
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

SERGIO FILONI, VITO MARGOTTA

**Studio della capacità rigenerativa del sistema
nervoso centrale negli Anfibi anuri in relazione con lo
stadio di sviluppo. II. Osservazioni sulla
rigenerazione del lobo ottico dello *Xenopus laevis*
(Daudin) dopo la metamorfosi**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 54 (1973), n.1, p. 151–156.*
Accademia Nazionale dei Lincei

http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1973_8_54_1_151_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. — *Studio della capacità rigenerativa del sistema nervoso centrale negli Anfibi anuri in relazione con lo stadio di sviluppo. II. Osservazioni sulla rigenerazione del lobo ottico dello *Xenopus laevis* (Daudin) dopo la metamorfosi (*)*. Nota di SERGIO FILONI e VITO MARGOTTA, presentata (**) dal Socio A. STEFANELLI.

SUMMARY. — The regenerative power of the optic lobe was studied in 70 young metamorphosed specimens of *Xenopus laevis*.

The experimental animals were grouped as follows:

Group I: more than 80% of the volume of the optic lobe was removed.

Group II: 30% to 50% of the volume of the optic lobe was ablated.

Group III: less than 30% of the optic lobe was ablated.

The results showed that the regenerative capacity of the midbrain in metamorphosed specimens is very low. Only when the ablation of the optic lobe was inferior to 30% (Group III), the regeneration of numerous neurons and fibres was observed. Nevertheless the structure of the regenerated part was aberrant. In Groups I and II the regeneration of the optic lobe was always abortive or entirely lacking.

I dati riguardanti le capacità rigenerative del sistema nervoso centrale degli embrioni degli Anfibi anuri dimostrano chiaramente che con il procedere dello sviluppo embrionale si ha una graduale diminuzione del potere rigenerativo.

Al contrario, almeno per quanto concerne la rigenerazione a livello dell'encefalo, le ricerche fino ad ora eseguite negli stadi larvali e dopo la metamorfosi non consentono di trarre una conclusione definitiva sull'andamento delle capacità rigenerative delle varie regioni encefaliche degli Anfibi anuri dopo la fine del periodo embrionale.

Terry (1956) in uno studio sulla rigenerazione del mesencefalo di embrioni e larve di *Rana pipiens*, sottoposte ad asportazione unilaterale, ha osservato che dopo lo stadio embrionale 21 (sec. Shumway, 1940) era possibile ottenere solo una rigenerazione parziale della parte asportata. Tuttavia dai suoi dati non risulta che con il procedere dello sviluppo larvale vi sia una diminuzione delle capacità rigenerative: una parziale rigenerazione del lobo ottico destro è stata riscontrata sia in stadi larvali precoci che in quelli tardivi (dallo stadio III allo stadio XV, sec. Taylor e Kollros, 1946).

Al contrario i primi dati ottenuti da uno di noi (Filoni, 1968 b) in *Xenopus laevis* hanno dimostrato che la notevolissima potenzialità rigenerativa del mesencefalo, riscontrabile allo stadio larvale 47-48 (sec. Nieuwkoop e Faber, 1956), subiva una diminuzione molto netta a partire dallo stadio 55.

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

(**) Nella seduta del 13 gennaio 1973.

Sempre in *Xenopus*, Kościuszko (1958) ha osservato che il telencefalo di larve allo stadio 50 manteneva immutate le elevate potenzialità rigenerative riscontrabili in stadi larvali più precoci (Srebro, 1957; Filoni, 1964 a). Kwiatkowi (1959; 1961) in uno studio sulla rigenerazione delle connessioni nervose, dopo resezione effettuate a differenti livelli dell'encefalo sia in larve di *Xenopus laevis* che in individui metamorfosati da 30 giorni, ha constatato che questi ultimi manifestavano le stesse elevate capacità rigenerative riscontrabili nelle larve.

Jordan (1958) ha dimostrato che era possibile ottenere una buona rigenerazione del telencefalo anche in individui di *Xenopus laevis* metamorfosati, quantunque il processo rigenerativo si completasse in un tempo molto più lungo di quello richiesto negli stadi larvali e determinasse la neoformazione di un telencefalo con una struttura meno regolare. D'altra parte Srebro (1965) ha osservato una limitatissima rigenerazione del telencefalo in adulti di *Xenopus laevis*, mentre Spagna e Lombardo (1969) hanno osservato in adulti di *Rana esculenta* una considerevole rigenerazione dopo rimozione limitata di varie aree telencefaliche.

A livello del mesencefalo Filoni e Oberti (1968), Filoni e Margotta (1972), dopo rimozione del lobo ottico destro in adulti di *Xenopus laevis*, hanno ottenuto una rigenerazione molto limitata.

Abbiamo ritenuto opportuno fare un'analisi particolareggiata dell'andamento del potere rigenerativo dell'encefalo degli Anuri durante l'intera vita larvale e dopo la metamorfosi. A tal fine abbiamo preso in esame le capacità rigenerative del tetto mesencefalico di *Xenopus laevis*, sia perché l'entità della sua rigenerazione negli stadi larvali precoci e le modalità con cui essa si attua sono già state ampiamente studiate da uno di noi (Filoni, 1964 b e seguenti), sia perché il tetto mesencefalico, proprio per la sua complessa struttura, avrebbe potuto rivelare meglio di altre regioni encefaliche anche le più lievi anomalie morfologiche. I dati relativi all'andamento della capacità rigenerativa durante tutta la vita larvale sono stati già pubblicati (Filoni e Gibertini, 1969) ed hanno dimostrato che con il procedere della vita larvale si ha una manifesta diminuzione del potere rigenerativo rilevabile non solo da un minor volume del rigenerato, ma soprattutto da anomalie sempre più notevoli della sua struttura. Tale diminuzione del potere rigenerativo, graduale fino allo stadio 55, diviene molto marcata dopo questo stadio.

Lo studio della capacità rigenerativa negli individui metamorfosati, i cui risultati verranno qui esposti, ci è sembrato di particolare interesse poiché tra l'altro, avrebbe potuto contribuire a chiarire se la netta diminuzione del potere rigenerativo, che si manifesta proprio in quegli stadi larvali in cui le trasformazioni metamorfiche divengono più notevoli, fosse dovuta al particolare momento critico in cui viene a trovarsi l'individuo operato metamorfosante, oppure ad una effettiva e definitiva diminuzione del potere rigenerativo.

Questa ricerca è stata compiuta su 70 giovani individui metamorfosati di *Xenopus laevis* (Daudin), operati di asportazione parziale del lobo ottico destro.

Per quanto concerne l'intervallo di tempo intercorso tra la fine della metamorfosi ed il momento dell'operazione, possiamo distinguere tre Lotti:

Lotto I: comprende 29 animali, operati tra il 1° giorno ed il 10° giorno dopo la metamorfosi.

Lotto II: comprende 14 animali, operati al 30° giorno dopo la metamorfosi.

Lotto III: comprende 27 animali, operati al 120° giorno dopo la metamorfosi.

Circa l'entità dell'asportazione, sono stati eseguiti tre tipi di intervento:

a) asportazione estesa (superiore all'80 % del lobo ottico destro) in 31 animali (12 del Lotto I; 10 del Lotto II; 9 del Lotto III).

b) asportazione limitata (compresa tra il 50 % ed il 30 % del lobo ottico destro) in 33 animali (16 del Lotto I; 4 del Lotto II; 13 del Lotto III).

c) asportazione molto limitata (inferiore al 30% del Lobo ottico destro) in 1 animale del Lotto I e in 5 animali del Lotto III.

Le operazioni sono state effettuate al binoculare da dissezione. Previa apertura del cranio mediante un grosso ago di tungsteno (nel Lotto I e nel Lotto II) o mediante delicata trapanazione (nel Lotto III), la rimozione parziale del lobo ottico destro era eseguita utilizzando finissimi aghi di tungsteno ed un bisturi da oculista. L'intera operazione era eseguita su animali anestetizzati con MS 222 (1 : 2000).

La mortalità post-operatoria è stata nulla.

Immediatamente dopo l'intervento gli animali sono stati trasferiti in camera termostatica a 18 °C e tenuti a digiuno per circa una settimana su carta bibula inumidita e successivamente trasferiti in acqua di fonte e nutriti con Tubifex o carne tritata.

Per il numero degli individui sacrificati e per gli stadi di fissazione si rimanda alla Tabella I.

TABELLA I.

LOTTO	Stadio (*) opera- zione	Numero operati	Numero fissati dopo giorni dall'operazione																
			5	10	15	20	25	30	50	60	90	120	210	300	365	425	485	730	
I	I-10	29	1	4	3		3	3	1	2	3	1	1	1	3	3			
II	30	14	2		2			2		2	1	3		1	1				
III	120	27				6		3		3	3	3					4	5	

(*) Espresso in giorni dopo la metamorfosi.

Gli encefali sono stati fissati in liquido di Bouin. Le sezioni trasversali seriate, di 7-10 μ di spessore, sono state colorate con emallume-eosina, con il metodo di Mallory-Azan oppure impregnate con il metodo all'argento colloidale di Bodian.

I risultati ottenuti nella presente ricerca dimostrano che la capacità rigenerativa in individui operati, dopo la metamorfosi, di asportazione parziale del lobo ottico destro è molto limitata e dipende, non tanto dall'età dell'individuo operato (almeno nell'intervallo di tempo compreso fra un giorno dopo la metamorfosi e 120 giorni dopo la metamorfosi), quanto dall'entità dell'asportazione. Infatti tra i tre Lotti in cui sono stati suddivisi gli animali sperimentali non abbiamo riscontrato sostanziali differenze né nella entità della rigenerazione, né nelle modalità con cui tale rigenerazione si attua.

La prima fase del processo rigenerativo, che si completa intorno al 20° giorno post-operatorio, è caratterizzata in tutti i casi esaminati da una intensa attività mitotica nell'area mesencefalica residua, dalla migrazione degli elementi neurali neoformati sulla superficie di resezione e dalla rigenerazione della pia madre primitiva che viene a chiudere completamente il ventricolo mesencefalico (Tav. I, fig. 1). Per quanto concerne l'attività mitotica, essa raggiunge i valori più elevati al 20° giorno dopo l'intervento (Tav. II, figg. 6-7) e pur riscontrandosi soprattutto in corrispondenza dello strato ependimale della regione tettale residua, è evidenziabile anche nell'ependima del toro semicircolare e del tegmento. In prossimità della zona di asportazione, le cariocinesi, più numerose che altrove, si trovano non solo nell'ependima, ma anche, malgrado in numero molto inferiore, nel grigio periventricolare. In tutti i tre Lotti, dopo il 20° giorno post-operatorio l'attività mitotica decresce rapidamente, tanto che al 30° giorno è molto ridotta ed intorno al 60° giorno è trascurabile.

Gli elementi neurali derivati dalla attività cariocinetica della regione residua migrano sulla superficie di resezione fino a tappezzarla completamente; tale migrazione si riscontra tra il 10° e il 20° giorno post-operatorio, periodo in cui si realizza la chiusura del ventricolo mesencefalico ad opera della pia madre primitiva rigenerata (Tav. I, fig. 1).

La seconda fase del processo rigenerativo è estremamente lunga ed il risultato finale è in rapporto alla vastità dell'ablazione.

Quando l'asportazione è molto limitata (inferiore al 30%), la continuità della lamina tettale si ristabilisce intorno al 90° giorno post-operatorio.

Tuttavia la parte rigenerata ha una struttura profondamente anomala poiché, pur essendo costituita non solo dallo strato ependimale, ma anche da numerosi neuroni e fibre nervose neoformate, questi non si organizzano secondo la precisa stratificazione riscontrabile nel tetto ottico normale, ma sono più o meno caoticamente disposti.

Quando l'estensione dell'asportazione è compresa tra il 30% ed il 50%, solo in un numero molto limitato di casi (in nove casi su un totale di trentatré) si è osservata la completa chiusura del ventricolo mesencefalico ad opera di fibre e cellule nervose rigenerate, peraltro mai disposte secondo la tipica organizzazione tettale (Tav. II, figg. 4-5).

Nella maggior parte dei mesencefali operati di asportazione compresa tra il 30% ed il 50% del lobo ottico destro e nella totalità di quelli in cui la asportazione era superiore all'80%, il processo rigenerativo si arresta alla prima

fase (Tav. I, figg. 2-3) ed anche dopo un intervallo di tempo estremamente lungo (730 giorni dall'operazione) non si osserva alcuna ulteriore evoluzione della rigenerazione.

I risultati riportati in questo lavoro, se associati a quelli precedentemente ottenuti nella rigenerazione del mesencefalo di *Xenopus laevis* durante la vita larvale (Filoni e Gibertini, 1969) e nell'adulto (Filoni e Oberti, 1968), ci consentono di avere un quadro completo dell'andamento della capacità rigenerativa del mesencefalo durante lo sviluppo e l'accrescimento di tale specie.

Nella larva (Filoni e Gibertini, 1969) la capacità rigenerativa del mesencefalo è elevatissima negli stadi precoci (stadio 47-48 sec. Nieuwkoop e Faber, 1956), ma con il procedere dello sviluppo larvale essa diminuisce gradualmente fino a subire, al momento della metamorfosi, una brusca diminuzione.

Allo stato attuale della nostra ricerca, riteniamo che tale netta diminuzione sia attribuibile non tanto alle particolari condizioni sfavorevoli in cui viene a trovarsi l'individuo durante la crisi metamorfica, quanto ad una effettiva e definitiva flessione del potere rigenerativo. Infatti, come risulta dai dati riportati in questa Nota, una volta superata la crisi metamorfica, non si osserva alcuna ripresa della capacità rigenerativa che ha un'entità paragonabile a quella che si riscontra nell'adulto (Filoni e Oberti, 1968; Filoni e Margotta, 1972).

Pertanto, i risultati ottenuti negli individui metamorfosati avvalorano l'ipotesi, già precedentemente avanzata (Filoni e Gibertini, 1969), secondo la quale la riduzione della potenzialità rigenerativa del mesencefalo in *Xenopus laevis* con il procedere della vita larvale, sia da attribuire alla graduale differenziazione degli elementi neurali responsabili del processo rigenerativo. Mentre negli stadi larvali precoci, tali «elementi a determinazione tardiva» (secondo la terminologia di Stefanelli, 1960) sono molto numerosi e permettono una completa rigenerazione della parte asportata, negli stadi larvali più avanzati essi perdono, in numero gradualmente crescente, la loro totipotenza. Alla metamorfosi, il processo di differenziamento interessa un numero estremamente elevato di tali elementi e di conseguenza, le capacità rigenerative divengono limitate e tali si mantengono per tutto il resto della vita dell'individuo.

BIBLIOGRAFIA

- FILONI S., « Rend. Ist. Sci. Camerino », 5, 111 (1964 a).
FILONI S., « Rend. Acc. Naz. Lincei », ser. VIII, 37, 521 (1964 b).
FILONI S., « La ricerca Scientifica », 6, 376 (1965).
FILONI S., « Rend. Acc. Naz. Lincei », ser. VIII, 45, 90 (1968 a).
FILONI S., « Boll. Zool. », 35, 396 (1968 b).
FILONI S., « Arch. Ital. Anat. Embriol. », 74, 89 (1969).
FILONI S. e GIBERTINI G., « Arch. Biol. », 80, 369 (1969).
FILONI S. e MARGOTTA V., « Rend. Acc. Naz. Lincei », sez. VIII (in corso di stampa) (1972).
FILONI S., MARGOTTA V. e GIBERTINI G., « Rend. Acc. Naz. Lincei », ser. VIII, 50, 807 (1971).

- FILONI S. e OBERTI C., « Rend. Acc. Naz. Lincei », ser. VIII, 45, 100 (1968).
JORDAN M., « Fol. Biol. », 6, 103 (1958).
KOŚCIUSZKO H., « Fol. Biol. », 6, 117 (1958).
KWIATKOWSKI C., « Fol. Biol. », 7, 309 (1959).
KWIATKOWSKI C., « Fol. Biol. », 9, 27 (1961).
NIEUWKOOP P. D. e FABER J., *Normal table of Xenopus laevis (Daudin)*, Amsterdam (1956).
SHUMWAY W., « Anat. Rec. », 78, 139 (1940).
SPAGNA A. e LOMBARDO F., « Rend. Acc. Naz. Lincei », ser. VIII, 46, 302 (1969).
SREBRO Z., « Fol. Biol. », 5, 211 (1957).
SREBRO Z., « Fol. Biol. », 13, 269 (1965).
STEFANELLI A., « Riv. Biol. », 53, 41 (1960).
TAYLOR A. C. e KOLLROS J. J., « Anat. Rec. », 94, 7 (1946).
TERRY R. J., « J. Exp. Zool. », 133, 389 (1956).

SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE I-II

TAVOLA I

- Fig. 1. - Mesencefalo di un individuo di *Xenopus laevis*, operato 10 giorni dopo la metamorfosi (Lotto I) di asportazione di circa il 50% del lobo ottico destro e fissato dopo 10 giorni dall'intervento. Il ventricolo mesencefalico è chiuso dalla pia madre primitiva rigenerata; la superficie di resezione è tappezzata da alcuni elementi neurali. $\times 60$.
- Fig. 2. - Mesencefalo di un individuo di *Xenopus laevis*, operato 120 giorni dopo la metamorfosi (Lotto III) di asportazione di circa il 40% del lobo ottico destro e fissato 485 giorni dall'operazione. Si osserva la sola rigenerazione della pia madre primitiva. $\times 45$.
- Fig. 3. - Mesencefalo di un individuo di *Xenopus laevis*, operato 120 giorni dopo la metamorfosi (Lotto III) di asportazione superiore all'80% del lobo ottico destro e fissato dopo 485 giorni dall'operazione. Non si nota alcun progresso della rigenerazione rispetto alla fig. 1. $\times 25$.

TAVOLA II

- Fig. 4. - Mesencefalo di un individuo di *Xenopus laevis*, operato 10 giorni dopo la metamorfosi (Lotto I) di asportazione di circa il 40% del lobo ottico destro e fissato dopo 425 giorni dall'operazione. L'area rigenerata è facilmente riconoscibile, poiché non presenta alcuna stratificazione. $\times 45$.
- Fig. 5. - Particolare della fig. 4. $\times 150$.
- Figg. 6 e 7. - Attività mitotica nello strato ependimale a livello del tetto ottico residuo di un mesencefalo di un individuo di *Xenopus laevis*, operato 120 giorni dopo la metamorfosi (Lotto III) di asportazione superiore all'80% del lobo ottico destro e fissato dopo 20 giorni dall'operazione. $\times 2000$.



