
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

SERGIO FILONI, MARIA VITTORIA DONATELLI

**Sulla rigenerazione del cervelletto in *Xenopus laevis*
(Daud.). Rigenerazione nella larva**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 46 (1969), n.1, p. 111–116.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1969_8_46_1_111_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 rigenerazione del cervelletto in Xenopus laevis (Daud.). Rigenerazione nella larva* (*). Nota di SERGIO FILONI e MARIA VITTORIA DONATELLI, presentata (**) dal Socio A. STEFANELLI.

SUMMARY. — The regeneration of the cerebellum in *Xenopus laevis* (Daud.) tadpoles operated at the stage 49 (according to Nieuwkoop e Faber) by ablation of the whole right rhomboidal lip, has been studied.

50 animals were operated. Some were sacrificed after 1-3-5-7-10-15-20-25-30-45 days, the others 1-2 months after the metamorphosis (3-4 months after having been operated).

The results have shown that the regenerative capacity of the cerebellum in tadpoles of *Xenopus laevis* at stage 49, is very high and it takes place with the same mechanisms which have been shown in the regeneration of the mesencephalon. In fact we can distinguish three phases: 1. a migration phase, during which some elements of the residual region lying in the ependymal layer migrate into the operated side and form a thin newformed wall; 2. a multiplicative phase, which results in a gradual thickening of the new ventricular wall; 3. a differentiative phase, characterized by the gradual differentiation of the neuroblasts constituting the regenerated region. The Purkinje neurons are the first which are differentiated.

One month after the metamorphosis the regeneration is very remarkable and every cellular layer of the cerebellum can be distinguished. Nevertheless only in a few cases the volume of the regenerated side is the same as the intact one.

INTRODUZIONE.

In precedenti ricerche volte a stabilire la capacità rigenerativa del sistema nervoso centrale in Anfibi anuri a vari stadi di sviluppo, uno di noi (Filoni, 1964 a e seguenti [1, 2, 3, 4, 5, 6]) ha messo in evidenza che varie regioni encefaliche di *Xenopus laevis* manifestano un notevole potere rigenerativo anche in stadi larvali piuttosto avanzati.

In particolare è stata dimostrata la pressoché completa rigenerazione morfologica ed istologica del telencefalo (Filoni, 1964 a [1]) e del mesencefalo (Filoni 1964 b [2]; 1965 a [3]; 1965 b [4]; 1968 [5]; Filoni e Oberti 1968 [6]) quando l'operazione venga eseguita a stadi larvali compresi fra lo stadio 47-48 e lo stadio 50 (secondo Nieuwkoop e Faber [7]).

Durante l'esame degli encefali che avevano subito l'asportazione dell'intera metà destra del mesencefalo, è stato osservato che nei rari casi in cui, per un'operazione non correttamente eseguita, veniva asportata anche parte della regione metencefalica omolaterale, si manifestavano elevate attività rigenerative non solo al livello del mesencefalo ma anche a quello del cervelletto.

Poiché dall'analisi bibliografica è risultato che negli Anfibi non sono state compiute ricerche sulla capacità rigenerativa di questo settore del neurasse, abbiamo ritenuto interessante eseguire uno studio particolareggiato sulla rige-

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

(**) Nella seduta dell'11 gennaio 1969.

nerazione del cervelletto in *Xenopus laevis* a vari stadi larvali e dopo la metamorfosi.

In questa Nota preliminare saranno esposti i primi risultati circa la rigenerazione del cervelletto in larve operate allo stadio 49 (secondo Nieuwkoop e Faber [7]).

MATERIALE E METODO.

Come risulta dalle osservazioni di Larsell in *Hyla regilla* (1923 [8], 1925 [9]) e di Baffoni su *Bufo bufo* (1959 [10]) e *Xenopus laevis* (1967 [11]), l'abbozzo impari dorsale del metencefalo degli Anuri origina dallo sviluppo di due ispessimenti laterali delle piastre alari della porzione rostrale del romboencefalo (detti labbra romboidali) i quali convergendo dorsalmente vengono a costituire la lamina cerebellare. In *Xenopus*, tale fusione avviene allo stadio 54, ma già allo stadio 49 le labbra romboidali sono notevolmente ispessite.

In questa esperienza è stata eseguita l'asportazione dell'intero labbro romboidale destro a 50 larve di *Xenopus laevis* Daud. allo stadio 49 (secondo Nieuwkoop e Faber [7]) ottenute in seguito ad ovulazione indotta con ormoni gonadotropi (Pregnyl della Organon).

Le larve provenivano tutte da una stessa deposizione e quindi costituivano un lotto omogeneo.

L'operazione è stata eseguita al microscopio da dissezione mediante finissimi aghi di tungsteno ed un sottilissimo bisturi appositamente costruito.

Dopo l'operazione, gli individui operati venivano trasferiti direttamente in una capace vasca, costantemente areata, ed allevati alla temperatura di circa 24°C.

Le larve hanno sopportato molto bene l'asportazione unilaterale del labbro romboidale poiché la sopravvivenza era superiore al 90%; tuttavia subito dopo l'intervento mostravano notevoli anomalie nella natazione che però diminuivano notevolmente già 24 ore dopo l'operazione e scomparivano nei giorni successivi.

Gli individui operati, nutriti come i controlli con polvere di ortica bollita, si sviluppavano e metamorfosavano normalmente.

Le larve sono state fissate in parte dopo 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 25, 30, 45 giorni dopo l'operazione e in parte 1-2 mesi dopo la metamorfosi (3-4 mesi dopo l'operazione). Gli encefali, sezionati a 5-10 μ di spessore, venivano colorati con emallume-eosina, Mallory-Azan, o impregnati con il metodo di Bodian.

DESCRIZIONE DEI RISULTATI.

In larve di *Xenopus* allo stadio 49, le labbra romboidali, pur essendo ancora separate da una tela sterile, sono già volumetricamente cospicue e si spingono dorsalmente incurvandosi verso la linea mediana.

Già a questo stadio si osservano numerosi elementi di Purkinje in via di differenziamento, mentre gli strati molecolare e granulare non sono ancora distinguibili.

La sostanza bianca ha già uno spessore considerevole e nella sua compagine si osservano rari elementi cellulari che negli stadi più avanzati partecipano alla costituzione del futuro strato molecolare.

Ventiquattro ore dopo l'asportazione del labbro romboidale destro, si osserva la formazione di un coagulo sanguigno che chiude lateralmente il IV ventricolo.

Data la modesta estensione della ferita, già a questo stadio la pelle ricopre completamente il luogo dell'operazione e nella maggioranza dei casi si mostra in questo punto notevolmente ispessita.

Sulla superficie di taglio si osservano numerose cellule e fibre in degenerazione.

Al terzo giorno postoperatorio, il coagulo sanguigno è quasi completamente riassorbito (Tav. I, fig. 1). Contemporaneamente inizia la rigenerazione della pia madre primitiva che chiude il ventricolo romboencefalico.

La rigenerazione della meninge è un processo piuttosto lungo che si attua rapidamente nella regione più cefalica (Tav. I, fig. 2), ma che procede in modo tanto più lento quanto più ci si sposta caudalmente. Mentre infatti nella zona situata subito dopo il mesencefalo la chiusura del ventricolo è già completa al quinto giorno postoperatorio, nella regione posta in prossimità dell'origine del settimo paio dei nervi cranici, la meninge non è ancora completamente rigenerata anche dopo quindici giorni dall'operazione.

La chiusura del IV ventricolo operata dalla pia madre rigenerata, consente ad elementi provenienti dalla regione residua, la formazione di una sottile parte neoformata. Infatti la meninge viene a costituire il substrato morfologico su cui questi elementi si distribuiscono in uno o pochi strati. Tali cellule hanno l'aspetto di tipici elementi indifferenziati con nucleo fortemente allungato costituito da fini granuli di cromatina omogeneamente distribuiti.

La rigenerazione della parete metencefalica neoformata procede di pari passo con la rigenerazione della meninge poiché non rigenera là dove la meninge non si è ancora ricostituita.

Nella maggioranza dei casi, già al settimo giorno postoperatorio, si osserva la formazione di una parete rigenerata nella zona più cefalica della regione metencefalica (Tav. I, fig. 3).

Nei giorni successivi, grazie all'attività mitotica dei suoi elementi, specie in prossimità dell'istmo, l'area rigenerante si ispessisce gradualmente.

Questa fase moltiplicativa non è molto intensa poiché dopo 15 giorni dall'operazione l'area neoformata è ancora costituita da pochi strati cellulari, anche ai livelli più cefalici.

Fino a questo periodo, le sue cellule hanno ancora un aspetto indifferenziato; tuttavia, alla periferia della sostanza grigia omogenea, la sostanza bianca ha già raggiunto un volume considerevole.

Fra il ventesimo e il venticinquesimo giorno postoperatorio, nella sostanza bianca periferica sono presenti alcuni rari elementi che con ogni probabilità rappresentano le prime cellule del futuro strato molecolare (Tav. I, fig. 4). Nello stesso periodo di tempo, nella sostanza grigia si osservano fra gli ele-

menti indifferenziati, alcune cellule con nucleo voluminoso la cui cromatina non appare omogeneamente distribuita nel karioplasma ma organizzata in zolle aderenti alla membrana nucleare.

Fra un mese e quarantacinque giorni dopo l'intervento, molti di questi elementi sia per le dimensioni del pirenoforo che per la distribuzione della cromatina, assumono un aspetto comparabile a quello delle cellule di Purkinje presenti nella regione metencefalica rimasta intatta (Tav. II, fig. 1). È in questo periodo che nella maggioranza dei casi si ha la fusione degli strati delle cellule di Purkinje del lato intatto e di quello rigenerante. In alcuni casi, la fusione delle due labbra romboidali non avviene e, anche dopo un mese dalla metamorfosi, fra il lato destro e il sinistro si interpone una tela sterile.

Un mese dopo la metamorfosi, il volume del rigenerato è notevole, ma solo in alcuni casi raggiunge le dimensioni del lato intatto (Tav. II, figg. 2 e 3). Da un punto di vista istologico, la parte destra del cervelletto è perfettamente comparabile a quella intatta. Nella regione rigenerata si osservano, fra lo strato molecolare e granulare, numerose cellule di Purkinje a differenziamento ultimato, disordinatamente disposte in tre, quattro strati (Tav. II, fig. 4). Anche nei casi sopradescritti di non fusione delle labbra romboidali, si osserva che la mancanza della unione morfologica delle due parti metencefaliche non impedisce un normale differenziamento istologico sia della regione intatta che di quella rigenerata. In questi casi, tuttavia, il volume del rigenerato è molto esiguo.

DISCUSSIONE.

I dati riportati in questa breve Nota, relativi alla rigenerazione del cervelletto dopo asportazioni unilaterali in larve di *Xenopus laevis*, dimostrano il notevole potere rigenerativo di questo settore del neurasse anche quando l'operazione venga eseguita a stadi larvali piuttosto avanzati (stadio 49 secondo Nieuwkoop e Faber).

Da essi risulta infatti che 3 mesi dopo l'operazione e 1 mese dopo la metamorfosi, la citoarchitettura della regione rigenerata è in tutto comparabile a quella della metà intatta, almeno da quanto è dato vedere dalle colorazioni usate. Tuttavia è evidente che tale capacità rigenerativa è inferiore a quella che si osserva al livello del telencefalo e del mesencefalo (Filoni, 1964 a [1]; 1964 b [2]; 1965 a [3]; 1965 b [4]; 1968 [5]; Filoni e Oberti, 1968 [6] poiché solo raramente il volume del rigenerato eguaglia quello del lato integro.

Circa i processi con cui si realizza la rigenerazione del cervelletto, nella presente ricerca si è osservato che essi sono fondamentalmente simili a quelli che intervengono nella rigenerazione del mesencefalo in seguito ad asportazioni unilaterali (Filoni, in corso di stampa).

Anche in questo caso, ad un processo cicatriziale iniziale consistente nella formazione di un coagulo sanguigno che chiude il IV ventricolo e nella rigenerazione della pelle al di sopra del coagulo, segue il processo rigenerativo del sistema nervoso che si attua mediante tre fasi fondamentali: fase migratoria, fase moltiplicativa, fase di differenziamento istologico.

Nella prima fase, elementi indifferenziati situati nello strato espendimale della regione residua, dopo essersi attivamente moltiplicati, migrano nel lato operato per organizzarsi in uno o più strati cellulari. Tali cellule hanno l'aspetto di tipici elementi migranti con nucleo allungato e cromatina uniformemente diffusa nel carioplasma.

Allo stato attuale delle ricerche, non possiamo ancora precisare quale sia l'esatta provenienza di tali elementi poiché è necessario un accurato studio dell'attività mitotica nella regione residua.

Come avviene nella rigenerazione del mesencefalo, in questa fase la meninge svolge un ruolo fondamentale in quanto rappresenta il substrato morfologico che consente un'ordinata disposizione delle cellule neoformate.

Nella seconda fase, l'esile parete ventricolare rigenerata si ispessisce gradualmente grazie all'attività mitotica dei suoi elementi.

La terza fase, inizia solo fra il ventesimo e trentesimo giorno postoperatorio: è in questo periodo che si osservano le prime modificazioni nucleari del differenziamento istologico.

Come avviene nello sviluppo (Baffoni, 1959 [10]), anche nel processo rigenerativo i primi neuroni che si differenziano sono quelli di Purkinje.

Dagli studi di Baffoni (1959) sul differenziamento di questi neuroni durante lo sviluppo di *Bufo bufo*, risulta che il differenziamento dei neuroblasti di Purkinje non è sincrono poiché inizia prima sui lati della lamina cerebellare (allo stadio XI secondo Taylor e Kollros) e solo molto più tardi raggiunge la linea mediana. Solo dopo 20 giorni di vita terrestre tutte le cellule di Purkinje sono diventate simili.

Inoltre l'Autore ha dimostrato nel cervelletto dei Rospì adulti processi degenerativi a carico di cellule di Purkinje differenziate preesistenti e processi differenziativi di nuovi elementi di Purkinje da neuroblasti quiescenti.

In base a queste osservazioni, le cellule di Purkinje vanno considerate come neuroni a ciclo breve e differenziazione tardiva (secondo la classificazione di Stefanelli, 1955 [12]).

Nello *Xenopus*, i neuroni di Purkinje si differenziano meno tardivamente che in *Bufo*, poiché si osservano neuroni di Purkinje in via di differenziamento fin dallo stadio 46 (Nieuwkoop e Faber, 1956 [7]); tuttavia, come in *Bufo*, non si differenziano contemporaneamente.

A questo punto è interessante chiedersi se i neuroni di Purkinje presenti nella metà rigenerata siano neoformati cioè derivino da elementi indeterminati che, dopo essersi attivamente moltiplicati, si determinano e differenziano sotto lo stimolo regolativo, oppure si formino a spese di elementi già determinati, provenienti dalla regione residua, che si differenziano secondo il proprio destino.

Recenti ricerche eseguite da uno di noi (Filoni, in corso di stampa) sulla rigenerazione del tetto ottico, hanno chiaramente dimostrato che le cellule del tetto rigenerato si determinano e differenziano durante il processo rigenerativo.

Infatti, dopo asportazione di entrambi i lobi ottici, ha ottenuto la restituzione della parte asportata non solo da un punto di vista morfologico

ma anche da quello istologico, come è dimostrato dalla presenza dei neuroni del nucleo mesencefalico del V.

Poiché in queste condizioni sperimentali, il tetto ottico rigenerato si forma a spese di cellule indifferenziate provenienti da territori completamente diversi (quali il toro semicircolare e la base del mesencefalo), è evidente che la loro determinazione non è preesistente ma è indotta dallo stimolo regolativo.

In base ai dati della presente ricerca, sembra fin d'ora assai probabile che anche la rigenerazione del cervelletto avvenga ad opera di elementi indeterminati poiché il differenziamento dei neuroni di Purkinje nell'area rigenerante inizia solo a partire dal ventesimo giorno postoperatorio, quando il differenziamento di molti neuroni di Purkinje presenti nel lato rimasto indenne è già da tempo in atto. Sembra logico ritenere che se le cellule di Purkinje rigenerate derivassero da elementi già determinati provenienti dal lato intatto, il loro differenziamento dovrebbe essere molto più precoce.

Comunque solo lo studio della rigenerazione del cervelletto dopo asportazioni bilaterali, unitamente a quello della rigenerazione del cervelletto in stadi postmetamorfici (quando tutti i neuroni di Purkinje sono differenziati), potrà dire se questa ipotesi è esatta.

BIBLIOGRAFIA.

- [1] FILONI S., « Rend. Ist. Sci. Camerino », 5, 111 (1964 a).
- [2] FILONI S., « R.-C. Acc. Naz. Lincei », ser. VIII, 37, 521 (1964 b).
- [3] FILONI S., « La Ricerca Scientifica », 6, 376 (1965 a).
- [4] FILONI S., « Boll. Zool. », 32, 801 (1965 b).
- [5] FILONI S., « R.-C. Acc. Naz. Lincei », ser. VIII, 45, 18 (1968).
- [6] FILONI S. e OBERTI C., « R.-C. Acc. Naz. Lincei », ser. VIII, 45, 28 (1968).
- [7] NIEUWKOOP P. D. e FABER J., *Normal table of Xenopus laevis (Daudin)*, Amsterdam 1956.
- [8] LARSELL O., « J. Comp. Neurol. », 36, 89 (1923).
- [9] LARSELL O., « J. Comp. Neurol. », 39, 249 (1925).
- [10] BAFFONI G. M., « Riv. Neuroembriol. », 5, 33 (1959).
- [11] BAFFONI G. M., « R.-C. Acc. Naz. Lincei », ser. VIII, 43, 118 (1967).
- [12] STEFANELLI A., « La Ricerca Scientifica », 25, 2778 (1955).

SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE I-II

TAVOLA I.

- Fig. 1. - *Dopo 3 giorni dall'operazione*: il coagulo sanguigno si è completamente riassorbito. La pelle al di sopra della ferita è rigenerata. 110 ×.
- Fig. 2. - *Dopo 5 giorni dall'operazione*: le meninge ha chiuso il ventricolo. 110 ×.
- Fig. 3. - *Dopo 7 giorni dall'operazione*: elementi indifferenziati migrati dalla regione residua si accollano alla pia madre e costituiscono un'esile parete ventricolare neoformata. 110 ×.
- Fig. 4. - *Dopo 25 giorni dall'operazione*: nell'area rigenerante, già volumetricamente cospicua, inizia il differenziamento dei neuroni di Purkinje. 110 ×.

TAVOLA II.

- Fig. 1. - *Dopo 45 giorni dall'operazione*.
- Figg. 2-3. - *Dopo 3 mesi dall'operazione e 1 mese dopo la metamorfosi*.
CC = commissura cerebellare; fig. 2: 90 ×; fig. 3: 60 ×.
- Fig. 4. - *Area rigenerata dopo 3 mesi dall'operazione e 1 mese dalla metamorfosi*. 370 ×.



