

---

ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI  
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI  
**RENDICONTI**

---

SERGIO FILONI, CARLOS OBERTI

**Fenomeni rigenerativi del mesencefalo in adulti di  
*Xenopus laevis***

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,  
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 45 (1968), n.1-2, p.  
100–106.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<[http://www.bdim.eu/item?id=RLINA\\_1968\\_8\\_45\\_1-2\\_100\\_0](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1968_8_45_1-2_100_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.** — *Fenomeni rigenerativi del mesencefalo in adulti di Xenopus laevis*<sup>(\*)</sup>. Nota<sup>(\*\*)</sup> di SERGIO FILONI e CARLOS OBERTI, presentata dal Socio A. STEFANELLI.

SUMMARY. — Adult specimens of *Xenopus laevis* (Daudin) were operated by unilateral ablation of the tectum opticum and their midbrain was examined 1 to 7 months afterwards.

The following conclusions were drawn from the results:

1) The regeneration takes place from undifferentiated cells located in the ependymal layer of the contralateral tectum opticum rather than from the ependyma of the homolateral torus semicircularis.

2) The new formed elements line to the regenerated meninx and, by multiplication and migration, they close the mesencephalic ventricle. When this contact with the meninx is not established, the ependymal layer folds itself and forms soprannumerary ventricles.

3) Afterwards, newly formed fibres reach the restituted area. At the same time the regenerated elements start to differentiate and migrate towards the periphery. Thus, 7 months after the operation the regenerated structure is constituted of white matter, differentiated neurons and ependyma. Nevertheless, the restitutive process is not yet at an end, as is demonstrated by the mitoses still present in the tissue.

#### INTRODUZIONE.

I risultati delle numerose ricerche sulla rigenerazione del sistema nervoso centrale degli Anfibi, hanno chiaramente dimostrato che in generale la capacità rigenerativa, elevata negli stadi embrionali precoci, e, seppure in minor grado in quelli larvali, si riduce sensibilmente con il completo sviluppo dell'individuo.

Infatti il potere rigenerativo dell'adulto è confinato al livello del midollo spinale dove è stata accertata una rigenerazione molto notevole negli Urodeli (fra gli altri, Stefanelli e Capriata, 1943 [1]; Stefanelli e Cervi, 1946 [2]; Piatt, 1955 [3]; Kirsche, 1956 [4]; Winkelmann, 1963 [5]; Biancani e Marini, 1963 [6] e, in minor grado, negli Anuri (Piatt e Piatt, 1958 [7]; Schonheit, 1965 [8]), mentre è molto limitato al livello delle varie regioni encefaliche (Weissfeiler, 1924 [9], 1925 [10]; Sibbing, 1953 [11]; Piatt, 1955 [3]; Srebro, 1965 [12]; Lombardo, 1966 [13]).

Recentemente uno di noi (Filoni, 1964 a [14] e segg.), ha intrapreso uno studio sulla capacità rigenerativa delle varie regioni encefaliche in larve di Anuri. In particolare ha ottenuto una notevole rigenerazione del mesencefalo in larve di *Xenopus laevis* operate allo stadio 47-48 (sec. Nieuwkoop e Faber [15]), di asportazione unilaterale di questo settore del neurasse. Tale

(\*) Ricerca eseguita nel centro di Neuroembriologia del C.N.R., presso l'Istituto di Anatomia Comparata «G. B. Grassi» dell'Università di Roma.

(\*\*) Pervenuta all'Accademia il 26 luglio 1968.

potere rigenerativo, che porta nella maggioranza dei casi ad una restituzione pressoché perfetta della parte asportata anche da un punto di vista istologico e funzionale (Filoni, 1964 b [16]; 1965 a [17]; 1965 b [18]), si è rivelato notevolmente superiore non solo in confronto ad altri Anuri (Terry, 1956 [19]), ma anche rispetto agli Urodeli (Crelin, 1952 [20]).

Data la particolare capacità rigenerativa del mesencefalo in *Xenopus laevis* allo stadio larvale, nel presente studio abbiamo voluto analizzare in quale grado il potere rigenerativo perduri in individui a sviluppo ed accrescimento completamente ultimato, dopo estese asportazioni degli strati del tetto.

#### MATERIALE E METODO.

Sono stati operati complessivamente venticinque individui adulti di *Xenopus laevis* (di sesso maschile), anestetizzati con M. S. 222 alla concentrazione di 1 : 1000.

Previa apertura del cranio mediante trapanazione, eseguita con tutti gli accorgimenti necessari per evitare il riscaldamento dell'osso, si procedeva alla asportazione unilaterale del tetto ottico mediante aspirazione con una pipetta collegata ad una pompa peristaltica. L'operazione era eseguita al binoculare da dissezione. L'emorragia veniva arrestata con Spongostan<sup>(1)</sup> (spugna di gelatina di ottima tolleranza). Dopo suturazione la ferita era ricoperta con una soluzione densa di collodio. Gli animali operati venivano quindi trasferiti in una capace vasca con acqua corrente mantenuta a bassissimo livello fino alla completa rimarginazione della ferita. L'allevamento successivo era eseguito in una capace vasca di acquario. La maggior parte degli interventi fu effettuata fra luglio e settembre; nei mesi invernali la temperatura dell'acqua veniva mantenuta fra i 20 e i 22°C. Gli animali erano abbondantemente nutriti con carne tritata e Tubifex.

Gli individui operati non presentavano un comportamento sostanzialmente diverso da quelli di controllo; si nutrivano spontaneamente ed erano anche in grado di riprodursi. Nei casi in cui si sono osservate anomalie della natazione dovute a mancata coordinazione di movimenti, si rilevavano alla dissezione lesioni diencefaliche, della base del telencefalo e talora del cervelletto. Periodicamente e subito prima di essere sacrificati, gli animali erano sottoposti al test di Stone (1944 [21], 1948 [22]) allo scopo di accertare il grado di funzionalità del tetto mesencefalico. Gli animali venivano uccisi, mediante decapitazione, ad intervalli varianti da venti giorni a sette mesi dopo l'operazione. Gli encefali erano fissati per la maggior parte in Bouin, alcuni in Zenker o formalina neutra. Le sezioni seriate di 10 µ di spessore sono state colorate con Emallume-eosina, Fast blue-cresil violet, Mallory-Azan, Spielmayer, Feulgen o impregnati con il metodo di Bodian. Tre ence-

(1) Fabbriato dalla Ferrosan Medicinalfabrik, Copenhagen.

fali sono stati impregnati con il metodo di Golgi. L'esame istofotometrico dei preparati colorati con la Feulgen è stato eseguito con l'apparecchio modello Lison.

#### DESCRIZIONE DEI RISULTATI.

Il processo rigenerativo susseguente a questo tipo di operazione è estremamente lento ed in generale l'area rigenerata è molto esigua. Tuttavia la lentezza con cui procede la rigenerazione ci ha permesso di mettere in evidenza alcuni interessanti meccanismi morfogenetici.

La chiusura del ventricolo mesencefalico, dovuta subito dopo l'intervento alla formazione di un coagulo sanguigno, viene effettuata, man mano che quest'ultimo si va riassorbendo, dal tessuto connettivo cicatriziale le cui fibre si insinuano tra gli interstizi dello Spongostan, utile substrato per le fibre stesse (Tav. I, fig. 1). Successivamente o contemporaneamente inizia la rigenerazione della pia madre in genere a partire dal lobo ottico rimasto intatto (Tav. I, fig. 2; Tav. II, fig. 2).

Questa prima fase è molto lunga e, quando l'asportazione è notevolmente estesa il processo rigenerativo rimane a questo stadio anche dopo un mese dall'operazione. Nell'ependima residuo si osservano numerose mitosi. Nei casi in cui l'operazione è limitata all'asportazione unilaterale del tetto ottico, si osserva una moltiplicazione e migrazione degli elementi endodimali della regione controlaterale, che, dopo aver ricoperto la superficie di taglio del lobo ottico intatto (Tav. I, fig. 1; Tav. II, fig. 4), si accollano alla pia madre e si portano verso il toro semicircolare del lato operato fino a ristabilire la continuità dell'ependima del ventricolo mesencefalico (Tav. I, fig. 2; Tav. II, fig. 2).

Nella regione lesa, l'ependima del toro semicircolare non ricopre mai la superficie di taglio (Tav. I, fig. 1). Solo in un caso si è osservata una proliferazione dell'ependima in questa regione che peraltro era di modesta entità, tanto che l'ependima non riusciva a raggiungere la meninge e si richiudeva su se stesso determinando la formazione di un ventricolo soprannumerario (Tav. II, fig. 3).

Come è desumibile dalla fig. 3, Tav. I, la migrazione di elementi situati nello strato endodimale verso la superficie di resezione del lobo ottico residuo porta come risultato alla formazione di un ventricolo mesencefalico molto più esteso che nel controllo. La chiusura del ventricolo inizia nella maggioranza dei casi nella regione più caudale della zona di asportazione e sette mesi dopo l'operazione è ancora incompleto nelle altre parti.

Nel tentativo di chiudere il ventricolo mesencefalico, talora l'ependima, probabilmente in seguito ad esagerata attività proliferativa, forma delle protusioni oppure, ripiegandosi più volte su se stesso, determina la formazione di ventricoli soprannumerari; talora forma invaginazioni poco profonde che poi si chiudono su se stesse (Tav. II, fig. 1, fig. 3).

Le cellule della regione in via di rigenerazione hanno un aspetto di elementi migranti con nucleo fusiforme molto allungato con asse maggiore

generalmente disposto in senso perpendicolare alla superficie ventricolare (Tav. I, fig. 5). La morfologia del nucleo è quella tipica di elementi indifferenziati, la cromatina è diffusa in tutto il nucleo sotto forma di finissimi granuli.

Un fatto molto interessante è che la migrazione di elementi ependimali sulla superficie di taglio del lobo ottico residuo determina un rimodellamento dei vari strati del tetto che si orientano tutti parallelamente all'ependima neoformato (Tav. II, fig. 4).

Pertanto nelle prime fasi del processo rigenerativo, l'area rigenerata appare costituita esclusivamente da elementi indifferenziati disposti in più strati accollati alla meninge. In una fase successiva, tale regione viene raggiunta da fibre rigenerate che si estendono sulla sua superficie. Nelle aree in cui l'ependima, ripiegandosi, determina quelle protusioni ed invaginazioni già descritte, si osserva una profusa penetrazione di fibre neoformate (Tav. II, fig. 6).

Contemporaneamente dagli strati costituiti da elementi indifferenziati si staccano cellule che migrano verso la periferia (Tav. I, fig. 4). Lo studio del nucleo dimostra che questi elementi perdono l'aspetto di neuroblasti per assumere quello di elementi a vario grado di differenziamento istologico, i più periferici essendo in generale i più differenziati. Dopo sette mesi dall'operazione il rigenerato è quindi costituito da sostanza bianca, elementi differenziati, ependima. Le cellule differenziate tuttavia non hanno una disposizione a strati ma sono caoticamente disposte (Tav. I, fig. 4). Talora nel rigenerato si riscontrano ventricoli soprannumerari non comunicanti con la cavità ventricolare principale (Tav. II, figg. 5, 6). Si osservano ancora mitosi non solo nell'area rigenerata ma anche nell'ependima del lato intatto (Tav. I, fig. 6).

L'esame microfotometrico dell'ependima dell'area rigenerante ha dimostrato un più alto contenuto di DNA rispetto all'ependima normale poiché i valori medi della densità ottica dei nuclei neoformati sono risultati significativamente più elevati dei controlli. Tali dati, estesi ad un maggior numero di casi, saranno oggetto di una prossima pubblicazione.

I risultati del test di Stone, da un lato non hanno mai messo in evidenza un recupero funzionale del lobo ottico in via di rigenerazione e dall'altro hanno dimostrato la corrispondenza fra integrità morfologica del lobo ottico controlaterale e risposta motoria riflessa. Quando infatti l'operazione comportava anche varie lesioni al lobo ottico controlaterale e al diencefalo, la risposta motoria era proporzionale all'entità dell'asportazione.

#### DISCUSSIONE.

I dati riportati nella presente ricerca dimostrano che la capacità rigenerativa del mesencefalo in individui adulti di *Xenopus laevis* è molto limitata, contrariamente a quanto avviene negli stadi larvali.

La parte rigenerata, costituita da fibre, scarse cellule differenziate ed ependima, non mostra alcuna precisa organizzazione morfologica dei suoi

elementi; il processo rigenerativo procede con estrema lentezza e dopo sette mesi dalla operazione non è ancora terminato, come è dimostrato dall'attività mitotica ancora in atto. Tuttavia, malgrado la rigenerazione sia solo parziale, entrano in atto processi morfogenetici restitutivi molto simili a quelli che intervengono nelle prime fasi della rigenerazione della larva (Filoni non pubblicato).

La prima fase del processo rigenerativo si attua grazie ad una inusitata attività moltiplicativa e migratoria degli elementi endodermali che porta ad una graduale chiusura del ventricolo mesencefalico. In questo processo iniziale un ruolo importante è svolto dalla pia madre che, ricoprendo la superficie cruenta, mentre da un lato fornisce la condizione per lo sviluppo di una rete vascolare, dall'altro viene a costituire una superficie di contatto per l'ependima neoformato. Tale rapporto fra meninge ed ependima, sperimentalmente determinato, permette la chiusura del ventricolo mesencefalico.

È interessante osservare che in tutti i casi esaminati, gli elementi cellulari cui si deve la costituzione della nuova parete ventricolare, vengono mobilitati dall'ependima del tetto ottico controlaterale e mai dal toro semicircolare del lato operato. Quindi la graduale chiusura del ventricolo avviene in senso dorsoventrale e mai viceversa. Ciò dimostra la maggiore attività degli elementi endodermali del tetto ottico rispetto a quelli del toro semicircolare e spiega anche perché, quando l'operazione interessa entrambi i lobi ottici, la rigenerazione sia limitata alla ricostituzione della meninge.

Gli elementi cellulari provenienti dallo strato ependimale del lobo ottico residuo, hanno il tipico aspetto di elementi indifferenziati e presentano un nucleo con un alto contenuto di DNA.

L'importanza dell'ependima nei fenomeni rigenerativi del midollo spinale della larva e dell'adulto di Anuri ed Urodela è stata chiaramente dimostrata da Stefanelli e coll. (1944, [1]; 1946, [2]; 1950, [23]). Secondo questo Autore, la rigenerazione di tale settore del neurasse è dovuta ad elementi situati nello strato ependimale, denominati a determinazione tardiva, che conservano carattere embrionale anche nell'adulto e che si determinano e differenziano sotto lo stimolo regolativo.

Le osservazioni del presente studio unite a quelle di altri Autori (Srebro, 1965 [13]; Lombardo, 1966, [14]), dimostrano che la mobilitazione di elementi situati nello strato ependimale è un fenomeno generale poiché rappresenta un meccanismo morfogenetico fondamentale che entra in atto non solo nella rigenerazione del midollo spinale ma anche in quella delle varie regioni encefaliche. La assai minore rigenerazione del mesencefalo nell'adulto di *Xenopus laevis* rispetto alla larva, può essere spiegata ammettendo che man mano che procede l'accrescimento e lo sviluppo dell'individuo, si ha un graduale differenziamento degli elementi situati nell'ependima. Si può pertanto ritenere che nell'adulto il numero degli elementi indeterminati e pertanto capaci di entrare in attività cariocinetica durante i fenomeni rigenerativi, sia molto limitato. Ciò spiega anche perché la rigenerazione nell'adulto proceda con estrema lentezza.

L'esiguità della rigenerazione del mesencefalo in adulti di *Xenopus laevis*, è anche dimostrata dalla prova fisiologica che non ha mai rivelato un ritorno della capacità motoria riflessa in seguito a stimolazione visiva. Tale test non è definitivo ed è necessario uno studio accurato dei potenziali evocati.

#### CONCLUSIONI.

In conclusione si può affermare che la rigenerazione del mesencefalo di *Xenopus laevis* adulti è molto più limitata rispetto alla larva e non porta mai ad una restituzione completa della parte asportata. Tuttavia si osservano complessi fenomeni rigenerativi a carico del lobo ottico residuo che se non portano alla formazione di una struttura paragonabile a quella del tetto ottico, consentono tuttavia la chiusura del ventricolo mesencefalico ad opera di una parete neoformata costituita da endodermia, neuroni differenziati, fibre rigenerate.

Gli AA. ringraziano il Signor Fulvio Biocca, allievo interno, per l'aiuto tecnico nell'allestimento delle microfotografie.

#### BIBLIOGRAFIA.

- [1] STEFANELLI A. e CAPRIATA A., « Ric. Morfol. », 20-21, 1 (1943).
- [2] STEFANELLI A. e CERVI M., « Boll. Soc. Ital. Biol. sperim. », 22, 7 (1946).
- [3] PIATTI J., *Regeneration in the Central Nervous System of Amphibia*, in: *Regeneration in the Central Nervous System*, W. F. Windle, ed. C. C. Thomas, Springfield 1955.
- [4] KIRSCH W., « Z. Mikr.-Anat. Forsch. », 62, 521 (1956).
- [5] WINKELMANN E., « Z. Aertzl. Forth. », 57, 1202 (1963).
- [6] BIANCANI L. e MARINI M., « R.-C. Acc. Naz. Lincei », ser. 8<sup>a</sup>, 35, 606 (1963).
- [7] PIATT J. e PIATT M., « Anat. Rec. », 131, 81 (1958).
- [8] SCHONHEIT B., « Z. Mikr.-Anat. Forsch. », 72, 519 (1965).
- [9] WEISSFEILER J., « C. R. Soc. Biol. (Paris) », 91, 543 (1924).
- [10] WEISSFEILER J., « Rev. Suisse Zool. », 32, 1 (1925).
- [11] SIBBING W., « Arch. Entw. Mech. », 146, 433 (1953).
- [12] SREBRO Z., « Folia Biol., Krakow », 13, 269 (1965).
- [13] LOMBARDO F., « R.-C. Acc. Naz. Lincei », ser. 8<sup>a</sup>, 41, 126 (1966).
- [14] FILONI S., « Rend. Ist. Sci. Camerino », 5, 111 (1964 a).
- [15] NIEUWKOOP P. D. e FABER J., « Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin) », Amsterdam 1956.
- [16] FILONI S., « R.-C. Acc. Naz. Lincei », ser. 8<sup>a</sup>, 37, 521 (1964 b).
- [17] FILONI S., « La Ricerca Scientifica », 6, 376 (1965 a).
- [18] FILONI S., « Boll. Zool. », 32, 801 (1965 b).
- [19] TERRY J., « J. Exp. Zool. », 133, 389 (1956).
- [20] CRELIN E. S., « J. Exp. Zool. », 120, 547 (1952).
- [21] STONE L. S., « Proc. Soc. Exp. Biol. Med. », 57, 13 (1944).
- [22] STONE L. S., « Annals of N. Y. Acad. Sci. », 49, 856 (1948).
- [23] STEFANELLI A., THERMES G. e PODDIE M., « Riv. Biol. », 42, 239 (1950).

## SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE I-II

## TAVOLA I.

- Fig. 1. - *Asportazione tetto ottico destro dopo 60 gg. dall'operazione.* Il ventricolo è chiuso da tessuto connettivo cicatriziale. L'ependima ricopre la superficie cruenta del lobo ottico residuo.
- Fig. 2. - *Asportazione del tetto ottico destro dopo 120 gg.* Elementi ependimali migrano verso il toro semicircolare e ristabiliscono la continuità dello strato ependimale.
- Fig. 3. - *Asportazione del tetto ottico destro dopo 210 gg.* La migrazione di elementi ependimali sulla superficie di resezione del lobo ottico residuo determina un enorme ampliamento del lume ventricolare.
- Fig. 4. - Particolare della fig. 3. Dallo strato ependimale si staccano elementi a vario grado di differenziamento.
- Fig. 5. - Particolare dell'area rigenerante dopo 140 gg. Le cellule hanno il tipico aspetto di elementi migranti con nucleo fortemente allungato.
- Fig. 6. - Dopo 210 gg. dall'operazione si notano ancora mitosi.

Ogni divisione della scala al piede delle microfotografie 50  $\mu$ .

## TAVOLA II.

- Fig. 1. - *Asportazione tetto ottico destro dopo 140 gg.* Protusione dovuta ad iperproliferazione dell'ependima del lobo ottico sinistro.
- Fig. 2. - Particolare della fig. 2, Tav. I. La chiusura del ventricolo mesencefalico è completata. Notare la meninge rigenerata.
- Fig. 3. - *Asportazione del tetto ottico destro dopo 90 gg.* Solo in questo caso l'ependima del toro semicircolare omolaterale prolifera; tuttavia non raggiunge la meninge e si richiude su se stesso.
- Fig. 4. - *Asportazione del tetto ottico sinistro dopo 140 gg.* L'ependima ricopre la superficie di taglio. Gli strati del tetto si orientano parallelamente all'ependima neoformato.
- Figg. 5-6. - *Asportazione del tetto ottico destro dopo 140 gg.* Si sono formati ventricoli soprannumerari. L'area rigenerata viene raggiunta da fibre neoformate (fig. 6).

Ogni suddivisione della scala al piede delle microfotografie 50  $\mu$ .



