.

Branchie di *Scyliorhinus stellaris* L., *Salmo irideus* Gibb., *Anguilla anguilla* L. (presa in mare), *Carassius auratus* L., allo stadio adulto, sono state fissate in acido osmico all'1%, tamponato a pH 7,2. L'inclusione è stata fatta in Vestopal, seguendo le tecniche usuali. Le sezioni sono state eseguite con l'ultramicrotomo LKB Ultratome, raccolte su griglie con membrana di Formvar rinforzata con un leggero strato di carbone, quindi colorate con acetato di uranile e con piombo, secondo le tecniche di Karnovsky (1961) e di Reynolds (1963). Le fotografie sono state eseguite con il microscopio elettronico Hitachi HS-7.

Sui medesimi preparati sono state fatte sezioni semifini (tra 0,3 e 0,5  $\mu$ ) per mezzo dell'ultramicrotomo Furieri. Esse sono state colorate con violetto di genziana e fucsina basica (Moore e coll. 1960) ovvero con blu di toluidina (Trump e coll., 1961).

#### STRUTTURA DELLA LAMELLA RESPIRATORIA.

Ogni foglietto branchiale porta su ciascuna delle sue facce una serie di lamelle secondarie o respiratorie: queste sono piccole lamine sottili, che misurano in genere 10-20  $\mu$  di spessore (Tav. I, fig. 3). Non si è notata alcuna

(\*) Lavoro eseguito nell'Istituto di Zoologia dell'Università di Milano dal Gruppo di Ricerca per l'Embriologia del C.N.R.

(\*\*) Nella seduta del 16 aprile 1966.

sensibile differenza anche a livello ultrastrutturale, tra le lamine respiratorie delle specie prese in esame, che comprendono sia Selaci che Teleostei e tra questi forme sia di acqua salata che dolce, quindi sembra possibile, in base ai risultati ottenuti, descrivere i caratteri morfologici di una lamella tipo.

La lamella secondaria è costituita da un rivestimento epiteliale e da un asse vascolare (Tav. I, fig. 1). L'epitelio appare bistratificato contrariamente a quanto fino ad oggi si credeva (vedi ad esempio Acrivo, Battaglini e Boni 1964), sulla base di ricerche eseguite al microscopio ottico (Tav. I, figg. 1 e 2; Tav. II, fig. 6).

Poiché un epitelio respiratorio deve essere il più possibile sottile in quanto non deve essere di ostacolo agli scambi gassosi (vedi ad esempio l'epitelio degli alveoli polmonari, tipicamente monostratificato e costituito da lamine sottilissime, Karrer 1958) abbiamo voluto controllare se effettivamente l'aspetto bistratificato corrispondesse ad una reale situazione, ovvero se fosse la conseguenza di una sovrapposizione parziale di lembi citoplasmatici. Quest'ultimo fenomeno si verifica con frequenza per cui è possibile osservare limitate zone in cui si possono mettere in evidenza anche tre lamine citoplasmatiche sovrapposte. Tuttavia i nuclei delle cellule epiteliali appaiono chiaramente disposti su due file (Tav. I, fig. 1; Tav. II, fig. 6) e questa constatazione sembra indicare una effettiva duplicità dell'epitelio branchiale; in particolare i nuclei dell'assisa inferiore sono localizzati in genere in corrispondenza dei corpi delle cellule di Bietrix, ove cioè l'asse vascolare forma delle depressioni sulla sua superficie esterna (Tav. I, fig. 1; Tav. II, fig. 6). Inoltre le cellule dei due strati possono essere distinte anche sulla base di taluni caratteri citoplasmatici. Nelle cellule della assisa superiore il citoplasma appare più denso agli elettroni (Tav. III, fig. 9) e più ricco di organuli; soprattutto il condrioma e l'apparato di Golgi mostrano un notevole sviluppo (Tav. I, fig. 2; Tav. III, fig. 10). Secondo Menefee (1957) la presenza di apparati di Golgi molto sviluppati nelle cellule epiteliali sarebbe da ricondurre alla necessità di svolgere un lavoro osmotico: è evidente l'importanza di una tale possibilità in cellule di rivestimento delle branchie. Nelle cellule dello strato inferiore il citoplasma è decisamente più povero di organuli e più trasparente agli elettroni.

È anche possibile escludere che lo strato più profondo di cellule sia costituito da fibrociti, o comunque da cellule di natura connettivale responsabili della formazione di una lamina basale costituita da fibrille collagene, descritta dagli Autori che hanno compiuto le loro osservazioni per mezzo del microscopio ottico. I due strati di cellule infatti non sono separati tra di loro per mezzo di una membrana basale (che tipicamente si trova al di sotto di tutti gli epiteli), mentre quest'ultima è presente tra l'asse vascolare e lo strato cellulare profondo (Tav. II, figg. 5 e 6). È bene precisare che per membrana basale intendiamo quel sottile strato di materiale omogeneo, e comunque non formato da fibrille collagene, che al microscopio elettronico si trova al disotto degli epiteli. Inoltre le cellule delle due assise presentano ampie zone di contatto, e pure frequenti sono i desmosomi (Tav. III, figg. 8, 9 e 10). È noto che questi ultimi si possono osservare solo in cellule del medesimo tessuto, e sono tipici

degli epitelii. Per tale motivo pensiamo che i due strati cellulari esterni all'asse vascolare siano entrambi di natura epiteliale.

Le cellule dei due tipi sono molto appiattite, con nucleo allungato secondo l'asse della lamella; quelle esterne hanno la superficie libera caratterizzata da brevi e tozzi microvilli, e sono rivestite da un sottile strato di materiale costituito da esilissimi filamenti di modesta densità elettronica (Tav. I, fig. 2; Tav. IV, figg. 12 e 13). È presumibile che si tratti di un velo protettivo mucopolisaccaridico, secreto dalle cellule mucipare.

Alla base della lamella l'epitelio è chiaramente pluristratificato (Tav. II, figg. 4 e 7), in quanto tra le due assise cellulari, che sono state descritte, si interpongono numerose cellule poliedriche ed a mutuo contatto. Queste non sembrano ordinate in file regolari e presentano un aspetto oltremodo polimorfo. In alcune il citoplasma appare ricco di ribosomi, raggruppati in rosette di tipo polisomiale, di elementi del reticolo endoplasmatico prevalentemente di tipo liscio e di mitocondri. Altre hanno un aspetto abbastanza simile a quello delle cellule a cloruri, che sono particolarmente numerose a livello delle pieghe tra le lamelle: è verosimile quindi che si tratti di cellule che si stanno differenziando.

Esistono infine delle cellule che presentano dei tipici corpi di degenerazione mielinica (Tav. II, fig. 4) ovvero corpi di aspetto vario, delimitati da una membrana, e contenenti del materiale di alta densità elettronica, e strutture diverse, quali vescicole e tubuli. Il loro aspetto è molto simile a quello descritto in corpi presenti in stadi precoci dell'oogenesi degli Anfibi (Lanzavecchia, 1966) e dei Pesci (Facchini Pajetta, 1966) ed interpretati quali corpi di segregazione del tipo dei lisosomi. Si tratterebbe in altri termini di cellule adibite alla demolizione di sostanze cataboliche prodotte nelle branchie. Quale ipotesi alternativa, che tuttavia non può essere per il momento dimostrata, si può proporre una analogia tra queste cellule e le « dust cells » degli alveoli polmonari, produttrici di sostanze batotone. In definitiva l'epitelio che ricopre le lamelle respiratorie delle branchie appare identico a quello che riveste il corpo delle larve dei Pesci, anch'esso bistratificato, e formato da due tipi cellulari con caratteristiche uguali a quelle ora descritte per l'epitelio branchiale. In entrambi i casi infine sono presenti cellule mucipare, che secernono le sostanze mucopolisaccaridiche che formano un rivestimento mucoso sulla superficie corporea.

L'unica differenza consiste in un appiattimento dell'epitelio branchiale le cui cellule risultano laminari invece che pressapoco cubiche, come si verifica nel resto del corpo (ovviamente delle larve, dato che nell'adulto l'epitelio è pluristratificato). Curiosamente tale situazione è simile a quella che si osserva nelle larve degli Anfibi, ove l'epitelio dei filamenti delle branchie è anche esso bistratificato, analogamente a quanto si verifica nel resto del corpo. Si può prospettare l'ipotesi che gli epitelii respiratori presentino caratteristiche uguali a quelle dell'organo (nella larva o nell'embrione) da cui sono derivati. Così ad esempio l'epitelio degli alveoli polmonari appare monostratificato, derivando da quello del tubo digerente dell'embrione, che presenta le mede-

sime caratteristiche; naturalmente non teniamo in considerazione l'ipotesi, ancor di recente avanzata (Bertalanffy, 1964), di una possibile derivazione mesenchimatica di detto epitelio.

#### CELLULE EPITELIALI A FUNZIONE PARTICOLARE.

Tra le cellule aventi funzione di rivestimento sono stati osservati due tipi particolari di cellule a funzione diversa: le cellule mucipare e le cellule a cloruri (Tav. I, fig. 3; Tav. IV, fig. 11).

*Le cellule mucipare* sono localizzate in prevalenza all'apice e alla base della lamella, mentre di rado è possibile osservarne lungo i bordi.

Nell'*Anguilla* esse sono molto numerose e talvolta formano delle serie continue tra le cellule di rivestimento nella zona interposta tra una lamella e quella successiva. Raramente per contro sono localizzate nella regione apicale. In *Salmo iredeus* le cellule mucipare sono meno numerose e presentano una disposizione più regolare. Infine esse sono scarsissime in *Scyliorhinus*. Le cellule mucipare sono voluminose, presentano un reticolo endoplasmatico ruvido molto sviluppato, costituito da citomembrane ad andamento parallelo, disposte a coppa nella zona basale della cellula, dove è pure localizzato il nucleo e l'apparato di Golgi particolarmente sviluppato. Nella parte centrale e distale il citoplasma è occupato da grossi vacuoli a mutuo contatto, ripieni di una sostanza omogenea, finemente fibrillare e trasparente agli elettroni, di probabile natura mucopolisaccaridica. L'attività di queste cellule pare continua e si manifesta con una ininterrotta formazione delle vescicole di secreto a livello dell'apparato di Golgi, e una successiva migrazione delle stesse verso la superficie cellulare esterna. Tale ipotesi sembra potersi dedurre dal fatto che non sono mai state osservate cellule in fase di svuotamento o di riempimento di secreto.

*Le cellule a cloruri.* - Considerazioni di ordine fisiologico inducono a sostenere che le branchie esercitino un attivo controllo sulla regolazione osmotica (Key e Willmer, 1932), mediante la secrezione di sali contro il gradiente del mezzo esterno, nel caso di Pesci di mare, e un assorbimento di sali contro il gradiente interno, nel caso di Pesci d'acqua dolce. Key e Willmer in uno studio istologico sull'epitelio branchiale, identificano un tipo di cellule che ritengono responsabili di una attiva secrezione di sali. Essi descrivono queste cellule come voluminose, ricche di granuli ed eosinofile, localizzate tra il circolo sanguigno e l'ambiente esterno, quindi in una posizione ottimale per adempiere una funzione osmoregolatrice. Pettengill e Copeland (1948) attribuiscono alle cellule a cloruri un duplice ruolo: di assorbimento e di escrezione. Questo particolare tipo di cellule è stato ultimamente oggetto di studio al microscopio elettronico da parte di numerosi ricercatori (Doyle, 1960; Kessel e Beams, 1962; Doyle e Gorecki, 1961; Phillipott, 1963). Questi Autori descrivono le cellule a cloruri come elementi aventi caratteri strutturali ben definiti: numerosi mitocondri e un reticolo endoplasmatico liscio molto sviluppato.

Nella presente ricerca si è osservato che le cellule a cloruri hanno una localizzazione e una distribuzione abbastanza simile, nelle specie prese in esame. Queste cellule si trovano alla base della lamella respiratoria: quindi tra le cellule dell'epitelio pluristratificato del corpo del foglietto. La loro forma allungata risulta talora modificata per la pressione esercitata dalle cellule adiacenti. Le cellule a cloruri possono essere isolate tra le cellule epiteliali o unite a gruppi di 2-4 elementi (Tav. III, figg. 8 e 9).

Queste sono facilmente riconoscibili per il grande numero di mitocondri, e per la presenza di un reticolo endoplasmatico liscio del tutto caratteristico, formato da un insieme di tubuli sottili, variamente orientati e parzialmente anastomizzati a costituire un sistema tridimensionale (Tav. IV, figg. 12 e 13). Tra questi tubuli si osservano rari elementi del reticolo endoplasmatico ruvido e ribosomi liberi. L'apparato di Golgi, in posizione soprannucleare, ha dimensioni variabili, ma generalmente assume uno sviluppo ridotto, contrariamente a quanto si osserva in normali cellule a funzione secernente.

In prossimità della membrana apicale, che appare frastagliata, si osservano numerose vescicole che per il loro aspetto sembrano doversi interpretare quali vescicole di pinocitosi: il loro significato non può essere spiegato con sicurezza (Tav. IV, fig. 13).

È verosimile che il processo di secrezione dei cloruri avvenga sotto il controllo del sistema tubulare del reticolo endoplasmatico, in analogia a quanto sostenuto da Sedar (1961) per le cellule oxintiche della mucosa gastrica, le quali hanno una funzione simile a quella delle cellule a cloruri, essendo deputate anche esse alla secrezione di ioni.

L'osservazione di altri tipi di cellule implicate nel processo di secrezione o di trasporto di sali mostra tuttavia delle notevoli differenze ultrastrutturali rispetto alle cellule a cloruri dei Pesci. In particolare sia le cellule dei tubuli renali, sia quelle delle ghiandole del sale che si trovano nelle narici degli Uccelli marini (Doyle, 1960; Komnick, 1965), sia quelle delle papille anali di certi Insetti (Baccetti, 1962; Copeland, 1964), sono caratterizzate da un comune sistema di introflessioni della membrana cellulare alla base delle cellule stesse, mentre non sembra svilupparsi un reticolo endoplasmatico liscio tubulare. Secondo le osservazioni di Copeland (1964) tuttavia è possibile intravedere una analogia funzionale tra le cellule a cloruri delle branchie dei Pesci e quelle delle papille anali di zanzara (*Culex quinquefasciatus*), e quindi con gli altri tipi di cellule che secernono sali (o acidi). « *The canalicoli (observed in the Mosquito epithelial cells) might be observed analogous, if not homologous, with the crypt observed in the chloride cell of fish gills. If it is postulated that a protected surface is essential for the secretion of salt (or acids), then the comparison is valid on the basis of functional morphology, i.e.; the cellular indentation take different forms but serve the same end* » (Copeland pp. 253, 1964).

## LAVORI CITATI.

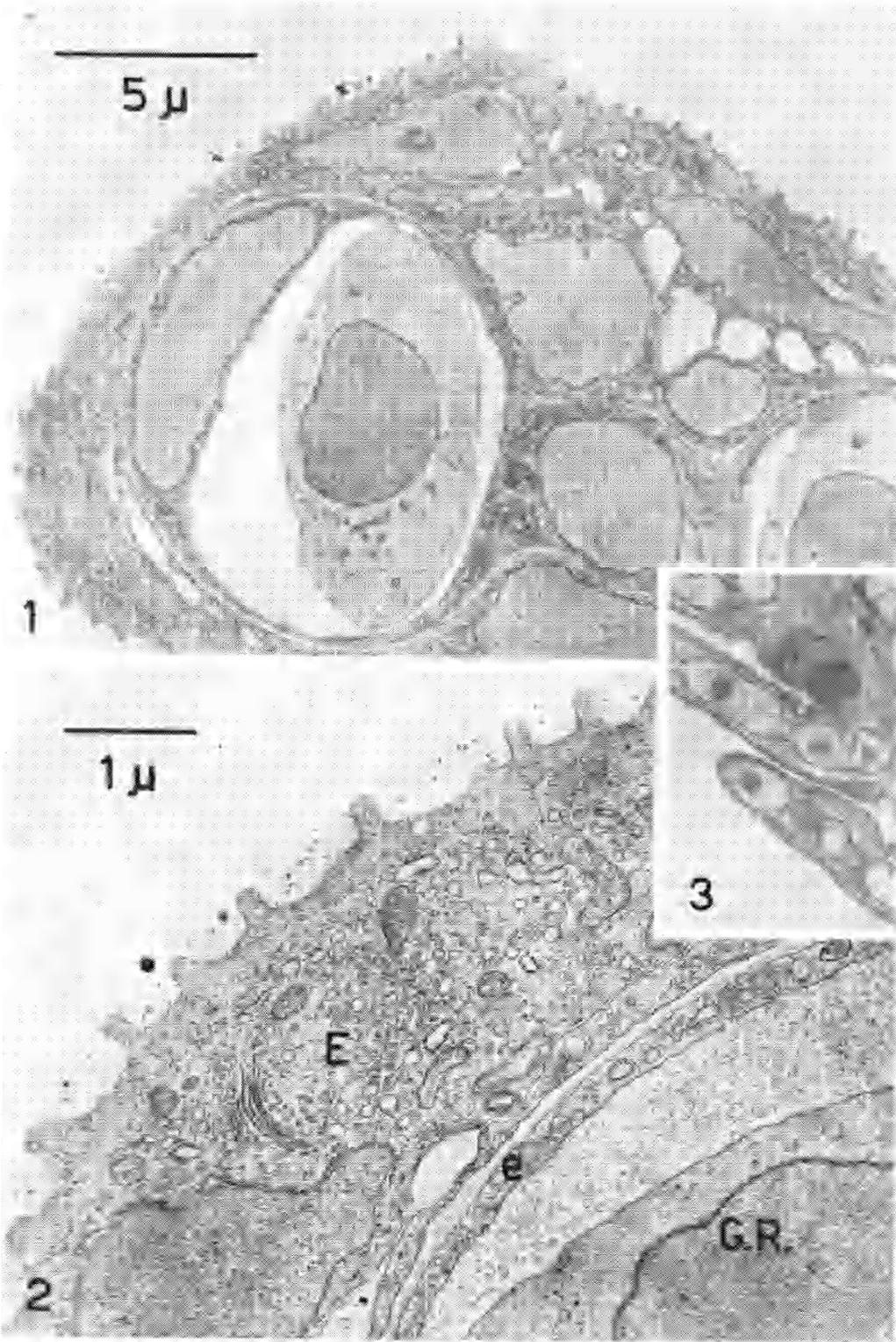
- C. ACRIVO, « Zool. Anz. », 114, 101 (1936).  
 B. BACCETTI, « Redia », 47, 105 (1962).  
 P. BATTAGLINI e P. BONI, « Arch. Zool. Ital. », 49, 301 (1964).  
 F. D. BERTALANFFY, « Intern. Rev. Cytol. », 17, 213 (1964).  
 E. BIETRIX, *Étude de quelques faits relatifs à la morphologie du système circulatoire à propos du réseau branchial des Poissons*, Thèse Masson, Paris, 54 pp. (1895).  
 D. COPELAND, « J. Cell Biol. », 23, 253 (1964).  
 W. L. DOYLE, « Anat. Rec. », 136, 184 (1960).  
 W. L. DOYLE, « Exp. Cell Res. », 21, 386 (1960).  
 W. L. DOYLE e D. GORECKI, « Physiol. Zool. », 34, 81 (1961).  
 E. FACCHINI PAJETTA, *Atti V Congr. Ital. Micr. Elettr.*, Bologna (1966), in corso di stampa.  
 M. J. KARNOWSKY, « J. Biophys. Biochem. Cytol. », 2, 729 (1961).  
 M. D. KARRER, « J. Biophys. Biochem. Cytol. », 2, 4 (1958).  
 R. G. KESSEL e H. W. BEAMS, « J. Ultrastructure Research », 6, 77 (1962).  
 A. KEY e E. N. WILLMER, « J. Physiol. », 76, 368 (1932).  
 K. KOMNICK, *Organization der Zelle in Sekretion und Exkretion*, Berlin (1965).  
 G. LANZAVECCHIA, « Atti Accad. Lincei, Cl. Sc. fisiche, Memorie », in corso di stampa.  
 M. G. MENEFEE, « J. Ultrastructure Research », 1, 49 (1957).  
 R. D. MOORE, V. MUMAW e M. D. SCHOENBERG, « J. Ultrastructure Research », 4, 113 (1960).  
 O. PETTENGILL e D. COPELAND, « J. Exp. Zool. », 108, 235 (1948).  
 W. PHILLPOTT e D. COPELAND, « J. Cell Biol. », 18, 389 (1963).  
 M. PLEHN, « Zool. Anz. », 24, 439 (1901).  
 E. REYNOLDS, « J. Cell Biol. », 17, 208 (1963).  
 A. W. SEDAR, « J. Biophys. Biochem. Cytol. », 9, 1 (1961).  
 B. F. TRUMP, E. A. SMUCKLER e E. P. BENDITT, « J. Ultrastructure Research », 5, 343 (1961).  
 L. VIALETTEON, *Éléments de Morphologie de Vertébrés*, Doin, Paris 1911.

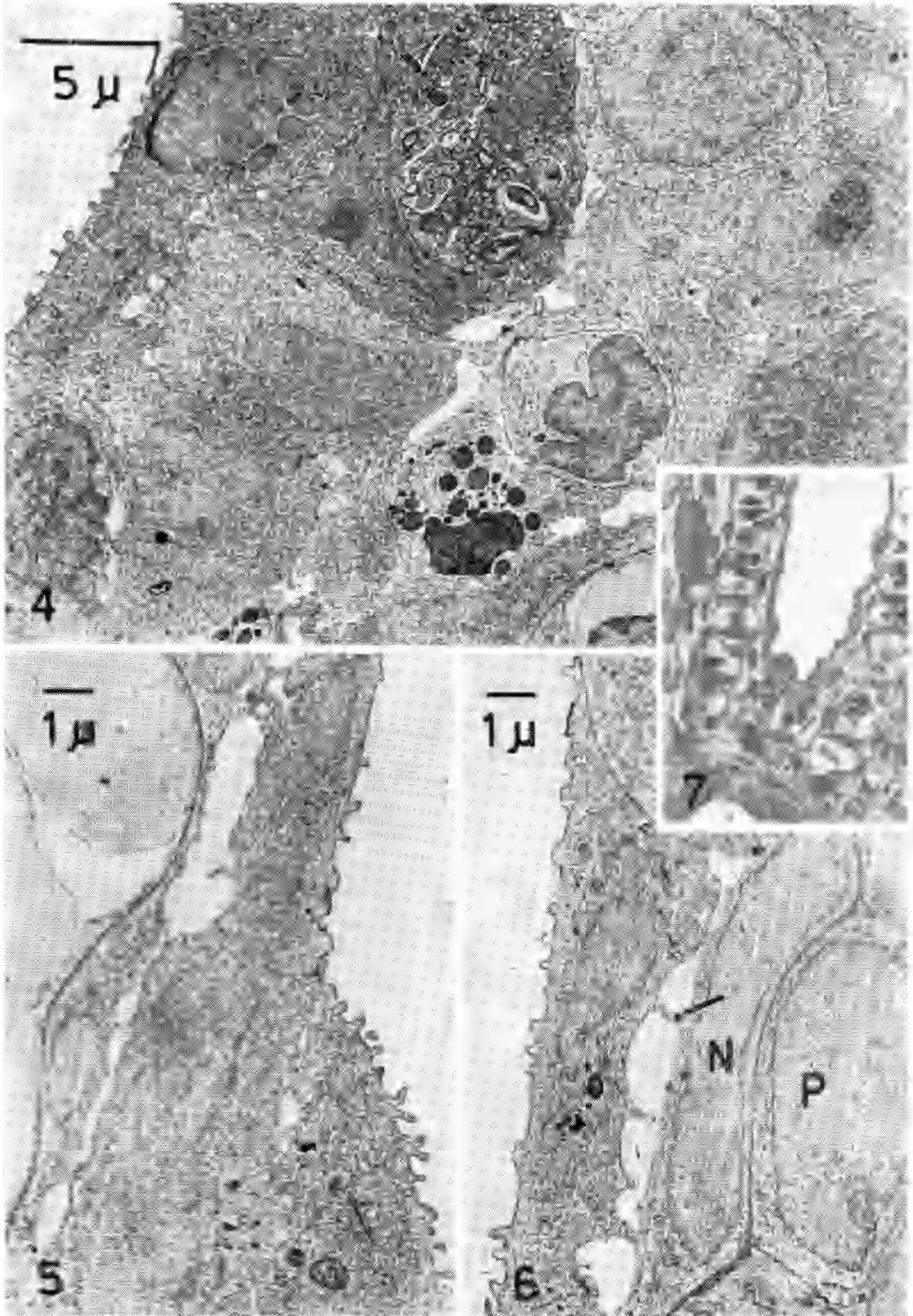
## SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE I-IV

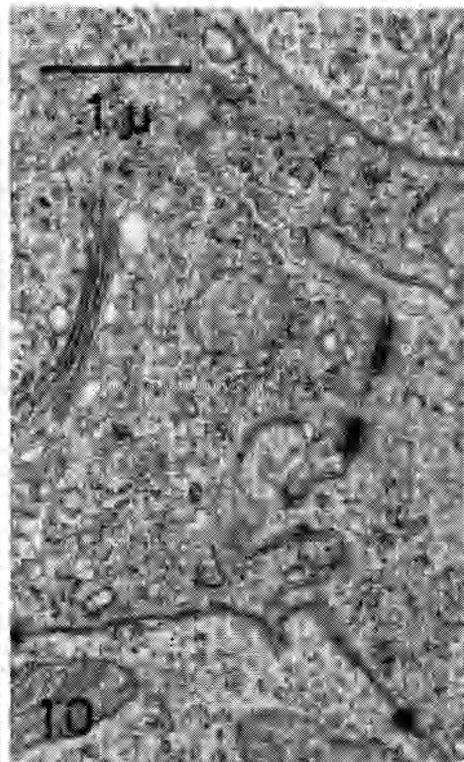
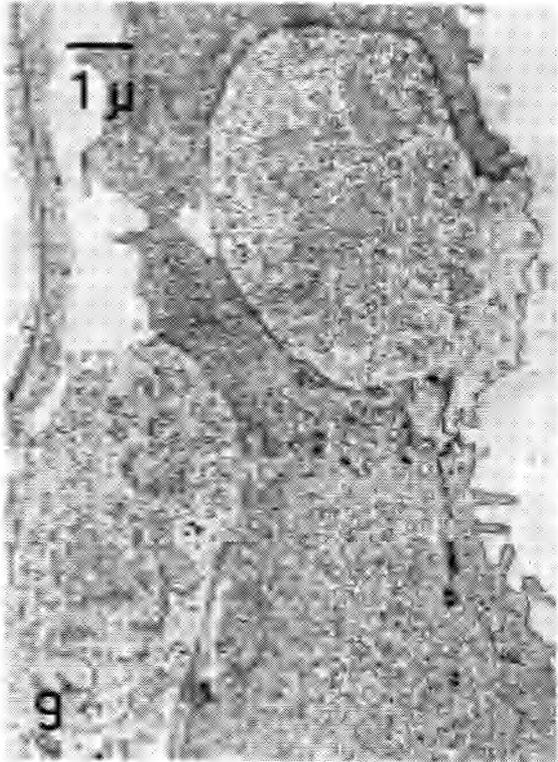
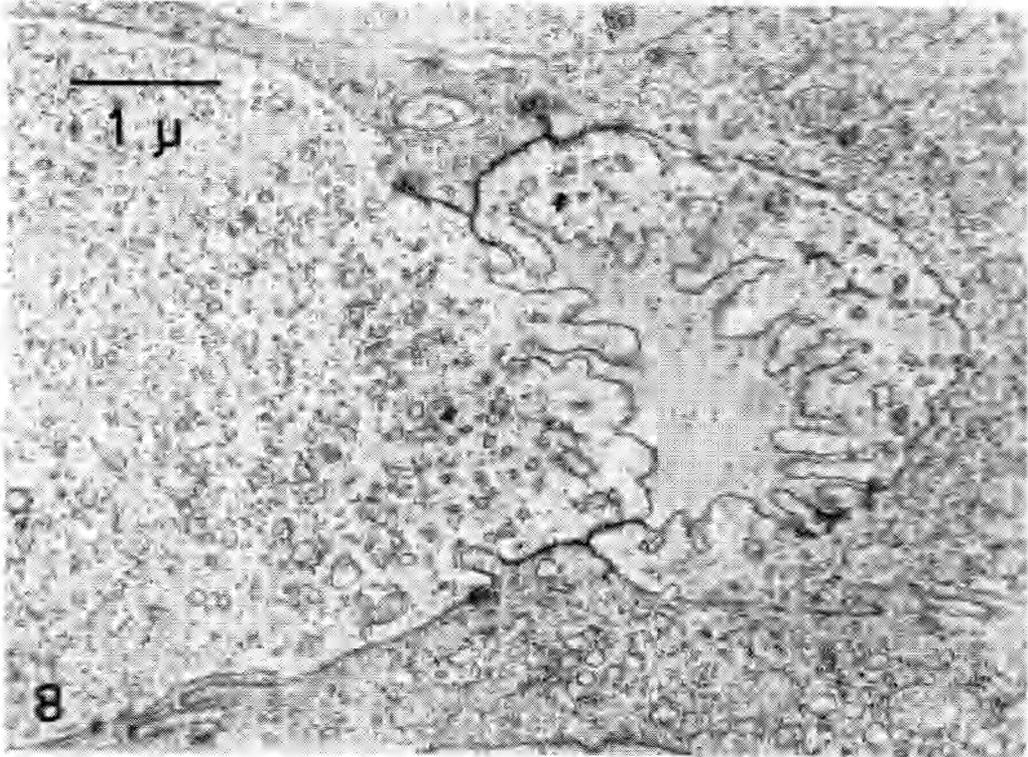
## TAVOLA I.

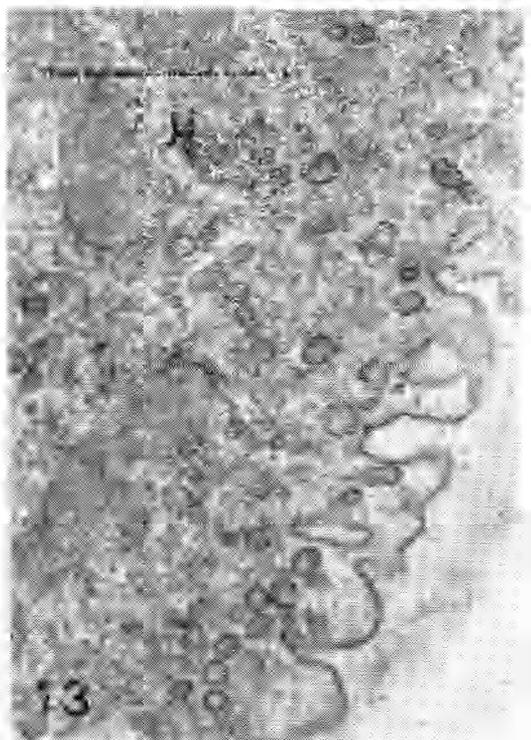
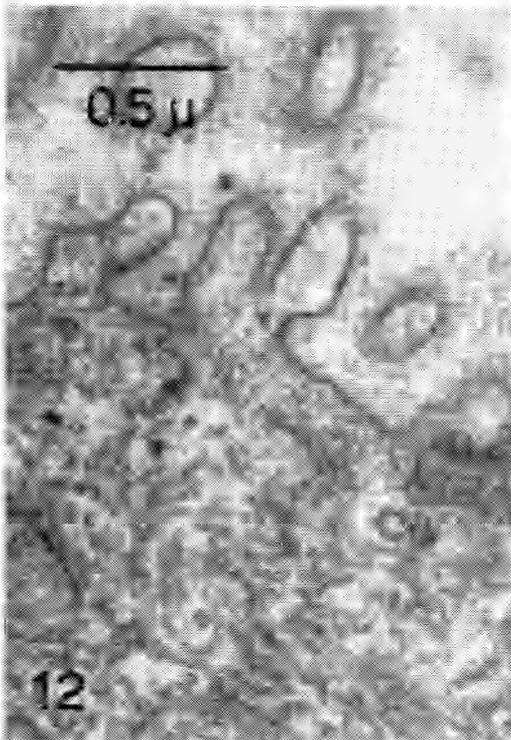
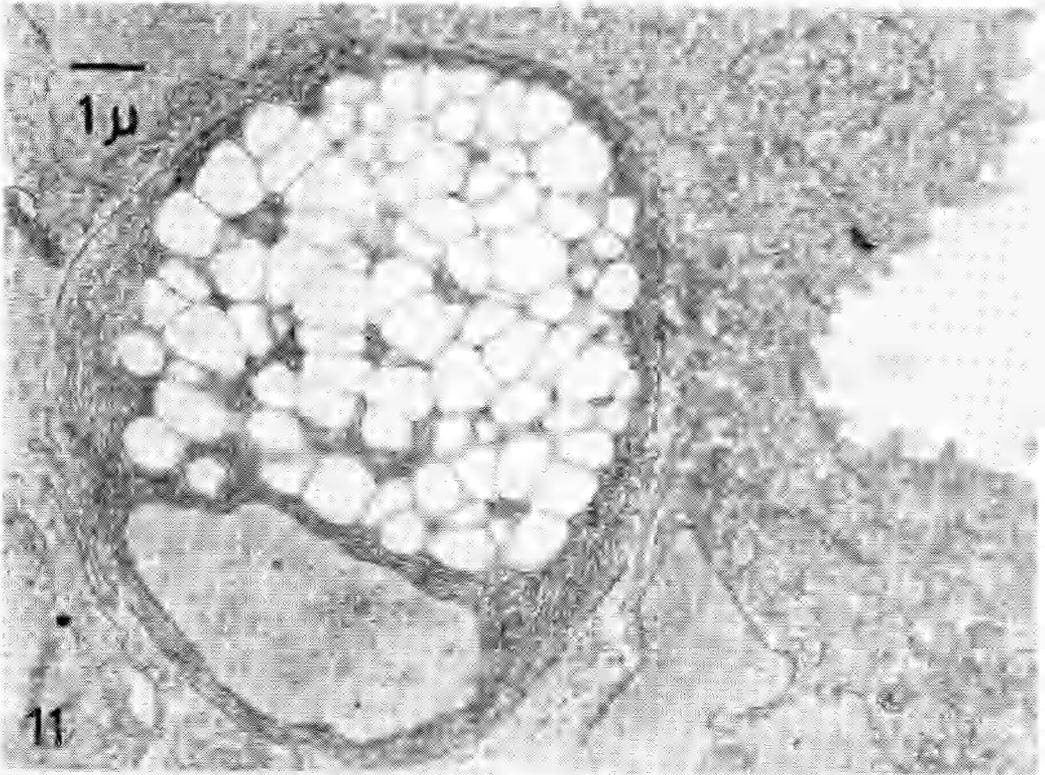
(vedere il paragrafo MATERIALE E METODI per le note tecniche generali)

- Fig. 1. - Apice di una lamella respiratoria, in sezione longitudinale. Sono chiaramente visibili i due strati cellulari che costituiscono l'epitelio e l'asse vascolare.  $\times 6.000$ .
- Fig. 2. - Particolare dell'epitelio di rivestimento delle lamelle respiratorie che appare chiaramente bistratificato (E = epitelio; e = endotelio; G.R. = globulo rosso).  $\times 19.000$ .
- Fig. 3. - Fotografia eseguita al microscopio ottico di sezione semifine. Sezione longitudinale. È possibile vedere una lamella in toto e la localizzazione delle cellule mucipare nel punto di inserzione delle lamelle sul foglietto.  $\times 700$ .









## TAVOLA II.

- Fig. 4. — Sezione condotta nella zona basale delle lamelle: l'epitelio è chiaramente pluristratificato. Sono visibili i diversi tipi di cellule che lo compongono.  $\times 4.000$ .
- Fig. 5. — Zona dell'epitelio di rivestimento in prossimità del punto di inserzione della lamella sul foglietto in cui cominciano ad apparire tre strati cellulari sovrapposti.  $\times 7.000$ .
- Fig. 6. — Le due assise cellulari rivelano punti di contatto con desmosomi ( $\uparrow$ ). Il nucleo (N) della cellula epiteliale dello strato inferiore è addossato ad un pilastro (P) dell'asse vascolare.  $\times 7.000$ .
- Fig. 7. — Fotografia eseguita al microscopio ottico di sezione semifine. Chiaramente visibile l'epitelio pluristratificato a livello della piega tra le due lamelle successive.

## TAVOLA III.

- Fig. 8. — Sezione obliqua alla superficie epiteliale, nella zona basale tra due lamelle respiratorie. Sono visibili gli apici di due cellule a cloruri, circondate da cellule epiteliali a citoplasma di maggiore densità elettronica. Si osservano alcuni desmosomi nella zona di contatto tra i due tipi cellulari.  $\times 19.000$ .
- Fig. 9. — Cellule a cloruri racchiuse tra due cellule epiteliali. L'apice sporge rispetto alle cellule adiacenti ed è rivestito da un denso strato mucoso. È chiaramente visibile la diversa densità elettronica delle cellule dello strato superiore ed inferiore.  $\times 8.800$ .
- Fig. 10. — Aspetto delle giunzioni tra due cellule. Al centro desmosomi tra due cellule epiteliali, in basso desmosomi tra due cellule epiteliali e una cellula a cloruri.  $\times 19.000$ .

## TAVOLA IV.

- Fig. 11. — Cellula mucipara. All'interno si osservano numerosi vacuoli ripieni di una sostanza molto trasparente agli elettroni di probabile natura mucopolisaccaridica. Alla base della cellula è ben visibile il nucleo e le lamine dell'ergastoplasma foggiate a coppa.  $\times 8.800$ .
- Fig. 12. — Particolare ingrandito della zona apicale di una cellula a cloruri. Sono visibili i tubuli del reticolo endoplasmico liscio.  $\times 44.000$ .
- Fig. 13. — Particolare della zona apicale di una cellula a cloruri: il margine appare assai frastagliato e sono visibili numerose vescicole, verosimilmente di tipo pinocitotico, ed il caratteristico reticolo tubulare liscio.  $\times 32.000$ .