
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

MARIA PIA GHISOLI, GIOVANNA PESARESI, GIULIANA
RIAVINI

**Sul contenuto di RNA nei neoplasti durante la
rigenerazione di *Dugesia lugubris***

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 42 (1967), n.6, p. 934–942.*
Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1967_8_42_6_934_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. — *Sul contenuto di RNA nei neoblasti durante la rigenerazione di Dugesia lugubris* (*). Nota di MARIA PIA GHISOLI, GIOVANNA PESARESI e GIULIANA RIAVINI, presentata(**) dal Corrisp. P. PASQUINI.

SUMMARY. — In *Dugesia lugubris* the amount of RNA in the neoblasts forming the regenerating blastema varies with time.

Generally the quantity of RNA is more conspicuous in the neoblasts of the blastema than in those of the near regions.

RNA increases during the healing process and decreases when the scar is formed; there is a further increase in RNA until the differentiation processes begin.

Generally the posterior blastema is the richest in RNA; it takes origin from the neoblasts migrated from the postpharyngeal region. In the control non-regenerating animals also, the neoblasts of this region are the richest in RNA.

Tra le ricerche fatte sui fenomeni rigenerativi nelle Planarie alcune riguardano la presenza e le variazioni dell'RNA nei neoblasti che migrando da territori vicini alla ferita concorrono alla formazione del blastema. La Clement-Nöel, (1944) [1] e Brøndsted, (1955) [2] furono fra i primi Autori a dimostrare che la basofilia citoplasmatica dei neoblasti dipende da un alto contenuto in acido ribonucleico. Secondo la Clement-Nöel è difficile decidere se le cellule dei blastemi rigenerativi abbiano un elevato tenore in RNA già prima della loro migrazione oppure se se ne arricchiscano quando si accumulano in prossimità della ferita. Nel corso della morfogenesi del blastema si avrebbe una progressiva diminuzione di RNA nei neoblasti, il che renderebbe più evidente il parallelismo tra rigenerazione ed embriogenesi a cui accennano alcuni Autori. In entrambi i casi si assiste infatti da principio alla sintesi e all'accumulo dei nucleoprotidi che vengono poi utilizzati durante la organogenesi ed il differenziamento.

Più tardi Pedersen (1959) [3] in *Planaria vitta* ha confermato che la basofilia è dovuta esclusivamente a RNA e a mucopolisaccaridi acidi. Secondo Lindh (1957) [4] invece, anche DNA sarebbe presente nel citoplasma dei neoblasti.

Lender e Gabriel (1960) [5] usando la colorazione al verde di metilepironina, hanno confermato la presenza di RNA nei neoblasti del blastema, però non sono riusciti a mettere in evidenza variazioni notevoli nel tenore di acidi nucleici in queste cellule.

Ghirardelli (1959) [6] ha pure compiuto ricerche sulla quantità di RNA nei neoblasti utilizzando una variazione del metodo Brachet proposta da

(*) Istituto di Zoologia ed Anatomia Comparata della Università di Trieste diretto dal prof. E. Ghirardelli e Istituto di Zoologia della Università di Bologna diretto dal prof. E. Vanini. Ricerche eseguite con contributi del C.N.R.

(**) Nella seduta del 13 maggio 1967.

Gerola e Vannini (1949) [7]. In dischetti isolati dalla regione anteriore del corpo di *Dugesia lugubris* egli ha potuto dimostrare che normalmente, come conseguenza immediata del taglio, aumenta la carica di RNA non solo nei neoblasti vicino alla ferita, che sono i primi ad accumularsi nel blastema, ma anche in quelli che si trovano nel parenchima, ad una certa distanza dalla lesione operatoria. I neoblasti così attivati migrano in direzione della ferita aumentando le dimensioni del blastema di rigenerazione che, pertanto, risulta più ricco di RNA delle restanti regioni del dischetto. La pironinofilia però non è costante, ma tende a diminuire nel corso della morfogenesi. In rapporto con la circostanza che nei dischetti viene conservata la polarità originaria, si osserva inoltre che la pironinofilia non presenta lo stesso grado di intensità nel blastema anteriore ed in quello posteriore. Nel caso particolare di dischetti prelevati dalla regione anteriore del corpo di una Planaria, il blastema maggiormente pironinofilo è quello posteriore, in corrispondenza del quale si differenzia il nuovo faringe.

Anche Teshirogi (1962) [8] osserva che durante la formazione del blastema si ha un forte aumento della basofilia, che interessa tutte le cellule del blastema e anche quelle dei tessuti immediatamente vicini alla parte rigenerante.

Boriani e Ghirardelli (1965) [9] in Planarie irradiate con dosi diverse di raggi X, hanno dimostrato che l'RNA contenuto nei neoblasti diminuisce in misura tanto più accentuata quanto è maggiore la dose somministrata. Gli stessi Autori hanno anche constatato che vi è un certo rapporto fra la quantità di acidi nucleici contenuta nei neoblasti e la velocità dei processi rigenerativi.

Il presente lavoro eseguito negli Istituti di Zoologia di Bologna e di Trieste su esemplari adulti di *Dugesia lugubris* ha lo scopo di illustrare le variazioni dell'RNA citoplasmatico nei neoblasti durante la rigenerazione.

Le Planarie utilizzate provenivano tutte dagli allevamenti dell'Istituto di Zoologia di Bologna. Si sono fatte tre serie di osservazioni: nella prima le Planarie venivano decapitate e simultaneamente private della regione caudale del corpo con due tagli fatti rispettivamente subito dietro le auricole e all'altezza del poro genitale. Gli esemplari della seconda serie sono stati decapitati mentre quelli della terza serie sono stati privati solo della regione caudale. Nella prima serie si avevano così due blastemi di rigenerazione, mentre nella seconda serie si aveva solo il blastema anteriore e nella terza serie soltanto quello posteriore.

Gli esemplari così operati venivano uccisi in distensione con HNO_3 al 5% e fissati in Serra dopo 6 h, 15 h, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10 giorni; inclusi e sezionati longitudinalmente in fette di 7μ ; colorati poi con blu di toluidina Chroma all'1% mescolato in parti uguali con soluzione tampone a pH 4,7 diluita a 1:10 (prima serie) oppure con una soluzione di blu di toluidina al litio mescolata in parti uguali con una soluzione tampone a pH 4,7 diluita a 1:10 (seconda e terza serie).

Si è potuto ottenere in questo modo una colorazione di tonalità costante da un lato per gli esperimenti eseguiti a Bologna (I serie) e dall'altro per

quelli eseguiti a Trieste (II e III serie, nelle quali le fette vennero tutte colorate simultaneamente). La prima serie presentava intensità di colorazione diversa rispetto alle altre due e ciò può essere dovuto a differenti condizioni di allevamento, probabilmente riguardo al grado di durezza dell'acqua ⁽¹⁾; ma questo fatto non ha per noi una notevole importanza, trattandosi di determinare le variazioni relative e non le quantità assolute del tenore di RNA durante la rigenerazione.

L'intensità della colorazione è stata determinata con l'istofotometro Lison ser. HG 73 della Electrophysique di Bruxelles in possesso dell'Istituto di Zoologia di Bologna.

Per ogni esemplare si esaminarono 50 neoblasti in ciascuna di quattro zone caratteristiche del corpo dell'animale e precisamente nella regione anteriore alle auricole (AA), nella regione prefaringea (PR), nella regione postfaringea (PF) e nella regione posteriore al poro genitale (PG). Per ciascun stadio sono stati esaminati almeno due esemplari.

In base ai valori ottenuti si sono potuti costruire dei diagrammi, indicanti le variazioni di concentrazione di RNA nel corpo dell'animale nei dieci giorni di durata degli esperimenti. In ascissa sono indicate le quattro zone considerate, in ordinata i valori di estinzione (fig. 1 e 2).

Nelle curve riguardanti i controlli, cioè Planarie non operate (fig. 1), il massimo contenuto in RNA si ha nella regione postfaringea mentre i valori delle altre tre regioni sono inferiori. La curva dei controlli di Bologna indica però valori medi più alti di quella dei controlli di Trieste. Ciò è probabilmente dovuto a quella diversità di condizioni di allevamento e di colorabilità di cui si è detto precedentemente.

L'esame istofotometrico degli esemplari, che rigenerano sia anteriormente che posteriormente, prelevati dopo sei ore dall'operazione rivela un forte abbassamento dei valori di RNA in corrispondenza della zona postfaringea, mentre negli esemplari che rigenerano separatamente testa o coda si hanno valori più bassi nella regione anteriore. In questo momento, mentre le ferite anteriori sono quasi completamente chiuse, in corrispondenza di quelle posteriori si nota ancora un'abbondante fuoriuscita di muco e di cellule del parenchima più o meno alterate.

Successivamente, a 15 h, si ha un'abbassamento dei valori del contenuto in RNA anche nella regione posteriore degli esemplari che rigenerano sia anteriormente che posteriormente, mentre le curve degli altri esemplari hanno un andamento tra loro simile con picchi corrispondenti sia alla regione cefalica che a quella caudale.

Negli esemplari di un giorno tutte e tre le curve presentano un discreto livellamento, però nelle curve che si riferiscono agli esemplari rigeneranti posteriormente si nota una tendenza all'aumento dei valori nella regione posteriore, mentre un aumento dei valori nella regione anteriore si rileva sia

(1) Il nutrimento somministrato alle Planarie allevate a Bologna ed a Trieste era in entrambi i casi costituito da *Tubifex* vivi raccolti nei dintorni di Bologna.

negli esemplari che rigenerano la testa sia in quelli che rigenerano entrambe le parti. A questo punto tutte le ferite sono in genere completamente cicatrizzate; si nota un discreto addensamento di neoblasti sotto la cicatrice, mentre altri neoblasti si vedono migrare verso questa zona da quelle immediatamente vicine, formando così il blastema di rigenerazione.

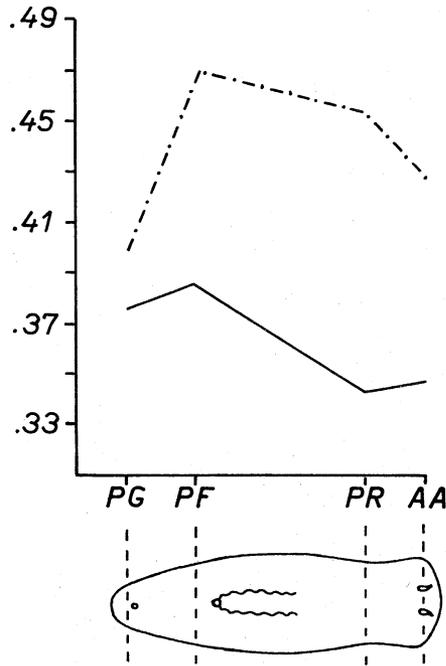


Fig. 1. - Valori di estinzione in Planarie intere allevate a Bologna (linea a tratti e punti) e a Trieste (linea continua). In ascissa sono indicate le regioni del corpo della Planaria in cui sono state fatte le misure dei neoblasti. AA - capo; nelle Planarie in rigenerazione indica il blastema; PR - regione prefaringea; PF - regione postfaringea; PG - regione del poro genitale; nelle Planarie che rigenerano indica il blastema posteriore. In ordinata i valori di estinzione.

A due giorni, il contenuto di RNA è maggiore nella regione cefalica per le Planarie che rigenerano la testa e per quelle che presentano due blastemi (con lieve aumento anche nella fascia PG), mentre in quelle che rigenerano la coda i valori maggiori si hanno nella fascia posteriore.

A tre giorni, il diagramma delle Planarie che rigenerano sia anteriormente che posteriormente è molto simile a quello di 15 h, con un picco nella zona anteriore; nelle Planarie che rigenerano il capo vi è un aumento di RNA abbastanza notevole, sia nella regione del blastema, sia nella regione posteriore; aumento cospicuo di RNA si ha nella regione posteriore delle Planarie che riformano la coda.

A quattro giorni si ha un fortissimo aumento del contenuto in RNA nella zona del blastema dei rigenerati posteriori, mentre i rigenerati anteriori

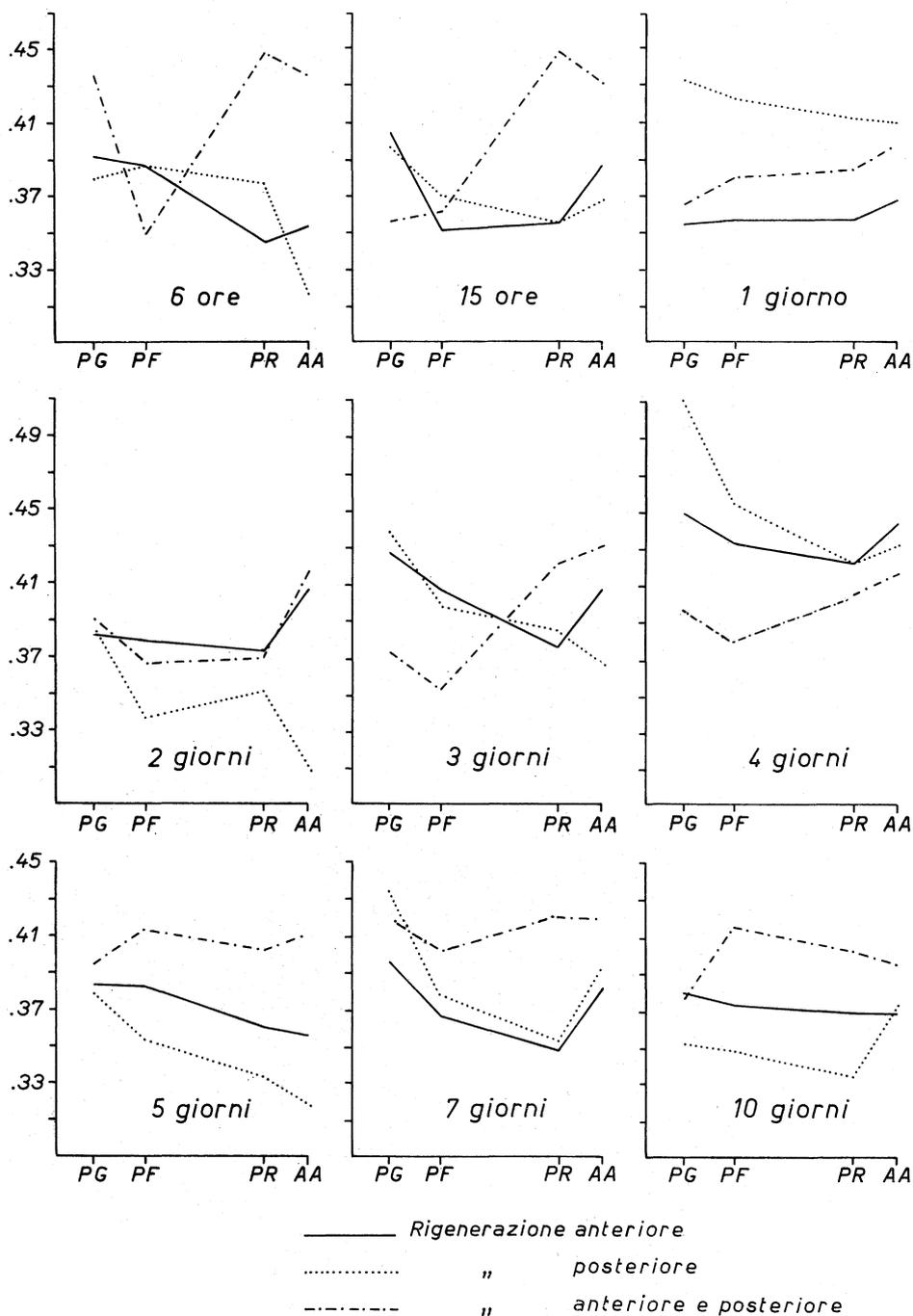


Fig. 2. - Diagrammi comparativi dei valori di estinzione nelle tre serie di esperienze, in momenti successivi della rigenerazione. Per le altre spiegazioni si veda la fig. 1.

presentano valori più vicini nelle diverse regioni; andamento simile hanno i rigenerati sia anteriori che posteriori.

A cinque giorni si nota nuovamente un certo livellamento dei valori; nei rigenerati posteriori il valore più elevato è sempre nella zona del blastema, nei rigenerati anteriori e posteriori il massimo è nella zona del blastema anteriore, mentre per i rigenerati anteriori per la prima volta si riscontra una diminuzione di RNA nella regione anteriore.

A sette giorni nei rigenerati sia anteriori che posteriori si osservano valori pressoché uguali in tutte le regioni considerate, mentre per i rigenerati o anteriori o posteriori si ha un aumento di RNA nei due rispettivi blastemi.

A dieci giorni, si osservano valori quasi uguali in tutte le zone per gli esemplari che presentano la sola rigenerazione anteriore. Per quelli che presentano entrambe le rigenerazioni la curva tende ad assumere lo stesso andamento di quella dei controlli. Nei rigenerati posteriori, invece, per la prima volta, si osserva che i valori della zona AA superano quelli delle altre regioni del corpo compresa la zona del blastema. In questo periodo nei blastemi anteriori si notano già segni di differenziamento, con formazione di macchie di pigmento, che sembrano comparire prima dei tronchi nervosi.

Nelle Planarie private sia della parte anteriore che di quella posteriore, il contenuto di RNA nelle diverse regioni del corpo subisce notevoli oscillazioni nel corso dei processi di rigenerazione. Si potrebbe pensare che ciò sia in gran parte imputabile al fatto che in uno stesso esemplare si hanno simultaneamente due blastemi, il che determina una notevole interferenza dei due campi di rigenerazione. Inoltre, in tali casi di rigenerazione simultanea la carica di RNA è maggiore nella zona del blastema anteriore e ciò può essere in rapporto con una maggiore complessità delle strutture che si formano in esso rispetto a quelle che si formano dal blastema posteriore, o con una dominanza della regione anteriore su quella posteriore.

Risultati differenti si hanno tuttavia nella rigenerazione dei dischetti prelevati dalla regione anteriore del corpo (Ghirardelli, 1959) [6]. In essi il blastema posteriore è infatti più ricco di RNA di quello anteriore; in questo caso però, nel dischetto resta una buona parte del cervello, mentre il faringe e le zone faringee, che sono quelle normalmente più ricche di RNA, si formano *ex-novo*. Queste osservazioni sono confermate dai risultati riguardanti gli esemplari che rigenerano la sola regione posteriore; essi non solo hanno valori di RNA nella zona del blastema sempre più elevati rispetto a quelli delle altre regioni (la sola eccezione si ha in blastemi di 10 giorni), ma questi valori sono in generale maggiori di quelli dei blastemi anteriori della stessa età, che sono stati sempre colorati simultaneamente, appunto per evitare una delle possibili cause di errore.

Non si deve vedere in questo fenomeno una anomalia, perché già dalle curve dei controlli appare chiaramente che la regione più carica di RNA è quella postfaringea. È logico quindi che il blastema posteriore, formandosi a spese dei neoplasti di questa regione, già assai carichi di RNA, finisca con il presentare valori più alti di quelli osservati nei blastemi anteriori che si for-

TABELLA I.
Rigenerazione simultanea delle regioni anteriore e posteriore.

REGIONE	6 h	15 h	1 g	2 g	3 g	4 g	5 g	7 g	10 g	Medie	Controlli
AA	43,6	43,1	39,3	41,5	43,0	41,7	41,1	42,0	39,5	41,6	42,8
PR	44,9	44,8	38,3	37,0	42,1	40,7	40,3	42,1	40,3	41,1	45,3
PF	35,0	36,0	38,0	36,8	35,3	38,0	41,4	40,2	41,6	38,0	46,8
PG	43,7	35,4	36,5	39,3	37,3	39,9	39,4	41,9	37,6	39,0	39,8
Medie	41,8	39,8	38,0	38,6	39,4	40,0	40,5	41,5	39,7	39,9	43,6

Valori delle medie delle letture all'istofotometro. I valori di estinzione per la costruzione delle curve si ottengono dividendo per 100 i dati della tabella.

TABELLA II.
Rigenerazione anteriore.

REGIONE	6 h	15 h	1 g	2 g	3 g	4 g	5 g	7 g	10 g	Medie	Controlli
AA	35,4	38,6	36,8	40,6	40,7	44,4	35,6	38,2	36,9	38,5	34,7
PR	34,6	35,6	35,7	37,3	37,6	40,1	36,0	34,9	36,9	36,5	34,3
PF	38,7	35,1	35,7	37,9	40,6	43,1	38,3	36,6	37,3	38,1	38,5
PG	39,3	40,5	35,5	38,4	42,8	45,0	38,4	39,7	38,0	39,7	37,7
Medie	37,0	37,4	35,9	38,5	40,4	43,1	37,0	37,3	37,2	38,2	36,3

TABELLA III.
Rigenerazione posteriore.

REGIONE	6 h	15 h	1 g	2 g	3 g	4 g	5 g	7 g	10 g	Medie	Controlli
AA	31,7	36,9	41,0	30,8	36,6	43,0	31,9	39,4	37,3	36,5	34,7
PR	37,7	35,5	41,1	35,1	38,3	42,1	33,1	35,3	33,4	36,8	34,3
PF	38,7	36,8	42,2	33,8	39,9	45,3	35,2	37,8	34,9	38,2	38,5
PG	37,9	39,7	43,4	38,8	44,0	51,1	38,0	43,6	35,1	41,2	37,7
Medie	36,5	37,2	41,9	34,6	39,7	45,3	34,5	39,0	35,1	38,2	36,3

mano in corrispondenza di regioni nelle quali i neoblasti hanno una quantità minore di RNA. Potrebbe essere questa una ulteriore prova della migrazione dei neoblasti sostenuta dalle scuole di Wolff e Lender e recentemente confermata anche da Cecere, Grasso, Urbani e Vannini (1964) [10] con l'impiego di tecniche istoautoradiografiche.

Anche le oscillazioni del contenuto di RNA nelle regioni intermedie potrebbero essere dovute alle migrazioni di neoblasti che arriverebbero ai blastemi anche da regioni distanti del corpo, come mostrano in modo netto, se confrontati con i controlli, i grafici che si riferiscono alla rigenerazione sia anteriore che posteriore dopo sei e quindici ore dal taglio.

Il fatto che il blastema posteriore abbia una carica più alta di RNA sembra essere una condizione più generale che non quella inversa. Infatti anche nella rigenerazione anteriore, gli stessi blastemi hanno una carica di RNA minore di quella delle regioni sane situate dietro al faringe ma maggiore di quelle riscontrate nella regione prefaringea (Tabelle I, II e III).

Viene così confermato che nei blastemi rigenerativi si ha un aumento dell'RNA rispetto alle regioni retrostanti, dovuto sia alla migrazione dei neoblasti sia anche all'aumento di RNA nei neoblasti che formano il blastema. Questo aumento non è costante e progressivo. Infatti l'RNA può aumentare nel blastema fino a che la cicatrizzazione non è ancora avvenuta, diminuire poi al primo e al secondo giorno, aumentare di nuovo fino al quarto - quinto giorno, per poi subire una ulteriore diminuzione ed un nuovo incremento che cessa durante i processi di differenziamento.

I valori massimi si hanno attorno al quarto giorno quando la cicatrizzazione è avvenuta ed il blastema, completamente formato, non ha ancora cominciato a differenziarsi.

È da notare anche che l'aumento di RNA, pur essendo relativamente più alto nella regione interessata direttamente dai processi rigenerativi, può verificarsi nei neoblasti sparsi in tutto il corpo (vedi Tab. II e III al quarto giorno). Questi fenomeni sono stati ulteriormente confermati da Di Marcotullio (1966) [11] con osservazioni al microscopio a fluorescenza.

BIBLIOGRAFIA.

- [1] M. CLEMENT NÖEL, *Les acides pentosenucléiques et la régénération*, « Ann. Soc. Roy. Belgique », 75, 25-33 (1944).
- [2] H. V. BRØNDSTED, *Planarian regeneration*, « Biol. Rev. », 30, 65-126 (1955).
- [3] K. Y. PEDERSEN, *Cytological studies on the Planarian neoblast*, « Zeit. f. Zellf. », 50, 799-817 (1959).
- [4] N. O. LINDH, *Histological aspects on regeneration in Euplanaria polychroa*, « Archiv. för Zool. », 11 (8), 89-103 (1957).
- [5] TH. LENDER et A. GABRIEL, *Étude histochimique des néoblastes de Dugesia lugubris (Turbellarié Triclade) avant et pendant la régénération*, « Bull. Soc. Zool. France », 85, 100-110 (1960).
- [6] E. GHIRARDELLI, *Gli acidi nucleici nella rigenerazione di dischetti isolati dal corpo di Dugesia lugubris*, « Acta Embryol. et Morphol. Exp. », 2, 320 (1959).

- [7] F. M. GEROLA e E. VANNINI, *La colorazione con verde di metile e pironina in mezzo tamponato nella ricerca degli acidi ribonucleici*, « Boll. Soc. It. Biol. Sper. », 25, 644-646 (1949).
- [8] W. TESHIROGI, *Dynamic morphological change and time-table during the regeneration of the Turbellarian Bdellocephala brunnea*, « Sci. Rep. Fac. Lit. Sc. Hirosaki Univ. », 9 (I), 21-48 (1962).
- [9] G. BORIANI ed E. GHIRARDELLI, *Azione dei raggi X sull'RNA dei neoblasti di Polycelis nigra in rigenerazione*, « Radiobiol. Radioter. e Fisica Med. », 21 (3), 162-177 (1965).
- [10] F. CECERE, M. GRASSO, E. URBANI ed E. VANNINI, *Osservazioni autoradiografiche sulla rigenerazione di Dugesia lugubris*, « Rend. Ist. Sci. Univ. Camerino », 5 (2), 193-198 (1964).
- [11] A. DI MARCOTULLIO, *Osservazioni al microscopio a fluorescenza dei neoblasti di Dugesia lugubris in rigenerazione*, « Boll. Zool. », XXXIII (1), 225-226 (1966).