
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

LUIGI BOSCO, SERGIO FILONI, VITTORIO BORGHESI

**La rigenerazione del midollo spinale della coda di
larve di *Xenopus laevis* in seguito ad amputazioni
ripetute**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 63 (1977), n.1-2, p.
113–119.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1977_8_63_1-2_113_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 di larve di Xenopus laevis in seguito ad amputazioni ripetute.* Nota (*) di LUIGI BOSCO, SERGIO FILONI e VITTORIO BORGHESI, presentata dal Socio A. STEFANELLI.

SUMMARY. — In the present work, tadpoles of *Xenopus laevis* were submitted to successive removal of 70% of the tail. The structure of the regenerated spinal cord and the evolution of the regenerative process was compared with those of tadpoles submitted to one amputation.

The results obtained demonstrated that:

- 1) Either after one amputation or after two or three amputations, the regenerative process exhibits the same phases:
 - a) migratory phase, b) multiplicative phase, c) differentiative phase.
- 2) Either after one amputation or after two or three amputations, the newformed spinal cord is constituted not only by the ependymal layer but also by neurons and fibers.
- 3) The spinal cord regenerated after two or three amputations has a structure less complex than that of the spinal cord regenerated after one amputation.

INTRODUZIONE

Fino a qualche tempo fa si riteneva che il midollo spinale della coda delle larve degli Anuri fosse dotato di modestissime capacità rigenerative. Infatti la maggioranza degli Autori che si sono interessati del problema era concorde nell'ammettere che le larve degli Anuri rigenerassero un midollo spinale codale costituito esclusivamente da ependima, privo di neuroni e di fibre nervose (vedi Piatt, 1955; Goss, 1969).

Tuttavia Stefanelli e Collaboratori, in larve di *Hyla arborea* e *Rana Esculentata* sottoposte all'amputazione della coda o alla asportazione di un segmento di midollo spinale caudale, oltre ad aver esaminato le prime fasi del processo rigenerativo (Stefanelli, Thermes e Poddie, 1950), misero in evidenza la potenzialità dello strato ependimale del midollo spinale caudale di neoformare, seppure in numero limitato, neuroni e fibre nervose (Thermes, 1950; Stefanelli, 1951).

Stefanelli (1951) e Baffoni (1952), dopo aver eseguito amputazioni ripetute della coda di larve di *Triturus vulgaris meridionalis* e di *Hyla arborea savignyi* a stadi larvali precoci, hanno osservato che mentre nell'Urodelo il midollo spinale rigenerava completamente anche dopo la quinta amputazione, in *Hyla* già dalla prima amputazione il midollo caudale rigenerava, almeno nei primi dieci giorni, come un semplice tubulino ependimale privo di neuroni e di fibre nervose. Solo verso la fine della vita larvale era possibile riscontrare

(*) Pervenuta all'Accademia il 2 agosto 1977.

nel midollo spinale rigenerato dell'*Hyla* uno scarso numero di neuroni e fibre nervose, ma ciò solo dopo la prima amputazione, mai dopo le amputazioni successive.

Recenti studi da noi effettuati in larve di *Xenopus laevis* sottoposte alla amputazione del 70% della coda hanno dimostrato che in questa specie la capacità rigenerativa del midollo spinale è elevata in quanto il midollo neofornato raggiunge una struttura che, pur non essendo del tutto sovrappo- nibile a quella dei controlli, è caratterizzata da numerosi neuroni e fibre neofor- mate (Filoni, Bava, Margotta, 1974; Filoni e Bosco 1975).

Nella presente ricerca abbiamo ritenuto che fosse interessante saggiare ulteriormente il potere rigenerativo del midollo spinale caudale di questa specie praticando amputazioni ripetute della coda ed esaminando l'evoluzione del processo rigenerativo successivo ad ogni amputazione dopo un considere- vole intervallo di tempo dall'operazione.

MATERIALE E METODO

La presente ricerca è stata compiuta su larve di *Xenopus laevis* ottenute in seguito ad ovulazione ed accoppiamento indotti con ormoni gonadotropi (Pregnyl della Organon). Sono stati allestiti tre lotti di esperienze (vedi Tabella).

TABELLA

Lotto	Grup- po	N. amp.	Intervallo in gg. fra le amp.	Stadio alla amputazione			N. fissati dopo giorni dall'ultima amputazione						
				I	II	III	4	8	12	16	20	30	Totale
I	—	1	—	48	—	—	5	5	5	5	5	10	35
II	A	2	20	48	50	—	5	5	5	5	5	10	35
	B	2	20	48	54	—	5	—	5	—	5	5	20
III	A	3	20	48	50	52	5	5	5	5	5	10	35
	B	3	20	48	54	55	5	—	5	—	5	5	20

Lotto I: costituito da larve sottoposte ad una sola amputazione del 70% della coda allo stadio 48 (sec. Nieuwkopp e Faber, 1956) allevate in acqua e sacrificate dopo 4-8-12-16-20-30 giorni dall'operazione.

Lotto II: costituito da larve sottoposte a due amputazioni successive ad un intervallo di 20 giorni l'una dall'altra. La prima amputazione, eseguita allo stadio 48, consisteva nell'asportazione del 70% della coda, la seconda amputazione consisteva nell'asportazione della parte rigenerata.

Questo lotto, per quanto concerne lo stadio larvale al quale è stata eseguita la seconda amputazione, non è un lotto di esperienze omogeneo poiché dopo la prima amputazione le larve operate non si sviluppavano tutte con la stessa velocità e raggiungevano, al momento dell'intervento successivo, stadi larvali diversi. Pertanto, nell'ambito di tale lotto sono stati distinti due differenti gruppi:

Gruppo A: costituito da larve sottoposte alla prima amputazione allo stadio 48, alla seconda amputazione allo stadio 50 e allevate in acqua.

Gruppo B: costituito da larve sottoposte alla prima amputazione allo stadio 48, alla seconda amputazione allo stadio 54 e allevate in acqua.

Le larve dei due gruppi sono state sacrificate a tempi scalari dalla seconda amputazione (vedi Tabella).

Lotto III: costituito da larve sottoposte a tre amputazioni successive ad un intervallo di venti giorni. La prima amputazione, eseguita allo stadio 48, consisteva nell'asportazione del 70% della coda, la seconda e la terza amputazione consistevano nell'asportazione della parte rigenerata.

Anche nell'ambito di tale lotto, sono stati distinti due differenti gruppi:

Gruppo A: costituito da larve sottoposte alla prima amputazione allo stadio 48; alla seconda amputazione allo stadio 50; alla terza amputazione allo stadio 52.

Gruppo B: costituito da larve sottoposte alla prima amputazione allo stadio 48; alla seconda amputazione allo stadio 54; alla terza amputazione allo stadio 55.

Mentre gli individui del gruppo A sono stati allevati in acqua, gli individui del gruppo B, allevati in acqua fino alla seconda amputazione, dopo la terza amputazione sono stati trasferiti in una soluzione di PTU (4 (6) Propyl-2-tiouracile) allo 0,01% che veniva rinnovata ogni tre giorni.

Il trattamento con PTU è stato effettuato allo scopo di inibire la metamorfosi degli individui operati in modo da poter seguire il processo rigenerativo del midollo spinale della coda per un tempo sufficientemente lungo.

Le larve dei due gruppi sono state sacrificate a tempi scalari dalla terza amputazione (vedi Tabella).

Le larve dei tre lotti sono state allevate alla temperatura di 22°-24 °C.

Tutte le fissazioni sono state eseguite in liquido di Bouin.

Le sezioni trasversali seriate di 7-10 μ di spessore, sono state colorate con emallume-eosina, blu di toluidina o impregnate con il metodo all'argento colloidale di Bodian.

DESCRIZIONE DEI RISULTATI

L'esame dell'evoluzione del processo rigenerativo del midollo spinale della coda nei giorni successivi ad ogni amputazione ha rivelato che sia dopo una sola amputazione sia dopo due o tre amputazioni, la rigenerazione del

midollo spinale segue la stessa successione di fasi che si realizzano in tempi fondamentalmente corrispondenti, tenuto conto della variabilità individuale.

La prima fase, che si attua al quarto giorno post-operatorio, è caratterizzata dalla migrazione di elementi dello strato ependimale del moncone che si organizzano a costituire una dilatazione ampollare (Tav. I, fig. 1).

Dopo otto giorni dall'operazione, grazie alla notevole attività mitotica delle cellule della parete ampollare, il midollino in rigenerazione, oltre ad accrescersi in lunghezza, aumenta in spessore e, di conseguenza, il lume dell'ampolla ependimale neoformata diviene meno ampio rispetto al quarto giorno (Tav. I, fig. 2).

Il restringimento del lume del canale ependimale e l'ispessimento della parete del midollino in rigenerazione diviene sempre più notevole man mano che si procede dall'estremità apicale verso la base del rigenerato. A questo livello si osservano le prime fibre nervose provenienti dalla regione del moncone.

Fra l'ottavo e il dodicesimo giorno, inizia il processo di differenziamento degli elementi neurali del midollo in rigenerazione e alcune delle cellule che nei giorni precedenti avevano il tipico aspetto di elementi neurali indifferenziati con nucleo allungato e con cromatina uniformemente distribuita nella cariolina, appaiono con nucleo globoso e cromatina addensata intorno alla membrana nucleare e al nucleo (Tav. I, fig. 3). Tali elementi, che occupano una posizione periferica rispetto alle altre cellule, sono in numero limitato all'estremo apicale, ma divengono via via più numerosi man mano che si procede verso la base. In questa regione del midollo rigenerato, nel citoplasma di alcuni degli elementi neurali in via di differenziamento è possibile rilevare l'iniziale formazione della sostanza di Nissl; tali elementi sono situati nella regione latero-ventrale del midollo neoformato (Tav. II, fig. 1). Nella zona più esterna del midollo, si osservano alcune fibre neoformate che a livello della base della coda rigenerata vanno costituendo la sostanza bianca.

Dopo 16-20 giorni, il midollino neoformato ha raggiunto un volume considerevole e ciò per l'aumento della sostanza grigia e soprattutto della sostanza bianca (Tav. I, figg. 4-5). All'estremo del grigio periventricolare si osservano numerosi elementi cellulari in via di differenziamento, situati sia nella regione ventrale che dorsale (Tav. II, figg. 2-3-4); il metodo di Nissl ha rivelato in un numero notevole di tali elementi la presenza di sostanza tigroide (Tav. II, fig. 2).

Al ventesimo giorno postoperatorio, in corrispondenza della linea mediana della regione dorsale si osservano alcune cellule interpretabili, per posizione, come neuroni di Rohon-Beard in via di differenziamento (Tav. II, fig. 4).

A questo stadio del processo rigenerativo, la sostanza bianca è abbondante e numerose fibre neoformate sono visibili anche verso la parte distale del midollo.

Per quanto concerne la struttura del rigenerato alla fine dell'esperimento, i risultati ottenuti, desunti dal confronto degli individui che avevano subito una sola amputazione (Lotto I) con quelli che avevano subito 2 o 3 ampu-

tazioni successive (rispettivamente Lotto II e III), hanno dimostrato che in tutte e tre i lotti di esperienze il midollo neoformato risulta costituito oltre che dall'ependima anche da neuroni e fibre rigenerate (Tav. I, figg. 6-7-8). Tuttavia, mentre nel midollo spinale rigenerato dopo una sola amputazione, fra i neuroni neoformati sono identificabili oltre ai neuroni motori ventrali anche alcuni neuroni dorsali di Rohon-Beard (Tav. II, fig. 6) dopo 2 o 3 amputazioni si osservano neuroni ventrali motori e neuroni dorsali (meno numerosi rispetto al Lotto I) ma non tipici neuroni di Rohon-Beard. Infatti i neuroni dorsali che occupano la posizione tipica dei neuroni di Rohon-Beard non raggiungono le notevoli caratteristiche dimensioni di tali elementi.

Nei tre lotti abbiamo osservato, seppure sporadicamente e in prossimità del moncone, alcuni neuroni gangliari situati ai lati del midollo neoformato (Tav. I, figg. 5-6; Tav. II, fig. 5); tuttavia nei midolli dei lotti II e III il numero di tali elementi è estremamente limitato (una o poche unità). La presenza di neuroni e numerose fibre neoformate nel midollo rigenerato dopo tre amputazioni è riscontrabile anche quando la seconda e la terza amputazione vengono eseguite in stadi tardivi (Lotto III, Gruppo B) (Tav. I, fig. 7).

DISCUSSIONE

I dati ottenuti in questa ricerca mettono in evidenza la notevole entità della capacità rigenerativa del midollo spinale della coda di larve di *Xenopus laevis*, poiché da essi risulta come in questa specie il midollo caudale sia in grado di neoformare neuroni e fibre nervose non solo dopo una amputazione della coda, ma anche in seguito ad amputazioni successive.

L'analisi del processo rigenerativo ha rivelato che dopo la seconda e la terza amputazione si rinnovano tutte le fasi caratteristiche del processo rigenerativo che segue ad una sola amputazione. In particolare tale studio ha dimostrato che, dopo ciascuna amputazione, alla fase migratoria degli elementi mobilitati dalla regione endimale del moncone, alla fase moltiplicativa segue la fase di differenziamento a carico di elementi indifferenziati del grigio periventricolare. Il notevole potere rigenerativo del midollo caudale delle larve di *Xenopus laevis* è dimostrato anche dai dati ottenuti dall'esame dei midolli rigenerati degli individui del gruppo B del Lotto III da cui risulta la possibilità di neoformazione di neuroni e fibre nervose anche quando le amputazioni successive alla prima siano eseguite a stadi larvali tardivi. Tale risultato non è attribuibile ad una influenza esercitata dal trattamento con PTU, necessario per inibire le trasformazioni metamorfiche delle larve operate, poiché recenti dati da noi ottenuti e di prossima pubblicazione, sull'effetto del PTU sulla rigenerazione del mesencefalo e del midollo spinale caudale hanno dimostrato che questa sostanza non esercita un effetto diretto sugli elementi responsabili del processo rigenerativo a tali livelli del neurasse. D'altra parte, l'analisi istologica del midollo caudale neoformato, eseguita alla fine della fase di differenziamento (trentesimo giorno postoperatorio), ha rivelato che

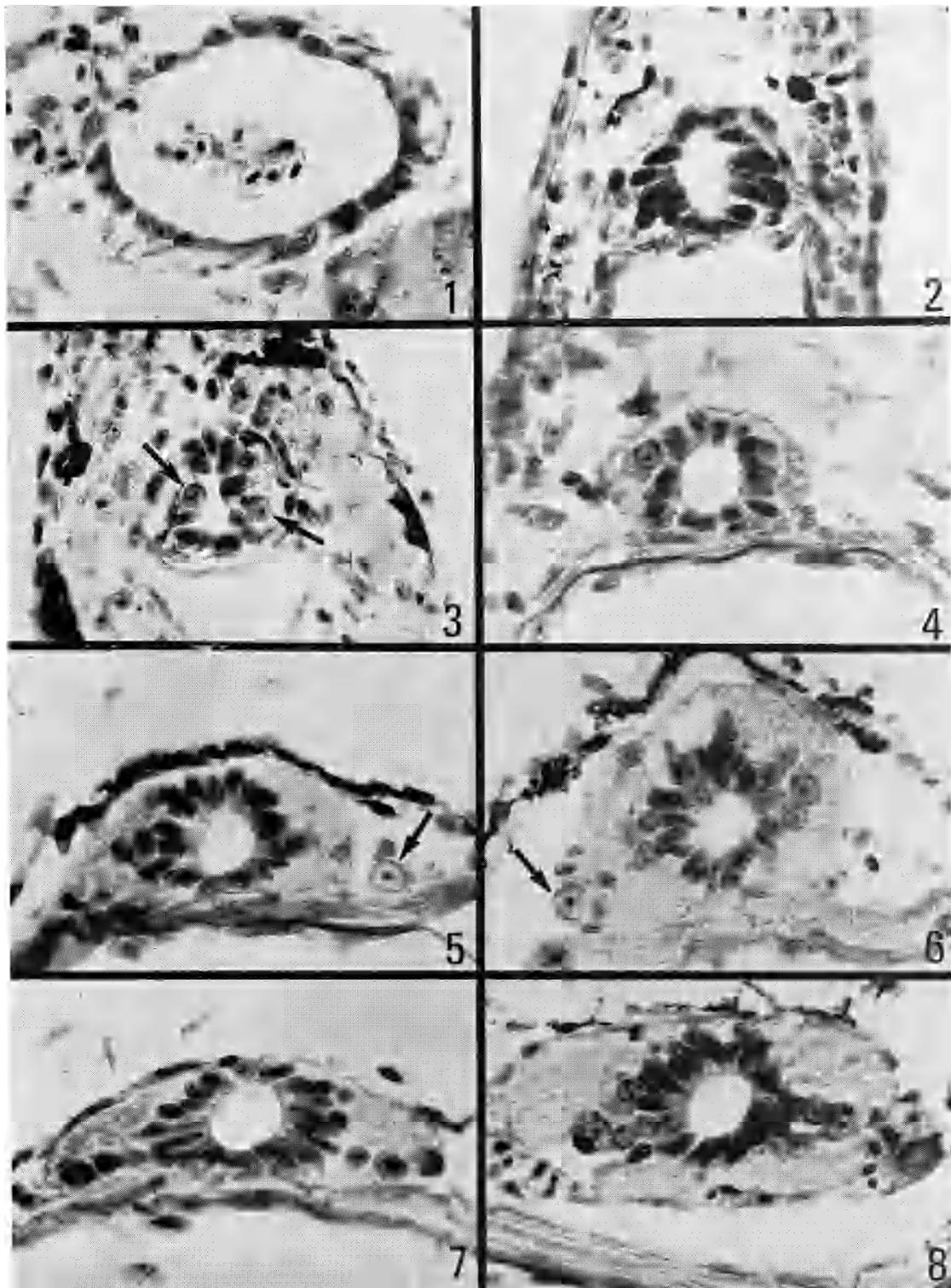
la complessità istologica del midollo spinale di larve sottoposte ad una sola amputazione della coda non è sovrapponibile a quella di larve sottoposte ad amputazioni ripetute. Mentre infatti dopo la prima amputazione il midollo neoformato raggiunge una struttura che è prossima a quella dei controlli malgrado non sia sovrapponibile, a partire della seconda amputazione il midollo caudale neoformato risulta strutturalmente meno complesso. In particolare non si osservano tipici neuroni di Rohon-Beard. Tuttavia bisogna rilevare che le larve sottoposte a due o tre amputazioni (Lotti II e III) avevano raggiunto alla fine dell'esperimento stadi larvali più avanzati di quelli raggiunti dalle larve sottoposte ad una sola amputazione (Lotto I) (stadio 56-57; 57-58 per le larve dei lotti II e III; stadio 54-55 per le larve del lotto I) ed è noto che con il procedere della vita larvale si ha una progressiva diminuzione in numero e dimensioni di tali elementi. Pertanto l'assenza di neuroni di Rohon-Beard negli individui sottoposti a 2-3 amputazioni non è necessariamente correlabile con un decremento del potere rigenerativo.

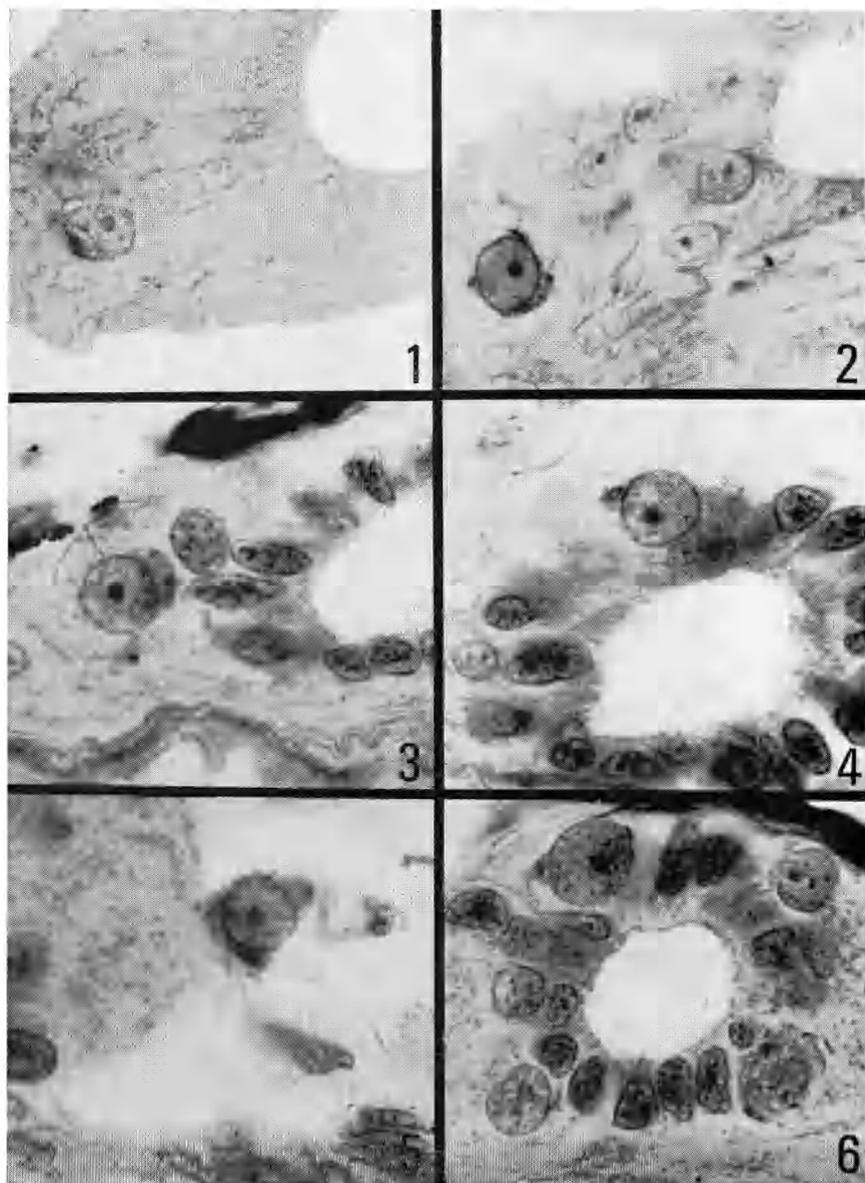
L'elevato grado di restituzione del midollo spinale caudale in seguito ad una amputazione e la neoformazione di neuroni e fibre nervose dopo amputazioni ripetute rappresentano dei dati finora mai riscontrati negli Anfibi Anuri. Infatti nelle specie in cui è stata messa in evidenza una certa potenzialità dello strato ependimale di neoformare neuroni, questi si riformano, sempre in numero limitato, dopo un'amputazione e mai dopo amputazioni ripetute, già a partire dalla seconda (Stefanelli 1951; Baffoni, 1952).

Pertanto i risultati ottenuti nella presente ricerca dimostrano che la potenzialità rigenerativa del midollo spinale di larve di *Xenopus laevis*, è notevolmente più elevata di quella osservata negli Anuri finora studiati.

BIBLIOGRAFIA

- BAFFONI G. M. (1952) - *La rigenerazione della coda e gli effetti reattivi delle cellule di Mauthner in Anfibi anuri ed urodeli* « Rend. Acc. Naz. Lincei » (ser. VIII), 12, 189-194.
- FILONI S., BAVA C. e MARGOTTA V. (1973) - *La rigenerazione del midollo spinale della coda in larve di Xenopus laevis (Daudin)*. « Rend. Acc. Naz. Lincei » (ser. VIII), 55, 586-591.
- FILONI S. e BOSCO L. (1975) - *La rigenerazione del midollo spinale della coda in larve di Xenopus laevis (Daudin). II. Analisi del processo rigenerativo*. « Rend. Acc. Naz. Lincei » (ser. VIII), 58, 57-63.
- GOSS J. (1969) - *Principles of regeneration*, Academic Press, New York and London, 209.
- 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.
- STEFANELLI A. (1951) - *I fenomeni rigenerativi e degenerativi del midollo spinale caudale degli Anfibi e dei Rettili*, « Boll. Zool. », 17, 279-290.
- STEFANELLI A., THERMES G. e PODDIE M. (1950) - *La rigenerazione del midollo spinale delle larve di Anfibi Anuri e sue relazioni con la corda dorsale*. « Riv. Biol. », 42, 239-264.
- THERMES G. (1950) - *Comportamento del midollo spinale caudale delle larve di Hyla dopo riallacciamento ritardato con il restante neurasse*. « Rend. Seminario Fac. Sci. Univ. Cagliari », 20, 1-5.





SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE I-II

TAVOLA I

- Fig. 1. - Dopo 4 giorni dalla seconda amputazione della coda (lotto II, gruppo A): sezione trasversale a livello dell'ampolla apicale. 700×.
- Fig. 2. - Dopo 8 giorni dalla seconda amputazione della coda (lotto II, gruppo A): la parete dell'ampolla si è ispessita. 700×.
- Fig. 3. - Dopo 12 giorni dalla seconda amputazione della coda (lotto II, gruppo A): fra le cellule della parete del midollo neoformato, si osservano due elementi in via di differenziamento (freccie). 700×.
- Fig. 4. - Dopo 16 giorni dalla terza amputazione della coda (lotto III, gruppo A): nella parte dorso-laterale è visibile un neurone neoformato. La sostanza bianca è ben evidente. 700×.
- Fig. 5. - Dopo 20 giorni dalla terza amputazione della coda (lotto III, gruppo A): all'esterno del midollo neoformato è visibile un neurone gangliare (freccia). 700×.
- Fig. 6. - Dopo 30 giorni dalla terza amputazione della coda (lotto III, gruppo A): il midollino neoformato è costituito oltre che dall'ependima, anche da neuroni e fibre nervose. Lateralmente al midollo è visibile un neurone gangliare (freccia). 700×.
- Fig. 7. - Dopo 30 giorni dalla terza amputazione (lotto III, gruppo B): oltre all'ependima, si osserva il grigio periventricolare, grossi neuroni ventrali e abbondante sostanza bianca. 700×.
- Fig. 8. - Dopo 30 giorni da una sola amputazione (lotto I): il midollo neoformato ha un volume considerevole e presenta numerosi neuroni e fibre nervose. 700×.

TAVOLA II

- Fig. 1. - Dopo 12 giorni dalla terza amputazione della coda (lotto III, gruppo A): nella parte ventrale del midollo, si osserva un elemento neurale con nucleo globoso e citoplasma basofilo, in via di differenziamento. 1300×.
- Fig. 2. - Dopo 16 giorni dalla seconda amputazione della coda (lotto II, gruppo A): è visibile un neurone in differenziamento con sostanza tigroide ben evidente. 1300×.
- Figg. 3-4. - Dopo 20 giorni dalla terza amputazione della coda (lotto III, gruppo A): neurone ventrale (fig. 3) e neurone dorsale (fig. 4) neoformati. 1300×.
- Fig. 5. - Dopo 30 giorni dalla terza amputazione della coda (lotto III, gruppo A): neurone gangliare neoformato. 1300×.
- Fig. 6. - Dopo 30 giorni da una sola amputazione della coda: si osservano numerosi neuroni neoformati; dorsalmente un neurone di Rohon-Beard. 1300×.