
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

SERGIO FILONI

**Sulla origine del materiale neoformato nella
rigenerazione del mesencefalo in larve 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. 90-99.*
Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1968_8_45_1-2_90_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. — *Sulla origine del materiale neoformato nella rigenerazione del mesencefalo in larve di Xenopus laevis* (*). Nota (**) di SERGIO FILONI, presentata dal Socio A. STEFANELLI.

SUMMARY. — After unilateral ablation of the midbrain in *Xenopus laevis* tadpoles (at stage 47-48 according to Nieuwkoop and Faber) most of the newly formed material originates from the contralateral part; it is in fact this region which displays the maximum mitotic increase following the operation. Such an increase is evident at the level of both the alar plate and the basal plate of the contralateral region.

The cephalic and caudal stumps as well cooperate in the regeneration of the removed part. Nevertheless, the role which these two regions play in the regenerative process is remarkably lower than that of the contralateral side. This is demonstrated by a lower mitotic increase and by a shorter period of increased cell proliferation than that of the residual side.

Furthermore, it was observed that as far as the maximal mitotic activity period is concerned (5th day after the operation) a higher number of mitoses take place than in the control even in regions which are far from the place of operation. This data is discussed here.

INTRODUZIONE.

L'analisi bibliografica dimostra che, al contrario di quanto si verifica per gli Urodeli, ancora scarse sono le conoscenze sulla capacità rigenerativa del sistema nervoso centrale in Anuri allo stato larvale. Così, mentre è stata ampiamente studiata la rigenerazione del midollo spinale in varie larve di Anuri (Stefanelli e Coll. 1950 [1], 1951 [2]), le osservazioni sulla rigenerazione delle varie regioni encefaliche sono scarse e limitate a poche specie. Infatti la massima parte dei lavori in Anuri allo stato larvale è stata eseguita sullo *Xenopus laevis*; per di più anche in questa specie le osservazioni sono state circoscritte a pochi settori dell'encefalo. In particolare, mentre è stata accertata una notevolissima rigenerazione del telencefalo (Jordan, 1955 [3]; Srebro, 1957 [4]; Filoni, 1964 a [5]), è stata dimostrata una assai scarsa rigenerazione del diencefalo (Srebro, 1959 [6]).

Ciò faceva supporre un gradiente di attività rigenerativa cefalo-caudale e pertanto mi è sembrato utile estendere le mie ricerche alla rigenerazione del mesencefalo. I primi risultati ottenuti hanno rivelato una eccezionale capacità rigenerativa di questo settore del neurasse in quanto nella maggioranza dei casi ho ottenuto una riparazione morfologica e fisiologica pressoché completa (Filoni, 1964 b [7]; 1965 a [8]; 1965 b [9]). Un tale risultato non era mai stato raggiunto non solo in altri Anuri (Terry, 1956 [10]), ma neppure in Urodeli (Crelin, 1952 [11]).

(*) 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.

Pertanto ho ritenuto interessante continuare le precedenti osservazioni allo scopo di analizzare dettagliatamente la graduale restituzione della parte asportata. In questa nota saranno esposti i primi risultati delle ricerche sulla attività mitotica dei territori circostanti alla zona di asportazione, volte a stabilire l'origine del materiale neoformato.

MATERIALE E METODO.

Sono state esaminate circa cinquanta larve di *Xenopus laevis*, tutte provenienti da una stessa deposizione, operate di asportazione dell'intera metà destra del mesencefalo allo stadio 47-48 sec. Nieuwkoop e Faber [12]. Dopo l'operazione, eseguita secondo la tecnica già descritta (Filoni, [7]), le larve sono state allevate alla temperatura di 18°C e nutrite con polvere di ortica

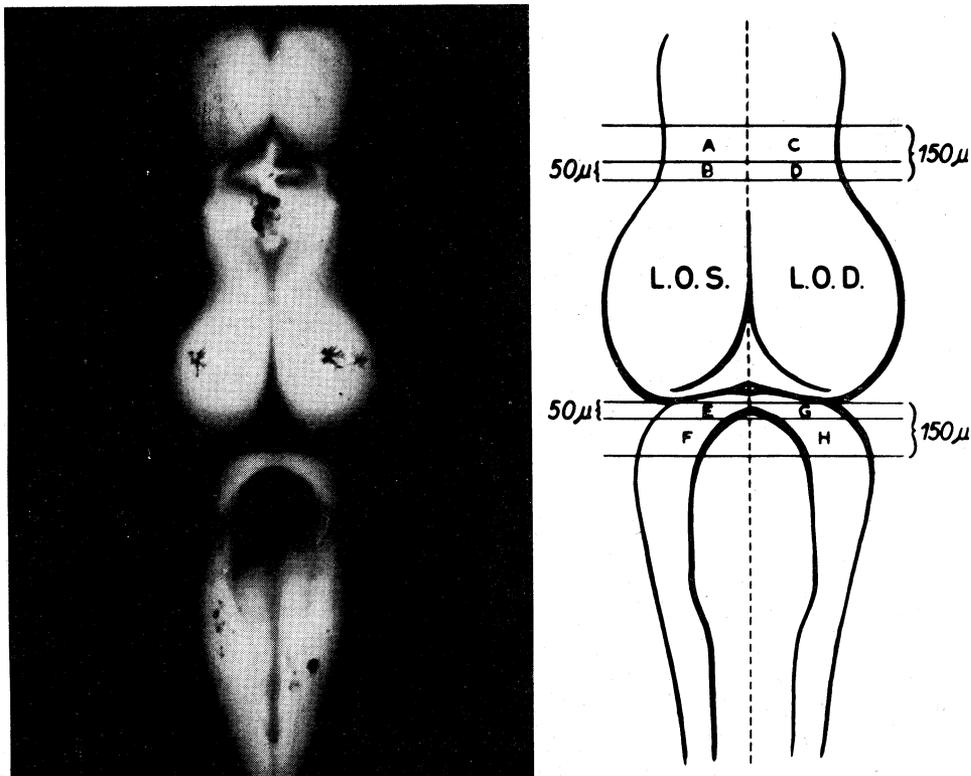


Fig. 1. - Encefalo di larva di *Xenopus laevis* allo stadio 50 sec. Nieuwkoop e Faber.

(Ingrandimento della fotografia: 34 ×; del disegno 50 ×).

bollita, in media tre volte alla settimana. Come controlli, sono state usate larve normali pari stadio provenienti dallo stesso lotto di uova e allevate nelle stesse condizioni ambientali. Gli animali, sacrificati da uno a venti giorni dopo l'operazione, sono stati fissati in Bouin o Carnoy, inclusi in paraffina sezionati a 5 µ di spessore e colorati con emallume eosina o con la Feulgen.

I computi numerici sono stati eseguiti su sezioni alterne allo scopo di escludere l'eventualità di calcolare due volte la stessa mitosi e limitati ai quadri cariocinetici che vanno dalla prometafase all'anafase. Per ogni gruppo considerato, sono stati esaminati da tre a cinque individui.

DESCRIZIONE DEI RISULTATI.

A) *Andamento dell'attività mitotica nella regione controlaterale.*

Come è desumibile dal grafico (fig. 2) e dalla Tabella I, l'attività mitotica della parte mesencefalica sinistra (L.O.S., fig. 1), rimasta praticamente invariata rispetto al controllo pari stadio fino al secondo giorno postoperatorio, subisce, a partire da tre giorni dopo l'operazione, un incremento statisticamente significativo che diviene via via più cospicuo nei giorni successivi

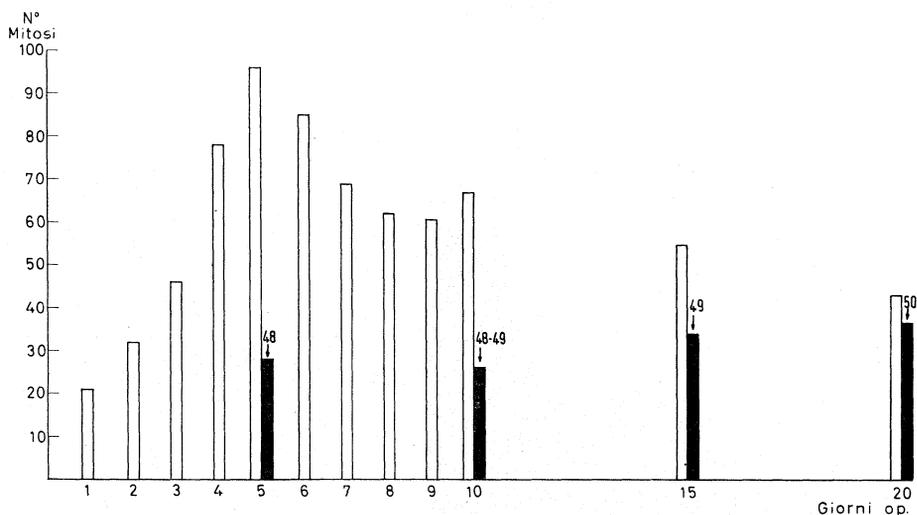


Fig. 2. - Numero di mitosi presenti nel lobo ottico residuo (il sinistro) da 1 a 20 giorni dopo l'operazione. In nero i controlli. Spiegazione nel testo.

fino a raggiungere il suo massimo valore verso il quinto giorno postoperatorio. In questo periodo il numero delle mitosi presenti sul lato sinistro del mesencefalo risulta più che triplo rispetto al controllo pari stadio. Dal quinto al settimo giorno, l'attività mitotica, pur mantenendosi su valori molto elevati, subisce una deflessione per rimanere poi su valori pressoché costanti fino al decimo giorno. Nei giorni successivi si osserva una ulteriore diminuzione della attività mitotica che, a partire dal ventesimo giorno, raggiunge valori molto simili ai controlli.

Una volta stabilita l'attiva partecipazione del lato residuo nel processo rigenerativo, ho voluto precisare se le cellule neoformate provenissero dalla parte dorsale o ventrale di questa regione o da entrambe le parti. A tale scopo

ho determinato il numero medio delle mitosi nella piastra alare e basale della metà sinistra del mesencefalo di animali sperimentali e di controllo ed ho ricavato il rapporto n. mitosi piastra alare/n. mitosi piastra basale nei due lotti.

TABELLA I.

| Giorni (1) | | STADIO | | N. CASI | | MEDIA MITOSI | | Indice t student | P |
|------------|----|--------|----|---------|---|--------------|-----------|------------------|--------|
| T | C | T | C | T | C | T | C | | |
| 1 | | 47-48 | | 3 | | 21±2,08 * | | 1,7 | >0,05 |
| 2 | | | | 4 | | 32,3±3,2 | | 1 | >0,05 |
| 3 | 5 | | | 3 | 5 | 45,7±2,6 | 27,8±2,8 | 4,3 | <0,01 |
| 4 | | 48 | | 4 | | 78±8,63 | | 6,1 | <0,001 |
| 5 | | 48 | | 5 | | 95,8±5,6 | | 10,8 | <0,001 |
| 6 | | | | 3 | | 85±9,8 | | 7,4 | <0,001 |
| 7 | | | | 4 | | 69±4,9 | | 8,28 | <0,001 |
| 8 | 10 | | | 3 | 5 | 62±2,08 | 25,8±2,58 | 9,64 | <0,001 |
| 9 | | 48-49 | | 5 | | 60,6±8,9 | | 3,74 | <0,01 |
| 10 | | 48-49 | | 4 | | 67,3±7,7 | | 5,63 | <0,001 |
| 15 | 15 | 49 | 49 | 4 | 5 | 54,5±2,25 | 34,2±3,61 | 4,47 | <0,005 |
| 20 | 20 | 50 | 50 | 4 | 5 | 42,8±5,2 | 36,6±2,95 | 1,1 | >0,05 |

Numero di mitosi presenti nella regione mesencefalica controlaterale (lato sinistro) da 1 a 20 giorni dopo l'operazione. T = trattati; C = controlli.

(1) Dal primo al quinto giorno postoperatorio, è stato usato come controllo un unico lotto di individui allo stadio 48, fissati dopo 5 giorni di permanenza a 18°C. Analogamente, gli individui sacrificati da 6 a 10 giorni dopo l'operazione, hanno uno stesso controllo costituito da un lotto di individui fissati dopo 10 giorni di permanenza a 18°C (st. 48-49).

(*) $S\bar{x}$ = errore standard.

Tali determinazioni sono state eseguite su larve fissate dopo cinque giorni dall'operazione in quanto, verificandosi in questo periodo il massimo incremento dell'attività mitotica, era ragionevole supporre che eventuali alterazioni del rapporto risultassero più evidenti. Dai dati ottenuti (Tabella II) risulta che:

1) in larve normali allo stadio 48 il numero assoluto delle mitosi presenti nel tetto mesencefalico è costantemente superiore a quello presente nel corpo. Ciò è in accordo con i dati di Baffoni (1967, [13]);

2) durante il processo rigenerativo, si riscontra un aumento significativo dell'attività mitotica tanto nella piastra alare che basale della regione controlaterale;

3) al quinto giorno postoperatorio, il rapporto n. mitosi piastra alare/n. mitosi piastra basale nella parte sinistra di individui sperimentali non subisce alcuna variazione significativa rispetto ai controlli pari stadio.

TABELLA II.

| STADIO 48 | | | | | | |
|----------------------------|-----------------------|-------|------------------------|-------|---------------------------------|---------------------|
| GIORNI 5 | | | | | | |
| | N. MITOSI p. alare | | N. MITOSI p. basale | | N. MITOSI p. alare/p. basale | |
| | T | C | T | C | T | C |
| Media | 61 | 17,4 | 34,8 | 10,4 | 1,78 ^(o) | 1,66 ^(o) |
| Errore standard | ±4,04 | ±2,04 | ±2,54 | ±0,81 | ±0,12 | ±0,10 |
| Indice t student | 9,64 | | 9,16 | | 0,76 | |
| P | <0,001 | | <0,001 | | >0,05 | |

Numero di mitosi presenti nella piastra alare e basale della regione mesencefalica controlaterale (lato sinistro) dopo 5 giorni dall'operazione T = trattati (5 casi); C = controlli (5 casi).

(^o) Media dei rapporti N. mitosi piastra alare/N. mitosi piastra basale.

B) *Andamento dell'attività mitotica nei monconi cefalico e caudale.*

I risultati dei computi mitotici in un tratto di 150 μ anteriore e posteriore al lobo ottico asportato (rispettivamente nella zona C+D e nella zona G+H della fig. 1), eseguiti dopo 3-5-10-15 giorni dall'operazione, sono riportati nella Tabella III. Essa rivela un andamento molto simile nella regione cefalica e caudale al lato operato; in particolare dimostra un aumento significativo del numero delle mitosi solo fra il quinto e il decimo giorno postoperatorio; al terzo e al quindicesimo giorno, la differenza fra il numero di mitosi dei trattati e quella dei controlli non è significativa.

Ho ritenuto interessante estendere le mie osservazioni anche nella zona situata 150 μ cefalicamente e caudalmente al lobo ottico residuo (rispettivamente zona A+B e E+F della fig. 1), allo scopo di analizzare l'andamento dell'attività mitotica in un territorio completamente illeso. I risultati di questi calcoli (Tabella IV) dimostrano che anche il lato sinistro, certamente non interessato nell'operazione, subisce un significativo incremento mitotico in entrambe le regioni e che tale incremento è paragonabile a quello che si verifica nelle corrispondenti regioni del lato destro; infatti la differenza tra il numero assoluto delle mitosi nei due lati non risulta significativa quando l'analisi venga eseguita in un tratto di 150 μ anteriormente e posteriormente alla zona della

TABELLA III.

| GIORNI (1) | STADIO | | N. CASI | | T | | MEDIA MITOSI | | Indice t student | | P | |
|------------|--------|-------|---------|---|------------|-----------|--------------|-----------|------------------|------|--------|--------|
| | T | C | T | C | a | p | a | p | a | p | a | p |
| 3 | 48 (-) | | 3 | | 24,3±1,77* | 17,3±1,86 | 20,7±3,72 | 15,3±2,41 | 0,88 | 0,67 | >0,05 | >0,05 |
| 5 | 48 | | 3 | 3 | 51±1,16 | 35,3±2,61 | | | 7,62 | 5,6 | <0,005 | <0,005 |
| 10 | 48-49 | 48-49 | 3 | 3 | 33,3±1,78 | 23±1,73 | 21,7±2,73 | 14±1,73 | 3,54 | 3,7 | <0,025 | <0,025 |
| 15 | 49 | 49 | 3 | 3 | 26,7±1,77 | 18,3±2,03 | 23±1,40 | 15,3±2,86 | 1,63 | 0,85 | >0,05 | >0,05 |

Numero di mitosi presenti in un tratto di 150 μ della regione situata anteriormente (a) e posteriormente (p) al lobo ottico operato (il destro). T = trattati; C = controlli.

(1) Come controllo dell'attività mitotica al terzo e al quinto giorno postoperatorio è stato usato un unico lotto di individui fissato dopo 5 giorni di permanenza a 18°C.

(*) $S\bar{x}$ = errore standard.

TABELLA IV.

| GIORNI | STADIO | CASI | ZONA ESAMINATA | MEDIA MITOSI | | Indice t student | P |
|--------|--------|------|-----------------|--------------|-----------|------------------|-------|
| | | | | I. d. | I. s. | | |
| 5 | 48 | 3 | A+B+C+D, fig. I | 51±1,16* | 46,7±1,77 | 2,04 | >0,05 |
| | | | B+D, fig. I | 18±0,58 | 11±1 | 4,40 | <0,02 |
| | | | E+F+G+H, fig. I | 35,3±2,61 | 33,3±4,38 | 0,39 | >0,05 |
| | | | E+G, fig. I | 12,3±1,45 | 13±2,08 | 0,27 | >0,05 |

Numero di mitosi nel lato destro (I. d.) e sinistro (I. s.) delle regioni situate cefalicamente e caudalmente al territorio di operazione (ved. fig. 1).

(*) $S\bar{x}$ = errore standard.

lesione. Tuttavia, se circoscriviamo la nostra indagine nell'immediata vicinanza del territorio di asportazione (zona B e D, 50μ a monte), risulta evidente che il lato destro (in diretto rapporto con l'area lesa) subisce un incremento mitotico significativamente maggiore rispetto al sinistro (completamente illeso).

Per esaminare più dettagliatamente il fenomeno della diversa distribuzione cefalo-caudale del numero delle mitosi sui due lati, ho eseguito il conteggio delle mitosi presenti nella zona A+B e nella zona C+D della fig. 1 su sezioni alterne. Dal grafico (fig. 3), risulta evidente che mentre nei 100μ più cefalici le due

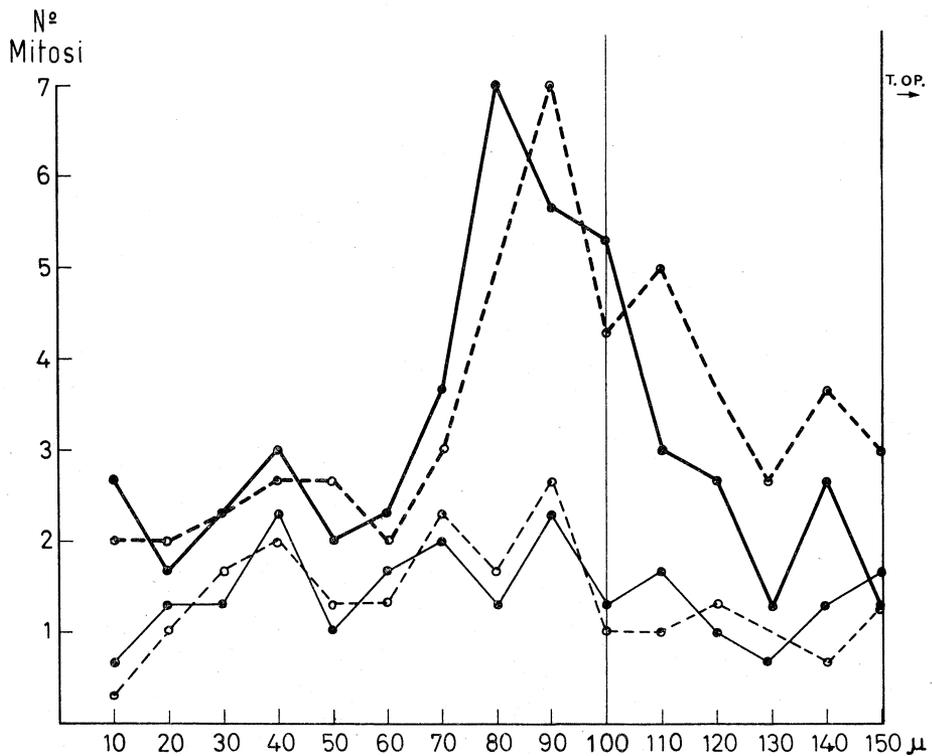


Fig. 3. - Numero di mitosi presenti, in sezioni alterne, sul lato destro (linea tratteggiata) e sinistro (linea continua) di un tratto di 150μ della regione posta cefalicamente al territorio di operazione (rispettivamente nella zona CD e AB della fig. 1). A tratto più sottile, i relativi controlli. Ogni valore riportato rappresenta la media di tre osservazioni. T. op. = territorio di operazione. Spiegazione nel testo.

curve si intersecano dimostrando un analogo andamento dell'attività mitotica nei due lati, nei 50μ più caudali le due curve si separano rivelando un costante maggior numero di mitosi sul lato destro rispetto al sinistro, sezione per sezione. Questo fenomeno è risultato evidente solo nella regione situata anteriormente mentre non è chiaro in quella situata posteriormente e quindi deve essere confortato da una più estesa indagine.

DISCUSSIONE.

Il problema dell'origine del materiale neoformato cui si deve la restituzione della parte asportata in seguito ad ablazione unilaterale in varie regioni del neurasse è stato lungamente studiato ed affrontato con varie tecniche; tuttavia questi studi, eseguiti per la grande maggioranza su materiale embrionale, non hanno portato ad un risultato comune. Infatti mentre per alcuni autori (Daltrop, 1932 [14]), il materiale neoformato deriva dai bordi anteriore e posteriore della lesione, per altri (Detwiler, 1944 [15], 1946 [16], 1947 [17]; Holtzer, 1951 [18]; Stefens, 1959 [19]; Corner, 1963 [20]), esso origina dalla parte controlaterale. Altri Autori ancora (Harrison, 1947 [21]), pur sostenendo un'origine dal lato residuo non escludono anche una partecipazione delle regioni cefalica e caudale alla zona di asportazione.

I dati riportati nella presente ricerca, relativi ai computi mitotici riscontrati nella regione residua, dimostrano che in seguito ad asportazione unilaterale di tutta la metà destra del mesencefalo in larve di *Xenopus laevis* la parte rigenerata deriva soprattutto dalla regione controlaterale. È infatti in questa regione che l'incremento mitotico raggiunge i valori più alti e si mantiene per un tempo più lungo. Essa rappresenta l'area che fornisce la maggior quantità di materiale necessario per l'edificazione della parte asportata collaborando, unitamente all'attività mitotica dell'area in via di rigenerazione, alla formazione di un tutto simmetrico. È interessante osservare che l'incremento della attività mitotica nella regione controlaterale si riscontra non solo a livello della piastra alare ma anche a quello della piastra basale. In particolare al quinto giorno postoperatorio i due incrementi sono del tutto comparabili.

Pertanto risulta evidente che anche la parte ventrale del lato intatto fornisce un notevole contributo alla rigenerazione del mesencefalo. L'importanza di questa regione nel processo rigenerativo in seguito ad asportazioni unilaterali del neurasse, risulta molto meno evidente quando l'operazione venga eseguita a stadi embrionali. Così Detwiler (1946 [16]), ha stabilito che in seguito ad ablazione del lato destro della regione presuntiva del mesencefalo in embrioni di *Amblystoma punctatum*, la restituzione avviene analogamente a quanto si verifica nel bulbo (Detwiler, 1944 [15]), grazie all'attiva proliferazione di cellule della regione dorsale della parte controlaterale e alla loro successiva migrazione verso il lato operato. Infatti l'Autore ha osservato una elevata attività mitotica massimamente circoscritta nella parte dorsale del lato intatto.

I risultati da me ottenuti, dimostrano che quando l'operazione di asportazione unilaterale del mesencefalo venga eseguita su individui di *Xenopus laevis* allo stato larvale, la rigenerazione della parte asportata si effettua a spese sia della regione ventrale che dorsale del lato intatto. Tuttavia, analogamente a quanto si verifica nel normale sviluppo, la piastra alare presenta, anche nel processo rigenerativo, un maggior numero di mitosi rispetto alla

basale e pertanto fornisce una quantità di materiale cellulare maggiore di quest'ultima. D'altra parte lo studio dell'attività mitotica nelle regioni situate cefalicamente e caudalmente all'area operata, fa ritenere che anche queste regioni cooperino seppure in minor grado alla edificazione della nuova struttura.

Che la zona controlaterale abbia una funzione prevalente nel processo rigenerativo è dimostrato dal fatto che mentre in quest'area il numero delle mitosi aumenta sensibilmente a partire dal terzo giorno postoperatorio e si mantiene elevato fino al quindicesimo dopo aver raggiunto il suo massimo valore al quinto giorno, il numero delle mitosi nei monconi cefalico e caudale è statisticamente superiore ai controlli solo tra il quinto e il decimo giorno postoperatorio. Inoltre anche nel periodo della massima attività mitotica (quinto giorno), l'incremento mitotico subito dalla regione cefalica e caudale alla zona operata è notevolmente inferiore a quello subito dalla parte controlaterale.

Interessante infine è il dato che dimostra un significativo aumento della attività mitotica anche nella regione situata anteriormente e posteriormente al lobo ottico residuo. Ciò è sorprendente in quanto entrambi i territori non sono stati interessati in alcun modo dall'operazione. Tale dato è tuttavia confortato da esperienze di Autori precedenti. In particolare Harrison (1947 [21]), osservò, dopo asportazione unilaterale del territorio presuntivo del bulbo in embrioni di *Amblystoma punctatum*, un incremento mitotico anche in regioni molto distanti dalla zona dell'operazione. Più recentemente Biancani e Marini (1963 [22]), hanno osservato in Tritoni adulti sottoposti ad asportazione della coda, attività mitotica del midollo spinale del moncone anche in zone lontane dal taglio. Analogamente Lombardo (1966 [23]), ha constatato la presenza di cariocinesi anche in territori lontani dalla regione lesa in seguito a rimozioni di parti del telencefalo di Rana.

Evidentemente l'ablazione di un qualsiasi territorio del neurasse, determina una stimolazione della attività mitotica che è massima nelle regioni circostanti alla zona lesa, ma che è rilevabile anche in regioni più distanti, completamente illese. Si può ritenere, in accordo con Harrison (1947 [21]), che il fenomeno sopradescritto sia comparabile a quello dell'iperplasia compensatoria osservata da Detwiler (1945 [24]) nell'emisfero residuo dopo rimozione di una metà del telencefalo.

BIBLIOGRAFIA.

- [1] STEFANELLI A., THERMES G. e PODDIE M., « Riv. Biol. », 42, 239 (1950).
- [2] STEFANELLI A., « Boll. Zool. », 18, 279 (1951).
- [3] JORDAN M., « Fol. Biol. », 3, 331 (1955).
- [4] SREBRO Z., « Fol. Biol. », 5, 211 (1957).
- [5] FILONI S., « Rend. Ist. Sci. Camerino », 5, 111 (1964 a).
- [6] SREBRO Z., « Fol. Biol. », 7, 191 (1959).
- [7] FILONI S., « R.-C. Acc. Naz. Lincei », ser. 8^a, 37, 521 (1964 b).
- [8] FILONI S., « La Ricerca Scientifica », 6, 376 (1965 a).
- [9] FILONI S., « Boll. Zool. », 32, 801 (1956 b).

- [10] TERRY J., « J. Exp. Zool. », 133, 389 (1956).
[11] CRELIN E. S., « J. Exp. Zool. », 120, 547 (1952).
[12] NIEUWKOOP P. D. e FABER J., *Normal Table of Xenopus laevis (Daudin)*, Amsterdam 1956.
[13] BAFFONI G. M. « R.-C. Acc. Naz. Lincei », ser. 8^a, 43, 608 (1967).
[14] DALTRUP A., « Arch. Entw. mechan. », 127, 1 (1932).
[15] DETWILER S. R., « J. Exp. Zool. », 96, 129 (1944).
[16] DETWILER S. R., « Anat. Rec. », 94, 229 (1946).
[17] DETWILER S. R., « J. Exp. Zool. », 104, 53 (1947).
[18] HOLTZER H., « J. Exp. Zool. », 117, 523 (1951).
[19] STEFENS L. B., « J. Exp. Zool. », 141, 353 (1959).
[20] CORNER M. A., « J. Exp. Zool. », 153, 301 (1963).
[21] HARRISON R. G., « J. Exp. Zool. », 106, 27 (1947).
[22] BIANCANI L. e MARINI M., « R.-C. Acc. Naz. Lincei », ser. 8^a, 35, 606 (1963).
[23] LOMBARDO F., « R.-C. Acc. Naz. Lincei », ser. 8^a, 41, 126 (1966).
[24] DETWILER S. R., « J. Exp. Zool. », 100, 103 (1945).