
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

ANNA MARIA ZACCHEI, MARIA TERESA MANZELLA

Il comportamento del midollo allungato di *Xenopus laevis* D. in coltura

Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 50 (1971), n.6, p. 799–802.

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1971_8_50_6_799_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. — *Il comportamento del midollo allungato di Xenopus laevis D. in coltura* (*). Nota di ANNA MARIA ZACCHEI e MARIA TERESA MANZELLA, presentata (**) dal Socio A. STEFANELLI.

SUMMARY. — *Medulla explants* dissected from *Xenopus laevis* D. at the stage 53-56 were cultured *in vitro* for three weeks. In these long-term cultures, stained by the Bodian method, a remarkable differentiation of the neurons and fibers was observed. The axons grow out in many different patterns such as bundles and networks as usually observed for the nervous tissue in culture.

In precedenti lavori sullo sviluppo del sistema nervoso in coltura (Stefanelli e Zacchei, 1959; Stefanelli, 1960, 1962; Stefanelli, Zacchei e Caravita, 1964; Stefanelli, Zacchei *et al.*, 1964) si è indagato sui vari fattori che influenzano l'orientamento ed il differenziamento delle fibre nervose e sui loro rapporti con altri tipi cellulari, usando come materiale embrioni di pollo e di quaglia.

Abbiamo ora messo a punto la tecnica per coltivare sistema nervoso di Anfibi ed abbiamo iniziato le nostre ricerche studiando midollo allungato dello *Xenopus laevis* D. soprattutto considerando la facilità con cui sono reperibili, nel tegmento motorio rombencefalico, i due grossi elementi mauthneriani, già da tempo oggetto di studio sia *in vivo* che *in vitro* nel nostro Istituto.

Da quando Harrison (1910) seguì per primo l'accrescimento *in vitro* delle fibre dalle cellule del canale midollare di embrioni di Rana, le indagini e le esperienze che la coltura di tessuti e di cellule ha consentito sono state condotte quasi esclusivamente su Uccelli e Mammiferi. Sul sistema nervoso degli Anfibi in coltura, infatti, non si conoscono dati in letteratura e le uniche notizie riguardano il comportamento di frammenti di gastrule precoci (Barth e Barth, 1962; Jones e Elsdale, 1963) o di gastrule avanzate (Patricolo, 1967).

Riferiamo in questa prima Nota i dati ottenuti dalla coltura di intere sezioni di midollo allungato prelevate da larve in stadi molto avanzati dello sviluppo, immediatamente precedenti la metamorfosi. Le nostre osservazioni hanno mostrato che anche in questo caso, come per gli Uccelli e per i Mammiferi, si può ottenere *in vitro* uno sviluppo completo degli elementi nervosi; questo fatto ci sembra di particolare valore, considerando che tutte le precedenti ricerche riguardano, come si è detto, cellule provenienti da embrioni molto più giovani.

(*) Lavoro eseguito nell'Istituto di Anatomia Comparata G. B. Grassi dell'Università di Roma con un contributo del C.N.R.

(**) Nella seduta del 18 giugno 1971.

MATERIALE E METODI

I segmenti di midollo allungato sono stati prelevati da larve allo stadio 53-56 di *Xenopus laevis* D. ottenute provocando l'ovulazione con ormoni gonadotropi, secondo la tecnica di Neuwkoop e Faber.

Le larve, prima del prelievo dei tessuti, sono state tenute nella soluzione di Niu e Twitty con 300.000 U di Penicillina, 300 mg di Streptomicina solfato, 10 mg di Tetraciclina-HCl, 500 mg di Sulfatiazolo/l., secondo il metodo di Moser, Hadji-Hazimi e Slatkine (1960).

I metencefali, privati delle meningi, sono stati sezionati in segmenti di 1-1,5 mm di spessore; pertanto ogni espianto rappresenta una intera fetta trasversale del bulbo; le colture sono state fatte sul doppio coprioggetto di Maximow, con la tecnica della goccia pendente, usando come substrato un coagulo di plasma o di collagene (Bornstein, 1958).

Il mezzo di coltura usato è costituito da: 82 % della soluzione di Seto (Seto e Rounds, 1968), 5 % di ultrafiltrato di uovo intero, 13 % di siero di vitello, cui sono aggiunti 100 U/cc di Penicillina G, 0,1 mg/cc di Streptomicina solfato, 500 U/cc di Mycostatin, a pH 7,4.

Le colture sono state osservate ogni giorno al contrasto di fase ed il mezzo è stato cambiato ogni terzo giorno. A tempi diversi, le colture sono state fissate con il liquido di Bouin e colorate con il metodo di Bodian al cloruro d'oro.

OSSERVAZIONI

I dati che qui riportiamo sono stati ottenuti, per la quasi totalità, da espianti colorati con il metodo di Bodian e mantenuti *in vitro* per periodi variabili da 7 a 23 giorni. Non consideriamo in questa Nota le differenze provocate dal substrato, perché esse non sono sostanziali; tuttavia è apparso evidente che il coagulo di plasma è il supporto più idoneo per l'accrescimento delle fibre e che la pellicola di collagene consente una più accentuata proliferazione delle cellule di Schwann.

Con l'osservazione giornaliera a contrasto di fase abbiamo potuto seguire l'attecchimento ed il comportamento delle colture a partire dalle prime 24-48 ore, in cui solo piccoli gruppi di fibre e di neuroglia emergono dagli espianti. Nei giorni successivi l'espianto si distende ed intorno ad esso, a costituire un monostrato su una zona abbastanza ampia, si forma una rete di cellule a contatto; in seguito un numero sempre maggiore di fibre fuoriesce dall'espianto e la loro proliferazione si estende tutto intorno ad esso (Tavola I).

Nell'osservazione di una coltura differenziata si possono quindi considerare due zone: una zona centrale dove sono i neuroni con una fitta maglia di neuriti e neuroglia e una zona periferica di sviluppo dei neuriti, della neuroglia e di cellule di presumibile origine dalle meningi.

Negli espianti in cui si è raggiunta una buona distensione del pezzo sul substrato sono riconoscibili molte delle relazioni topografiche che si notano

in una sezione trasversa: in midolli non coltivati si evidenziano nella regione ventrale alcune grosse cellule nervose multipolari, che hanno un citoplasma ben impregnato e prolungamenti dendritici ben visibili, mentre nella regione dorso-laterale vi è una numerosa popolazione di piccole cellule nervose.

La distribuzione dei fasci di fibre è molto varia e le fibre hanno tendenza a fuoriuscire da punti indeterminati del frammento in coltura: i gruppi più cospicui contengono alcuni assoni piuttosto grandi; quando è possibile risalire alla loro origine centrale si vede che sempre cominciano da grosse cellule motorie ventrali (Tavola II). Perifericamente questi grossi assoni si dividono più volte; molti aumentano gradualmente in larghezza e finiscono tutti con arborizzazioni terminali libere di varia complessità. Le fibre più grosse variano in lunghezza ma sono sempre molto estese; le fibre più fini sono più difficilmente rintracciabili e possono essere seguite solo per brevi tratti al di fuori dell'espianto. Lunghi assoni contribuiscono a formare un fine plesso di fibre che si estendono intorno all'espianto ramificandosi ripetutamente (Tavola II, 3).

Il decorso delle fibre non è sempre rettilineo: dopo un primo tratto che segue un cammino centrifugo, diritto, numerose fibre deviano seguendo percorsi tortuosi e si dividono in filamenti sottili che formano plessi variamente complicati; a contatto con altri fasci di fibre formano fusioni con le varie modalità ampiamente descritte da Levi nel pollo. Quando le fibre vengono a contatto delle cellule gliali formano in alcuni casi su di esse grovigli più o meno complessi, sfioccandosi ripetutamente.

Gli elementi non nervosi sono notevolmente più abbondanti e la proporzione varia da un espianto all'altro (Tavola I e Tavola II, 4); queste differenze sono probabilmente in rapporto alle condizioni del mezzo ed alla più o meno completa asportazione delle meningi dalla sezione posta in coltura.

Il comportamento dei segmenti midollari da noi studiati è paragonabile a quello osservato nelle colture a lungo tempo di midollo spinale di Uccelli e Mammiferi (Peterson *et al.*, 1965; Crain e Peterson, 1964; Bornstein, 1965; Bunge *et al.*, 1965; Crain, 1966; Sobkowicz, Guillery e Bornstein, 1968) in cui sono state descritte modalità di organizzazione delle cellule e delle fibre che somigliano alle strutture osservabili nelle sezioni istologiche di un midollo integro di età corrispondente.

In quelli dei nostri preparati in cui la distensione dell'espianto sul substrato ha consentito di esaminare alcuni dei gruppi cellulari, abbiamo potuto notare che il differenziamento degli elementi nervosi era avanzato (Tavola II, 1) e che la fascicolazione era più cospicua e molto più complessa rispetto alle condizioni esistenti nell'espianto al momento della messa in coltura. Lo sviluppo degli assoni che fuoriescono dall'espianto ovviamente risente delle condizioni meccaniche della coltura, che li obbligano a svilupparsi in un solo piano, l'orizzontale; la maggior parte di essi si allontana perciò dall'espianto radialmente e, per un certo tratto, in modo lineare.

Il supporto delle cellule gliali, che a sua volta si è sviluppato in modo non omogeneo, in rapporto alla competizione con le cellule delle meningi, influisce in modo diverso sul successivo comportamento delle fibre: queste

infatti, a più o meno breve distanza dall'espianto, risentono della presenza di un ostacolo, e mostrano delle deviazioni. Questo spiega la formazione di grosse fascicolazioni, che girano intorno all'espianto e che, via via, aumentano di spessore per l'inserirsi di nuove fibre intorno alla fibra « pioniera »; dà inoltre ragione della formazione di anse, dello sfioccarsi (Tavola II, 5) intorno e sopra ad una cellula delle fibre più sottili che compongono i fasci e degli aspetti con i quali ha termine il percorso delle fibre.

In questa Nota preliminare non si fa riferimento alle cellule di Mauthner: con le osservazioni finora compiute non è stato infatti possibile individuare questi caratteristici elementi tra i grossi neuroni motori presenti nella parte ventrale delle sezioni in coltura. Una possibile spiegazione è che l'involuzione dei neuroni di Mauthner, che nelle larve si verifica spontaneamente in uno stadio immediatamente successivo a quello da noi preso in esame (in rapporto al riassorbimento della coda), sia accentuata ed accelerata dalle condizioni artificiali che si realizzano *in vitro*. Ciò sia in rapporto alla ovvia mancanza dello specifico territorio di innervazione che alla lentezza (diversi giorni) con la quale si verifica la distensione dell'espianto sul substrato.

Per chiarire questo punto sono in corso ricerche su stadi larvali più precoci e su stadi embrionali; ci si propone, cioè, di studiare il comportamento *in vitro* di questi elementi ponendoli in coltura nel momento in cui il loro differenziamento è appena iniziato o non ancora completo.

BIBLIOGRAFIA

- A. STEFANELLI e A. M. ZACCHEI, « R. Accad. Naz. dei Lincei », 26, 753 (1959).
A. STEFANELLI, « Acta Embr. Exp. Morph. », 3, 159 (1960).
A. STEFANELLI, « Rend. Ist. Sc. Univ. Camerino », 3, 113 (1962).
A. STEFANELLI, A. M. ZACCHEI e S. CARAVITA, « Rend. Ist. Sc. Univ. Camerino », 5, 141 (1964).
A. STEFANELLI, A. M. ZACCHEI, S. CARAVITA, E. CATALDI e L. IERADI, « Boll. di Zool. », 31, fasc. II (1964).
L. G. BARTH e L. G. BARTH, « J. Morphol. », 110, 347 (1962).
K. W. JONES e T. R. ELSDALE, « J. Embryol Exp. Morph. », 11, 135 (1963).
E. PATRICOLO, « Acta Embr. Exp. Morph. », 10, 75 (1967).
H. MÖSER, I. HADJI-HAZIMI e S. SLATKINE, « Rev. Suisse de Zool. », 75, 619 (1968).
M. B. BORNSTEIN, « Lab. Invest. », 7, 134 (1958).
T. SETO e D. E. ROUNDS, « Methods in Cell Physiology », 3, 75 (1968).
S. M. CRAIN e E. R. PETERSON, « J. Cell and Comp. Physiol. », 64, 1 (1964).
E. R. PETERSON, S. M. CRAIN e M. R. MURRAY, « Zeit. Zellforsch. », 66, 130 (1965).
M. B. BORNSTEIN, « Monograph. », No 2, Slow, Latent and Temperature Virus Infections, 177 (1965).
R. P. BUNGE, M. B. BUNGE e E. R. PETERSON, « J. Cel. Biol. », 24, 163 (1965).
S. M. CRAIN, « Anat. Rec. », 148, 273 (1966).
H. M. SOBKOWICZ, R. W. GUILLERY e M. B. BORNSTEIN, « J. Comp. Neur. », 132, 365 (1968).



