
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

SERGIO FILONI, CARLO BAVA, VITO MARGOTTA

**La rigenerazione del midollo spinale della coda in
larve di *Xenopus laevis* (Daudin)**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 55 (1973), n.5, p. 586–591.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1973_8_55_5_586_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. — *La rigenerazione del midollo spinale della coda in larve di Xenopus laevis (Daudin) (*)*. Nota (**) di SERGIO FILONI, CARLO BAVA e VITO MARGOTTA, presentata dal Socio A. STEFANELLI.

SUMMARY. — Fifty larvae of *Xenopus laevis* at stage 48 (according to Nieuwkoop and Faber) were submitted to tail amputation. Either 50% or 70% of the tail was cut off. The animals were sacrificed from the 30th to the 40th day after the operation, when they had reached stage 56-57.

The study of the regenerated tail demonstrated that the histological structure of the neo-formed spinal cord is very similar to that of control animals, although the volume is clearly reduced. The regenerated spinal cord is constituted not only by the ependymal layer but also by the gray periventricular layer; numerous neurons have differentiated, among which the Rohon-Beard nerve cells and the motor neurons are identifiable. The white matter is noticeable, but the Mauthner fibres are lacking. Ganglion cells at the sides of the regenerated spinal cord, approaching its ventral surface, were frequently found.

Tra le ricerche sulle capacità rigenerative del sistema nervoso centrale degli Anfibi, quelle riguardanti la rigenerazione del midollo spinale del tronco e della coda sono le più numerose. Per la relativa bibliografia, si rimanda ad un nostro precedente lavoro (Margotta e Filoni, 1969).

Da esse è chiaramente emerso che negli Anfibi urodela, tanto allo stato larvale che adulto, la rigenerazione del midollo spinale è pressoché totale sia da un punto di vista volumetrico che strutturale. La sola eccezione riguarda le fibre di Mauthner che rigenerano solo nelle larve precoci.

Stefanelli e la sua Scuola hanno chiaramente messo in evidenza i processi morfogenetici responsabili della rigenerazione del midollo spinale degli Anfibi urodela, in seguito ad amputazione della coda o ad asportazione di un segmento della regione del tronco (Stefanelli e Capriata, 1943; Stefanelli, 1944; Stefanelli e Cervi, 1946; Stefanelli, 1951, 1952; Marini e Baffoni, 1967; Marini, 1968). Grazie a queste ricerche, è stato possibile identificare i seguenti processi: un processo degenerativo delle fibre nervose ascendenti e delle cellule vicine alla superficie di resezione; un processo migratorio delle cellule indifferenziate, provenienti dallo strato ependimale; un processo moltiplicativo a carico di tali elementi con la formazione di una « ampolla rigenerativa » apicale; un processo differenziativo con neoformazione di neuroni e fibre nervose.

Negli Anfibi anuri il potere rigenerativo del midollo spinale è estremamente limitato nell'adulto (Sgobbo, 1890; Marinesco, 1894; Piatt e Piatt, 1958; Roguski, 1959; Schönheit, 1965); nella larva è senz'altro maggiore, ma sull'entità di tale rigenerazione non vi è accordo completo tra i vari Autori

(*) 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 15 ottobre 1973.

che si sono interessati di questo problema. Lorente De No' (1921), dopo parziale resezione del midollo spinale del tronco in larve di Rana, osservò una estesa rigenerazione di assoni attraverso la regione dell'asportazione; non notò invece alcuna riproduzione di cellule nervose e ritenne che l'unione della sostanza grigia fosse dovuta alla ridistribuzione delle cellule sopravvissute. Hooker (1925), dopo aver completamente tagliato il midollo spinale del tronco di larve di Anuri, osservò, oltre alla rigenerazione di fibre, anche quella di neuroni originatesi dalla migrazione di cellule indifferenziate.

Stefanelli ed allievi (Stefanelli, 1950, 1951; Stefanelli, Thermes e Poddie, 1950; Stefanelli, Thermes e Massida, 1950; Thermes, 1950) hanno dimostrato che nella *Rana esculenta* ed in *Hyla arborea* la rigenerazione del midollo spinale si attua con un processo del tutto simile a quello messo in evidenza nei Tritoni. In particolare, dopo asportazione di un segmento di midollo spinale della coda di *Hyla*, Stefanelli, Thermes e Poddie (1950) hanno osservato che i monconi cefalico e caudale del canale endimale si chiudevano grazie alla migrazione delle cellule endimali e si sviluppavano in piccole ampolle apicali che, unendosi tra loro al quarto giorno, costituivano un tubulino endimale. Se, oltre al midollo, veniva asportato anche un segmento di corda dorsale, si formava una codina soprannumeraria per cui si aveva un ritardo nella fusione delle due ampolle apicali. In seguito a ciò, a carico della parte midollare rimasta isolata da quella cefalica si osservava un processo regressivo dei neuroni differenziati, cosicché il midollo spinale si riduceva ad un sottile tubulino formato da un solo strato di cellule endimali. Thermes (1950) ha seguito l'ulteriore destino di questo tubulino e, pur non essendo riuscita a mettere in evidenza un'attività mitotica nell'epitelio endimale, ha osservato che fra il ventiduesimo ed il ventinovesimo giorno dall'intervento comparivano attorno ad esso nuove fibre e si differenziavano cellule dorsali del tipo di Rohon-Beard e cellule più piccole di tipo motorio. La possibilità di una limitata neoformazione di neuroni a carico di elementi endimali del midollo spinale delle larve degli Anuri, nonché la produzione di nuove fibre nervose, è stata confermata da Stefanelli (1951) in un lavoro conclusivo.

Baffoni (1952), dopo aver eseguito amputazioni ripetute della coda di larve di *Triturus vulgaris meridionalis* e di *Hyla arborea savignyi* allo scopo di saggiare l'effetto dell'attività rigenerativa delle fibre di Mauthner sul pirenoforo, ha potuto vedere che, mentre nella coda rigenerata dei Tritoni la rigenerazione del midollo spinale era totale ad ogni amputazione, nelle larve di *Hyla* il midollo rigenerava, fin dalla prima amputazione, come un semplice tubulino endimale privo di cellule nervose differenziate e di fibre.

Piatt (1955), sulla base di una completa rassegna bibliografica e di sue personali osservazioni sulla rigenerazione del midollo spinale degli Anfibi, conclude che, contrariamente agli Urodeli, i quali in seguito ad amputazione della coda rigenerano completamente il midollo spinale ed i gangli, «... when the tail of larval anurans is amputated a neural axis regenerates but it consists only of a simple epithelial tube without neurons and with very few fibers».

L'impossibilità di una neoformazione di neuroni nella coda rigenerata delle larve degli Anuri è anche sostenuta da Goss (1969) il quale afferma che: «...when the spinal cord itself regenerates, it consists of little more than an endymal tube, devoid of neurons and accompanied by few nerve fibers. This contrasts with the practically complete replacement of urodele spinal cords in regenerating tails. Another difference between anuran and urodele tail regenerates is that tadpoles do not form new spinal ganglia beyond the level of amputation, while urodeles do».

La constatazione che la maggior parte delle conclusioni tratte sulle capacità rigenerative del midollo spinale della coda nelle larve degli Anuri si basano su rigenerati osservati dopo pochi giorni dall'amputazione, ci ha indotto ad intraprendere la presente ricerca per vedere se, lasciando trascorrere un lungo periodo di tempo dall'amputazione della coda, il midollo spinale rigenerato raggiungesse una struttura più complessa di quella di un semplice tubulino endimale. A ciò siamo stati spinti anche dai risultati ottenuti in nostri precedenti lavori sulla rigenerazione dell'encefalo di larve di varie specie di Anuri, lavori che hanno dimostrato una notevole capacità rigenerativa del sistema nervoso centrale degli Anuri anche negli stadi post-embryonali (Filoni, 1964 *a*, 1964 *b*, 1969; Filoni e Gibertini, 1969; Filoni e Margotta, 1970, 1971, 1972), contrariamente a quanto ritenuto fino a poco tempo fa dalla maggior parte degli Autori.

I dati riportati in questa Nota riguardano la rigenerazione del midollo spinale della coda di larve di *Xenopus laevis*, operate ad uno stadio larvale in cui, come risulta dalle nostre precedenti ricerche, il potere rigenerativo del sistema nervoso centrale è molto elevato.

Sono state utilizzate 50 larve di *Xenopus laevis* (Daudin), ottenute in seguito ad ovulazione ed accoppiamento indotti con ormoni gonadotropi («Pregnyl» della Organon) ed operate allo stadio 48 (sec. Nieuwkoop e Faber, 1956) di asportazione del 50% (30 individui) o del 70% (20 individui) della coda e sacrificate tra il 30° ed il 40° giorno dall'operazione, quando le larve avevano raggiunto lo stadio 56-57. La resezione è stata eseguita con un bisturi e le larve operate sono state trasferite successivamente in acqua abbondantemente aerea e nutrite con polvere di ortica bollita. Gli animali operati, così come quelli dei due tipi di controlli (larve normali allo stadio 48 ed allo stadio 56-57), sono stati fissati in liquido di Bouin e tagliati a 10 μ secondo il piano trasversale o sagittale e le sezioni seriate sono state colorate con emalume-eosina, blù di toluidina o impregnate con il metodo all'argento colloidale di Bodian.

Sia nel caso dell'amputazione del 50% che del 70% della coda, la coda delle larve operate e sacrificate a partire dal trentesimo giorno dall'intervento aveva raggiunto la stessa lunghezza delle larve normali pari stadio (stadio 56-57).

All'esame istologico il midollo spinale della coda rigenerata, pur essendo volumetricamente più ridotto rispetto ai controlli, ha una struttura assai simile al normale (Tav. I, figg. 1, 2). Il canale endimale, piuttosto ampio, è circondato, oltre che dall'endimale, anche dal grigio periventricolare che forma un triangolo, la cui base è posta ventralmente. Le mitosi sono localizzate non solo nell'endimale, ma anche, seppur in numero minore, nel grigio periventricolare. (Tav. II, figg. 4, 5). Verso la periferia del grigio periventricolare si osservano numerosi neuroni differenziati e tra questi, nella regione ventrale, i grossi neuroni motori nettamente separati dalla sostanza grigia centrale (Tav. II, fig. 6). Dorsalmente, in corrispondenza della linea mediana, abbiamo riscontrato la presenza di grossi neuroni del tipo di Rohon-Beard con una distribuzione simile a quella normale (Tav. I, fig. 2; Tav. II, fig. 7). La sostanza bianca, quantunque sia meno abbondante di quella dei controlli, ha un volume considerevole (Tav. I, fig. 3); in essa non abbiamo notato la presenza delle fibre di Mauthner.

Ai lati del midollo spinale rigenerato, in prossimità della sua porzione ventrale, laddove nei controlli si trovano i gangli spinali, abbiamo frequentemente constatato l'esistenza di cellule gangliari, ma in numero sempre molto esiguo e variabile da caso a caso (Tav. II, fig. 8).

I presenti risultati dimostrano che, anche se la rigenerazione del midollo spinale della coda dello *Xenopus* allo stato larvale è solo parziale, pur tuttavia, qualora intercorra un notevole intervallo di tempo tra l'operazione e la fissazione, il midollo spinale della coda rigenerata delle larve di *Xenopus* può raggiungere una organizzazione molto complessa, essendo costituito, oltre che dall'endimale, anche da numerosi neuroni e fibre neofornate.

Poiché, come è stato ampiamente dimostrato da Stefanelli e Coll. (Stefanelli e Capriata, 1943; Stefanelli, Thermes e Poddie, 1950), la rigenerazione del midollo spinale degli Anfibi avviene ad opera degli elementi endimali, i risultati da noi ottenuti dimostrano che nelle larve di *Xenopus laevis* la potenzialità dello strato endimale del midollo spinale della coda è molto elevata, poiché i suoi elementi non solo sono in grado di ricostituire un tubolino endimale, ma, analogamente a quanto si verifica negli Anfibi urodela, possono differenziarsi in neuroni.

BIBLIOGRAFIA

- BAFFONI G.M., « Rend. Acc. Naz. Lincei », ser. VIII, 12, 189 (1952).
FILONI S., « Rend. Ist. Sci. Camerino », 5, 111 (1964 a).
FILONI S., « Rend. Acc. Naz. Lincei », ser. VIII, 37, 521 (1964 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., « Arch. Ital. Anat. e Embriol. », 75, 171 (1970).
FILONI S. e MARGOTTA V., « Arch. Biol. », 82, 433 (1971).
FILONI S. e MARGOTTA V., « Rend. Acc. Naz. Lincei », ser. VIII, 62, 228 (1972).
GOSS R. J., *Principles of regeneration*, Academic Press, New York and London, 209 (1969).

- HOOKE D., « J. Comp. Neur. », 38, 315 (1925).
- LORENTE DE NO' R., « Trab. Lab. Invest. biol. Univ. Madr. », 19, 147 (1921).
- MARGOTTA V e FILONI S., « Arch. Biol. », 80, 347 (1969).
- MARINESCO G., « C. Rend. Soc. Biol. », 46, 389 (1894).
- MARINI M., « Riv. Neurobiol. », 14, 16 (1968).
- MARINI M. e BAFFONI G.M., « Rend. Acc. Naz. Lincei », ser. VIII, 42, 943 (1967).
- NIEUWKOOP P.D. e FABER J., *Normal table of Xenopus laevis (Daudin)*, Amsterdam: North Holland Publ. Co. (1956).
- PIATT J., *Regeneration in the central nervous system of Amphibia*, in WINDLE W.F., *Regeneration in the central nervous system*. Charles C. Thomas, Springfield, 20 (1955).
- PIATT J. e PIATT M., « Anat. Rec. », 131, 81 (1958).
- ROGUSKI H., « Fol. Biol. (Kraków) », 7, 129 (1959).
- SCHÖNHEIT B., « Z. Mikr.-Anat. Forsch. », 72, 519 (1965).
- SGOBBO F., « Psichiatria », Napoli, 8, 294 (1890).
- STEFANELLI A., « Boll. Soc. Ital. Biol. Sperim. », 19, 252 (1944).
- STEFANELLI A., « Rend. Acc. Naz. Lincei », ser. VIII, 8, 498 (1950).
- STEFANELLI A., « Boll. Zool. », 18, 279 (1951).
- STEFANELLI A., « Rend. Acc. Naz. Lincei », ser. VIII, 13, 294 (1952).
- STEFANELLI A. e CAPRIATA A., « Ricerche di Morfologia », 20-21, 1 (1943).
- STEFANELLI A. e CERVI M., « Boll. Soc. Ital. Biol. Sperim. », 22, 1 (1946).
- STEFANELLI A., THERMES G. e MASSIDA R., « Rend. Sem. Fac. Sci. Univ. Cagliari », 20, 1 (1950).
- STEFANELLI A., THERMES G. e PODDIE M., « Riv. Biol. », 42, 239 (1950).
- THERMES G., « Rend. Sem. Fac. Sci. Univ. Cagliari », 20, 1 (1950).

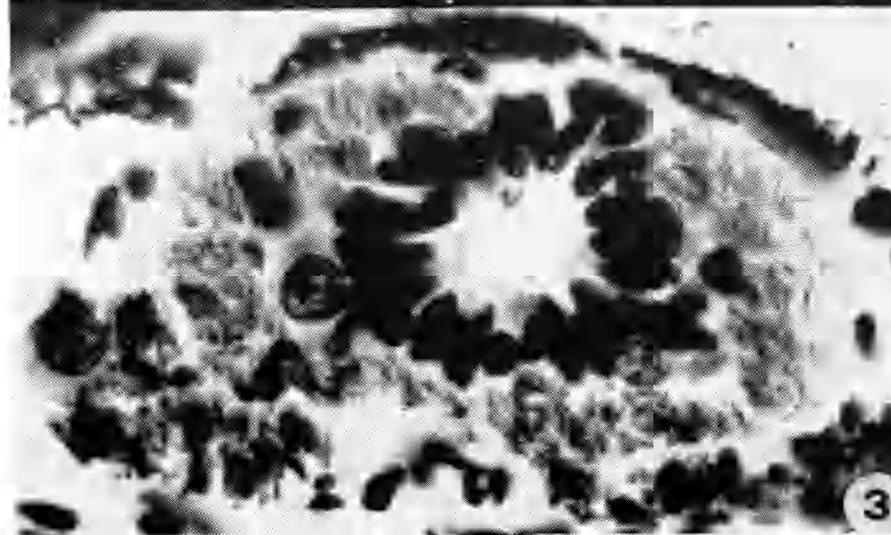
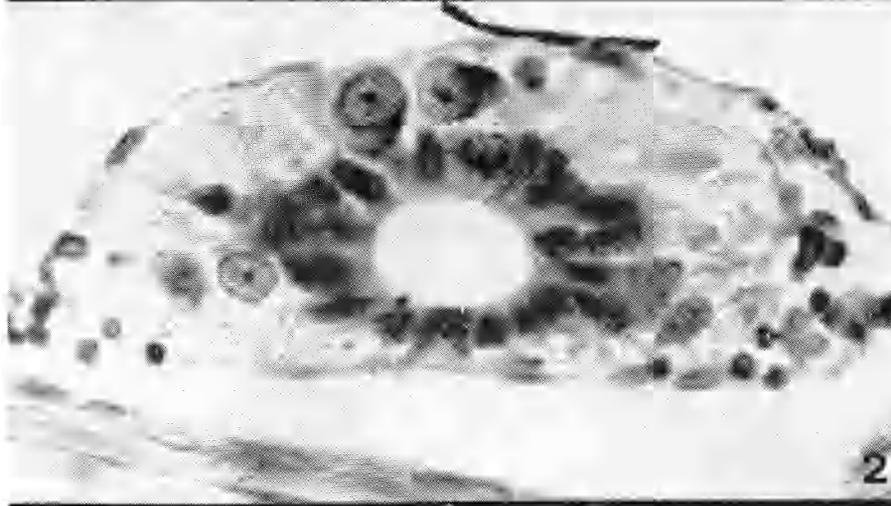
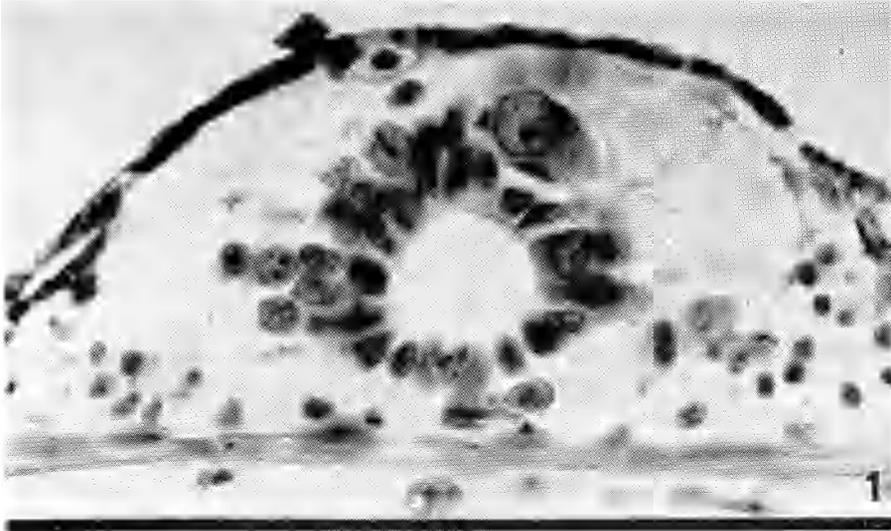
SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE I-II

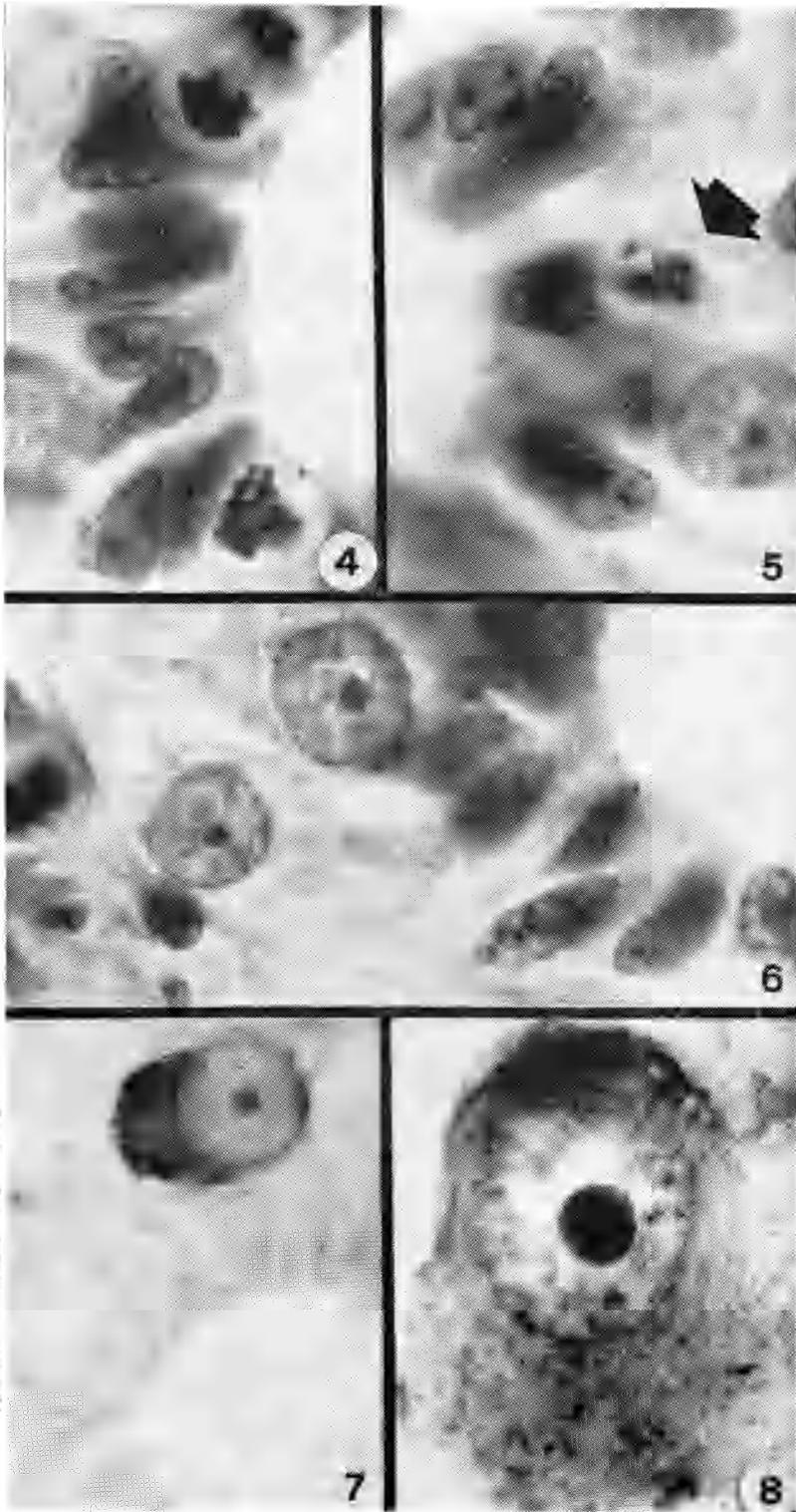
TAVOLA I

- Fig. 1. - Midollo spinale della coda di una larva normale di *Xenopus laevis* allo stadio 56-57 (sec. Nieuwkoop e Faber) ($\times 1000$).
- Fig. 2. - Midollo spinale rigenerato della coda di una larva di *Xenopus laevis*, operata di amputazione del 70% della coda allo stadio 48 (sec. Nieuwkoop e Faber) e sacrificata allo stadio 56-57, dopo 35 giorni dall'operazione ($\times 1000$).
- Fig. 3. - Midollo spinale rigenerato della coda di una larva di *Xenopus laevis*, operata di amputazione del 70% della coda allo stadio 48 (sec. Nieuwkoop e Faber) e sacrificata allo stadio 56-57, dopo 35 giorni dall'operazione. Alla periferia della sostanza grigia si osservano numerosi fasci di fibre ($\times 1000$).

TAVOLA II

- Figg. 4, 5. - Mitosi endpendimali (fig. 4) ed extraependimali (fig. 5, freccia) presenti nel midollo spinale rigenerato della coda di una larva di *Xenopus laevis*, operata di amputazione del 70% della coda allo stadio 48 (sec. Nieuwkoop e Faber) e sacrificata allo stadio 56-57, dopo 35 giorni dall'operazione ($\times 2500$).





- Fig. 6. — Regione ventrale del midollo spinale rigenerato della coda di una larva di *Xenopus laevis*, operata di amputazione del 70% della coda allo stadio 48 (sec. Nieuwkoop e Faber) e sacrificata allo stadio 56-57, dopo 35 giorni dall'operazione. Sono visibili due neuroni motori ($\times 2500$).
- Fig. 7. — Neurone del tipo di Rohon-Beard, presente nel midollo spinale rigenerato della coda di una larva di *Xenopus laevis*, operata di amputazione del 70% della coda allo stadio 48 (sec. Nieuwkoop e Faber) e sacrificata allo stadio 56-57, dopo 35 giorni dall'operazione ($\times 2500$).
- Fig. 8. — Cellula gangliare spinale, situata ai lati del midollo spinale rigenerato della coda di una larva di *Xenopus laevis*, operata di amputazione del 70% della coda allo stadio 48 (sec. Nieuwkoop e Faber) e sacrificata allo stadio 56-57, dopo 35 giorni dall'operazione ($\times 2500$).