
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

SERGIO FILONI, VITO MARGOTTA

**Fenomeni degenerativi e rigenerativi in encefali di
larve di *Xenopus laevis*, impiantati nella camera
anteriore dell'occhio di *Rana esculenta***

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 53 (1972), n.1-2, p.
203–208.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1972_8_53_1-2_203_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 degenerativi e rigenerativi in encefali di larve di Xenopus laevis, impiantati nella camera anteriore dell'occhio di Rana esculenta* (*). Nota (**) di SERGIO FILONI e VITO MARGOTTA, presentata dal Socio A. STEFANELLI.

SUMMARY. — Unilateral ablation of the midbrain was performed in 27 tadpoles of *Xenopus laevis* (Daudin) at stage 47 (according to Nieuwkoop and Faber). Their brain was implanted in the anterior chamber of the eye of adult specimens of *Rana esculenta* L. and was fixed at 10-20-30 days after the operation.

In some cases we observed that the implanted brain displayed a regenerative capacity which, although much less ineffective than *in vivo*, led to the regeneration of a new mesencephalic wall. In the partially regenerated optic tectum, no layering can be observed: 30 days after the operation, the neo-formed tectal lamina consisted of numerous cells packed together and of a thin peripheral layer of fibres.

INTRODUZIONE

Dai numerosi studi sulla istogenesi del tetto mesencefalico, è risultato che la tipica organizzazione in strati grigi e fibrosi, di tipo corticale, si attua in seguito alla progressiva migrazione, verso l'esterno, dei neuroblasti del grigio periventricolare. Questo progressivo processo di stratificazione inizia allorché la lamina tettale in via di sviluppo viene raggiunta dalle fibre ottiche. Tuttavia l'assenza di queste ultime, pur determinando una notevole ipoplasia del tetto ottico (Larsell, 1929, 1931; Leghissa, 1946; Filogamo, 1950; Kollros, 1953; McMurray, 1954; Stefanelli, 1954; Leghissa, 1959 a, 1962) non impedisce che si completi la sua stratificazione.

Nel pollo, Stefanelli e Chiti (1954), mediante impianti corion-allantoidei di frammenti di mesencefalo di embrioni allo stadio di vescicola ottica primaria, hanno dimostrato l'autodifferenziamento dei neuroni bipolari a neurite ricorrente. Leghissa (1959 b, 1962), sullo stesso materiale e utilizzando la stessa tecnica, ha osservato che la struttura generale della lamina tettale si realizza ugualmente anche in isolamento morfologico e funzionale, purché il trapianto del frammento del tetto ottico venga eseguito quando la migrazione dei neuroblasti è già iniziata *in vivo*. Qualora il trapianto venga effettuato in stadi più precoci, la struttura del tetto ottico risulta del tutto anormale.

Nel corso di uno studio comparativo sulle capacità rigenerative dell'encefalo degli Anfibi anuri, abbiamo constatato una notevole rigenerazione del mesencefalo ed in particolare del tetto ottico in larve di *Xenopus laevis* operate allo stadio 47-48 ed allo stadio 50 (sec. Nieuwkoop e Faber) (Filoni, 1964,

(*) Ricerca eseguita nell'Istituto di Anatomia comparata « G. B. Grassi » dell'Università di Roma con un contributo del Consiglio Nazionale delle Ricerche.

(**) Pervenuta all'Accademia il 19 luglio 1972.

1965 *a*, 1965 *b*, 1968 *a*, 1968 *b*, 1969; Filoni e Gibertini, 1969; Filoni, Margotta e Gibertini, 1971). L'esame del processo rigenerativo ha dimostrato che il meccanismo di ricostituzione della struttura del tetto mesencefalico durante la rigenerazione è sovrapponibile a quello riscontrato negli Anfibi anuri nel corso dell'ontogenesi (Kollros, 1953). Anche durante la rigenerazione la graduale stratificazione della lamina tettale si attua per progressiva migrazione delle cellule dall'interno verso la periferia ed inizia in concomitanza con l'arrivo al tetto ottico neoformato delle fibre rigenerate. Tuttavia, recenti ricerche (Filoni, Gibertini e Margotta, 1972) hanno dimostrato che la potenzialità delle cellule tettali ad organizzarsi in strati non è determinata dalle fibre ottiche. Infatti, in assenza di queste ultime, il tetto ottico rigenerato, pur presentando una marcata ipoplasia, mostra una tipica organizzazione in strati. D'altra parte, è noto che negli Anfibi il tetto ottico, pur costituendo la stazione principale delle fibre ottiche, è molto più di un centro visivo, poiché riceve eccitamenti di senso di varia origine ed è connesso con tutti i centri motori del mesencefalo, rombencefalo e midollo spinale, tramite le sue vie efferenti.

Ci è sembrato pertanto interessante proseguire lo studio del determinismo della citoarchitettura della lamina tettale durante il processo rigenerativo. In particolare, nel presente lavoro abbiamo impiantato nella camera anteriore dell'occhio di *Rana esculenta* encefali di larve di *Xenopus laevis* operate di asportazione unilaterale del mesencefalo per vedere, nel caso in cui si manifestassero capacità rigenerative anche in tali condizioni sperimentali, quale fosse la struttura del tetto ottico rigenerato. A questo studio siamo stati indotti anche dalla constatazione che, almeno da quanto risulta dalla nostra indagine bibliografica, non è stato analizzato se l'encefalo degli Anuri manifesti potenzialità rigenerative in condizione di isolamento.

MATERIALE E METODO

Nella presente ricerca sono stati eseguiti 27 impianti di encefalo di larve di *Xenopus laevis* (Daudin) allo stadio 47 (sec. Nieuwkoop e Faber) in individui adulti di *Rana esculenta* L. di entrambi i sessi.

Ogni impianto, eseguito nella camera anteriore dell'occhio di ciascun individuo di *Rana esculenta*, era costituito oltre che dall'encefalo (reciso all'altezza del bulbo) di una larva di *Xenopus laevis* operata, immediatamente prima dell'impianto, di asportazione unilaterale del mesencefalo, anche della sottostante base del cranio e del sovrastante tegumento. Particolare attenzione è stata posta affinché la pia madre primitiva risultasse danneggiata il meno possibile. Per quanto concerne le modalità di asportazione unilaterale del mesencefalo nelle larve di *Xenopus laevis*, è stata adottata la stessa tecnica illustrata in precedenza da uno di noi (Filoni, 1969).

Prima dell'intervento, le larve di *Xenopus laevis*, sviluppate da uova ottenute mediante ovulazione e fecondazione artificialmente indotte con ormoni gonadotropi («Pregnyl» della Organon) secondo la tecnica di Nieuwkoop e Faber

(1956), sono state ripetutamente lavate in acqua di fonte addizionata con Gentamicina 70 $\mu\text{g/l}$ e Mycostatin 50 Unità/l. Ogni frammento da impiantare è stato ulteriormente lavato, dopo l'isolamento, in una soluzione di Holtfreter contenente Gentamicina 70 $\mu\text{g/l}$ e Mycostatin 50 Unità/l.

Le rane, prima dell'intervento, sono state disinfettate con una soluzione di permanganato di potassio nella concentrazione di 3 mg/l. Tutte le operazioni sono state effettuate in cabina sterile al binoculare da dissezione.

Gli individui operati sono stati sacrificati dopo 10 gg.-20 gg.-30 gg. dall'intervento e il frammento impianto, isolato al binoculare da dissezione, è stato fissato in Bouin. Le sezioni trasversali seriate, di 7 μ di spessore, sono state colorate con emallume-eosina.

DESCRIZIONE DEI RISULTATI

Dopo 10 gg. dall'operazione.

Sono stati esaminati quattro casi. In tutti si sono riscontrate estese degenerazioni sia a carico della sostanza grigia che bianca, non solo in corrispondenza della zona di operazione, ma in tutto l'encefalo impiantato, anche a livello del telencefalo; numerosissime le picnosi. In due dei quattro casi esaminati, nell'area operata si è osservata l'iniziale formazione di un esile strato di cellule che, originatesi dalla regione infundibolare, tende a chiudere il ventricolo mesencefalico che risulta in parte obliterato da cellule e da fibre in degenerazione (fig. 1). Molte cellule che costituiscono questo monostrato sono in attività mitotica. La regione operata appare limitata dorsalmente dal tegumento rigenerato.

Dopo 20 gg. dall'operazione.

Disponiamo di quattordici casi. In tre di essi l'encefalo impiantato è assente ed il frammento è rappresentato esclusivamente da residui della base del cranio e dal tegumento. In un caso si sono riscontrate numerosissime picnosi a livello di tutto l'encefalo; la sostanza bianca si presenta vacuolizzata. In sei casi, l'impianto, dal punto di vista istologico, è in condizioni migliori rispetto a quelle riscontrate dopo 10 giorni dall'operazione: le picnosi sono in numero molto ridotto od assenti nell'intera estensione dell'impianto, la sostanza bianca è omogenea ed inoltre in tutto l'encefalo si osserva una elevatissima attività mitotica specie in corrispondenza dello strato ependimale. Tuttavia, nei sei casi suddetti l'impianto è volumetricamente molto ridotto e non ha conservato la sua organizzazione iniziale tanto che risulta molto difficile l'identificazione delle varie regioni encefaliche. Nei rimanenti quattro casi, l'impianto ha mantenuto la propria organizzazione morfologica ed inoltre nell'area operata è possibile osservare una iniziale rigenerazione del lato mesencefalico asportato (Tav. I, figg. 2-3). In corrispondenza di tutte le regioni encefaliche, che hanno conservato la loro struttura tipica, le picnosi sono

assenti o in numero estremamente ridotto. L'attività mitotica è notevole in tutto l'impianto, ma è particolarmente accentuata nel lato mesencefalico residuo (il sinistro) (Tav. I, fig. 6). Sul lato destro, il ventricolo mesencefalico risulta chiuso da una parete ventricolare neoformata, le cui cellule si moltiplicano attivamente, limitata verso l'esterno dalla pia madre primitiva. In tre dei quattro casi, a questo stadio del processo rigenerativo, è già possibile distinguere, nel lato rigenerato, una porzione tettale da una porzione sottostante (tegmentale) (Tav. I, fig. 2). La prima risulta costituita esclusivamente da numerose cellule il cui nucleo, con cromatina distribuita uniformemente nel carioplasma, ha una forma molto allungata con l'asse maggiore disposto perpendicolarmente alla superficie ventricolare. La regione tegmentale è invece costituita, oltre che da sostanza grigia rappresentata da cellule con caratteristiche citologiche simili a quelle degli elementi cellulari della regione tettale, anche da sostanza bianca periferica. Nell'ultimo di questi quattro casi, la parete ventricolare neoformata è costituita solo da un monostrato di cellule sia nella parte dorsale che ventrale.

Dopo 30 gg. dall'operazione.

In tre dei nove casi di cui disponiamo, il frammento impiantato è rappresentato solo da residui della base del cranio e dal tegumento. In cinque casi l'encefalo impiantato appare più o meno marcatamente disorganizzato tanto che è ben difficile riconoscere le varie regioni encefaliche. Tuttavia le sue cellule sono ben conservate ed alcune di esse sono in attività mitotica. Le picnosi sono in numero molto limitato. Nel restante caso, l'impianto ha ben conservata la sua organizzazione per l'intera estensione. Nella regione operata, chiaramente riconoscibile, si osserva una notevole rigenerazione della parte asportata (Tav. I, fig. 4). Il rigenerato è circondato dalla pia madre primitiva ed è costituito, oltre che da sostanza grigia, in cui sono riconoscibili numerose mitosi sia ependimali che extraependimali, anche da scarsa sostanza bianca periferica. A livello della lamina tettale, non è visibile alcuna stratificazione neppure incipiente. Tuttavia nella sostanza bianca periferica si osservano alcuni elementi che sono nettamente separati da grigio periventricolare (Tav. I, fig. 5).

DISCUSSIONE

Dai dati ottenuti nella presente ricerca risulta che, qualora encefali di larve di *Xenopus laevis*, privati di una metà del mesencefalo, vengano impiantati nella camera anteriore dell'occhio di individui adulti di *Rana esculenta* e perciò posti in condizioni di isolamento morfologico e funzionale, si osservano estesi processi degenerativi nei giorni immediatamente successivi alla operazione che tuttavia possono essere seguiti da fenomeni riparativi più o meno cospicui.

A 10 giorni dall'intervento in tutto l'encefalo sono visibili numerosissime picnosi e degenerazioni a carico della sostanza bianca che appare vacuolizzata. Tuttavia già a questo stadio è possibile riscontrare l'inizio del processo rigenerativo, in corrispondenza dell'area mesencefalica, caratterizzato dalla iniziale formazione di un esile strato di cellule. Nei giorni successivi, mentre in alcuni casi la degenerazione dell'impianto prosegue, in altri, grazie ad una attività mitotica riscontrata in tutte le regioni encefaliche, massimamente circoscritta allo strato ependimale, l'encefalo impiantato recupera, in modo più o meno esteso, i danni subiti. Mentre nella maggior parte dei casi la iniziale organizzazione morfologica generale dell'impianto si perde, tanto che risulta problematica l'identificazione delle varie aree encefaliche, in altri essa si conserva. È in questi ultimi casi che nell'area operata, chiaramente identificabile, è possibile stabilire con certezza l'esistenza di un processo rigenerativo in atto che si realizza a spese degli elementi dello strato ependimale e che porta alla costituzione di un rigenerato volumetricamente piuttosto considerevole. Tuttavia, analizzando in particolare la struttura del tetto ottico neoformato, osserviamo che, anche dopo 30 giorni dall'intervento, esso non presenta alcuna stratificazione.

Allo stato attuale di questa nostra ricerca non siamo in grado di stabilire se l'assenza della stratificazione nel tetto ottico rigenerato, nelle condizioni sperimentali descritte, sia attribuibile all'assenza di connessioni periferiche, oppure alle precarie condizioni ambientali che non hanno consentito il completamento del processo rigenerativo del tetto ottico nell'arco dei 30 giorni. Possiamo tuttavia affermare con certezza che anche in condizioni di isolamento il mesencefalo di *Xenopus laevis* allo stadio larvale 47 manifesta capacità rigenerativa, seppure in misura nettamente inferiore a quella precedentemente riscontrate *in vivo* (Filoni, 1964, 1965 a, 1965 b, 1968 a, 1968 b, 1969; Filoni e Gibertini, 1969; Filoni, Margotta e Gibertini, 1971).

Tali risultati sono simili a quelli da noi precedentemente ottenuti in trapianti, nel sottocutaneo, di segmenti di midollo spinale tra Tritoni adulti (Marini e Margotta, 1961; Filoni e Margotta, 1969; Margotta e Filoni, 1969, 1970). Anche nel caso di segmenti di midollo spinale, posti in condizioni di isolamento morfologico e funzionale, abbiamo osservato come i fenomeni degenerativi iniziali, che si manifestano nei primi giorni dall'intervento, siano poi seguiti da fenomeni rigenerativi notevoli che si realizzano fondamentalmente con le stesse modalità messe in evidenza da Stefanelli e Capriata (1943) nella rigenerazione del midollo spinale dei Tritoni adulti, dopo resezione della coda.

Possiamo pertanto concludere che le potenzialità rigenerative del sistema nervoso centrale degli Anfibi si estrinsecano, seppure più attenuate, anche qualora le regioni del neurasse che possiedono tale potere rigenerativo vengano poste in condizione di isolamento morfologico e funzionale.

BIBLIOGRAFIA

- FIOLOGAMO G., « Riv. Biol. », 42, 73 (1950).
 FILONI S., « Rend. Acc. Naz. Lincei », ser. VIII, 37, 521 (1964).
 FILONI S., « La Ricerca Scientifica », 6, 376 (1965 a).
 FILONI S., « Boll. Zool. », « Atti XXXIV Convegno U.Z.I. », 32, 801 (1965 b).
 FILONI S., « Rend. Acc. Naz. Lincei », ser. VIII, 45, 90 (1968 a).
 FILONI S., « Boll. Zool. », « Atti XXXVII Convegno U.Z.I. », 35, 396 (1968 b).
 FILONI S., « Arch. Ital. Anat. e Embriol. », 74, 89 (1969).
 FILONI S. e GIBERTINI G., « Arch. Biol. », 80, 369 (1969).
 FILONI S. e MARGOTTA V., « Acta Embryol. Experim. », 169 (1969).
 FILONI S., MARGOTTA V. e GIBERTINI G., « Rend. Acc. Naz. Lincei », ser. VIII, 50, 807 (1971).
 FILONI S., GIBERTINI G. e MARGOTTA V., « Arch. Ital. Anat. e Embriol. », 77, 1 (1972).
 KOLLROS J. J., « J. Exp. Zool. », 123, 153 (1953).
 LARSELL O., « J. Comp. Neur. », 48, 331 (1929).
 LARSELL O., « J. Exp. Zool. », 58, 1 (1931).
 LEGHISSA S., « Monitore Zool. Ital. », 55, 96 (1946).
 LEGHISSA S., « Atti Acc. Sci. Ist. Bologna », ser. XI, 6, 57 (1959 a).
 LEGHISSA S., « Rend. Acc. Sci. Ist. Bologna », ser. XI, 6, 35 (1959 b).
 LEGHISSA S., « Arch. Ital. Anat. e Embriol. », 67, 343 (1962).
 MARGOTTA V. e FILONI S., « Arch. Biol. », 80, 347 (1969).
 MARGOTTA V. e FILONI S., « Acta Embryol. Experim. », 151 (1970).
 MARINI M. e MARGOTTA V., « Rend. Acc. Naz. Lincei », ser. VIII, 30, 948 (1961).
 McMURRAY V. M., « J. Exp. Zool. », 125, 247 (1954).
 NIEUWKOOP P. D. e FABER J., *Normal table of Xenopus laevis (Daudin)*, Amsterdam (1956).
 STEFANELLI A., « Rend. Acc. Naz. Lincei », ser. VIII, 16, 277 (1954).
 STEFANELLI A. e CAPRIATA A., « Ricerche di Morfologia », 20-21, 1 (1943).
 STEFANELLI A. e CHITI L., « Rend. Acc. Naz. Lincei », ser. VIII, 16, 287 (1954).

SPIEGAZIONE DELLA TAVOLA I

TAVOLA I

- Fig. 1. - Particolare della regione mesencefalica di un impianto fissato dopo 10 giorni dall'operazione. Si osserva la neoformazione di uno strato cellulare (freccia 1), i cui elementi sono in attività mitotica (freccia 2), che circonda una zona in degenerazione ($\times 400$).
- Figg. 2, 3 e 4. - Regione mesencefalica di tre impianti fissati dopo 20 giorni (figg. 2 e 3) e dopo 30 giorni (fig. 4) dall'intervento. La regione neoformata si trova sul lato sinistro della linea passante per le due frecce. IPO = ipofisi ($\times 120$).
- Fig. 5. - Particolare della fig. 4. La lamina tectale neoformata non presenta alcuna stratificazione ($\times 240$).
- Fig. 6. - Mitosi (frecce) nella regione mesencefalica di un impianto fissato 20 giorni dopo l'operazione ($\times 800$).

