
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

SERGIO FILONI, LUIGI BOSCO, CESARE CARLIZZI

**La rigenerazione del midollo spinale della coda di
larve di *Xenopus laevis* operate negli stadi tardivi**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 63 (1977), n.5, p. 440–446.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1977_8_63_5_440_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 operate negli stadi tardivi.* Nota di SERGIO FILONI, LUIGI BOSCO e CESARE CARLIZZI, presentata (*) dal Socio A. STEFANELLI.

SUMMARY. — The experiments in this work were designed to study the regenerative capacity of caudal spinal cord in larval *Xenopus laevis* at stages near to metamorphosis. 70% of the tail was removed in larval *Xenopus laevis* at stage 56-57 (acc.to Nieuwkoop and Faber, 1956). The experimental animals were reared in 0.01% solution of PTU (4(6)-Propyl-2-thiouracil) in order to inhibit metamorphosis, and sacrificed after 3-5 months.

The results obtained demonstrated that: a) the regenerated spinal cord of the tadpoles submitted to amputation of the tail at stage 56-57 presents a histological structure essentially similar to the structure of the regenerated spinal cord of the specimens operated at stage 48. In all cases the regenerated spinal cord is formed by ependymal layer, neurons and fibers. b) PTU has no direct effect on the regenerative process of the caudal spinal cord.

Nell'ambito del problema della rigenerazione del sistema nervoso centrale degli Anfibi anuri, da tempo affrontato nel nostro Istituto, recentemente abbiamo iniziato lo studio della rigenerazione del midollo spinale caudale delle larve degli Anuri, poiché abbiamo constatato come i dati ottenuti dai vari Autori che hanno analizzato la capacità neoformativa di questo settore del neurasse siano per lo più limitati alle prime fasi del processo rigenerativo e talora siano contrastanti (per la relativa bibliografia si rimanda a Piatt, 1955 e a Filoni, Bava e Margotta, 1973).

La prima specie da noi presa in esame è stata *Xenopus laevis* poiché proprio in questa specie abbiamo saggiato più dettagliatamente che in altre i processi rigenerativi di varie regioni encefaliche mettendo in evidenza una notevolissima capacità rigenerativa a livello del telencefalo, mesencefalo e cervelletto negli stadi larvali precoci (Filoni, 1964 a e seguenti, Filoni e Gibertini, 1969; Filoni, Margotta e Gibertini, 1972).

Dai primi risultati ottenuti, abbiamo constatato che, contrariamente a quanto era stato finora osservato in altre specie di Anuri (vedi Piatt, 1955; Goss, 1969), il midollo spinale caudale di larve di *Xenopus laevis* operate di asportazione del 50-70% della coda a stadi precoci (stadio 48 sec. Nieuwkoop e Faber, 1956) rigenera non solo un tubulino ependimale ma anche numerosi neuroni e fibre nervose, raggiungendo un volume considerevole (Filoni, Bava e Margotta, 1973; Filoni e Bosco, 1975).

Poiché in precedenti studi sulla rigenerazione del mesencefalo in larve di *Xenopus laevis*, abbiamo constatato che con il procedere della vita larvale

(*) Nella seduta del 18 novembre 1977.

si ha un decremento del potere rigenerativo che diviene nettissimo dopo lo stadio 55 (Filoni e Gibertini, 1969), nel presente studio abbiamo ritenuto che fosse interessante stabilire se il potere rigenerativo del midollo spinale della coda si mantenesse anche negli stadi larvali tardivi o non presentasse, come già messo in evidenza nell'encefalo, un netto decremento.

Il problema non era facilmente affrontabile poiché, essendo lo sviluppo larvale dello *Xenopus laevis* molto rapido, il tempo intercorrente fra lo stadio dell'operazione e quello del riassorbimento della coda probabilmente sarebbe stato troppo breve per consentire la totale estrinsecazione di un eventuale potere rigenerativo, che, anche quando è notevole, richiede, per il completamento del processo stesso, fra i 30 e i 40 giorni. Pertanto lo studio del potere rigenerativo del midollo spinale della coda negli stadi larvali avanzati è stato compiuto non solo su larve operate a stadi tardivi ed allevate in acqua, ma anche su larve che - operate allo stesso stadio ma poi trasferite in una soluzione di PTU (4(6)-propil-2-tiouracile), potente inibitore della metamorfosi - permanevano allo stato larvale e quindi potevano essere sacrificate a tempi notevolmente più lunghi dall'operazione.

Per la validità di quest'ultima esperienza si è reso necessario appurare che il PTU non avesse un effetto diretto sul processo rigenerativo del midollo spinale. Tale verifica è stata effettuata su larve operate allo stadio 48 (stadio in cui, come si è detto, il potere rigenerativo è molto elevato) e sacrificate a tempi scalari dall'intervento.

MATERIALE E METODO

In questa ricerca sono state utilizzate larve di *Xenopus laevis* ottenute in seguito ad ovulazione ed accoppiamento indotti con ormoni gonadotropi (Pregnyl della Organon).

Sono stati eseguiti i seguenti lotti di esperienze:

Lotto I: costituito da 50 larve operate allo stadio 48 (secondo Nieuwkoop e Faber, 1956) di asportazione del 70% della coda, allevate in acqua e sacrificate a tempi scalari dall'intervento (dopo 4-8-12-16-20-25-30-45 gg), in gruppi di 5.

Lotto II: costituito da 50 larve operate allo stadio 48 di asportazione del 70% della coda, allevate in una soluzione di PTU allo 0,01% e sacrificate dopo 4-8-12-16-20-25-30-45 gg dalla operazione, in gruppi di 5.

Lotto III: costituito da 30 larve operate allo stadio 56-57 di asportazione del 70% della coda, allevate in acqua e sacrificate dopo 12-15 gg dall'intervento.

Lotto IV: costituito da 50 larve operate allo stadio 56-57 di asportazione del 70% della coda, allevate in una soluzione di PTU allo 0,01% e sacrificate dopo 2-5 mesi dall'intervento.

Gli individui sacrificati sono stati fissati in liquido di Bouin e le sezioni seriate di 7-10 μ di spessore sono state colorate con emallume-eosina,

Mallory-Azan, blu di toluidina o impregnate con il metodo all'argento colloidale di Bodian.

Per valutare l'entità della rigenerazione, dal punto di vista quantitativo, dei midolli neoformati nelle varie condizioni sperimentali, sono state eseguite misurazioni planimetriche di sezioni corrispondenti di midolli spinali rigenerati. Il volume è stato ottenuto moltiplicando il valore dell'area media per numero e lo spessore delle sezioni.

DESCRIZIONE DEI RISULTATI

LOTTO I. *Larve operate allo stadio 48 e allevate in acqua.*

I dati ottenuti dall'analisi dell'evoluzione del processo rigenerativo e dallo studio della struttura del midollo spinale rigenerato, alla fine del processo rigenerativo stesso, sono corrispondenti a quelli da noi già ottenuti in una precedente ricerca (Filoni e Bosco, 1975). L'allestimento di questo lotto sperimentale si è reso necessario al fine di disporre di un materiale di confronto omogeneo con gli individui del Lotto II provenienti dalla stessa deposizione.

La prima fase del processo rigenerativo (fase migratoria) si realizza con la costituzione di un'ampolla apicale, che si forma ad opera della migrazione di elementi dallo strato endimale siti immediatamente a monte della superficie di taglio (Tav. I, fig. 1).

Segue una fase caratterizzata da un'intensa proliferazione cellulare (fase moltiplicativa) degli elementi della parete ampollare neoformata e da una riduzione del diametro del canale endimale (Tav. I, fig. 3).

A partire dal 12° giorno post-operatorio, inizia il differenziamento dei neuroblasti, localizzati nella regione più esterna del midollo neoformato, in neuroni e, al 16° giorno la sostanza bianca diviene cospicua (Tav. I, fig. 5). Al 30° giorno post-operatorio il processo di neoformazione del midollo spinale caudale può dirsi ultimato, e il midollo rigenerato presenta numerosi neuroni e fibre neoformate (Tav. I, fig. 7).

LOTTO II. *Larve operate allo stadio 48 e allevate in PTU.*

Quando le larve normali vengono trasferite in una soluzione di PTU fin dallo stadio 48, il loro sviluppo si arresta alla fine del periodo premetamorfico. Infatti dopo 45 giorni dall'inizio dell'esperienza, mentre le larve di controllo allevate in acqua avevano raggiunto lo stadio 56 le larve allevate in PTU non avevano superato lo stadio 52. A questo arresto di sviluppo non corrisponde, tuttavia, un arresto dell'accrescimento poiché le dimensioni delle larve allevate in PTU erano molto prossime a quelle delle larve pari età allevate in acqua.

I risultati ottenuti in questo lotto sono del tutto sovrapponibili, sia per quanto riguarda l'evoluzione del processo rigenerativo del midollo spinale caudale sia per quanto concerne la struttura del rigenerato, a quelli ottenuti

nel lotto precedente (Tav. I, figg. 2, 4, 6, 8). Anche l'elaborazione statistica dei dati quantitativi non ha rivelato differenze significative tra i due lotti di esperienze.

LOTTO III. *Larve operate allo stadio 56-57 e allevate in acqua.*

L'esame istologico del midollo spinale rigenerato dopo 12-15 giorni dalla operazione, ha dimostrato che il processo rigenerativo è già in una fase avanzata. Verso la regione apicale, il midollo neoformato presenta un ampio canale ependimale delimitato, oltre che dallo strato ependimale anche da un abbondante grigio periventricolare. Le cellule del grigio periventricolare di questa regione sono per la maggior parte indifferenziate e presentano un nucleo con cromatina uniformemente distribuita nella cariolinfa. All'esterno della sostanza grigia, è visibile un esile strato di fibre neoformate. Procedendo dalla regione apicale della coda verso la base, si osserva che il midollo spinale neoformato presenta una struttura più complessa. Mentre lo strato fibroso diviene più cospicuo, gli elementi più esterni del grigio periventricolare si differenziano, il loro nucleo diviene sferoidale con cromatina addensata intorno alla membrana nucleare e al nucleolo; nel citoplasma compare la sostanza tigroide. A questo stadio del processo rigenerativo si osservano numerose mitosi localizzate soprattutto a livello dello strato ependimale (Tav. II, figg. 9, 10).

LOTTO IV. *Larve operate allo stadio 56-57 e allevate in PTU.*

Quando il trattamento con PTU è seguito a questo stadio, l'inibizione della metamorfosi non è assoluta. Infatti mentre la maggior parte degli individui permane allo stato larvale per molti mesi (5 mesi, nella presente esperienza), alcuni, malgrado presentino un notevole rallentamento delle varie fasi della metamorfosi rispetto ai controlli, riescono a metamorfosare. Le larve che subiscono l'inibizione della metamorfosi manifestano un aumento della mole somatica, che pur variabile da caso a caso, è sempre molto notevole.

L'esame istologico del midollo spinale rigenerato delle larve inibite nella metamorfosi non ha rilevato l'esistenza di apprezzabili differenze strutturali fra gli individui sacrificati dopo 60 giorni e quelli sacrificati dopo 150 giorni dall'intervento.

Nella generalità dei casi, e per tutta la sua estensione, il midollo neoformato è costituito, oltre che dall'ependima anche da neuroni e fibre nervose (Tav. II, figg. 11, 12, 13). Verso la parte apicale, il canale ependimale è dilatato e presenta uno scarso numero di neuroni; anche la sostanza bianca è costituita da un sottile mantello di fibre periferiche. Procedendo verso la base della coda rigenerata, il canale ependimale si restringe, il numero dei neuroni, localizzati sia nel grigio periventricolare sia esterni a questo, aumenta e la sostanza bianca diviene molto più cospicua (Tav. II, fig. 11).

Un'attenta analisi della sostanza grigia ha rivelato che le cellule di Rohon-Beard sono assenti per la maggior parte dell'estensione del midollo spinale rigenerato. Tuttavia, nella quasi totalità dei casi esaminati, abbiamo riscon-

trato rari neuroni che, pur non avendo tutte le caratteristiche tipiche delle cellule di Rohon-Beard, occupavano una posizione dorsale ed avevano dimensioni notevoli (Tav. II, fig. 11). D'altra parte, l'assenza di tipici neuroni di Rohon-Beard è stata riscontrata anche nelle larve non operate allevate in PTU per un periodo di tempo corrispondente a quelle operate.

Ai lati del midollo neoformato, in corrispondenza della sua porzione latero-ventrale, si possono osservare alcuni elementi gangliari (Tav. II, fig. 14); tuttavia queste cellule sono sempre in numero limitato. A livello dello strato ependimale, anche dopo 5 mesi di trattamento con PTU, si osservano cellule in mitosi (Tav. II, fig. 15).

L'esame volumetrico dei midolli rigenerati ha dimostrato che il volume medio è molto prossimo a quello degli individui normali allo stadio 56-57 e in qualche caso superiore, raggiungendo un valore sovrapponibile a quello che si riscontra negli individui non operati trattati con PTU. Non vi sono comunque differenze quantitative sostanziali fra gli individui sacrificati dopo 60 giorni e quelli sacrificati dopo 150 giorni.

DISCUSSIONE

I dati morfologici, istologici e quantitativi relativi al midollo spinale caudale rigenerato di larve di *Xenopus laevis* sottoposte all'amputazione del 70% della coda hanno dimostrato che la capacità rigenerativa di questa regione del neurasse è molto elevata anche negli stadi prossimi alla metamorfosi. Ciò è evidenziabile sia nelle prime fasi del processo rigenerativo che alla fine del processo stesso. Infatti, i suddetti esami condotti su larve operate allo stadio 56-57, allevate in acqua e sacrificate dopo 15 giorni dall'amputazione della coda, dimostrano che il midollo neoformato presenta una struttura del tutto sovrapponibile a quella che si riscontra in larve sottoposte alla stessa operazione allo stadio 48, e sacrificate dopo lo stesso periodo di tempo dall'intervento. Già a questo stadio del processo rigenerativo, il midollo neoformato è costituito in entrambi i lotti di esperienze, dallo strato ependimale, le cui cellule sono in attività mitotica, dal grigio periventricolare, i cui elementi più esterni sono in differenziamento e da fibre neoformate, particolarmente abbondanti verso la regione basale della coda rigenerata.

Lo studio dell'ulteriore evoluzione del processo rigenerativo eseguito su individui operati allo stadio 56-57 e trasferiti in PTU (antitiroideo che, come risulta dal confronto fra i lotti I e II non esercita, alla concentrazione usata, un effetto diretto sulla rigenerazione del midollo caudale) ha dimostrato che nelle larve operate negli stadi tardivi il processo rigenerativo realizza una struttura fondamentalmente simile a quella che si osserva quando l'operazione venga eseguita a stadi precoci. In entrambi i casi il midollo rigenerato è costituito, oltre che dall'ependima, anche da numerosi neuroni e fibre neoformate.

I dati ottenuti in questa ricerca, dimostrando che il potere rigenerativo del midollo spinale caudale di larve di *Xenopus laevis* è elevato anche allo

stadio 56-57, differiscono da quelli ottenuti a livello dell'encefalo ed in particolare del tetto ottico. Filoni e Gibertini (1969) hanno messo in evidenza che durante lo sviluppo larvale il potere rigenerativo del tetto ottico, estremamente elevato agli stadi larvali precoci (stadi 48-50), decresce gradualmente negli stadi larvali successivi per divenire molto limitato a partire dallo stadio 55. Questi Autori spiegano tale decremento della rigenerazione formulando l'ipotesi di un progressivo differenziamento degli elementi responsabili del processo rigenerativo durante lo sviluppo larvale, differenziamento che sarebbe favorito dall'alto livello dell'ormone tiroideo negli stadi della crisi metamorfica.

Questa diversità di risultati può essere interpretata considerando il diverso grado di complicazione morfologica che si realizza durante lo sviluppo larvale a livello delle due regioni del neurasse. Infatti mentre il mesencefalo subisce una graduale complicazione della sua struttura con il procedere dello sviluppo larvale, in quanto destinato ad assolvere funzioni sempre più complesse, il midollo spinale della coda, organo transitorio, conserva durante tutta la vita larvale una struttura relativamente semplice. Si può ritenere che a livello del midollo spinale anche gli elementi responsabili del processo rigenerativo permangono in uno stadio indifferenziato per tutta la vita larvale e siano in grado di manifestare la loro potenzialità rigenerativa anche negli stadi larvali più avanzati.

BIBLIOGRAFIA

- FILONI S. (1964 a) - *Aspetti morfologici ed istologici della rigenerazione del telencefalo in larve di Xenopus laevis*, « Rend. Ist. Sci. Camerino », 25, 111-134.
- FILONI S. (1964 b) - *Sulla rigenerazione del mesencefalo nelle larve di Xenopus laevis*, « Rend. Acc. Naz. Lincei », ser. VIII, 37, 521-527.
- FILONI S. (1969) - *Sulla morfogenesi del mesencefalo rigenerante in larve di Xenopus laevis*, « Arch. It. Anat. Embriol. », 74, 89-109.
- 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.
- FILONI S. e GIBERTINI G. (1969) - *A study of the regenerative capacity of the central nervous system of Anuran Amphibia in relation to their stage of development*. I. *Observations on the regeneration of the optic lobe of Xenopus laevis (Daudin) in the larval stages*, « Arch. Biol. (Liège) », 80, 369-411.
- FILONI S. e MARGOTTA V. (1971) - *A study on the regeneration of the cerebellum of Xenopus laevis (Daudin) in the larval stages and after metamorphosis*, « Arch. Biol. (Liège) », 82, 433-470.
- FILONI S., MARGOTTA V. e GIBERTINI G. (1972) - *Analysis of the regenerative process of the optic tectum in an Anuran (Xenopus laevis Daudin) following removal of both optic lobes*, « Monit. Zool. Ital. », 6, 213-229.
- GOSS R. L. (1969) - *Principles of reperation*, 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, p. 20.

SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE I-II

TAVOLA I

- Figg. 1-3-5-7. - Evoluzione del processo rigenerativo del midollo spinale caudale di larve operate allo stadio 48, allevate in acqua (Lotto I) e sacrificate dopo 4 (fig. 1), 8 (fig. 3), 16 (fig. 5) e 30 (fig. 7) giorni dall'intervento. Spiegazione nel testo. 600×.
- Figg. 2-4-6-8. - Evoluzione del processo rigenerativo del midollo spinale caudale di larve operate allo stadio 48, allevate in una soluzione di PTU allo 0,01% (Lotto II) e sacrificate dopo 4 (fig. 2), 8 (fig. 4), 16 (fig. 6) e 30 (fig. 8) giorni dall'intervento. Spiegazione nel testo. 600×.

TAVOLA II

- Figg. 9-10. - Mitosi a livello dello strato ependimale del midollo spinale caudale rigenerato di una larva allo stadio 56-57, allevata in acqua (Lotto III) e sacrificata dopo 15 giorni dall'intervento. 1450×.
- Fig. 11. - Struttura del midollo spinale caudale rigenerato di una larva operata allo stadio 56-57, allevata in PTU (Lotto IV) e sacrificata dopo 60 giorni dall'intervento. 600×.
- Fig. 12. - Rigenerazione anomala del midollo spinale caudale di un individuo operato allo stadio 56-57, allevato in PTU (Lotto IV) e sacrificato dopo 60 giorni dall'operazione: sono presenti due canali ependimali. 460×.
- Figg. 13-14. - Neuroni neoformati presenti nel midollo spinale caudale rigenerato di larve operate allo stadio 56-57, allevate in PTU (Lotto IV) e sacrificate dopo 150 giorni dall'intervento. Fig. 13: neuroni ventrali; fig. 14: neurone gangliare. 1450×.
- Fig. 15. - Mitosi a livello dello strato ependimale del midollo spinale caudale rigenerato di una larva operata allo stadio 56-57, allevata in PTU (Lotto IV) e sacrificata dopo 150 giorni dall'intervento. 1450×.



