
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

LUISA ANNA IERADI, EMILIA CATALDI

**Attività dell'acetilcolinesterasi nel cervelletto di
pollo coltivato in vitro**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 53 (1972), n.1-2, p.
214-216.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1972_8_53_1-2_214_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. — *Attività dell'acetilcolinesterasi nel cervelletto di pollo coltivato in vitro* (*). Nota (**) di LUISA ANNA IERADI e EMILIA CATALDI, presentata dal Socio A. STEFANELLI.

SUMMARY. — Since few histochemical investigations draw attention to the presence of acetylcholinesterase (AChE) in the neurons of brain cortex and retina in tissue culture, it seemed interesting to study the distribution of this enzyme activity in the nerve cells grown in organotypic and tissue cultures of cerebellum.

Cerebellar tissue from 14 and 16 day chick embryos and from adult animals was cultivated until 1 month. The methods by Koelle and by Karnowsky and Roots were followed for the localisation of AChE activity.

Our results suggested that the Purkinje cells grown in cultures have different histochemical characters from those observed *in vivo*. The significance of this enzyme distribution is discussed briefly.

Il ruolo dell'acetilcolinesterasi durante lo sviluppo del sistema nervoso centrale è ancora oggetto di discussione e di studio da parte di molti Autori; vi sono infatti cellule nervose che mentre nell'adulto sono prive di acetilcolinesterasi, in una fase del loro sviluppo contengono l'enzima, e inoltre, come norma generale, la quantità di AChE diminuisce nel S.N.C. dopo la maturazione cellulare. Questa diminuzione è stata osservata nei gangli spinali del pollo (Strumia e Baima-Bollone, 1964 e Tennyson *e al.* 1968) e nelle cellule di Purkinje di un certo numero di specie (Job *e al.* 1963; Csillik *e al.* 1964; Sakharova, 1966; Silver, 1976-69 e Ieradi e Cataldi, 1965). Poiché nei neuroni sunnominati non è stata provata una natura colinergica, il significato della presenza, seppure temporanea, dell'AChE non è ancora spiegabile; pertanto abbiamo pensato di portare un contributo alla chiarificazione di questo problema studiando il comportamento dell'attività di questo enzima nei neuroni di Purkinje coltivati *in vitro*.

Ricerche istochimiche eseguite su culture di S.N.C. e periferico e di retina (Hansson, 1966; Hösli e Hösli, 1970; Ieradi e Cataldi, 1970 e Minelli *e al.* 1971) hanno dimostrato che l'AChE è presente nei neuroni coltivati *in vitro*.

Nella presente esperienza abbiamo allestito due tipi di culture: culture di organo e di tessuto.

Le culture di tessuto sono state eseguite prelevando espianti di cervelletto di 0,5-1 mm da embrioni di pollo di 14-16 giorni. Gli espianti sono stati coltivati su coprioggetti rivestiti di un sottile strato di collagene (Bornstein, 1958) e incubati a 37° in goccia pendente, con il sistema del doppio coprioggetto di Maximov. Il mezzo nutriente era costituito da 50 parti di M.E.M., 40 di siero del cordone ombelicale, 25 di estratto embrionale di embrione di pollo di 9

(*) Ricerca eseguita nell'Istituto di Anatomia Comparata « G. B. Grassi » dell'Università di Roma con un contributo del C.N.R.

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

giorni, 4 parti di soluzione di glucosio al 20 % e una parte di acromicina in soluzione (7 mg/ml).

Le culture di organo sono state allestite prelevando lamelle di cervelletto da embrioni di pollo di 15–20 giorni e da polli adulti; le lamelle sono state coltivate in capsule di Petri su un filtro Millipore con un mezzo contenente TC 199 (55%), soluzione salina di Hanks (30 %), estratto embrionale di pollo di 9 giorni (15 %). La concentrazione finale di glucosio nel mezzo è stata portata a 600 mg/ml; come antibiotici sono stati usati penicillina (100 U/ml) e streptomomicina (100 g/ml). Le capsule sono state mantenute in termostato a 37° in corrente di CO₂ al 5 % e ossigeno al 95 %.

Dopo fissazione in formalina salata al 10 % per 20–30 minuti le culture sono state incubate per due–tre ore a 37° secondo il metodo di Koelle e a temperatura ambiente secondo il metodo di Karnowsky e Roots. Alcune culture per controllo sono state colorate con il metodo di Bodian e di Nissl.

Nelle culture di tessuto si ha una disorganizzazione dell'espianto e pertanto le cellule di Purkinje non sono più orientate in un'unica fila; nelle culture d'organo invece non si ha questa disorganizzazione e le cellule di Purkinje rimangono orientate come *in vivo* mantenendo gli stessi rapporti con gli altri strati.

Sia nelle culture di organo che nelle culture di tessuto allestite prelevando cervelletti da embrione di 15–20 giorni abbiamo notato che l'AChE è presente in neuroni che per forma e volume si possono identificare come neuroni di Purkinje (fig. 1). L'enzima è localizzato nel citoplasma della cellula e nel primo tratto dell'albero dendritico. Inoltre sono reattive nelle culture d'organo cellule nervose riconoscibili come neuroni di Golgi. Nelle culture di tessuto oltre le cellule di Purkinje sono reattivi altri tipi di neuroni non sicuramente identificabili. Negli espianti esaminati a varie età (7, 15, 23, 30 giorni di cultura) abbiamo riscontrato che l'attività dell'AChE non subisce nessuna modificazione apprezzabile. Poiché è noto che nel pollo (Ieradi e Cataldi, 1964) questo enzima è presente nelle cellule di Purkinje in un periodo che va dal 15° giorno di vita embrionale ad una settimana circa dopo la schiusa (fig. 2), appare chiaro che, essendo l'enzima presente nelle cellule coltivate *in vitro* anche dopo trenta giorni, non esiste un parallelismo dell'attività acetilcolinesterasica *in vivo* e *in vitro*. Mentre in studi istochimici precedentemente eseguiti su culture di gangli, retina, midollo, tetto ottico, era stata notata da noi e da altri Autori una identità di reazione *in vivo* e *in vitro*, i risultati ottenuti nel cervelletto mettono in evidenza che neuroni, altamente specializzati come quelli di Purkinje non raggiungono *in vitro*, almeno per quanto riguarda l'AChE, un completo differenziamento istochimico.

Nelle culture allestite prelevando lamelle di cervelletto adulto, dove le cellule di Purkinje sono prive di AchE, abbiamo notato che questa reazione rimane negativa anche dopo 15 giorni di cultura (fig. 3 e 4).

Kasa (1966) dopo aver isolato nel ratto adulto l'archicerebello aveva notato la ricomparsa, per un breve periodo, dell'AChE nelle cellule di Purkinje. Tra le varie ipotesi formulate dall'Autore sul significato di questa ricomparsa, la più probabile era che, essendo l'enzima in qualche modo legato alla

sintesi proteica la sua riattivazione fosse dovuta all'axotomia; in queste condizioni infatti le cellule di Purkinje si trovano in uno stato di attiva sintesi proteica, come nella prima settimana di vita post-natale, quando sono acetilcolinesterasi positive.

I risultati ottenuti negli espianti prelevati da cervelletti embrionali dove si nota una persistenza dell'enzima nei neuroni di Purkinje, possono anche essere messi in relazione con quelli ottenuti da Kasa, ritenendo, come Minelli *e al.* (1971) che le condizioni di cultura siano almeno in parte paragonabili a quelle di isolamento.

La mancata riattivazione dell'AChE notata invece nelle cellule di Purkinje nelle culture d'organo di cervelletto di pollo adulto si può spiegare ritenendo che in questo tipo di cultura non avvengono né fenomeni di sdifferenziamento, né fenomeni di riparazione, che richiedono una attiva sintesi proteica come nelle esperienze di Kasa.

Stiamo svolgendo ulteriori studi istochimici su vari tipi di neuroni di specie diverse in condizioni di isolamento, per poter contribuire alla chiarificazione del ruolo dell'AChE nel S.N.C. durante lo sviluppo.

Siamo grati al sig. G. Gentili per la sua valida assistenza tecnica.

BIBLIOGRAFIA

- BORNSTEIN M. B., «Lab. Invest.», 7, 134 (1958).
 CSILLIK B., JOO' F., KASA P., TOMITY I. e KALMAN GY., «Acta Biol. Hung.», 15, 11 (1964).
 HANSSON H. A., «Acta Physiol. Scand.», 70, suppl. 288, 3 (1966).
 HÖSLI E. e HÖSLI L., «Brain Research», 19, 494 (1970).
 IERADI L. A. e CATALDI E. e DEL GROSSO N., «Rend. Acad. Naz. Lincei», serie VIII, 38, 717 (1970).
 IERADI L. A. e CATALDI E., «Riv. Ist. Norm. pat.», 10, 413 (1964).
 JOO' F., KASA P., KALMAN GY. e CSILLIK B., «Folia Hist. Cyt.», 1, suppl. 1, 118 (1963).
 KASA P., CSILLIK B., JOO' F. e KNYIHAR E., «J. Neurochem.», 13, 173 (1966).
 KIM S. U. «Experientia», 26, 292 (1970).
 MINELLI G., CIANI F. e CONTESTABILE A., «Histochemie», 28, 160 (1971).
 SAKHAROVA A. V., «Tsitologiya», 8, 54, (1966).
 SILVER A., «Inter. Rev. Neurobiol.», 10, 57 (1967).
 SILVER A., «Experientia», 25, 63 (1969).
 STRUMIA E. e BAIMA-BOLLONE P. L., «Acta Anat.», 57, 281 (1964).
 TENNYSON V. M., BRZIN M. e DUFFY P., «in A. Lajtha and D. H. Ford (Eds), Brain Barrier Systems, Progress in Brain Research», 29, Elsevier, Amsterdam. New York, pag. 41 (1968).

SPIEGAZIONE DELLA TAVOLA I

- Fig. 1. - Attività dell'AChE nei neuroni di Purkinje di cervelletti di embrioni di pollo in cultura di tessuto per 23 gg. - 1400×.
 Fig. 2. - Attività dell'AChE nelle cellule di Purkinje del cervelletto di pulcino appena nato. - 1200×.
 Fig. 3. - Cervelletto di pollo adulto in cultura d'organo, da 15 gg. Notare l'assenza dell'AChE dalle cellule di Purkinje. - 220×.
 Fig. 4. - Attività dell'AChE nel cervelletto di pollo adulto. - 150×.

