

---

ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI  
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

# RENDICONTI

---

REMIGIO ROSSI, FRANCESCO FONTANA, GIUSEPPE  
COLOMBO

**Ricerche sull'aggregazione di cellule dissociate di  
embrioni di cavalletta (*Schistocerca gregaria*,  
Forskål). II. Effetto del siero sull'aggregazione in  
colture stazionarie**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,  
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 54 (1973), n.6, p. 970-975.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<[http://www.bdim.eu/item?id=RLINA\\_1973\\_8\\_54\\_6\\_970\\_0](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1973_8_54_6_970_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/>

**Embriologia sperimentale.** — *Ricerche sull'aggregazione di cellule dissociate di embrioni di cavalletta (Schistocerca gregaria, Forskål).* II. *Effetto del siero sull'aggregazione in colture stazionarie* (\*). Nota di REMIGIO ROSSI, FRANCESCO FONTANA e GIUSEPPE COLOMBO, presentata (\*\*) dal Socio A. STEFANELLI.

SUMMARY. — The effects of the addition of fetal calf serum are described on the self-aggregation of embryonic locust cells obtained and seeded in culture according to the techniques already described (this « Rendiconti » 54, 795-802 (1973)).

The main effect of the fetal calf serum, tested at different concentration, is the inhibition of the adhesion of the cells to the bottom of the culture dish; this effect is higher with the increase of serum concentration.

In tissue culture media with 10 per cent of fetal calf serum aggregates are easily formed and all are floating on the medium. The shape and the size of the aggregates obtained both of preblastokinetic and postblastokinetic embryos, in different media are more similar than the aggregates obtained without serum.

The fetal calf serum aids the initial aggregation but, at the concentration of 10 per cent, the aggregates also at 24 h begin to disaggregate.

#### INTRODUZIONE

Nella prima Nota di questa serie di ricerche (Fontana, Rossi e Colombo [1]) sono stati descritti i risultati di esperimenti di aggregazione di cellule embrionali dissociate di cavalletta in colture stazionarie, con terreni di coltura diversi. Si rimanda alla Nota precedente per le notizie bibliografiche e per la descrizione dei metodi di allestimento delle colture.

Negli esperimenti sull'aggregazione con cellule embrionali di Mammiferi, i terreni usati sono di solito supplementati con siero fetale di vitello. Non è chiaro se esso soddisfi la richiesta metabolica implicata direttamente od indirettamente nel comportamento aggregativo delle cellule, oppure provveda a formare attorno alle cellule un ambiente macromolecolare protettivo, o inattivi la tripsina assunta dalle cellule; resta il fatto che il siero gioca un ruolo essenziale soprattutto per l'aggregazione di cellule dissociate con tripsina (Moscona [2]). Nelle ricerche con cellule embrionali di Anfibi (Townes e Holtfreter [3]) e di ricci di mare (Giudice [4]) sono usate semplici soluzioni saline o acqua di mare; ciò è comprensibile, poiché si tratta di sistemi cellulari particolari e di cellule provenienti da stadi molto precoci di sviluppo.

In molti terreni per colture *in vitro* di cellule di Insetti, sia primarie, sia di linee cellulari, viene aggiunto siero fetale di vitello per sopperire alle sostanze

(\*) 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.

anche macromolecolari che sono fornite dall'emolinfa; il siero bovino in molti casi favorisce l'accrescimento delle colture (Yunker, Vaughn e Cory [5]; Mitsuhashi e Grace [6]; Hink [7]; Brooks e Kurtti [8]) e questo effetto sembra dovuto a fattori legati alla frazione proteica albuminica (Kuno, Hink e Briggs [9]). Tuttavia non è stato studiato sistematicamente ed accuratamente l'effetto dell'aggiunta del siero di vitello nel processo di aggregazione; solo Ling, Horikawa e Fox [10] hanno osservato nelle aggregazioni ottenute mediante rotazione che aggregati di dimensioni maggiori si ottengono con concentrazioni di siero da 5 al 10%. Anche in colture stazionarie di Insetti l'aggregazione è ottenuta con terreni contenenti dal 10 al 20% di siero fetale bovino (Seecof e Unanue [11]; Eide e Chang [12]). Tuttavia non viene rilevato dai suddetti Autori quale possa essere l'effetto del siero sulle cellule dissociate di embrioni di Insetti.

Questa Nota espone i risultati ottenuti con l'aggiunta di siero fetale di vitello ai terreni di coltura.

#### MATERIALE E METODI

Le uova provengono dall'allevamento di cavallette *Schistocerca gregaria* Forskål, del nostro Istituto. La dissociazione delle cellule, la filtrazione, la concentrazione, il tempo di osservazione, i terreni di coltura usati ed in generale l'allestimento delle colture sono stati eseguiti secondo le stesse tecniche descritte nella Nota precedente, a cui si rimanda [1].

Come negli esperimenti precedenti anche in questi sono state allestite serie di colture di embrioni preblastocinetici e postblastocinetici (stadi 10-14 e 20-24 secondo le tavole di sviluppo Micciarelli-Sbrenna [13]).

Il siero fetale di vitello è stato fornito dalla Microbiological Associates Inc. e per tutte le prove si è impiegato lo stesso stock. Per tutte le condizioni sperimentali le prove sono state eseguite almeno due volte e si sono ottenuti identici risultati.

#### RISULTATI

Nelle due serie di esperimenti con embrioni pre- e postblastocinetici in terreni di coltura diversi si è usata una sola concentrazione di siero, al 10%, in seguito ai risultati di colture di cellule embrionali dissociate di embrioni postblastocinetici seminate in terreno di Grace al quale è stato aggiunto siero fetale di vitello a concentrazione crescente: 2,5; 5; 10; 20 e 40%. I risultati (Tavola I, figg. 1-6) mostrano che con l'aumentare della concentrazione di siero, si ha una progressiva inibizione dell'adesione delle cellule al fondo della capsula di coltura e si formano aggregati sferici, singolarmente individuabili, sospesi nel terreno di coltura.

Nel terreno col 2,5% ed in quantità minore col 5% di siero, parte delle cellule rimane attaccata al fondo della capsula e si formano aggregati riuniti

in ammassi appiattiti, non ben individuabili singolarmente per la presenza di cellule o cordoni di cellule che uniscono un ammasso all'altro, simili a quelli che si ottengono nelle colture senza siero. Con l'aggiunta del siero al 10% non si hanno cellule aderenti al fondo e gli aggregati sono tutti in sospensione, generalmente di forma rotondeggiante, i più piccoli a contorni netti, mentre i più grandi appaiono il risultato di fusioni di aggregati ed hanno aspetto morulare. Con concentrazioni del 20 e 40% di siero si formano aggregati più numerosi ma più piccoli, parte in sfaldamento e con cellule che presentano processi degenerativi.

L'aggiunta di siero al terreno di coltura di Grace sposta il pH del terreno da 6,7 a 6,8 col 2,5 e col 5%; a 7 con il 10%; a 7,2 col 20% e a 7,5 col 40% di siero. Non si può discriminare con sicurezza se i risultati sopra descritti sull'influenza del siero siano dovuti solo alle proteine del siero stesso o anche all'influenza dell'aumentata basicità del mezzo ed alle modificazioni della composizione complessiva del terreno. Fino alla concentrazione del 10% le modifiche alla composizione del terreno di Grace per aggiunta del siero sono contenute entro limiti modesti e gli effetti del siero possono essere imputati principalmente alla sua composizione proteica, tanto più che l'effetto più evidente, quello della inibizione all'adesione al fondo della capsula di coltura appare proporzionale alle concentrazioni di siero usate. Per questo per i successivi esperimenti si è adoperato il 10% di siero, in quanto non produce quei segni di sofferenza cellulare e disaggregazione che si osservano invece con le concentrazioni più alte, e si ottengono aggregati ben individuabili.

Qui di seguito sono descritti i risultati delle osservazioni degli aggregati a 24 ore della semina, in colture con i terreni già provati [1] ottenute con cellule di embrioni preblastocineticici (Tavola II, figg. 1-4) e poi con quelli postblastocineticici (Tavola II, figg. 5-8).

#### *Embrioni preblastocineticici.*

*Terreno HGL* (Tavola II, fig. 1). La maggior parte degli aggregati è in sospensione; essi sono rotondeggianti, pochi a contorno netto, la maggior parte di aspetto morulare. Altri di maggiori dimensioni sempre in sospensione, sono allungati ed appaiono dovuti a fusione di aggregati più piccoli difficilmente riconoscibili. Numerose cellule presentano degenerazione grassa.

*Terreno GMA* (Tavola II, fig. 2). Tutti gli aggregati sono in sospensione. La forma è generalmente rotondeggiante con margini in parte morulari. In alcuni casi questi aggregati si fondono formando ammassi allungati o globosi in cui è difficile individuare con precisione i contorni degli aggregati originali.

*Terreno GME* (Tavola II, fig. 3). Gli aggregati sono in sospensione, di forma rotondeggiante con margini netti, alcuni risultano evidentemente da fusione di piccoli aggregati rotondeggianti a contorni netti e formano grosse masse di forma irregolare con margini di aspetto morulare.

*Terreno SM.* Si formano in sospensione aggregati di forma rotondeggiante e di aspetto morulare: pochissimi hanno margini netti. Le fusioni interessano

pochi aggregati. La degenerazione grassa delle cellule è molto marcata, sia nelle cellule isolate sia in quelle costituenti i margini degli ammassi.

*Terreno SME* (Tavola II, fig. 4). Gli aggregati sono tutti in sospensione, di dimensioni uniformi, di forma rotondeggiante, hanno i margini in parte netti, in parte punteggiati da cellule fuoriuscenti. Molte cellule presentano degenerazione grassa. Sul fondo della capsula c'è del fine sedimento polverulento.

#### *Embrioni postblastocinetici.*

*Terreno HGL* (Tavola II, fig. 5). Gli aggregati sono in sospensione; quelli medi e piccoli sono rotondeggianti con contorni in parte netti, in parte formati da cellule individuabili; i più grandi sono allungati, derivati da fusione di aggregati più piccoli ed hanno tutti contorni morulari. Alcune cellule presentano degenerazione grassa.

*Terreno GMA* (Tavola II, fig. 6). Gli aggregati sono in sospensione, alcuni rotondeggianti a contorni netti altri di aspetto morulare. In sospensione si notano anche grossi ammassi di forma allungata derivati da fusione di singoli aggregati; hanno contorni irregolari per lo sporgere di cellule isolate.

*Terreno GME* (Tavola II, fig. 7). Gli aggregati sono generalmente in sospensione; i più piccoli sono rotondeggianti a contorni netti. Vi sono ammassi formati da piccoli aggregati ben riconoscibili, collegati da gruppi di cellule fra loro debolmente attaccate. All'esterno di questi gruppi si notano cellule vescicolose.

*Terreno SM*. Gli aggregati sono in sospensione; hanno forma rotondeggiante o allungata a margini per lo più netti. Si notano inoltre, ammassi di aspetto morulare che si collegano ad aggregati piccoli e formano così strutture irregolari per forma e dimensione.

*Terreno SME* (Tavola II, fig. 8). Gli aggregati sono di piccole dimensioni, di forma rotondeggiante a bordi netti, quasi tutti in sospensione. La maggior parte aderiscono fra loro e formano ammassi irregolari o sferici, mantenendo comunque le loro individualità. Ci sono numerose cellule con degenerazione di tipo vescicoso, probabilmente per la presenza di goccioline di grasso.

#### DISCUSSIONE

I risultati degli esperimenti qui descritti mostrano che uno dei principali effetti del siero fetale di vitello è quello di impedire l'adesione delle cellule al fondo della capsula di coltura e quest'effetto risulta proporzionale alla concentrazione del siero. In conseguenza di ciò, gli aggregati, che si formano del resto anche senza siero come abbiamo descritto nella Nota precedente, nei terreni col siero rimangono in sospensione assumendo forme rotondeggianti più regolari, anche quelli più grandi, ottenuti evidentemente per fusione di aggregati più piccoli. Questo risultato è stato ottenuto uniformemente con

tutti e cinque i terreni provati in seguito all'aggiunta del 10% di siero sia con cellule di embrioni preblastocineticici, che con quelle di embrioni postblastocineticici, le quali in alcuni terreni senza siero presentano maggior tendenza ad attaccarsi al substrato e le singole cellule ad espandersi a rete.

Il siero risulta quindi possedere dei fattori che favoriscono l'aggregazione probabilmente almeno nella prima fase della formazione degli aggregati ed il suo effetto si fa sentire principalmente con le cellule di embrioni postblastocineticici. È prematuro prospettare, anche come ipotesi di lavoro, quali siano i componenti del siero attivi in questo senso e quali siano le strutture ed i meccanismi cellulari sui quali il siero agisce.

Dai precedenti esperimenti con terreni senza siero appare che, prescindendo dagli effetti sulla sopravvivenza e sull'attività moltiplicativa, per quanto riguarda il processo dell'aggregazione i terreni di coltura che favoriscono l'adesione al substrato delle cellule dissociate sono quelli nei quali la formazione degli aggregati è minore e le differenze dell'effetto dei vari terreni appare molto evidente; l'aggiunta di una componente proteica, che è una delle caratteristiche principali del siero, fa sì che queste differenze in parte si attenuino.

L'aggiunta del siero produce la formazione di aggregati in sospensione: appare quindi che i meccanismi cellulari che agiscono nell'adesione delle cellule al substrato hanno un ruolo minore di quelli che intervengono nell'adesione delle cellule fra loro.

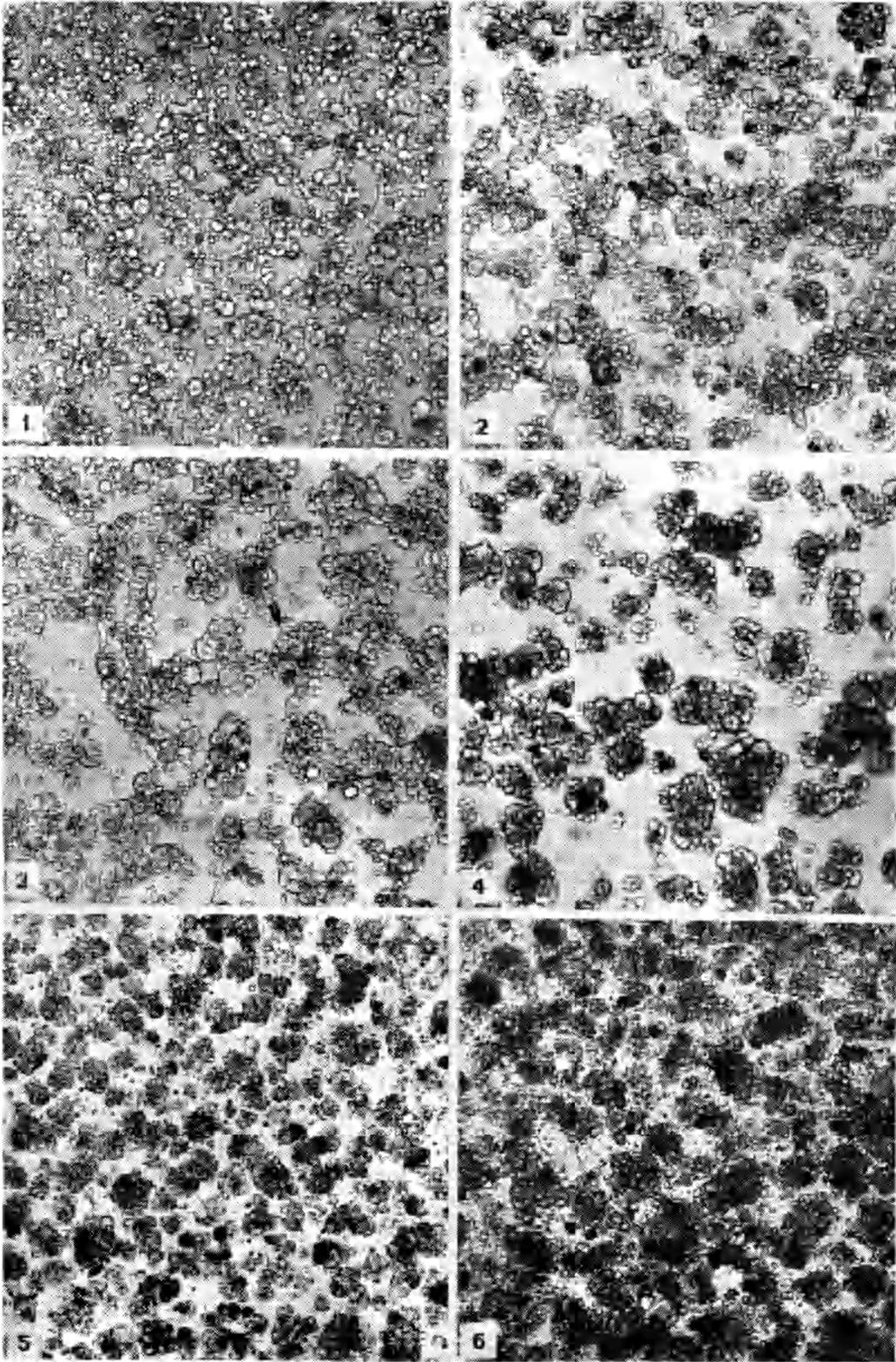
Queste osservazioni certamente non portano a conclusioni definitive ma permettono di discriminare i vari fattori ed indirizzare i piani delle ulteriori ricerche sperimentali.

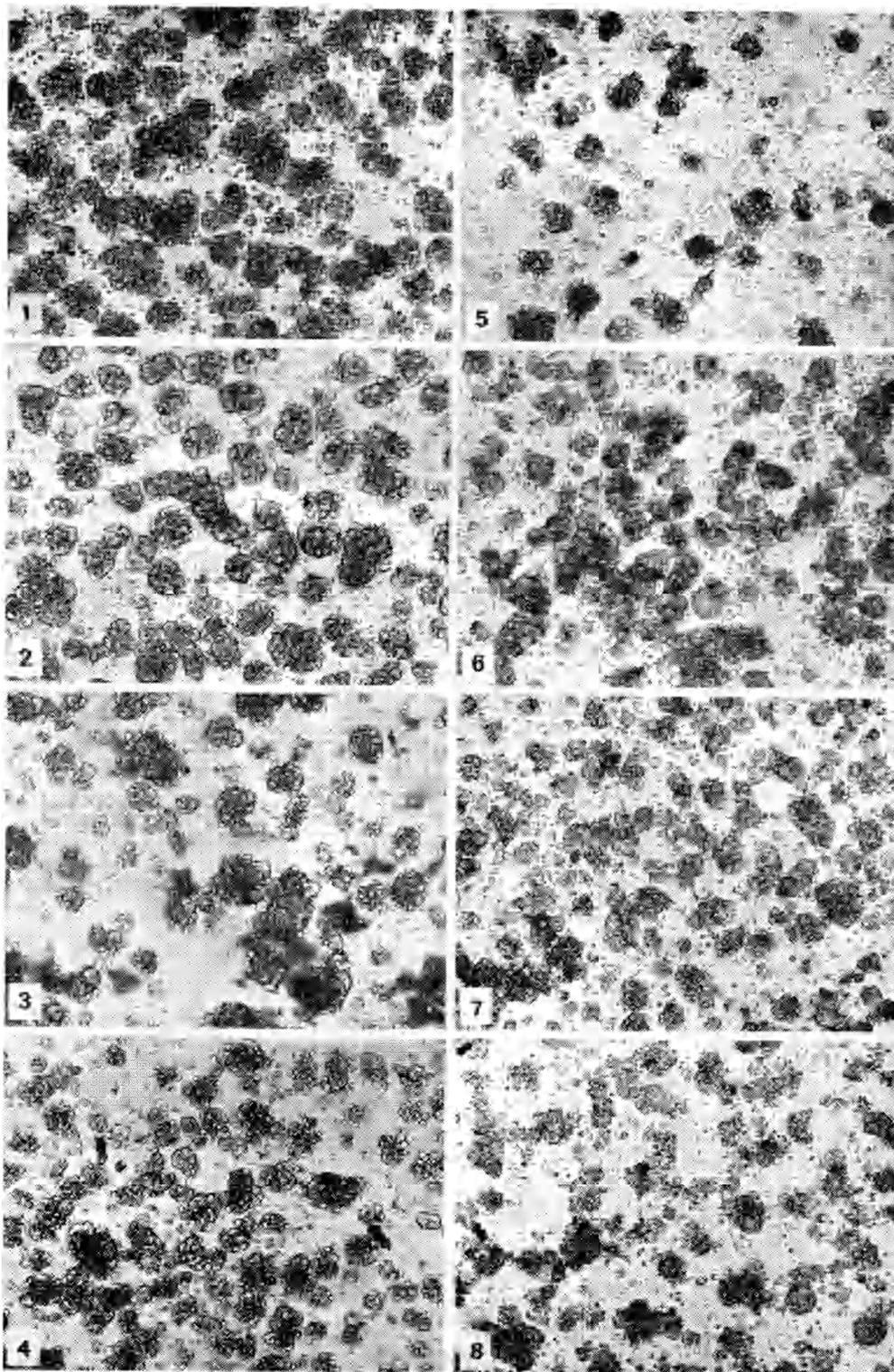
#### CONCLUSIONI

L'effetto di concentrazioni crescenti di siero fetale di vitello si manifesta come un progressivo distacco delle cellule dal fondo della capsula di coltura con formazione di aggregati sferici in sospensione. Il 10% di siero, in diversi terreni di coltura, favorisce l'aggregazione sia per cellule preblastocinetiche, sia per quelle postblastocinetiche. Esso sembra però insufficiente a mantenere gli aggregati, che dopo 48 h di coltura tendono ad appiattirsi e a disgregarsi.

#### BIBLIOGRAFIA

- [1] F. FONTANA, R. ROSSI e G. COLOMBO, *Ricerche sull'aggregazione di cellule dissociate di embrioni di cavalletta (Schistocerca gregaria Forskål)*. I. *Autoaggregazione (self-aggregation) in colture stazionarie con terreni diversi*, « Rend. Acc. Naz. Lincei », 54, 795-802 (1973).
- [2] A. A. MOSCONA, *Recombination of dissociated cells and the development of cell aggregates*, in « Cells and Tissue in Culture », ed. by E. N. Willmer, vol. I, 489-529 (1965).
- [3] P. L. TOWNES e J. HOLTFRETER, *Directed movements and selective adhesion of embryonic amphibian cells*, « J. Exp. Zool. », 128, 53-120 (1955).





- [4] G. GIUDICE, *The mechanism of aggregation of embryonic sea urchin cells: a biochemical approach*, « *Develop. Biol.* », 12, 233-247 (1965).
- [5] C. E. YUNKER, J. L. VAUGHN e J. CORY, *Adaptation of an Insect Cell Line (Grace's *Antheraea* cells) to medium free of Insect hemolymph*, « *Science* », 155, 1565-1566 (1967).
- [6] J. MITSUHASHI e T. D. C. GRACE, *Adaptation of established Insect cell Lines to a different culture medium*, « *Appl. Ent. Zool.* », 4, 121-125 (1969).
- [7] W. F. HINK, *Established Insect cell Line from the Cabbage Looper, *Tricoplusiani**, « *Nature* », 226, 466-467 (1970).
- [8] M. A. BROOKS e T. J. KURTTI, *Insect cell and tissue culture*, « *Ann. rev. Entomol.* », 16, 27-52 (1971).
- [9] G. KUNO, W. F. HINK e J. D. BRIGGS, *Growth-promoting serum proteins for *Aedes Aegypti* cells cultured in vitro*, « *J. Insect Physiol.* », 17, 1865-1879 (1971).
- [10] L. N. LING, M. HORIKAWA e A. S. FOX, *Aggregation of dissociated cells from *Drosophila* embryos*, « *Develop. Biol.* », 22, 264-281 (1970).
- [11] R. L. SEECOF e R. L. UNANUE, *Differentiation of embryonic *Drosophila* cells in vitro*, « *Exptl. Cell Res.* », 50, 654-660 (1968).
- [12] P. E. EIDE e T. H. CHANG, *Cell cultures from dispersed embryonic house fly tissues: techniques, mitosis and cell aggregates*, « *Exptl. Cell Res.* », 54, 302-308 (1969).
- [13] A. MICCIARELLI-SBRENNNA, *Gli stadi normali di sviluppo degli embrioni di *Schistocerca gregaria* (Forskål)*, « *Boll. Zool.* », 36, 77-95 (1969).

## SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE I-II

### TAVOLA I

Microfotografie di capsule seminate con cellule di embrioni post-blastocinetici in terreno di coltura di Grace a percentuali crescenti di siero: 1) senza siero; 2) col 2,5% 3) col 5%; 4) col 10%; 5) col 20%; 6) col 40% di siero.

Senza siero (1) e col 2,5% di siero (2) gli ammassi restano aderenti al substrato. Col 5% di siero gli aggregati sono generalmente in sospensione, ma legati fra loro con cordoni cellulari. Col 10% di siero gli aggregati sono in sospensione e ben individuabili singolarmente. Col 20 e 40% di siero (figg. 5 e 6) gli aggregati, in sospensione, si disaggregano e presentano cellule degeneranti.

Tutte le microfotografie sono allo stesso ingrandimento: 120×.

### TAVOLA II

Microfotografie con aggregati formati con sospensioni cellulari di embrioni preblastocinetici (figg. 1-4) e postblastocinetici (figg. 5-8), in terreni diversi, supplementati del 10% di siero fetale di vitello: 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×.