

---

ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI  
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

# RENDICONTI

---

SERGIO FILONI, LUIGI BOSCO

## La rigenerazione del midollo spinale della coda in larve di *Xenopus laevis* (Daudin). II) Analisi del processo rigenerativo

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,  
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8*, Vol. **58** (1975), n.1, p. 57–63.

Accademia Nazionale dei Lincei

<[http://www.bdim.eu/item?id=RLINA\\_1975\\_8\\_58\\_1\\_57\\_0](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1975_8_58_1_57_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). II) Analisi del processo rigenerativo* (\*). Nota di SERGIO FILONI e LUIGI BOSCO, presentata (\*\*) dal Socio A. STEFANELLI.

SUMMARY. — 70% of the tail was removed in larvae of *Xenopus laevis* at stage 48 (according to Nieuwkoop and Faber) in order to:

- a) analyze the course of the regeneration process of the spinal cord in the tail;
- b) ascertain the morphogenetic potential of the ependymal cells which replace the spinal cord experimentally removed;
- c) compare the regeneration capacity of this Anuran with that of the Urodela which is already known.

Morphogenetics phenomena noted in the days immediately following the operation are the same as those noted for the Urodela: formation of "ampulla terminalis" by ependymal cells remaining of the spinal cord; active growth of the ampulla and of the stump; gradual differentiation of the more external cells of periventricular grey; new formation of nerve fibers.

At the end of the regeneration process (30 days) the spinal cord of the tail of the larvae of *Xenopus laevis* reaches a complex organization, demonstrating the high potential of the ependymal cells which are capable of differentiating in various neuronal types. The regeneration capacity of the spinal cord of the tail of this Anuran, although inferior to the regeneration capacity of the Urodela, is notably advanced.

#### INTRODUZIONE

In una recente Nota sono stati riportati i dati riguardanti la rigenerazione del midollo spinale caudale di larve di *Xenopus laevis* operate allo stadio 48 (sec. Nieuwkoop e Faber) di parziale asportazione della coda (dal 50 % al 70 % della sua lunghezza) (Filoni, Bava e Margotta, 1973).

Da tale ricerca è emerso che, nelle condizioni sperimentali suddette, il midollo spinale della coda è in grado di rigenerare. Infatti, qualora intercorra un notevole intervallo di tempo (30-40 giorni) tra l'asportazione e la fissazione, il midollo spinale neoformato può raggiungere un alto grado di complessità strutturale. In particolare, il midollo rigenerato, pur essendo costituito da un minor numero di neuroni e di fibre nervose e privo delle fibre di Mauthner, rispetto ai controlli, presenta oltre all'ependima un abbondante grigio periventricolare, alla cui periferia si riscontrano numerosi neuroni altamente differenziati, fra cui i grossi neuroni motori e le cellule dorsali del tipo di Rohon-Beard; anche la sostanza bianca, sebbene meno cospicua rispetto ai controlli, ha un volume considerevole.

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

(\*\*) Nella seduta dell'11 gennaio 1975.

Questi dati sono di particolare interesse in quanto, come risulta dalla nostra indagine bibliografica (per la bibliografia si rimanda alla Nota già citata), gli Autori che hanno precedentemente studiato la rigenerazione del midollo spinale della coda in altre specie di Anuri, hanno constatato un potere rigenerativo molto più modesto di quello da noi evidenziato in *Xenopus laevis*.

In particolare, smentiscono nettamente le conclusioni cui sono giunti Piatt (1955) e più recentemente Goss (1969) che, generalizzando i risultati ottenuti in alcune specie di Anuri, affermano che contrariamente a quanto si verifica nelle larve degli Urodeli, che in seguito ad amputazione della coda rigenerano completamente il midollo spinale e i gangli, le larve degli Anuri non rigenerano che un semplice tubulino endodermico completamente privo di neuroni e con pochissime fibre nervose. Tutto ciò ci ha indotto ad estendere la precedente ricerca, analizzando le fasi del processo rigenerativo del midollo caudale di larve di *Xenopus laevis*.

#### MATERIALE E METODO

Settanta larve di *Xenopus laevis* allo stadio 48 (sec. Nieuwkoop e Faber), ottenute in seguito ad ovulazione ed accoppiamento indotti con ormoni gonadotropi (Pregnyl della Organon), sono state sottoposte ad amputazione del 70 % della coda. Gli individui sopravvissuti sono stati sacrificati dopo 4 gg. (5 casi)-8 gg. (10 casi)-12 gg. (10 casi)-16 gg. (10 casi)-20 gg. (10 casi)-25 gg. (10 casi)-30 gg. (10 casi), dall'operazione.

Dopo l'intervento, le larve sono state trasferite in acqua abbondantemente aerata, alla temperatura di 22-24 °C, e nutrite con polvere di ortica bollita. Gli animali operati, come quelli di controllo (larve normali pari stadio rispetto a quelle operate), sono stati fissati in liquido di Bouin e tagliati a 7-10  $\mu$  di spessore secondo il piano trasversale. Le sezioni seriate sono state colorate con emallume-eosina, blu di toluidina o impregnate con il metodo all'argento colloidale di Bodian.

#### DESCRIZIONE DEI RISULTATI

##### *Dopo 4 giorni dall'operazione.*

Nel blastema rigenerativo della coda, si osserva, al di sopra delle cellule cordali in attiva proliferazione, una dilatazione ampollare del lume del canale endodermico, delimitata da una parete monostratificata (« ampolla terminale » di Stefanelli) (Tav. I, fig. 1; Tav. II, fig. 9).

Il conteggio delle mitosi presenti sia nell'ampolla apicale che nel moncone del midollo spinale residuo, ha rivelato che l'attività mitotica è molto più notevole nella regione del midollo spinale immediatamente prossima alla superficie di taglio (300  $\mu$  a monte), che nell'ampolla apicale neoformata.

Nel midollo spinale residuo, le mitosi sono soprattutto localizzate nello strato ependimale; piuttosto rare sono le mitosi extraventricolari. A questo stadio del processo rigenerativo, le fibre nervose rigeneranti non hanno ancora raggiunto l'ampolla apicale.

*Dopo 8 giorni dall'operazione.*

A questo stadio, l'ampolla apicale oltre ad essersi estesa considerevolmente, si è anche notevolmente ispessita e, di conseguenza, presenta un lume molto più ridotto rispetto al quarto giorno (Tav. I, fig. 2). Tuttavia le cellule che la delimitano sono ancora indifferenziate come è rilevabile dall'aspetto del loro nucleo molto allungato, con asse maggiore disposto perpendicolarmente rispetto alla cavità ventricolare e con cromatina uniformemente diffusa nel karioplasma (Tav. II, fig. 11). Dall'esame delle mitosi, è risultato che mentre l'attività mitotica del midollo residuo ( $300\mu$  a monte della zona di amputazione) si mantiene sui valori prossimi a quelli che si riscontrano al 4° giorno, l'attività mitotica delle cellule dell'ampolla apicale è notevolmente aumentata (Tav. II, fig. 10).

A questo stadio, l'ampolla apicale non è ancora circondata da un mantello di fibre neoformate.

*Dopo 12 giorni dall'operazione.*

A questo stadio, il midollino neoformato, pur avendo un volume pressoché uguale rispetto all'8° giorno post-operatorio, presenta un'organizzazione strutturale più complessa. Nella regione più periferica del grigio periventricolare, inizia il processo di differenziamento istologico. Gli elementi neurali in via di differenziamento si distinguono nettamente da quelli ancora indifferenziati poiché hanno un nucleo globoso, con cromatina non uniformemente distribuita nel karioplasma ma in gran parte addensata e addossata alla membrana nucleare e al nucleolo (Tav. I, fig. 3; Tav. II, fig. 12). Dal conteggio delle mitosi, è risultato che, mentre a livello del moncone del midollo residuo l'attività mitotica è nettamente inferiore a quella riscontrata dopo 4-8 giorni dalla operazione, a livello del midollo neoformato il numero delle mitosi si mantiene sui valori riscontrati all'8° giorno. In corrispondenza della parte più cefalica del midollino neoformato, si osservano alcune fibre rigenerate, distribuite all'esterno del grigio periventricolare.

*Dopo 16 giorni dall'operazione.*

A questo stadio, mentre l'attività mitotica sia del midollo spinale residuo che di quello rigenerato si avvicina ai valori dei controlli, si ha una rapida evoluzione del processo di differenziamento, iniziato al 12° giorno post-operatorio, degli elementi più esterni del grigio periventricolare. Infatti il numero delle cellule con nucleo voluminoso, rotondeggiante, con cromatina addossata contro la parete nucleare e intorno al nucleolo, è molto superiore rispetto al 12° giorno (Tav. I, fig. 4; Tav. II, fig. 13); queste cellule in via di differenziamento si riscontrano soprattutto in corrispondenza della regione dorso-

mediana e della regione ventro-laterale del midollo neoformato. Esse sono nettamente separate dal grigio periventricolare che si è notevolmente ispessito ed ha assunto una disposizione triangolare, a base ventrale, intorno al canale ependimale il quale, ora, ha un diametro solo leggermente superiore a quello dei controlli.

A questo stadio, le fibre rigenerate costituiscono un'abbondante sostanza bianca periferica.

*Dopo 20 giorni dall'operazione.*

Il midollo spinale neoformato non differisce sostanzialmente rispetto a quello osservato al 16° giorno post-operatorio (Tav. I, fig. 5; Tav. II, fig. 14). Lateralmente al midollo spinale neoformato, in corrispondenza della sua parte ventrale, abbiamo osservato, sporadicamente, alcune cellule di tipo gangliare in via di differenziamento (Tav. I, fig. 5).

*Dopo 25 giorni dall'operazione.*

A questo stadio, ai lati del midollino in rigenerazione, ormai costituito da abbondante sostanza bianca e, oltre che dall'ependima e dal grigio periventricolare, anche da numerosi neuroni in via di differenziamento (Tav. I, fig. 6; Tav. II, fig. 16), i rari elementi gangliari neoformati hanno ormai completato il loro differenziamento (Tav. II, fig. 15).

*Dopo 30 giorni dall'operazione.*

A questo stadio, il midollo rigenerato, pur avendo un volume inferiore a quello dei controlli, presenta una complessità strutturale molto notevole (Tav. I, figg. 7, 8). Nella sostanza grigia si osservano numerosi neuroni completamente differenziati, come è dimostrato dalla presenza nel loro citoplasma di abbondante sostanza tigroide e di neurofibrille. Dorsalmente, in posizione mediana, sono chiaramente distinguibili i neuroni giganti del tipo Rohon-Beard, e ventralmente, in posizione laterale, i grossi motoneuroni (Tav. II, figg. 17, 18). Anche la sostanza bianca ha raggiunto un volume considerevole e sono visibili numerosi fasci di fibre neoformate (Tav. I, fig. 8); tuttavia le fibre di Mauthner sono assenti. Frequentemente ai lati del midollo spinale rigenerato, si osservano cellule gangliari neoformate. Tuttavia, queste sono isolate o in numero molto esiguo per cui non costituiscono dei veri gangli.

## DISCUSSIONE

I dati ottenuti in questa ricerca, permettendo di ricostruire le varie fasi che hanno portato alla restituzione del midollo spinale della coda di larve di *Xenopus laevis* allo stadio 48 (sec. Nieuwkoop e Faber), consentono di chiarire quale sia l'entità del potere rigenerativo del midollo spinale di questo Anuro e di stabilire con quali processi morfogenetici si realizzi la rigenerazione stessa. Come per primo ha dimostrato Stefanelli e la sua scuola (Ste-

fanelli, 1950; Stefanelli, Thermes e Poddie, 1950), la prima fase del processo rigenerativo del midollo spinale è caratterizzata dalla formazione di una dilatazione ampollare (« ampolla terminale » di Stefanelli) che si forma per attiva migrazione degli elementi provenienti dallo strato ependimale del midollo del moncone.

Nelle larve di *Xenopus*, operate allo stadio 48, la prima formazione di una ampolla apicale si realizza al 4° giorno post-operatorio. A questo stadio l'attività mitotica è molto accentuata nel segmento di midollo spinale immediatamente prossimo al blastema rigenerativo della coda, mentre è esigua a livello dell'ampolla. Nei giorni successivi, il numero delle mitosi presenti nella ampolla aumenta rapidamente, tanto che all'ottavo giorno post-operatorio i valori di densità mitotica raggiungono quelli del midollo del moncone, per superarli al dodicesimo giorno.

In seguito all'attiva moltiplicazione cellulare e all'intensa migrazione di cellule dal moncone residuo, l'ampolla apicale da monostratificata diviene pluristratificata. A questa fase, caratterizzata da una intensa attività mitotica e che potremmo definire fase proliferativa, segue la fase di graduale differenziamento degli elementi più esterni del grigio periventricolare. Tale processo inizia al dodicesimo giorno post-operatorio, in concomitanza con la comparsa delle fibre nervose rigenerate provenienti dal moncone, ed è riscontrabile dapprima a livello del nucleo, che da ellissoidale e con cromatina uniformemente distribuita nel carioplasma diviene globoso con cromatina addensata e addossata alla membrana nucleare e al nucleolo, e successivamente interessa anche il citoplasma in cui compaiono la sostanza tigroide e le neurofibrille. Questo processo è citologicamente evidenziabile dal dodicesimo al trentesimo giorno post-operatorio.

L'analisi morfologica, confermando i risultati già ottenuti (Filoni, Bava e Margotta, 1973), ha rivelato che alla fine del processo rigenerativo il midollo spinale neoformato, pur avendo un volume inferiore a quello dei controlli, presenta una struttura molto complessa poiché risulta costituito da numerosi neuroni fra cui, nettamente distinguibili, i motoneuroni e i neuroni del tipo di Rohon-Beard. Le fibre di Mauthner sono invece assenti. Particolarmente interessante è il risultato che dimostra la possibilità di rigenerazione di elementi gangliari, anche se allo stato attuale della ricerca non siamo in grado di precisarne l'origine. Va sottolineato però, che non si può parlare di rigenerazione di un'ordinata struttura gangliare poiché gli elementi osservati sono sempre in numero molto modesto.

Confrontando i risultati raggiunti nella presente ricerca con quelli ottenuti nella rigenerazione del midollo spinale della coda in diverse specie di Urodeli (Stefanelli e Capriata, 1943; Kiortsis, Uehlinger, Droin, 1959; Winkelmann, 1960, 1965; Schonheit e Rehmer, 1967, 1968); Egar e Singer, 1972), che hanno dimostrato una rigenerazione totale, risulta che nello *Xenopus* il processo rigenerativo si attua con le stesse modalità morfogenetiche, ricalcando la tipica successione dei processi descritti negli Urodeli.

In particolare, così come si verifica negli Urodeli, anche in *Xenopus* la rigenerazione del midollo spinale della coda avviene ad opera degli elementi ependimali del moncone che vanno incontro ad un graduale e plurimo processo di differenziamento manifestando in tal modo la loro elevata potenzialità a dare non solo cellule ependimali ma anche neuroni, fra cui neuroni specializzati, quali quelli di Rohon-Beard.

### BIBLIOGRAFIA

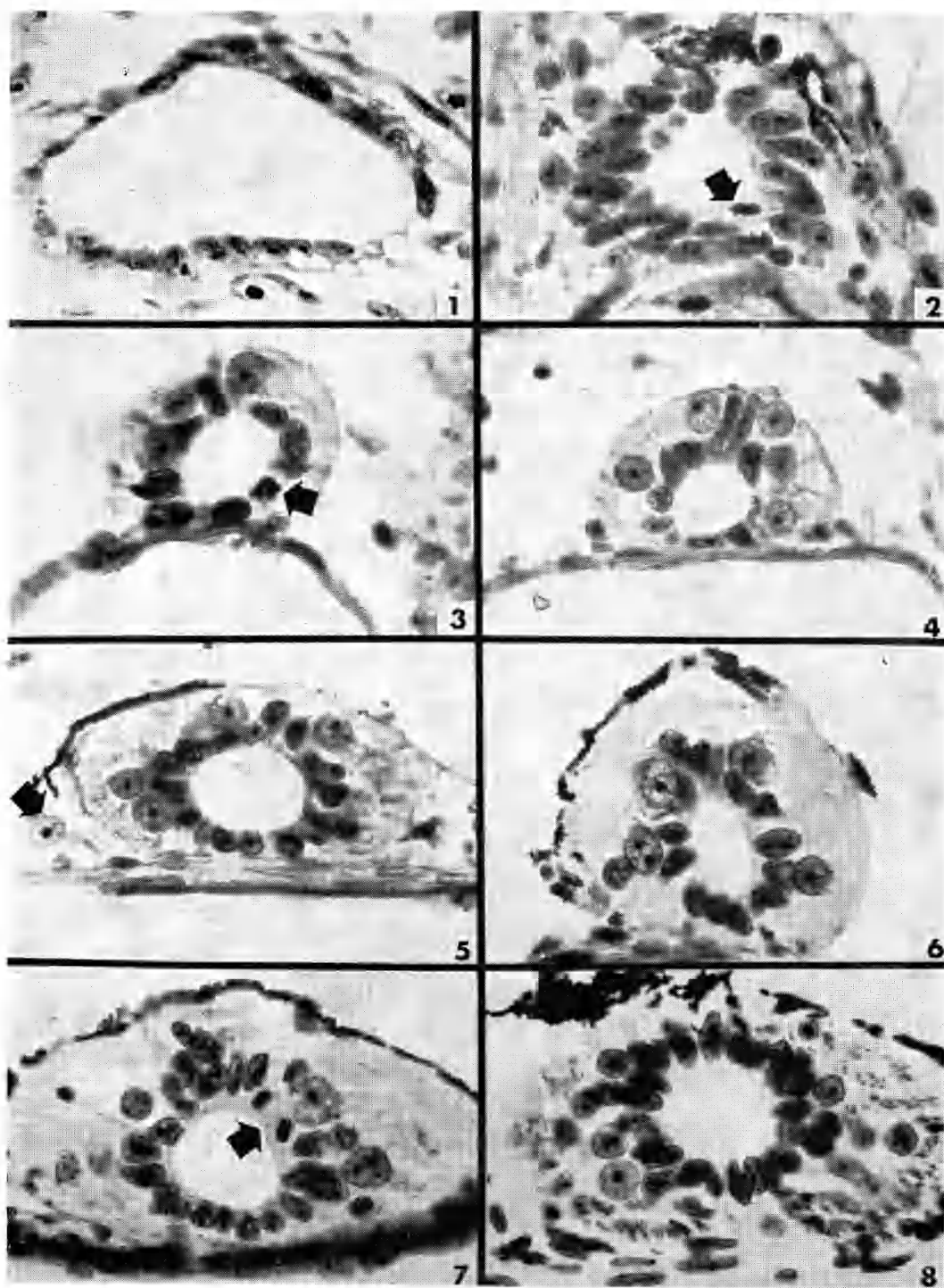
- EGAR M. e SINGER M. (1972) - « *Exp. Neurol.* », 37, 422.  
 FILONI S., BAVA C. e MARGOTTA V. (1973) - « *Rend. Acc. Naz. Lincei* », ser. VIII, 55, 586.  
 GOSS R. J. (1969) - *Principles of regeneration*, Academic Press, New York and London, 209.  
 KIORTSIS V., UEHLINGER V. e DROIN A. (1959) - « *Experientia* », 15, 311.  
 NIEUWKOOP P. D. e FABER J. (1956) - *Normal table of Xenopus laevis (Daudin)*. Amsterdam North Holland Publ. Co.  
 PIATT J. (1955) - *Regeneration in the central nervous system of Amphibia*, in Windle W. F., *Regeneration in the central nervous system*. Charles C. Thomas, Springfield, 20.  
 SCHONHEIT B. e REHMER H. (1967) - « *Z. Mikr. Anat. Forsch.* », 77, 453.  
 SCHONHEIT B. e REHMER H. (1968) - « *Z. Mikr. Anat. Forsch.* », 79, 389.  
 STEFANELLI A. e CAPRIATA A. (1943) - « *Ricerche di Morfologia* », 20-21, 1.  
 STEFANELLI A., THERMES G. e PODDIE M. (1950) - « *Riv. Biol.* », 42, 239.  
 STEFANELLI A. (1950) - « *Rend. Acc. Naz. Lincei* », ser. VIII, 8, 498.  
 WINKELMANN E. (1960) - « *Z. Mikr. Anat. Forsch.* », 66, 147.  
 WINKELMANN E. (1965) - « *Z. Mikr. Anat. Forsch.* », 72, 169.

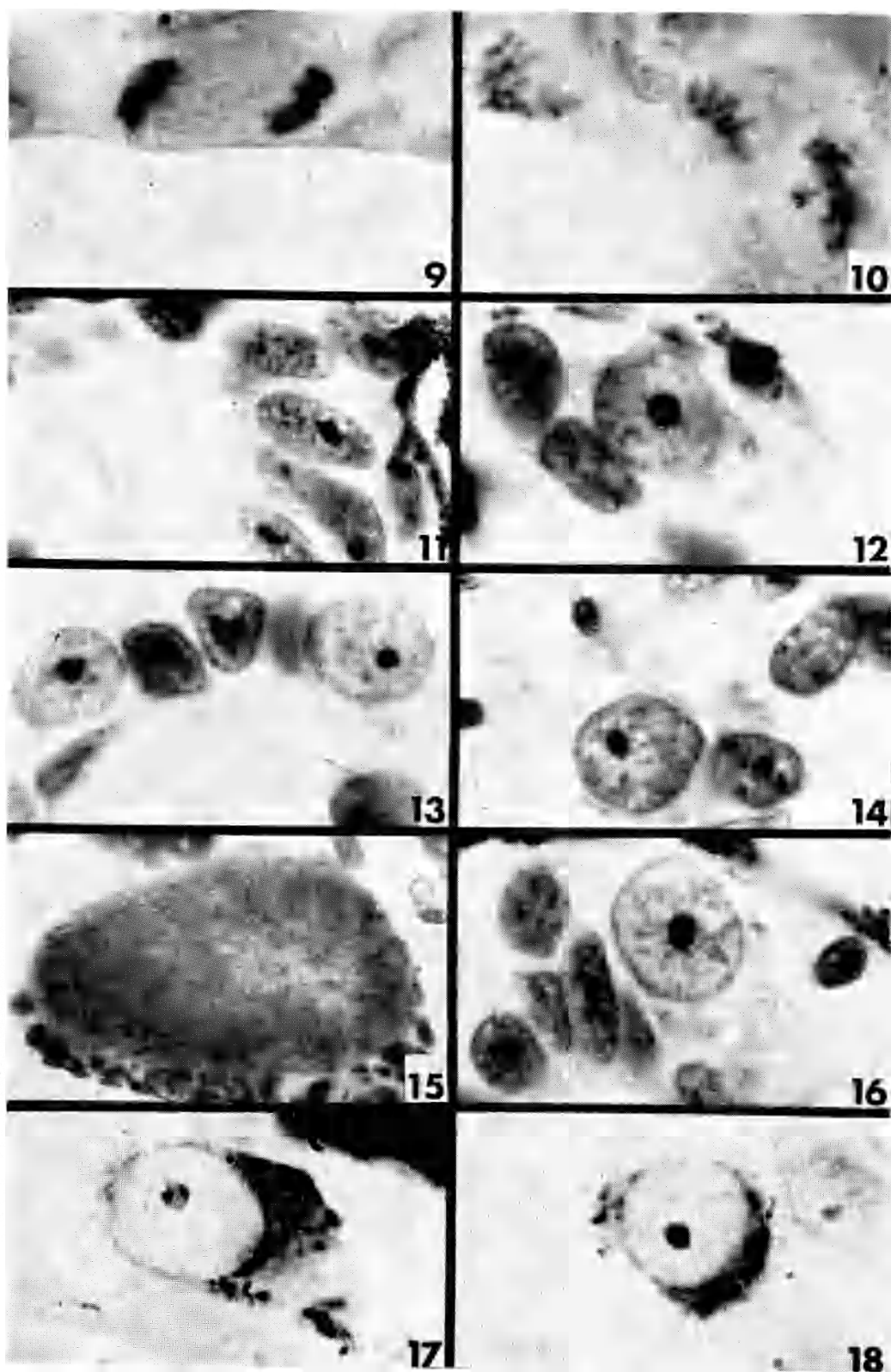
### SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE I-II

#### TAVOLA I

- Fig. 1. - Dopo 4 giorni dall'amputazione della coda: sezione trasversale al livello dell'ampolla apicale (1100×).  
 Fig. 2. - Dopo 8 giorni dall'amputazione della coda: la parete dell'ampolla è divenuta pluristratificata. Mitosi (freccia) (1100×).  
 Fig. 3. - Dopo 12 giorni dall'amputazione della coda: in corrispondenza del grigio periventricolare sono visibili due neuroni in via di differenziamento. Mitosi (freccia) (1100×).  
 Fig. 4. - Dopo 16 giorni dall'amputazione della coda: il numero di elementi in via di differenziamento con nucleo globoso e cromatina non uniformemente distribuita nel carioplasma, è superiore rispetto al 12° giorno postoperatorio (1100×).  
 Fig. 5. - Dopo 20 giorni dall'amputazione della coda: lateralmente al midollo spinale neoformato è visibile una cellula gangliare in via di differenziamento (freccia) (1100×).  
 Fig. 6. - Dopo 25 giorni dall'amputazione della coda: sono visibili numerosi neuroni in via di differenziamento (1100×).  
 Fig. 7-8. - Dopo 30 giorni dall'operazione: il volume del midollo spinale neoformato ha raggiunto un volume considerevole e risulta costituito da numerosi neuroni e fibre neoformate. Mitosi (freccia) (1100×).







## TAVOLA II

- Fig. 9. — Dopo 4 giorni dall'amputazione della coda: mitosi al livello della ampolla apicale (2800×).
- Fig. 10. — Dopo 8 giorni dall'amputazione della coda: mitosi al livello del midollo in rigenerazione (2800×).
- Fig. 11. — Dopo 8 giorni dall'amputazione della coda: gli elementi neurali presenti nel midollo in rigenerazione sono ellissoidali con cromatina uniformemente distribuita nel carioplasma (2000×).
- Fig. 12. — Dopo 12 giorni dall'amputazione della coda: nel grigio periventricolare è visibile un elemento neurale con nucleo globoso (2500×).
- Figg. 13-14. — Dopo 16 giorni dall'amputazione (fig. 13) e dopo 20 gg. (fig. 14): sono visibili neuroni in via di differenziamento presenti nella parte dorsale (fig. 13) e ventrale (fig. 14) del midollo in rigenerazione (2500×).
- Figg. 15-16. — Dopo 25 giorni dall'operazione: fig. 15, citoplasma di una cellula gangliare neoformata. Fig. 16, nucleo di un neurone del tipo di Rohon-Beard (2500×).
- Figg. 17-18. — Dopo 30 giorni dall'operazione: fig. 17, neurone del tipo Rohon-Beard completamente differenziato. Fig. 18, motoneurone (2500×).