Atti Accademia Nazionale dei Lincei

Classe Scienze Fisiche Matematiche Naturali

Rendiconti

Lucia Ceresa Castellani, Vincenzo G. Leone

Osservazioni preliminari al microscopio elettronico sugli elementi dell'eritropoiesi primitiva nell'embrione di pollo

Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. **41** (1966), n.5, p. 386–391.

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1966_8_41_5_386_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/

Zoologia. — *Osservazioni preliminari al microscopio elettronico sugli elementi dell'eritropoiesi primitiva nell'embrione di pollo.* Nota (*) di LUCIA CERESA CASTELLANI e VINCENZO G. LEONE, presentata (**) dal Corrisp. S. RANZI.

SUMMARY. — The ultrastructural characteristics of the emocytoblast, of the basophilic, polichromatophilic and acidophilic erythroblasts and of the eritrocyte of the primitive emopoietic series in the chick embryo are described. Particularly emphasized are the aspects of the pentameric polysomes, supposed to be linked with hemoglobin synthesis, and of the ferritine aggregates in the cytoplasm of the erythroblast and eritrocyte.

L'origine e lo sviluppo delle cellule del sangue negli embrioni di Vertebrati sono stati oggetto di numerose ricerche (Bremer, 1962; Wilt, 1965; Baglioni, 1966. Una completa rassegna bibliografica fino al 1960 si trova in Romanoff, 1960).

Osservazioni al microscopio elettronico sulla emopoiesi embrionale sono numerose per i mammiferi (Grasso, Swift e Ackerman, 1962; Sorenson, 1960, 1961), mentre sono scarse per quanto riguarda gli uccelli (Cattaneo, 1963) (1).

Negli embrioni di pollo, così come in embrioni di mammiferi, sono state descritte due serie di cellule rosse (Romanoff, 1960); la prima serie, detta primitiva, è formata da cellule più grandi di quelle della serie definitiva; al secondo giorno di incubazione, inizia la differenziazione delle cellule eritroidi, appare il proeritroblasto che, maturando, diviene eritroblasto basofilo, eritroblasto policromatofilo, eritroblasto acidofilo e finalmente, al quinto giorno, eritrocita.

Dal quarto al settimo giorno inizia la produzione delle cellule rosse della serie definitiva, che sono in generale più piccole e più ovali.

Nella presente Nota vengono descritti gli aspetti, rilevati al microscopio elettronico, delle cellule della serie primitiva eritrocitica negli embrioni di pollo.

Le osservazioni sono state eseguite sugli isolotti sanguigni del sacco del tuorlo, che nella prima metà del periodo di incubazione è l'organo principale della emopoiesi, e sul sangue circolante di embrioni nei primi cinque giorni di incubazione.

(*) Laboratorio di Embriologia e Morfologia Sperimentale dell'Università Statale di Milano. (Gruppo Ricerca per l'Embriologia del C.N.R.).

(**) Nella seduta del 12 novembre 1966.

(1) Durante la correzione delle bozze siamo venuti a conoscenza del lavoro di R. H. EDMONDS, *Electron microscopy of erythropoiesis in the avian jolk sac*, pubblicato su «Anat. Rec.», 1966.

MATERIALI E METODI.

Embrioni di pollo, dallo stadio di un somite (questo riferimento è più sicuro di quello cronologico in ore) fino a cinque giorni di incubazione, sono stati prefissati, in toto o in piccoli pezzi, in glutaraldeide (Sabatini e coll., 1963) al 3 % per la durata di due ore e poi fissati per un'ora in acido osmico all'1 %, tamponato a pH 7,4 (Millonig, 1962).

L'inclusione è stata fatta in Vestopal W.

Di questi embrioni sono stati esaminati il sacco del tuorlo, i vasi e il cuore. Le sezioni sono state eseguite con l'ultramicrotomo LKB Ultrotome, colorate con acetato di uranile e con citrato di piombo (Reynolds, 1963) e sono state osservate al microscopio elettronico Hitachi HS–7.

Sugli stessi preparati sono state eseguite sezioni semifini di spessore variabile da 0,3 a 0,8 μ; queste sezioni sono state colorate con violetto di genziana e fuxina basica (Moore e coll., 1960) o con bleu di toluidina (Trump e coll., 1961).

OSSERVAZIONI.

Al microscopio ottico sono state osservate le isole sanguigne del sacco del tuorlo (Tav. I, fig. 1); alternando le sezioni semifini con sezioni ultrafini, è stato possibile localizzare esattamente le cellule da osservare al microscopio elettronico. Sono stati presi in esame i vari stadi di maturazione delle cellule rosse embrionali del pollo e, precisamente: emocitoblasto, eritroblasto basofilo, eritroblasto policromatofilo, eritroblasto acidofilo, eritrocita.

Emocitoblasto. – Il nucleo (Tav. I, fig. 2) è quasi sferico, con un nucleolo sempre molto grande. La cromatina ha una disposizione omogenea; presenta solo una fascia ispessita all'interno della membrana nucleare. Nel citoplasma i ribosomi liberi sono abbondantissimi, e solo in parte raggruppati a formare polisomi; il reticolo endoplasmico è piuttosto scarso. L'apparato di Golgi è poco sviluppato e costituisce un reperto raro; i mitocondri tendono a raggrupparsi alle estremità della cellula e hanno un aspetto abbastanza normale. Numerose connessioni si stabiliscono tra nucleo e citoplasma per la presenza di pori nucleari (Tav. I, fig. 2) e, secondo le vedute di Grasso (1962), essi permetterebbero attivi scambi nucleo–citoplasmatici che potrebbero essere messi in relazione con una precoce sintesi, nel nucleo, di emoglobina (Davies, 1961, O'Brien, 1960) o solo di globina (De–Carvalho, 1954), materiale che successivamente passerebbe nel citoplasma.

Eritroblasto basofilo. – Il nucleo (Tav. II, fig. 3) in questo tipo di cellula ha una forma ovale e non vi si nota, come nell'emocitoblasto, un grosso nucleolo; tale organulo infatti appare piuttosto frammentato e ridotto di volume.

La distribuzione della cromatina è ancora abbastanza omogenea, ma se ne intravede un iniziale addensamento in zolle; è anche qui presente la

fascia ispessita di cromatina lungo la membrana nucleare e sono sempre evidenti le connessioni tra nucleo e citoplasma. Nel citoplasma dell'eritroblasto basofilo i ribosomi, numerosissimi, sono per la maggior parte raggruppati a formare polisomi.

Come è noto (Warner, Rich e Hall, 1962; Goodman e Rich, 1963; Gierer, 1963; Burka e Marxs, 1964) i polisomi impegnati nella sintesi dell'emoglobina hanno in prevalenza organizzazione pentamera, benché siano numerose anche le forme a tetrameri e a esameri. La presenza e l'abbondanza di questi caratteristici raggruppamenti polisomici nel citoplasma dell'eritroblasto basofilo (Tav. II, fig. 5), ci fa ritenere pertanto che tale cellula sintetizzi attivamente emoglobina.

Si rinvengono tracce del reticolo endoplasmico, mentre l'apparato di Golgi non è mai stato osservato; i mitocondri sono raggruppati ai poli della cellula e si presentano con aspetto normale.

Eritroblasto policromatofilo. – Nel nucleo di questa cellula l'addensamento della cromatina, iniziato già allo stadio di eritroblasto basofilo, è evidente; il nucleolo è fortemente ridotto e non sempre è stato visto; nel citoplasma rimangono poche tracce di reticolo endoplasmico, i mitocondri sono molto diminuiti di numero e l'apparato di Golgi è del tutto assente.

Eritroblasto acidofilo. – Nel nucleo (Tav. II, fig. 4) la cromatina risulta notevolmente addensata in zolle e queste hanno disposizione grossolanamente radiata; per quanto riguarda il citoplasma, il reticolo endoplasmico è quasi del tutto scomparso; i mitocondri sono scarsi e in fase degenerativa e l'apparato di Golgi è completamente assente. Gli eritroblasti acidofili presentano un reperto non riscontrato nelle forme meno mature; compaiono cioè nel citoplasma di queste cellule degli ammassi di ferritina, alcuni dei quali circondati da una membrana, a formare dei tipici siderosomi, mentre altri sembrano sprovvisti di qualsiasi membrana.

Eritrocita. – Gli eritrociti appartenenti alla serie eritrocitica primitiva del sangue embrionale hanno una forma leggermente affusolata, nucleo ovale (Tav. II, fig. 6) e sulla membrana plasmatica sono visibili numerose vescicole di pinocitosi in formazione. La matrice citoplasmatica appare molto opaca agli elettroni e questo denota che l'emoglobina vi è già in elevata concentrazione; tuttavia i ribosomi, benché più scarsi che nelle cellule in stadio più precoce di maturazione, sono ancora abbastanza numerosi e sempre raggruppati (Tav. III, fig. 7) a formare i tipici polisomi, essenzialmente pentameri; tale dato ci sembra interessante in quanto indice di una persistenza della sintesi emoglobinica. Negli eritrociti il reticolo endoplasmico è del tutto assente e gli scarsi mitocondri sono in fase degenerativa. Sono ancora visibili (Tav. III, fig. 7) i pori tra nucleo e citoplasma, sebbene risultino più distanziati di quanto appaia negli eritroblasti. Anche nel citoplasma degli eritrociti è possibile trovare occasionalmente ammassi di ferritina con disposizione para-

cristallina delle molecole (Tav. III, figg. 8–9); queste ultime si trovano raramente isolate nel citoplasma, o all'interno di vescicole di pinocitosi (Tav. IV, fig. 10).

La ferritina è stata per ora individuata con sicurezza in eritroblasti e in eritrociti di embrioni al quinto giorno di incubazione; alcune immagini, tuttavia non interpretabili con altrettanta sicurezza, ne indicherebbero la presenza anche in un periodo anteriore; altre ricerche sono dirette a stabilire esattamente l'inizio della sintesi della ferritina.

Nel citoplasma degli eritrociti sono visibili molto spesso dei microtubuli (Tav. IV, fig. 12) riuniti in fasci di circa 20 elementi, a decorso parallelo tra di loro, disposti secondo i meridiani della cellula. Per tale motivo agli apici cellulari appaiono sempre sezionati trasversalmente (Tav. IV, fig. 11).

Con tutta probabilità i fasci da noi osservati corrispondono a ciò che gli autori di lingua inglese chiamano « marginal band », una struttura osservata negli eritrociti nucleati di pesci, anfibi, e uccelli fino dalla fine dell'800, col microscopio ottico.

La funzione di questi microtubuli, del diametro di circa 250 Å è ancora incerta; con i recenti metodi di fissazione per l'osservazione al microscopio elettronico ne è stata constatata la presenza in molti tipi cellulari, sia di piante che di animali ed è possibile, come sostiene de–Thé (1964), che essi siano un componente costante del citoplasma, avente significato di impalcatura di sostegno per il mantenimento della forma cellulare (Fawcett, 1959) oppure impegnato nel trasporto di fluidi (Slautterback, 1963; Sandborn, 1964) o, ancora più verosimilmente, interpretabile come una struttura contrattile legata ai movimenti citoplasmatici (Ledbetter e Porter, 1963).

LAVORI CITATI.

BAGLIONI C., *Ontogenesis of erythrocytes and hemoglobin formation*, « J. of Cell. Pysiol. », *67* suppl., 169 (1966).

BREMER H., *Untersuchungen über die Bildung von Differenzierungsmustern am Mesoderm der Hühnerkeimscheibe*, « Wilhelm Roux' Arch. Entwickl–Mech. Org. », *154*, 103 (1962).

BURKA E. R. e MARKS P. A., *Protein synthesis in erythroid cells*. II: *Polyribosomes function in intact reticulocytes*, « J. Mol. Biol. », *9*, 439 (1964).

CATTANEO L., *Sul mesoderma dell'area opaca del blastoderma di pollo e sulle prime sue differenziazioni*, « Arch. it. Anat. Embriol. », *68*, 99 (1963).

DAVIES H. G., *Structure in nucleated erythrocytes*, « J. Cell. Biol. », *9*, 671 (1961).

DE–CARVALHO S., *Estudos sobre a hemoglobinogenese no eritroblasto*, « Edicao da Gazeta med. », Lisboa, Portuguesa (1954).

DE–THÉ G., *Cytoplasmic microtubules in different animal cells*, « J. Cell. Biol. », *23*, 265 (1964).

FAWCETT D. W., *Electron microscopic observations on the marginal band of nucleated erythrocytes*, « Anat. Rec. », *133*, 379 (1959).

GIERER A., *Function of aggregated reticulocyte ribosomes in protein synthesis*, « J. Mol. Biol. », *6*, 148 (1963).

GOODMAN H. M. e RICH A., *Mechanism of polyribosome action during protein synthesis*, « Nature », *199*, 318 (1963).

GRASSO J., SWIFT H. e ACKERMAN G. A., *Observations on the development of erythrocytes in mammalian fetal liver*, « J. Cell. Biol. », *14*, 235 (1962).

LEDBETTER M. C. e PORTER K. R., *A « microtubule » in plant cell fine structure* », J. Cell. Biol. », *19*, 239 (1963).

MILLONIG G., Comunicazione personale.

MOORE R. D., MUMAW V. e SCHOENBERG M. D., *Optical microscopy of ultrathin tissue sections*, « J. Ultrastructure Research », *4*, 113 (1960).

O'BRIEN B. R. A., *The presence of haemoglobin within the nucleus of the embryonic chick erythroblast*, « Exp. Cell Research », *21*, 226 (1960).

REYNOLDS E., *The use of lead citrate at high* pH *as an electron-opaque stain in electron microscopy*, « J. Cell. Biol. », *17*, 208 (1963).

ROMANOFF A. L., *The avian embryo*, The Macmillan Company éd., New York, (1960).

SABATINI D. D., BENSCH K. e BARRNETT R. J., *Cytochemistry and electron microscopy. The preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehide fixation*, « J. Cell Biol. », *17*, 19 (1963).

SANDBORN E., KOEN P. F., MCNABB J. D. e MOORE G., *Cytoplasmic microtubules in mammalian cells*, « J. Ultrastructure Research », *11*, 123 (1964).

SLAUTTERBACK D. B., *Cytoplasmic microtubules*, « J. Cell. Biol. », *18*, 367 (1963).

SORENSON G. D., *An electron microscopic study of hematopoiesis in the liver of the fetal rabbit*, « American J. Anat. », *106*, 27 (1961).

SORENSON G. D., *An electron microscopic study of hematopoiesis in the yolk sac*, « Laborat. Invest. », *10*, 178 (1960).

TRUMP B. F., SMUCKLER E. A. e BENDITT E. P., *A method for staining epoxy sections for light microscopy*, « J. Ultrastructure Research », *5*, 343 (1961).

WARNER J. R., RICH A. e HALL C. E., *Electron microscope studies of ribosomal clusters synthesizing hemoglobin*, « Science », *138*, 1399 (1962).

WILT F. H., *Erythropoiesis in the chick embryo: the role of endoderm*, « Science », *147*, 1588 (1965).

SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE I–IV

TAVOLA I.

Fig. 1. – Sacco del tuorlo di embrione allo stadio di 8 somiti (fotografia al microscopio ottico di una sezione semifine). È chiaramente visibile, sopra l'entoderma (E), un isolotto sanguigno (S), costituito ancora da un ammasso cellulare solido. × 1000.

Fig. 2. – Emocitoblasto di un embrione allo stadio di primo somite; nel citoplasma si notano numerosissimi ribosomi e i mitocondri; questi ultimi sono raggruppati ad un'estremità della cellula. Sulla membrana nucleare si vedono i pori ed all'interno di essa una fascia ispessita di cromatina. × 16.000.

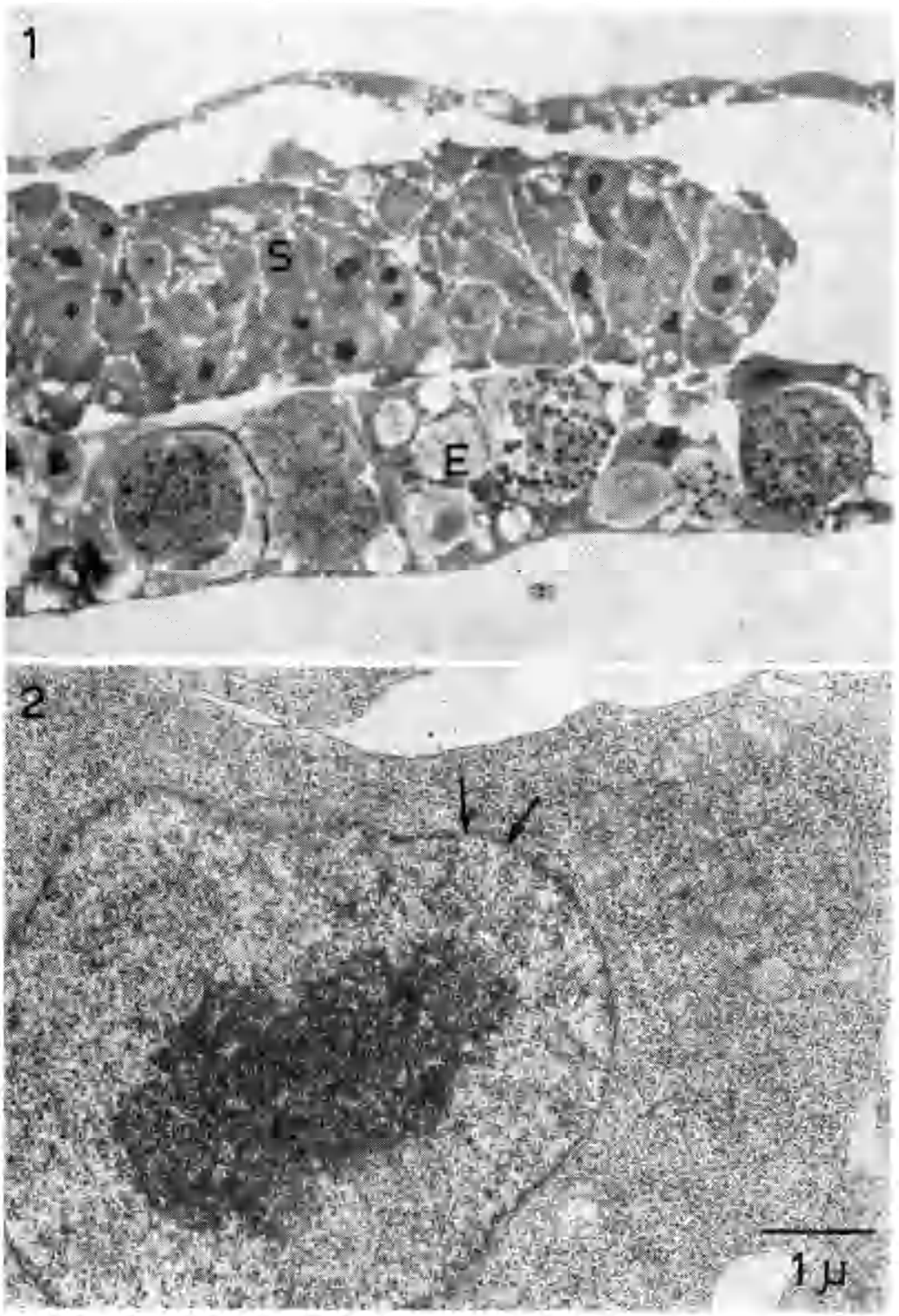
TAVOLA II.

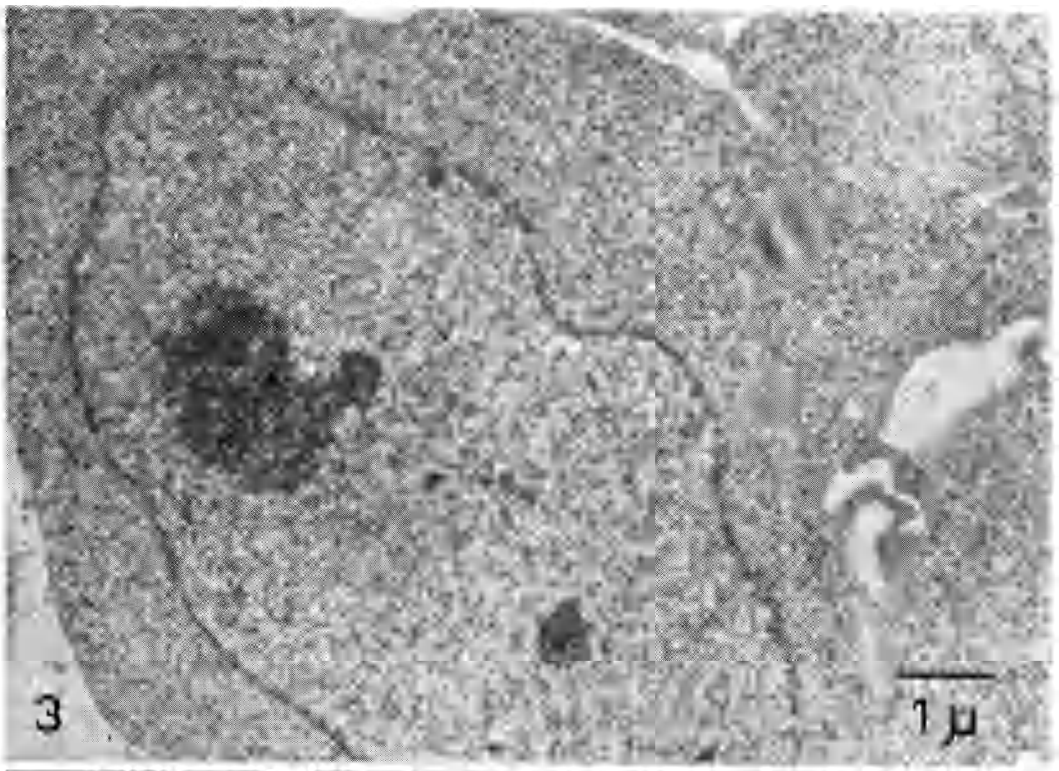
Fig. 3. – Eritroblasto basofilo (embrione allo stadio di 8 somiti); il nucleolo appare frazionato; nel citoplasma sono evidenti i raggruppamenti dei ribosomi in polisomi. × 13.000.

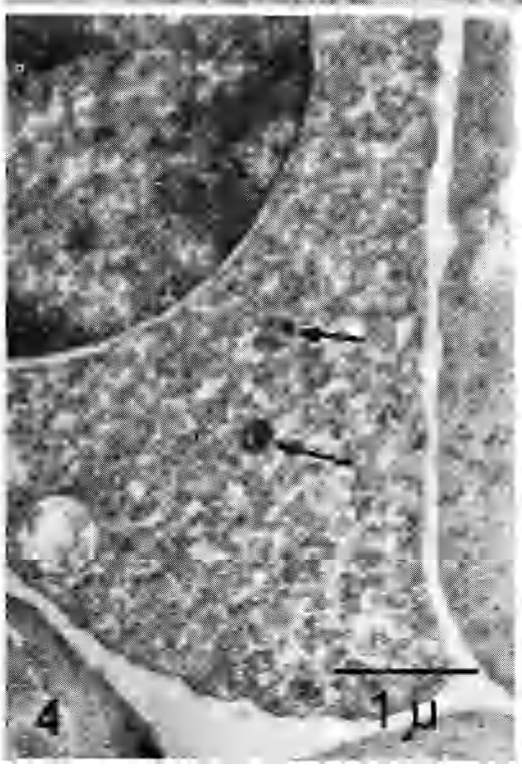
Fig. 4. – Eritoblasto acidofilo; nel nucleo la cromatina è addensata in zolle. Nel citoplasma si vedono ammassi di ferritina (↗) e un mitocondrio in fase degenerativa. × 19.000.

Fig. 5. – Particolare ingrandito della fig. 3; sono chiaramente visibili i tipici polisomi (pentameri e tetrameri). × 35.000.

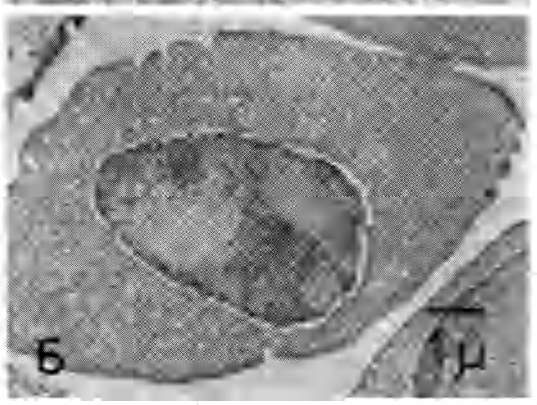
Fig. 6. – Eritrocita di un embrione al V giorno d'incubazione; la forma è affusolata e sulla membrana plasmatica si vedono vescicole di pinocitosi in formazione. × 7.500.

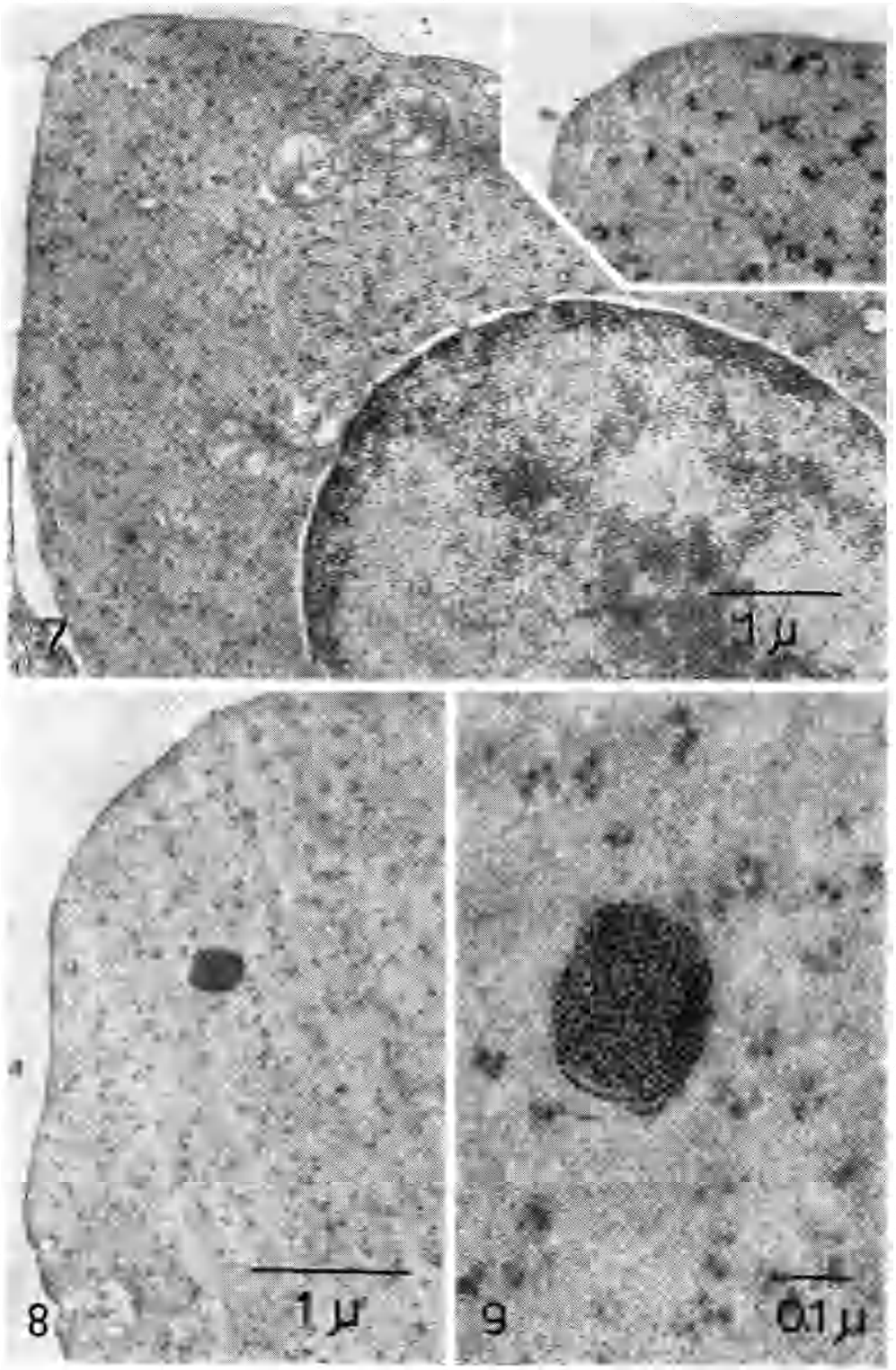

1
S
E
2
1 μ


3
1 µ


4
1 µ


5
0.5 µ


6
1 µ


7
1 μ
8
1 μ
9
0,1 μ

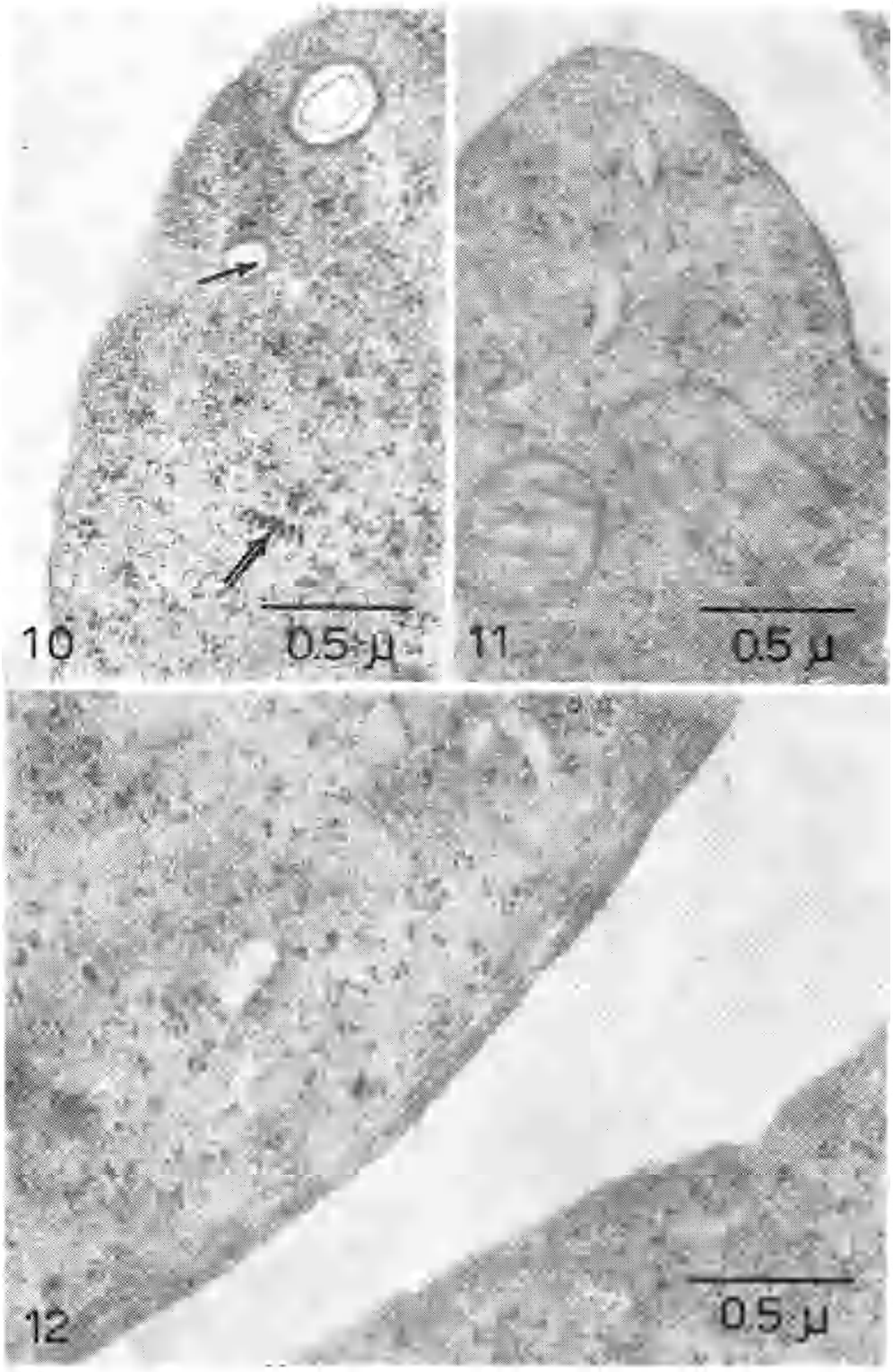

10
0.5 µ
11
0.5 µ
12
0.5 µ

TAVOLA III.

Fig. 7. – Eritrocita. Nel citoplasma sono evidenti i raggruppamenti ribosomici, prevalentemente a pentametro; si vedono mitocondri in degenerazione e, all'apice della cellula, un gruppo di microtubuli sezionati pressappoco trasversalmente. Nell'inserto in alto a destra essi sono raffigurati a più forte ingrandimento. Alcuni pori sono evidenti sulla membrana nucleare. × 19.000 – inserto × 47.000.

Fig. 8. – Aspetto del citoplasma di un eritrocita. Sono visibili numerosi complessi polisomici ed un siderosoma. × 28.000.

Fig. 9. – Particolare a forte ingrandimento della figura 8; è evidente la disposizione paracristallina delle molecole di ferritina all'interno del siderosoma. × 120.000.

TAVOLA IV.

Fig. 10. – Eritrocita. Alcune molecole di ferritina sono visibili, sia all'interno di una vescicola di pinocitosi (↗), che libere nel citoplasma. Oltre ai normali polisomi (pentameri e tetrameri) se ne vede uno con disposizione elicoidale (⇒). × 55.000.

Fig. 11. – Particolare di un eritrocita, al cui apice si vedono i microtubuli tagliati trasversalmente. × 55.000.

Fig. 12. – Gruppo di microtubuli a decorso parallelo al piano della sezione ed alla parete della cellula in un eritrocita. × 47.000.