
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

ALBERTO STEFANELLI, ANNA MARIA ZACCHEI, SILVIA
CARAVITA, EMILIA CATALDI, LUISANNA IERADI

**Differenziamento di fotorecettori di pollo in
riaggregati coltivati in vitro**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 42 (1967), n.5, p. 594–597.*
Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1967_8_42_5_594_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. — *Differenziamento di fotorecettori di pollo in riaggregati coltivati in vitro* (*). Nota di ALBERTO STEFANELLI, ANNA MARIA ZACCHEI, SILVIA CARAVITA, EMILIA CATALDI e LUISANNA IERADI, presentata (**) dal Socio A. STEFANELLI.

SUMMARY.—The nervous part of the retina of 4 days chicken embryos was disgregated and then it was let to reaggregate by culture *in vitro* for 28 days.

The incomplete development of the photoreceptor outer segments obtained in these experimental conditions was related to the absence of melanic cells of tapetum, which are involved in the metabolism of Vitamin A necessary to the synthesis of the visual pigments localized in the outer segments and which determine their structural organization.

In reaggregates of retina with the pigment epithelium, a further differentiation of the outer segments was observed and their characteristically arranged flat sacs or disks were found. Anyway, there was a delay in the differentiation process if compared with that of the controls: at 32 days the aggregates had the same structural organization found in chicken embryos of 17-19 days of age.

In una nostra recente Nota (« *Experientia* », vol. 23, f. 3, 1967), abbiamo illustrato il notevole grado di differenziamento degli elementi nervosi e dei fotorecettori della retina di embrione di pollo sottoposta a disgregazione con tripsina al 4° giorno di incubazione e riaggregata in piccole sferule di 1-2 mm di diametro e coltivata per 25 giorni *in vitro*.

Al microscopio elettronico si sono potute tra l'altro notare numerose tipiche sinapsi in una zona di fitto neuropilo, estremamente simile in struttura al neuropilo retinico normale. Inoltre, in relazione con i fotorecettori si sono differenziati al loro polo sinaptico dei tipici *synaptic ribbons* che rappresentano una delle caratteristiche più salienti di questo tipo di sinapsi.

Tuttavia, se il sistema sinaptico appariva così ben differenziato da far pensare possibile una attività bioelettrica non ci era mai stato possibile riconoscere il caratteristico differenziamento della parte emergente dei fotorecettori rappresentato dalle caratteristiche sacche appiattite e impilate lungo l'asse della cellula. In queste condizioni non era pensabile una fotosensibilità.

Questa osservazione riveste in se una certa importanza poiché dimostra la possibilità di un perfetto differenziamento del polo sinaptico senza il differenziamento della parte fotosensibile. O per lo meno si poteva desumere una precedenza nel tempo del differenziamento della sinapsi rispetto a quello della parte emergente.

(*) Lavoro eseguito nell'Istituto di Anatomia Comparata « G. B. Grassi » della Università di Roma e nel Centro di Neuroembriologia, con i contributi del Gruppo di Embriologia del C.N.R.

(**) Nella seduta del 13 maggio 1967.

Dalla letteratura risulta che il differenziamento dei coni e dei bastoncelli di pollo si inizia al 15° giorno di incubazione (Coulombre, 1955) con un concomitante aumento della attività della fosfatasi alcalina. Ma secondo Ueno (1961) il segmento esterno non raggiunge nemmeno alla nascita (21° giorno) il caratteristico differenziamento a dischi sovrapposti. Wada (1965) nota tuttavia come, sempre nel pollo, al 19° giorno di incubazione si notino nella parte emergente sacchi e tuboli, ma come l'impilamento lamellare si inizi solo alla nascita (21° giorno). In base a queste osservazioni appare evidente che la mancanza di parti emergenti lamellate nei nostri aggregati di complessivi 29 giorni di età non è una questione di tempo, ma un difetto di sviluppo.

Si è pertanto pensato che questa deficienza fosse dovuta alla modalità con cui si sono formati i nostri aggregati. In precedenti ricerche di alcuni di noi (Stefanelli, Zacchei e Ceccherini, 1961) si erano fatti aggregati di retina completa e le cellule melanizzate del tappeto avevano creato masse opache al centro dell'aggregato sotto forma di anello o di coppa; in questi casi i fotorecettori, che però non erano stati allora studiati con il microscopio elettronico, si presentavano assai meglio allineati contro le cellule ammassate del tappeto che nei sistemi di « rosette » ottenute con gli aggregati senza tappeto.

Sappiamo infatti dalla letteratura (Sorby, Reading e Bunyan, 1966) che il tappeto nero è fondamentale per la conversione della vitamina A nel cromoforo del pigmento visivo (retinene + opsina). L'assenza della vitamina A provoca la degenerazione del segmento esterno come hanno dimostrato Dowling e Gibbons nei topi (1961), Brown e Gibbons e Wald negli Anfibi (1963) e Eakin in una lucertola (1964). Così in alcuni ceppi di topi albini si nota la mancanza del differenziamento dei bastoncelli (Sorby, Koller, Attfield, Dovey e Lucas, 1954) e con il trattamento con iodato di K (Grignolo, 1966) si determina la degenerazione del tappeto nero e dei segmenti emergenti dei fotorecettori.

Da questi dati si poteva supporre quale causa della deficienza del differenziamento dei segmenti esterni dei fotorecettori la mancanza di rapporti con le cellule del tappeto apportatrici di vitamina A, necessaria alla sintesi dei pigmenti visivi che si localizzano nella parte emergente.

In base a questi precedenti abbiamo ripresa la cultura di riaggregati retinici da retine disgregate complete di tappeto nero e abbiamo anche prolungata la durata della coltura sino al 28° giorno (32 giorni complessivi).

Le osservazioni al microscopio elettronico hanno confermata la nostra aspettativa e infatti i fotorecettori si presentano con vario grado di differenziamento della parte emergente e delle caratteristiche sacche appiattite e sovrapposte (Tavv. I e II).

Il grado di differenziamento raggiunto dai fotorecettori così coltivati non corrisponde tuttavia a quello delle stesse cellule della stessa età, ma è simile a quello degli embrioni di 19-20 giorni di incubazione.

Questo ritardo può essere imputato a molteplici fattori, ma due sono soprattutto evidenti: a) la condizione trofica delle colture, che, seppure coltivate con la tecnica dei tubi rotanti, è sempre deficiente rispetto alla condizione di un occhio normale; b) lo stato di disorganizzazione morfologica, malgrado

la tendenza dei fotorecettori a disporsi in un unico strato contro le cellule melaniche del tappeto.

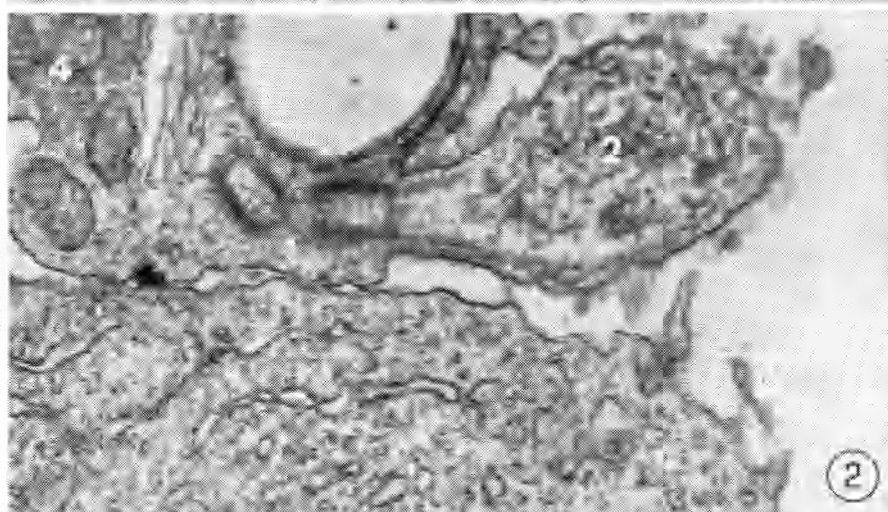
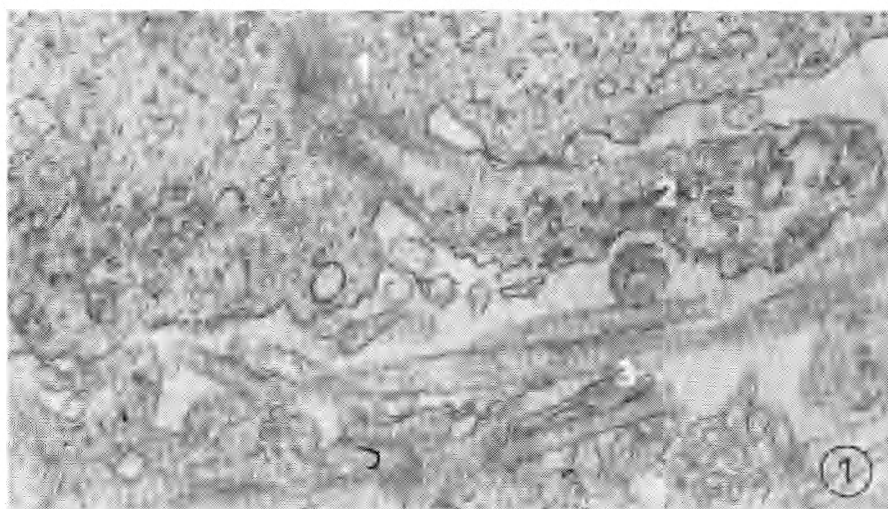
Sulla morfogenesi di questo sistema di sacche appiattite che caratterizza la parte emergente dei fotorecettori, siano coni che bastoncelli, si sono fatte diverse ipotesi. De Robertis nel topo (1956) ritiene che i tuboli ciliari siano in continuazione con i tuboli disordinati ora descritti. Tokuyasu e Yamada nel gatto e nel topo (1959) ritengono che le vescicole derivino dalla frammentazione dei tuboli ciliari e che le sacche lamellari derivino dall'incontro di queste vescicole con invaginazioni della membrana del segmento esterno. I tuboli di origine ciliare sarebbero «induttori» dei dischi derivanti dalla membrana cellulare. Lasanski e De Robertis (1960), con osservazioni sul topo si accordano a questa veduta. Anche Ueno (1961) trova nel pollo due tipi di vescicole: quelle derivanti dai tuboli ciliari e quelle da introflessione della membrana apicale, ma non è chiaro da quale delle due cavità derivino i dischi. Secondo Nilsson (1964), in *Rana*, prima della comparsa dei dischi non si osservano tuboli o vescicole di sorta ma solo «materiale particolato» e i dischi si formano subito col piano ortogonale dell'asse della cellula. Wada (1965) nel pollo descrive ancora alla nascita oltre ai dischi anche tuboli e vescicole. Eakin e Westfall (1961) in *Hyla* vedono rapporti tra i tuboli ciliari e le introflessioni della membrana da cui si originano i dischi.

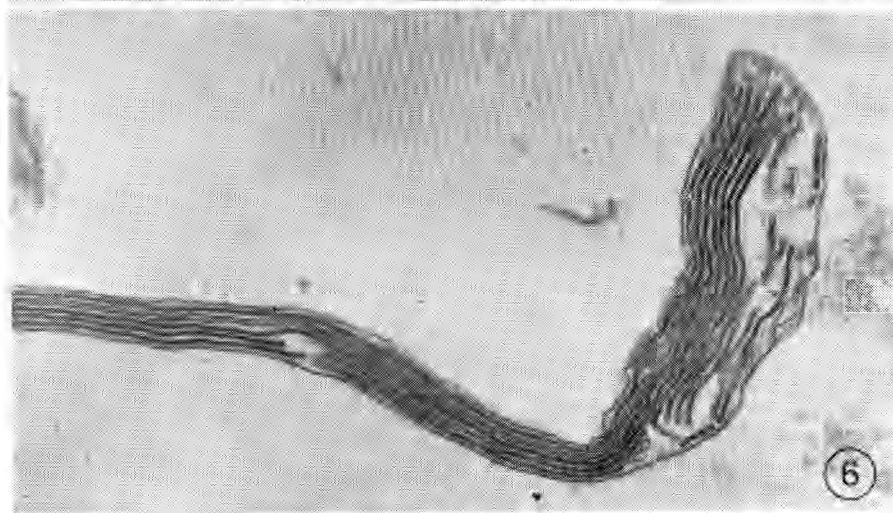
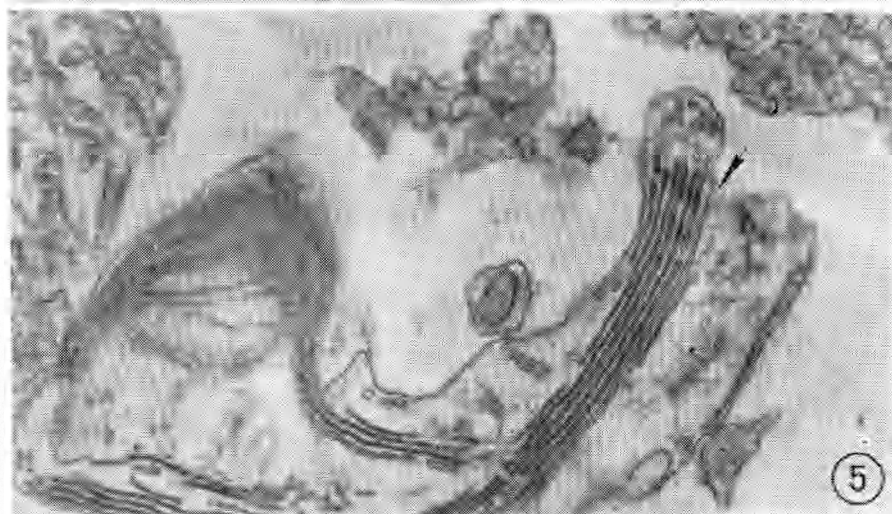
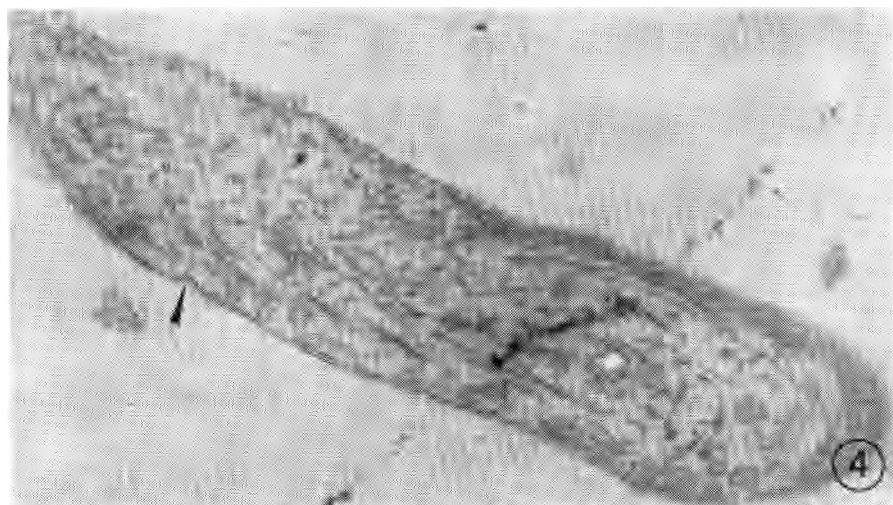
Nei nostri preparati, pur tenendo presente che la morfogenesi avviene nelle condizioni abnormi di coltura, non vi è evidenza di una derivazione dei tuboli e vescicole dai tuboli ciliari periferici, mentre vi sono aspetti evidenti di derivazione da invaginazioni della membrana del segmento emergente.

Le figure delle Tavv. I e II mostrano momenti successivi del differenziamento della parte emergente del segmento esterno dei fotorecettori in coltura. Nelle figg. 1 e 2 si osservano i centrioli basali (1) da cui emanano i tuboli ciliari periferici. Essi non sono dello stesso calibro dei tuboli che si vanno formando nel segmento emergente (2). È sufficiente questo per affermare che sono strutture diverse? La quantità di tuboli aggrovigliati in queste fasi iniziali di sviluppo del segmento emergente è notevole. Possono derivare tutti questi tuboli solo da quelli ciliari, come è stato detto da qualcuno, o più verosimilmente derivano per invaginazione della membrana della parte emergente?; nei punti segnati con una freccia si hanno immagini chiare di questa derivazione (figg. 3, 4, 5).

I tuboli tendono poi a dilatarsi in vescicolette e in sacche appiattite. Man mano che il segmento emergente si accresce queste sacche appiattite si dispongono verso il suo apice parallelamente all'asse maggiore di esso; solo successivamente si ha una tendenza al loro spostamento in senso ortogonale, a pettine, rispetto all'asse della cellula (figg. 4, 5, 6). I rapporti di queste sacche con l'esterno si perdono e diventa sempre più difficile osservare una continuità delle loro pareti con quella della cellula come è ancora visibile nel caso della fig. 5 (freccia).

Le condizioni da noi osservate non si possono imputare a difetto di fissazione poiché, se questo è stato un problema serio per tutti coloro che hanno





fissato l'occhio *in toto*, nel nostro caso, data la piccolezza degli aggregati, esso non ci si è posto.

In conclusione è stato constatato come la mancata differenziazione di tappeto nero impedisca il differenziamento del segmento emergente e soprattutto la formazione delle caratteristiche sacche laminari disposte a pettine, mentre il processo di differenziamento del polo sinaptico appare normale, come risulta dalle nostre precedenti ricerche (Stefanelli, Zacchei, Caravita, Cataldi e Ieraldi, 1966). Questa constatazione pone in dubbio una concomitanza tra la formazione della sinapsi e la sua attività funzionale; infatti i fotorecettori privi di segmento esterno, dove risiedono i pigmenti visivi, non sono fotosensibili.

La mancanza di differenziamento del tappeto negli aggregati in cultura può essere dovuta alla mancanza di vitamina A. Ricerche in corso tendono a chiarire questo problema.

BIBLIOGRAFIA.

- BROWN P. K., GIBBONS I. R. e WALD G., « J. Cell Biol. », 19, 79 (1963).
COULOMBRE A. F., « Am. J. Anat. », 96, 153 (1955).
DE ROBERTIS E., « J. Biophys. Biochem. Cytol. », 2 Suppl., 209 (1956).
DOWLING J. E. e GIBBONS I. R., *The Structure of the Eye*, G. K. Smelser ed., N. Y., Acad. Press, Inc., p. 85 (1961).
EAKIN R. M., « Vision. Res. », 4, 17 (1964).
EAKIN R. M., WESTFALL J. A., « Embryologia (Nagoya) », 6, 84 (1961).
GRIGNOLO A., « Exp. Eye Res. », 5, 86 (1966).
LASANSKY A. e DE ROBERTIS E., « J. Biophys. Biochem. Cytol. », 7, 679 (1960).
NILSSON S. E. G., « J. Ultrastr. Res. », 11, 581 (1964).
SJÖSTRAND F. S., « J. Cellular Physiol. », 42, 15 (1953).
SORSBY A., READING H. W. e BUNYAN J., « Nature », 210, 1011 (1966).
SORSBY A., KOLLER P. C., ATTFIELD M., DAVEY J. B. e LUCAS D. R., « J. Exp. Zool. », 125, 171 (1954).
STEFANELLI A., ZACCHEI A. M. e CECCHERINI V., « Acta Embriol. Morphol. Exp. », 4, 47 (1961).
STEFANELLI A., ZACCHEI A. M., « Rend. Acc. Naz. Lincei », 30, 818 (1962).
STEFANELLI A., ZACCHEI A. M., CARAVITA S., CATALDI E. e IERALDI L., « Rend. Acc. Naz. Lincei », 40, 758 (1966).

SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE

Le figure delle tavole mostrano vari gradi di differenziamento del segmento esterno di fotorecettori di retina di embrione di pollo in aggregati ottenuti da retine disgregate a 84 ore di incubazione complete di tappeto nero e coltivate *in vitro* per 28 giorni.

Fotografie al microscopio elettronico Hitachi H U 11; fissazione in osmio 1 % in tampone veronal acetato, secondo Sjöstrand, 1953. ($\times 42.000$).

1 Centrioli basali del cilio. — 2 Segmento esterno del fotorecettore con tuboli (notare la differenza di calibro con i tuboli ciliari). — 3 Microvilli delle cellule di Müller. — 4 Mitochondri del segmento interno del fotorecettore.

Notare il disordine dei tuboli e delle vescicole nelle fasi più iniziali e nelle parti più basali del segmento esterno. Nella figura 4 inizia all'apice l'assestamento dei sacchi o dischi. Con le frecce sono indicati punti di continuità evidente della membrana cellulare con le pareti dei tuboli e dei sacchi appiattiti.