

---

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

---

GIORGIO M. BAFFONI

**Effetti della temperatura sull'attività mitotica e sulla migrazione ventricolare del midollo spinale durante lo sviluppo embrionale di un Anfibio anuro**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 52 (1972), n.6, p. 960-964.*  
Accademia Nazionale dei Lincei

<[http://www.bdim.eu/item?id=RLINA\\_1972\\_8\\_52\\_6\\_960\\_0](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1972_8_52_6_960_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.** — *Effetti della temperatura sull'attività mitotica e sulla migrazione ventricolare del midollo spinale durante lo sviluppo embrionale di un Anfibio anuro* (\*). Nota di GIORGIO M. BAFFONI, presentata (\*\*) dal Socio A. STEFANELLI.

SUMMARY. — The mitotic population in the spinal cord of frog embryos submitted to 23° C instead of 12° C is triple. The time of the embryonal development at 12° C being quintuple, it must be deduced that at the lower temperature the mitotic phases are lengthened more than the interphasic ones.

The rate of the extraventricular mitoses increases (twice) in the spinal cord of frogs developed at 12° C. This means that the migration of the nerve cells is more influenced by the varying temperature than the cellular cycle is.

The results demonstrate that the embryonal nervous system may be satisfactorily used for studies on cell motility.

L'ipotesi che le cellule nervose in procinto di dividersi dallo strato mantellare si portino nell'epitelio ventricolare del tubo neurale (neurepitelio) per tornare quindi, effettuata la mitosi, nello strato mantellare [1], è stata confermata da recenti ricerche citochimiche e autoradiografiche (ved. [2]); con la dimostrazione di questa migrazione ventricolare, si è venuti in possesso di un modello ideale per l'analisi dei fattori che influenzano la migrazione cellulare nell'ambiente naturale di un organismo in sviluppo, cioè in assenza delle condizioni artificiali proprie delle culture *in vitro*.

In precedenti osservazioni è stato precisato che durante lo sviluppo larvale di Anfibi la migrazione ventricolare è di norma impedita ad una certa aliquota di cellule, come attesta la frequenza di mitosi extraventricolari; tale frequenza è risultata tipica per ogni specie esaminata e costante durante lo sviluppo larvale, indipendentemente dalle variazioni di densità mitotica [2]. È stato anche verificato che durante la rigenerazione del tessuto nervoso in adulti di Anfibi le mitosi extraventricolari presentano la stessa frequenza del periodo larvale in corrispondenza del tessuto neoformato, ma aumentano considerevolmente tra le mitosi del tessuto adulto: il fenomeno è stato attribuito all'ostacolo meccanico frapposto alla migrazione ventricolare e rappresentato dal feltro dei prolungamenti, infittito da sinapsi e desmosomi, del tessuto differenziato [3]. È stato infine osservato che nel tessuto nervoso in sviluppo (larve di Anfibi) la migrazione ventricolare è rallentata da sostanze

(\*) Ricerca eseguita nell'Istituto di Anatomia comparata dell'Università di Modena.

(\*\*) Nella seduta del 16 giugno 1972.

che modificano la viscosità cellulare, quali un alcaloide (colchicina) ed un ormone (tiroxina) [4].

La presente Nota riferisce i primi risultati ottenuti da esperienze intese a verificare l'influenza della temperatura sulla migrazione ventricolare delle cellule nervose del midollo spinale in sviluppo di un Anfibio anuro.

Ricordo in proposito che osservazioni su culture *in vitro* hanno verificato che la temperatura influenza la velocità mitotica [5, 6, 7, 8, 9] ed i movimenti ameboidei [10, 11, 12, ecc.] ivi compreso l'accrescimento dell'assone [13, 14].

Per questa ricerca da una massa di uova, deposta da una singola femmina di *Rana esculenta* L., sono stati separati due lotti di embrioni a stadio di placca neurale (stadio 16 di *R. esculenta* [15]). Uno dei due lotti è stato allevato in armadio termostatico a  $12^{\circ}\text{C} \pm 1$  e l'altro a  $23^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . L'esperienza è stata interrotta all'inizio del periodo larvale, inteso *sensu* Contronei [16] quando l'animale cominciava ad alimentarsi (stadio 31). Va notato che nel lotto tenuto a temperatura più bassa ( $12^{\circ}$ ) la durata dello sviluppo è risultata cinque volte maggiore di quella del lotto tenuto a temperatura più elevata (rispettivamente 63 e 12 giorni) e che la taglia somatica degli animali era maggiore, in accordo con quanto è stato verificato in un periodo larvale di *R. pipiens* [17]. Gli animali al termine dell'esperimento sono stati fissati alla stessa ora (ore 12,30, onde evitare l'eventuale influsso dei cicli circadiani) nel liquido di Sanfelice, quindi inclusi in celloidina-paraffina, sezionati in serie trasversali a  $5 \mu$  di spessore ed i preparati sono stati infine colorati in Mallory-Azan <sup>(1)</sup>. Tutte le mitosi (da prometafase ad anafase) di dimensioni omogenee, presenti nel midollo spinale del tronco (a partire dal calamo fino al livello dell'apertura anale), sono state contate, tenendo separate quelle allineate nell'epitelio ventricolare (neurepitelio) dalle mitosi mantellari (extraventricolari), evitando il doppio conteggio di una stessa mitosi e seguendo gli accorgimenti già utilizzati per questo tipo di ricerca [2, 18].

Nella Tabella I sono riportati i valori medi ottenuti su almeno tre esemplari di ogni lotto.

TABELLA I.

	DURATA sviluppo	M I T O S I				Differenza
		Totale	Ventric.	Extraventr.	% Extrav.	
Stadi 16-31 a $12^{\circ}\text{C}$	63 gg.	145	115,3	29,7	$20,5 \pm 1,1$	$10,6 \pm 2,6$ (P > .001)
Stadi 16-31 a $23^{\circ}\text{C}$	12 gg.	455	410	45	$9,9 \pm 2,4$	

(1) Ringrazio sentitamente il dott. Ivan Benedetti.

I risultati raccolti nella Tabella I mettono in evidenza che: durante lo sviluppo del midollo spinale di *R. esculenta*:

A) le mitosi extraventricolari, sulla popolazione delle cellule in mitosi, presentano una frequenza maggiore in *Rana* (9,9 %) rispetto a quella verificata in condizioni di temperatura analoghe su altri Anfibi anuri (3,4 % in *Xenopus*, 5,6 % in *Bufo* - [2]); ciò conferma che la frequenza delle mitosi extraventricolari negli Anfibi è indipendente da affinità filetiche o ecologiche della specie;

B) le cellule in divisione al termine del periodo embrionale sono decisamente più numerose nel lotto tenuto a 23° che in quello tenuto a 12°; ciò dimostra che la bassa temperatura inibisce l'attività mitotica;

C) le mitosi extraventricolari, invece, nel lotto tenuto a bassa temperatura (12°) presentano una frequenza maggiore che nel lotto tenuto a temperatura più elevata (23°); tale differenza risulta statisticamente significativa e dimostra che l'abbassamento della temperatura ambientale rallenta la migrazione ventricolare delle cellule nervose.

Questi risultati si prestano a due ordini di considerazioni.

Poichè la durata dello sviluppo dipende strettamente dalla velocità del ciclo cellulare, nel lotto tenuto a 23° si sarebbe dovuto avere un incremento di mitosi inversamente proporzionale alla durata dello sviluppo. Ciò però non si verifica: infatti questa è cinque volte minore mentre quella è solo il triplo. La triplicazione delle mitosi in *R. esculenta* a 23°C si trova in accordo con recenti ricerche autoradiografiche, compiute su embrioni di un Urodele (*Pleurodeles*), che ne avrebbero individuato la causa nella durata, proporzionalmente maggiore della fase S dell'intercinesi (a 12° tripla che a 23°) [19]; secondo l'Autore questo fatto, insieme all'annullamento della fase G<sub>1</sub>, nei lotti tenuti a bassa temperatura provocherebbe l'incremento della velocità proliferativa a scapito di quella differenziativa e spiegherebbe l'aumento della taglia somatica e l'iperplasia della colonna motoria del midollo, verificati in un periodo larvale di *R. pipiens* [17]. A quest'ultimo proposito va precisato che nel lotto di *R. esculenta* tenuto a 12°C, il grado di rallentamento di sviluppo (oltre cinque volte maggiore che a 23°C) e d'incremento della taglia somatica (Tabella II) corrispondono a quelli osservati nelle larve di *R. pipiens* [17]; non corrisponde invece l'entità dell'iperplasia del sistema nervoso; i risultati ottenuti da alcuni sondaggi sulle variazioni di spessore del midollo a vari livelli (10 %) mi hanno indotto ad eseguire alcuni computi sulle cellule nervose presenti a livello del calamo e su quelle del ganglio del 2° nervo spinale (Tabella II); i risultati, dei quali ritengo particolarmente significativi quelli del ganglio spinale (struttura tridimensionale), concordano nel verificare un aumento numerico di cellule nervose (11 %) inferiore all'incremento della taglia somatica (20 %); poichè la sostanza intercellulare non mostra differenze, ne consegue che la bassa temperatura provoca un ingrandimento somatico dovuto in parte ad iperplasia, ma in parte (50 % circa) anche ad ipertrofia cellulare;

la maggior abbondanza di citoplasma va messa in rapporto con accumulo di paraplasma a causa della minor richiesta energetica, nonostante l'inibizione dei processi differenziativi [17].

TABELLA II.

	TAGLIA SOMATICA		CELLULE NERVOSE	
	corpo ( $l \times h$ )	coda	al calamo	1° ganglio spinale
Lotto a 12° C . . . . .	5 × 3,7 mm	9 mm	219 ± 11	102 ± 4
Lotto a 23° C . . . . .	4 × 3,0 mm	7 mm	193 ± 14	93 ± 2

Comunque l'iperplasia riscontrata nel midollo spinale di *R. esculenta* a 12° C potrebbe giustificare un divario inferiore all'1 %, ma non può spiegare quello constatato tra durata di sviluppo (5,2 : 1) e decremento di mitosi (1 : 3,1); pertanto se ne deve dedurre che la bassa temperatura provochi un rallentamento particolarmente accentuato in almeno una delle fasi mitotiche qui considerate (prometafase-anafase). Giova ribadire che queste considerazioni emergono dal confronto tra lo sviluppo di un tessuto e quello dell'organismo; esse cioè non si possono concepire in esperienze su culture *in vitro*.

Il secondo luogo va considerato che le mitosi extraventricolari nel lotto di *R. esculenta* tenuto a 12° C sono in proporzione più numerose che nel lotto allevato a 23° C: infatti la loro frequenza risulta doppia. Questo fatto dimostra che la bassa temperatura, oltre a rallentare il ciclo cellulare, disturba anche la migrazione cellulare, confermando precedenti osservazioni su culture *in vitro* [5-12]. L'aumento di frequenza delle mitosi extraventricolari, anzi, indica che la bassa temperatura ha un effetto inibitorio sulla migrazione ventricolare maggiore di quello esercitato sul ciclo cellulare. Ciò può indicare che la temperatura eserciti sui liquidi intercellulari (che condizionano la migrazione cellulare) un'influenza maggiore di quella che possiede sul citoplasma, poichè quest'ultimo tende a conservare costanti le proprie condizioni.

Il rallentamento del ciclo cellulare e quello della migrazione ventricolare, indotti dalla bassa temperatura, sono fenomeni che vanno messi in rapporto con modificazioni fisico-chimiche, ed in particolare con l'aumento della viscosità dei liquidi rispettivamente cellulari ed intercellulari del midollo spinale in sviluppo: basti ricordare che la viscosità dell'acqua a 23° C aumenta sensibilmente (31 %) rispetto a 12° C ( $\eta$  da 0,00937 a 0,0123 [20]). Ne consegue che la migrazione ventricolare è influenzata da variazioni di viscosità non solo durante il periodo larvale [4], ma anche durante quello embrionale, pertanto durante tutto lo sviluppo.

Va infine accennato al fatto che nel midollo spinale di *R. esculenta* a 12° C alcune mitosi (1 %) sono localizzate sul bordo dello strato marginale, a ridosso della membrana limitante esterna; in attesa di conferme dell'esame in corso

sulla localizzazione delle mitosi nell'encefalo, si prospetta l'ipotesi che la bassa temperatura possa provocare un'inversione di polarità nella migrazione di alcune cellule nervose in procinto di dividersi.

#### CONCLUSIONI

Embrioni di *Rana esculenta* L. allevati a bassa temperatura (12°C), rispetto a quelli tenuti a temperatura maggiore (23°C), hanno una durata di sviluppo cinque volte maggiore, ma le mitosi risultano ridotte solo ad un terzo (invece che a un quinto). Alla luce delle attuali cognizioni ciò fa ritenere che le fasi mitotiche subiscano un rallentamento maggiore delle fasi intermitotiche. La migrazione ventricolare negli animali allevati a bassa temperatura (12°C) è anch'essa decisamente inibita, come attesta il raddoppio delle frequenze di mitosi extraventricolari; ciò dimostra che le variazioni della temperatura influenzano la migrazione cellulare più drasticamente che non il ciclo cellulare. Il rallentamento del ciclo cellulare e della migrazione ventricolare, provocati dalla bassa temperatura, sono stati messi in rapporto con le modificazioni dei liquidi intercellulari e citoplasmatici.

#### BIBLIOGRAFIA

- [1] SAUER F. C., « J. Comp. Neurol. », 6, 377-405 (1935); SCHAPER A., « Arch. Entw. Mech. Organ. », 5, 81-132 (1897).
- [2] BAFFONI G. M., « Rend. Acc. Naz. Lincei (ser. VIII) », 47, 405-410 (1969).
- [3] BAFFONI G. M., « Rend. Acc. Naz. Lincei (ser. VIII) », 48, 733-738 (1970).
- [4] BAFFONI G. M., « Rend. Acc. Naz. Lincei (ser. VIII) », 48, 463-468 (1970).
- [5] BUCCIANTE L., « Boll. Soc. Ital. Biol. Sperim. », 1, 529-530 (1925); « Arch. exper. Zellforsch. », 5, 1-24 (1927).
- [6] SPEAR F. G. « Arch. Exper. Zellforsch. », 7, 484-492 (1929).
- [7] RAO P. N. and ENGELBERG J., « Science », 148, 1092-1094 (1965); « Exp. Cell. Res. », 52, 198-208 (1968).
- [8] SISKEN J. E., MORASCA L. and KIBBY S., « Exp. Cell Res. », 39, 103-116 (1966).
- [9] VENDERLY C., CHANY C. and ROBBE-MARIDOR F., « Bull. Cancer », 55, 21-29 (1968).
- [10] HOLMES S. J., « California Univ. Publ. Zool. », 13, 167-174 (1914-16).
- [11] COMANDON J., « C.-R. Soc. Biol. », 82, 1305-1308 (1919).
- [12] DEHAAN J., « Arch. Neerland. Physiol. », 6, 388-420 (1922).
- [13] MOSSA S., « C.-R. Ass. Anat. », 21, 403-407 (1927); « Arch. exper. Zellforsch. », 4, 188-205 (1927).
- [14] LEVI G., « Zeitschr. ges. Anat. », Abt. III, *Erg. Anat. Entw.-ges.*, 31, 125-707 (1934).
- [15] MANELLI H. and MARGARITORA F., « Mem. Acc. Naz. XL », 12, 3-16 (1961).
- [16] COTRONEI G., « Rend. Acc. Naz. Lincei (ser. VI) », 15, 236-240 (1932).
- [17] DECKER R. S. and KOLLROS J. J., « J. Embryol. Exp. Morphol. », 21, 219-233 (1969).
- [18] BAFFONI G. M., « Arch. Zool. Ital. », 51, 337-358 (1966).
- [19] BRUGAL G., « W. ROUX' Arch. », 168, 205-225 (1971); « Develop. Biol. », 24, 301-321 (1971).
- [20] ABRIBAT M., et al., *Chimie physique et chimie biologique* (Techniques de Laboratoire) (Masson, Paris, 1954).