
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

FRANCESCO FONTANA, REMIGIO ROSSI, GIUSEPPE
COLOMBO

**Ricerche sull'aggregazione di cellule dissociate di
embrioni di cavalletta (*Schistocerca gregaria*,
Forskål). I. Auto-aggregazione (self-aggregation) in
colture stazionarie con terreni diversi**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 54 (1973), n.5, p. 795–802.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1973_8_54_5_795_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/>

SEZIONE III

(Botanica, zoologia, fisiologia e patologia)

Embriologia sperimentale. — *Ricerche sull'aggregazione di cellule dissociate di embrioni di cavalletta (Schistocerca gregaria, Forskål).*
I. *Auto-aggregazione (self-aggregation) in colture stazionarie con terreni diversi* (*). Nota di FRANCESCO FONTANA, REMIGIO ROSSI e GIUSEPPE COLOMBO, presentata (**) dal Socio A. STEFANELLI.

SUMMARY. — In stationary cultures dissociated cells of embryos of locusts *S. gregaria* Forskål at different stages of development, before and after blastokinesis, seeded in Petri dishes (Falcon Plastic) with different culture media form aggregates (self-aggregation). They are formed within 24 h and show different shape and pattern in the various tested media.

The developmental stage of the embryos from which the cells are obtained, is determinant upon the pattern of aggregation, with different media. With preblastokinetic embryos a higher number and larger aggregates are obtained in cultures with Grace's Antherea medium; with post-blastokinetic embryos best results are obtained with a medium formed by Hoyle's saline solution, glucose, lactalbumin hydrolisate and yeast extract.

INTRODUZIONE

L'aggregazione di cellule embrionali dissociate è un mezzo sperimentale molto usato nello studio, a livello cellulare e molecolare, dei processi e dei fattori implicati nelle associazioni delle cellule e nella loro organizzazione nei sistemi embrionali. Essa è impiegata nelle ricerche di biologia dello sviluppo nei Vertebrati (Moscona [1]) come pure in invertebrati, spugne (Wilson [2], Humphreys [3]), ricci di mare (Giudice [4]).

Questo metodo sperimentale presenta un particolare interesse nello studio della biologia dello sviluppo degli Insetti: infatti in questa classe le cellule sono determinate molto precocemente e i movimenti e le interazioni cellulari assumono un ruolo diverso che negli animali di altri gruppi impiegati nelle ricerche di embriologia.

Le ricerche sulle aggregazioni di cellule embrionali degli Insetti non sono altrettanto numerose di quelle con cellule di Vertebrati anche se l'aggregazione di cellule embrionali dissociate in questa classe sembra essere un fenomeno quasi costante.

Aggregati sono stati descritti da Lesseps [5] in colture stazionarie di cellule embrionali di *Drosophila melanogaster*; da Walter e Williams [6] nelle

(*) Ricerche eseguite con il contributo del Consiglio Nazionale delle Ricerche (Contratto n. 710190604) presso l'Istituto di Zoologia dell'Università di Ferrara.

(**) Nella seduta del 12 maggio 1973.

cellule dei corpi grassi con plasmotociti ameboidi della emolinfa di *Hyalophora cecropia* e *Antherea poliphemus*; da Kitamura [7] in colture di espianti di ovari di *Culex pipiens* e *Aedes aegypti*; da Seecof e Unanue [8] con cellule embrionali di *D. melanogaster*; da Eide e Chang [9] con cellule embrionali di *Musca domestica*; da Kurtti e Brooks [10] con mioblasti di *Malacosoma disstria* e *Tricoplusia ni*. Le ricerche sperimentali più complete sono state condotte da Ling, Horikawa e Fox [11] che hanno studiato l'aggregazione di cellule embrionali di *D. melanogaster* con il sistema stazionario (self-aggregation) ma principalmente la « mediated aggregation » ottenuta con la rotazione delle colture con il metodo messo a punto da Moscona [12]. Ling, Horikawa e Fox [11] hanno analizzato anche sperimentalmente i fattori che influiscono sull'aggregazione, quali la sintesi delle proteine, la temperatura, il pH del mezzo di coltura, ecc.

I diversi ricercatori hanno usato terreni di coltura differenti, ritenuti idonei per le diverse specie; per tessuti e cellule di Insetti di diversi ordini, infatti, i terreni di coltura proposti sono differenti e non sono ancora standardizzati (cfr. Brooks e Kurtti [13] e Vaughn [14]).

Uno di noi, Colombo e Micciarelli [15], è riuscito a coltivare *in vitro* embrioni di cavallette (*S. gregaria*) privi di tuorlo come pure ad ottenere risultati promettenti in colture di cellule embrionali e di ovari dello stesso insetto (Micciarelli e Colombo [16]) in un terreno basato sulla soluzione salina di Hoyle. Colture cellulari di Blatte sono state ottenute da Chen e Levi-Montalcini [17] con terreni ottenuti modificando il terreno di Grace [18].

In ricerche in corso in questo laboratorio cellule embrionali dissociate sono mantenute in coltura in vari terreni da più di 6 mesi (Fontana e Rossi, in corso di pubblicazione) e nell'allestimento di queste colture si è osservata l'aggregazione delle cellule entro 24 ore anche sospendendole semplicemente in soluzione salina di Hoyle [19], come del resto è stato visto da alcuni degli Autori sopra citati (Seecof e Unanue [8], Eide e Chang [9]).

Il processo di aggregazione può essere perciò adoperato come test per saggiare la risposta di cellule embrionali messe in coltura di fronte a diversi terreni.

In questa prima Nota verranno descritti i risultati di ricerche sulle aggregazioni di cellule dissociate di embrioni di cavalletta (*Schistocerca gregaria* Forskål) presi a stadi di sviluppo diverso, messe in colture stazionarie (self-aggregation) in differenti terreni di coltura.

MATERIALE E METODI

Le uova di cavalletta *Schistocerca gregaria* provengono dall'allevamento del nostro laboratorio; esse sono prelevate a tempi diversi dai tubi dove erano deposte.

Sono state eseguite due serie di esperimenti, una adoperando embrioni agli stadi 10-14, secondo le tavole di sviluppo di Micciarelli-Sbrenna [20], l'altra usando embrioni agli stadi 20-24. Nel primo caso gli embrioni sono

nel periodo preblastocinetico, hanno completato la metamerizzazione dell'addome, le pareti laterali non si sono ancora sollevate ad inglobare il tuorlo e gli occhi non hanno ancora iniziato la differenziazione degli ommatidi: si tratta cioè di embrioni in cui anche la differenziazione degli abbozzi degli organi non è od è appena iniziata. Negli stadi 20-24 gli embrioni hanno già compiuto la blastocinesi, le pareti laterali del corpo hanno già inglobato il tuorlo fino all'altezza dei segmenti toracici e, negli occhi, è già iniziata la differenziazione degli ommatidi: si tratta cioè di embrioni in cui è già avvenuta la differenziazione dei principali abbozzi degli organi ed inizia la differenziazione istologica, non è ancora iniziata la formazione della cuticola embrionale da parte dell'ectoderma, che avviene allo stadio 25 (Sbrenna G., in corso di pubblicazione).

Le uova sono esternamente sterilizzate ponendole per 5 min. in una soluzione al 3% di ipoclorito di sodio, e per 10 min. in soluzione Lugol; rilate due volte in soluzione salina di Hoyle sterilizzata alla quale sono aggiunti 300 unità/ml di penicillina e 300 µg/ml di streptomina; sono quindi aperte allo stereomicroscopio. Gli embrioni, liberati dalle membrane e dal tuorlo, sono raccolti in una provetta con 1 ml di soluzione di Hoyle ed omogeneizzati facendoli passare più volte attraverso la punta sottile di una pipetta Pasteur premuta sul fondo della provetta; la sospensione è poi filtrata attraverso un retino da plancton con fori di 21 µ di diametro. Si hanno così praticamente delle sospensioni monocellulari. Tali procedimenti danneggiano parte delle cellule; è stata determinata la percentuale delle cellule morte in base al metodo di assunzione del Tripán blu (Phillips e Terryberry [21]): la percentuale di cellule da considerarsi vive nella sospensione di cellule dissociate, contate con l'emocitometro di Burker, è del 30-40 per cento costantemente in tutte le dissociazioni eseguite.

Le colture sono allestite diluendo la sospensione cellulare filtrata di concentrazione nota coi vari terreni di coltura in modo da ottenere una densità cellulare voluta; la semina è stata fatta in capsule Falcon di plastica (35 × 10 mm), 2 ml per capsula. Dopo prove preliminari di semine di sospensioni cellulari a densità decrescenti, si è scelta una concentrazione cellulare di 7×10^5 cellule totali per ml, di cui 3×10^5 per ml vive, che si ottiene con la dissociazione di circa 20 embrioni preblastocinetici e di circa 10 embrioni postblastocinetici per ml.

Le capsule sono state poste in termostato a 30°C ed esaminate dopo 24 h col microscopio rovesciato Wild M 40. Il tempo di esame delle colture a 24 h dalla semina è stato scelto dopo aver seguito il formarsi degli aggregati con osservazioni ogni tre ore: gli aggregati in colture stazionarie incominciano a formarsi a 3 h dalla semina e si ingrandiscono progressivamente fino alla 24ma ora (Tavola I, figg. 1-6); da 24 a 48 ore non presentano all'esame microscopico cambiamenti apprezzabili; successivamente si osservano cellule migrare dagli ammassi cellulari ed in alcuni terreni evidenti segni di degenerazione cellulare.

Per ciascuna serie di embrioni preblastocinetici e postblastocinetici sono state allestite colture nei seguenti terreni: 1) HGL: soluzione salina di

Hoyle [19] + glucosio (8 g/l) + idrolisato di lattalbumina (8 g/l) + estratto di lievito (2 g/l) (Colombo e Micciarelli [15]). 2) GMA: terreno di coltura di Grace [18]. 3) GME: terreno formato da 1/2 terreno di Grace e 1/2 terreno Eagle. 4) SM: terreno di coltura di Schneider [22]. 5) SME: terreno formato da 1/2 terreno di Schneider e 1/2 terreno Eagle. I terreni di coltura di Grace e Schneider sono stati acquistati dalla GIBCO, l'idrolisato di lattalbumina, l'estratto di lievito e il terreno di coltura Eagle dalla DIFCO.

A tutti i terreni sono state aggiunte penicillina (100 unità/ml) e streptomina (100 µg/ml).

RISULTATI

Verranno descritti gli aggregati formati nei singoli terreni a 24 h dalla semina di sospensioni cellulari ottenute da embrioni pre- e postblastocineticici, osservati *in vivo* al microscopio rovesciato. Le osservazioni si basano su almeno 3 colture per ogni condizione sperimentale.

In tutte le colture gli aggregati sono più numerosi e di dimensioni maggiori nella parte mediana centrale della capsula, probabilmente perché nel maneggiare le capsule, soprattutto quando si mettono in termostato, le cellule si addensano maggiormente al centro a causa di deboli moti vorticosi. Le osservazioni si riferiscono sempre a questa parte centrale.

Embrioni preblastocineticici.

Terreno HGL (Tavola II, fig. 1). Gli aggregati sono rotondeggianti, abbastanza ben separati tra loro, aderenti al fondo per una piccola base, e di dimensioni varie; i più grandi sembrano essersi formati per fusione di aggregati più piccoli: presentano allora forma irregolare e sono per lo più in sospensione. I margini degli aggregati sono in alcuni punti lisci, in altre parti di aspetto morulare con singole cellule sferiche che sporgono dagli aggregati stessi.

Terreno GMA (Tavola II, fig. 2). Si formano grossi aggregati aderenti al fondo, prominenti verso l'alto e collegati tra loro a formare una rete.

Appaiono costituiti da aggregati più piccoli generalmente di forma rotondeggiante ed a margini netti che si fondono o aderiscono gli uni agli altri per buona parte del loro contorno. Ponti formati da prolungamenti di cellule fusiformi uniscono in più punti trasversalmente i cordoni di aggregati.

Terreno GME (Tavola II, fig. 3). Si ottengono aggregati relativamente piccoli attaccati al fondo e prominenti verso l'alto, di dimensioni e forme varie, parecchi fusi ampiamente tra loro e uniti inoltre da ponti di cellule fusiformi. I margini degli aggregati sono netti ma irregolari.

Terreno SM. Con questo terreno al fondo della capsula sedimenta del materiale forse di natura proteica che rende difficile l'esame microscopico ed impossibile fare microfotografie leggibili. Si formano aggregati di forma irregolare, taluni liberi nel liquido di coltura, altri ammassati tra loro.

Terreno SME (Tavola II, fig. 4). Gli aggregati sono per lo più piccoli, rotondeggianti, a contorni generalmente netti, alcuni di aspetto morulare. Alcuni aggregati venuti a contatto si fondono per una parte ma sono comunque riconoscibili.

Embrioni postblastocinetici.

Terreno HGL (Tavola II, fig. 5). Si formano aggregati di piccole e medie dimensioni: alcuni sono isolati e con contorni lisci, altri formano cordoni per fusione di aggregati più piccoli. Buona parte di quest'ultimi sono in sospensione mentre gli altri sono aderenti al fondo. I margini di molti aggregati sono netti, oppure presentano in parte contorni di aspetto morulare per lo sporgere di cellule sferiche.

Terreno GMA (Tavola II, fig. 6). Sono pochi in questo terreno gli aggregati rotondeggianti a margini netti, come si osservano in altre condizioni. Si ottengono invece delle reti di ammassi cellulari aderenti al fondo, dai quali sporgono cellule fusiformi o sottili cordoni cellulari.

Terreno GME (Tavola II, fig. 7). Più che aggregati come quelli già descritti, si forma in questo terreno una rete irregolare di ammassi cellulari, aderenti al fondo, forse costituiti dalla fusione di piccoli aggregati uniti tra loro spesso da cordoni di cellule fusiformi disposte in fila.

Terreno SM. Anche in queste colture si forma un fine sedimento granulare, ma di molto minor estensione ed entità che con sospensioni di embrioni preblastocinetici. Gli aggregati, aderenti al substrato, formano una rete irregolare dovuta alla fusione di aggregati più piccoli ed a sottili cordoni e ponti cellulari. Pochi aggregati presentano margini netti, molti hanno aspetto morulare.

Terreno SME (Tavola II, fig. 8). Gli aggregati sono molto piccoli, aderenti al substrato, generalmente di forma rotondeggianti a margini netti di solito isolati senza formare una rete. Quelli più grandi appaiono fusioni di piccoli ammassi strettamente uniti fra loro almeno per una piccola parte.

Sul fondo della capsula sono presenti, più numerose che nelle altre colture, anche cellule vive isolate per la maggior parte di forma rotondeggianti e, meno numerose, cellule di tipo fusiforme o fibroblastico.

DISCUSSIONE

Le cellule dissociate di embrioni di cavalletta, *Schistocerca gregaria* (Forskål), agli stadi di sviluppo studiati, si aggregano facilmente entro le prime 24 h dalla semina, quando sono poste in colture stazionarie, anche con semplice soluzione salina.

Nel sistema sperimentale descritto le cellule dissociate sedimentano, si può presumere a caso, sul fondo della capsula e dopo poche ore si raggruppano formando degli ammassi più o meno voluminosi che rimangono generalmente attaccati al fondo della capsula di coltura. I meccanismi che intervengono

sono, durante la sedimentazione, le collisioni casuali ed, in seguito, il movimento delle cellule; quando vengono a contatto esse aderiscono l'una all'altra formando degli ammassi che presentano già a 24 ore dalla semina un'organizzazione istologica che sarà descritta in una Nota successiva. È stata usata la dissociazione meccanica, che in confronto coi metodi di dispersione in cui vengono usati EDTA (o EGTA) o tripsina, altera meno la struttura della membrana cellulare. Tuttavia con la dispersione meccanica molte cellule vengono rotte od alterate irreversibilmente ed il numero di cellule che si possono ritenere vive è relativamente basso, circa il 30-40%. Le cellule morte sedimentano sul fondo della capsula di coltura; esse probabilmente non interferiscono nel movimento e nel contatto delle cellule vive sospese, ma modificano eventualmente in parte la composizione dei terreni sperimentati.

Le variabili prese in considerazione sono due: l'età o meglio lo stadio di sviluppo degli embrioni e la composizione dei terreni di coltura.

I nostri risultati (Tavola II) mostrano che sia con cellule di embrioni preblastocinetici che con quelle di embrioni postblastocinetici *si formano aggregati*, in tutti e cinque i terreni saggiati.

Nello stesso terreno però gli aggregati, formati da cellule di diversa origine, presentano forme e dimensioni diverse: la differenza è poco notevole per la Hoyle completa ma rilevante per gli altri quattro terreni. Generalmente le cellule di embrioni preblastocinetici danno origine ad ammassi di maggiori dimensioni anche per fusione o giustapposizione di aggregati più piccoli, e questo non solo per l'attività (movimento-contatto-adesione) di singole cellule, ma di gruppi di cellule che già si sono organizzate fra loro. L'esame istologico ed ultrastrutturale degli aggregati potrà chiarirci meglio l'organizzazione degli aggregati formati da cellule provenienti da embrioni di stadi diversi.

Dall'esame comparativo delle colture risulta che aggregati a struttura più compatta e a margini più netti si formano in quelle condizioni sperimentali in cui apparentemente sono sfavorite l'adesione delle cellule al substrato e la loro migrazione come cellule singole o come sottili cordoni cellulari. Le cellule degli embrioni preblastocinetici tendono in tutti i terreni a raggrupparsi in aggregati mentre quelli degli embrioni postblastocinetici tendono maggiormente ad aderire al substrato e a disporsi a cordoni. In questo comportamento le cellule degli embrioni postblastocinetici rispondono in maniera diversa di fronte ai terreni di coltura sperimentati.

Il maggior numero di aggregati di dimensioni più grandi si è ottenuto, con le cellule di embrioni preblastocinetici nel terreno di Grace, con quelle di embrioni postblastocinetici nel terreno formato dalla soluzione salina di Hoyle con glucosio, idrolisato di lattalbumina ed estratto di lievito. Questi risultati indicano che, per quanto riguarda la formazione degli aggregati in questi terreni, le cellule si trovano nelle condizioni ottimali e si possono formulare due ipotesi di lavoro: in questi terreni cellule con caratteristiche funzionali diverse (stadio di sviluppo) presentano struttura ed attività di membrana idonee all'adesione delle cellule fra loro, o sono in grado di produrre

fattori aggreganti, dimostrati essere presenti e necessari nella formazione di aggregati con cellule di mammiferi (Moscona [23], [24]), Pessac e Defendi [25]) ed anche nell'aggregazione di cellule embrionali di *D. melanogaster*, come con esperimenti indiretti hanno mostrato Allen e Fox [26].

Esperimenti con inibitori di diverso tipo sono in corso nel nostro laboratorio per individuare il ruolo dei vari processi cellulari nella formazione di aggregati anche nel nostro materiale sperimentale.

CONCLUSIONI

Cellule di embrioni di cavalletta, *Schistocerca gregaria* Forskål, poste in coltura stazionaria, dopo dissociazione meccanica, si aggregano a 30°C entro le prime 24 ore.

Cellule embrionali prese a due diversi stadi di sviluppo, uno pre- e l'altro postblastocinetico, formano aggregati di forma e dimensioni diverse. Anche i terreni di coltura usati influiscono sulla aggregazione: la soluzione salina di Hoyle, addizionata di glucosio, idrolisato di lattalbumina ed estratto di lievito sembra dare la miglior risposta per gli embrioni postblastocinetici, mentre per quelli preblastocinetici si ottengono migliori risultati con terreno di coltura di Grace.

Sembra che terreni che favoriscono lo sviluppo di colture di cellule isolate aderenti al substrato siano sfavorevoli alla formazione di aggregati e viceversa.

BIBLIOGRAFIA

- [1] A. A. MOSCONA, *Recombination of dissociated cells and the development of cell aggregates*, in «Cells and Tissues in Culture», E. N. Willmer ed. vol. I, 489-529 (1965).
- [2] H. V. WILSON, *On some phenomena of coalescence and regeneration in sponges*, «J. Exp. Zool.», 5, 245-258 (1907).
- [3] T. HUMPHREYS, *Chemical dissolution and in vitro reconstruction of sponge cells adhesions I Isolation and functional demonstration of the components involved*, «Develop. Biol.», 8, 27-47 (1963).
- [4] G. GIUDICE, *The mechanism of aggregation of embryonic sea urchin cells: a biochemical approach*, «Develop. Biol.», 12, 233-247 (1965).
- [5] R. J. LESSEPS, *Culture of dissociated Drosophila embryos: aggregated cells differentiate and sort out*, «Science», 148, 502-503 (1965).
- [6] D. R. WALTERS e C. M. WILLIAMS, *Reaggregation of Insect cells as studied by a new method of tissue and organ culture*, «Science», 154, 516-517 (1966).
- [7] S. KITAMURA, *The in vitro cultivation of tissues from the mosquitoes. III. Further studies on the cultivation of ovarian tissues of three mosquito species and the examination of the origin of cells grown in vitro*, «Kobe J. Med. Sci.», 12, 63-70 (1966).
- [8] R. L. SEECOF e R. L. UNANUE, *Differentiation of embryonic Drosophila cells in vitro*, «Exptl. Cell. Res.», 50, 654-660 (1968).
- [9] P. E. EIDE e T. H. CHANG, *Cell cultures from dispersed embryonic house fly tissues: technique, mitosis and cell aggregates*, «Exptl. Cell Res.», 54, 302-308 (1969).
- [10] T. J. KURTTI e M. A. BROOKS, *Growth and differentiation of lepidopteran myoblasts in vitro*, «Exptl. Cell Res.», 61, 407-412 (1970).

- [11] L. N. LING, M. HORIKAWA e A. S. FOX, *Aggregation of dissociated cells from Drosophila embryos*, « *Develop. Biol.* », 22, 264-281 (1970).
- [12] A. A. MOSCONA, *Rotation-mediated histogenetic aggregation of dissociated cells*, « *Exptl. Cell Res.* », 22, 455-475. (1961)
- [13] M. A. BROOKS e T. J. KURTTI, *Insect cell and tissue culture*, « *Ann. Rev. entomol.* », 16, 27-52 (1971).
- [14] J. L. VAUGHN, *Cell culture media and methods*, in « *Invertebrate tissue culture* » ed. by C. Vago, vol. I, 4-37 (1971).
- [15] G. COLOMBO e A. MICCIARELLI, *Colture in vitro di embrioni senza tuorlo di Schistocerca gregaria, Forsk (Ortotteri, Acrididi) a stadi precedenti la blastocinesi*, « *Rivista di Biologia* », 20, 371-405. (1967)
- [16] A. MICCIARELLI, G. SBRENNNA e G. COLOMBO, *Experiments of in vitro cultures of larval epiderm of desert locust (Schistocerca gregaria, Forskål)*, « *Experientia* », 23, 64-66 (1967).
- [17] J. S. CHEN e R. LEVI-MONTALCINI, *Long term cultures of dissociated nerve cells from the embryonic nervous system of the cockroach. Periplaneta americana*, « *Arch. Ital. Biol.* », 108, 503-537 (1970).
- [18] T. D. C. GRACE, *Establishment of four strains of cells from insect tissues grown in vitro*, « *Nature* », 195, 788-789 (1962).
- [19] G. HOYLE, *The effects of some common cations on neuromuscular transmission in Insect*, « *J. Gen. Physiol.* », 127, 90-105 (1955).
- [20] A. MICCIARELLI-SBRENNNA, *Gli stadi normali di sviluppo degli embrioni di Schistocerca gregaria, Forskål*, « *Boll. Zool.* », 36, 77-95 (1969).
- [21] H. J. PHILLIPS e J. E. TERRYBERRY, *Counting actively metabolizing tissue cultured cells*, « *Exptl. Cell Res.* », 13, 341-347 (1957).
- [22] I. SCHNEIDER, *Differentiation of larval Drosophila eye antennal discs in vitro*, « *J. Exp. Zool.* », 156, 91-104 (1964).
- [23] A. A. MOSCONA, *Studies on cell aggregation: demonstration of materials with selective cell-binding activity*, « *Proc. Nat. Acad. Sci. Wash.* », 49, 742-750 (1963).
- [24] A. A. MOSCONA, *Cell aggregation: properties of specific cell-ligands and their role in the formation of multicellular systems*, « *Develop. Biol.* », 18, 250-277 (1968).
- [25] B. PESSAC e V. DEFENDI, *Evidence for distinct aggregation factors and receptors in cells*, « *Nature, New Biology* », 238, 13-15 (1972).
- [26] R. M. ANTLEY e A. S. FOX, *The relationship between RNA and protein synthesis and the aggregation of Drosophila embryonic cells*, « *Develop. Biol.* », 22, 282-297 (1970).

SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE I-II

TAVOLA I

Microfotografie di capsule seminate con cellule di embrioni post-blastocinetici sospesi in semplice soluzione salina di Hoyle: 1) subito dopo la semina; 2) dopo 3 ore; 3) dopo 6 ore; 4) dopo 9 ore; 5) dopo 18 ore; 6) dopo 24 ore. Sul fondo si vedono numerose cellule isolate morte. Fino a 9 ore gli aggregati sono formati da cellule di aspetto normale; a 18 e a 24 ore (figg. 5 e 6) sopra e attorno agli aggregati si notano numerose cellule che si possono considerare morte, con aspetto simile a quello delle cellule singole isolate.

Tutte le microfotografie sono allo stesso ingrandimento: 120×.

TAVOLA II

Microfotografie di aggregati formati con sospensioni cellulari di embrioni preblastocinetici (figg. 1-4) e di embrioni postblastocinetici (figg. 5-8), in terreni diversi: Hoyle+glucosio+idrolisato (figg. 1 e 5); Grace (figg. 2 e 6); Grace-Eagle (figg. 3 e 7); Schneider-Eagle (figg. 4 e 8).

Tutte le microfotografie sono allo stesso ingrandimento: 120×.



