
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

FRANCESCO MARMO, GIUSEPPE BALSAMO

**Osservazioni in microscopia elettronica a scansione
sul sacco endolinfatico di *Lacerta s. sicula***

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 70 (1981), n.6, p. 279–283.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1981_8_70_6_279_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/>

SEZIONE III

(Botanica, zoologia, fisiologia e patologia)

Zoologia. — *Osservazioni in microscopia elettronica a scansione sul sacco endolinfatico di Lacerta s. sicula* (*). Nota di FRANCESCO MARMO (**), e GIUSEPPE BALSAMO (**), presentata (***) dal Corrisp. G. CHIEFFI.

SUMMARY. — The endolymphatic sac of *Lacerta s. sicula* (embryo, juvenile and adult) was studied with the scanning electron microscope.

Already in the 10 mm long embryo the endolymphatic sac contains aragonite crystals. Initially these crystals increase in number and size progressively through the successive developmental stages and then their number decreases drastically. Before hatching sets in some aragonite crystals fall into the sacculus to stratify over the calcite crystals; these latter appear as soon as the sacculus starts forming in the 16 mm long embryo. The calcite and aragonite crystals together constitute the otolithic membrane of the sacculus.

In the peripheral otoliths of the endolymphatic sac in embryos (just before hatching), in juveniles and in adults signs of erosion are clearly visible, an expression of the process of decalcification.

A double role for this organ is proposed: 1) It participates in the morphogenesis of aragonite otoliths, and 2) It serves as a calcium deposit.

Il sacco endolinfatico è un organo la cui funzione non è del tutto chiara e che certamente appare offrire caratteristiche diverse nelle varie classi dei Vertebrati. Nei mammiferi si è ammesso un suo intervento nel riassorbimento dell'endolinfa (Guild, 1927; Saxén, 1948, 1951; Bast e Anson, 1950 a-b; Watzke e Bast, 1950) ipotesi che trova appoggio nelle caratteristiche ultrastrutturali del suo epitelio (Lundquist *et al.*, 1964). Secondo altri il ruolo fisiologico di tale organo sarebbe quello di bilanciare la pressione dei liquidi labirintici (Davis e Anson, 1951; Egmond e Brinkmann, 1956; Allen, 1964). Esistono dati, però, che fanno ipotizzare per l'organo, almeno nei vertebrati non mammiferi, altre funzioni. Vasquez (1955) ritiene che il sacco endolinfatico dell'embrione di pollo intervenga nella morfogenesi degli otoliti. Una simile ipotesi trova conferma nell'accumulo di ⁴⁵Ca (de Vincentiis e Marmo, 1966) nell'organo già a 5 giorni di sviluppo e nella precoce segregazione nell'epitelio del sacco endolinfatico dell'embrione di pollo dell'anidraasi carbonica (Marmo, 1966), enzima che è dimostrato essere implicato nella morfogenesi degli otoliti (Marmo, 1965; de Vincentiis e Marmo, 1968). Vilstrup (1951) nei Selaci ha dimostrato che gli otoliti endogeni sono pro-

(*) Le osservazioni al microscopio elettronico a scansione sono state eseguite presso il Centro di Microscopia elettronica della Facoltà di Scienze dell'Università di Napoli.

Ringraziamo il direttore del Centro, prof. G. Ghiara, che ci ha consentito il presente lavoro ed i tecnici, Sigg. G. Orsello e G. Cafiero, per l'assistenza che ci hanno offerto.

Ringraziamo lo studente Ciro Abbondanza per la fattiva collaborazione.

(**) Istituto di Biologia generale e Genetica - Cattedra di Istologia ed Embriologia - Facoltà di Scienze - Università di Napoli. Via Mezzocannone, 8 - 80134 Napoli (Italia).

(***) Nella seduta del 26 giugno 1981.

dotti parte in situ a livello delle regioni maculari e parte nel sacco endolinfatico dal quale, attraverso il dotto, giungerebbero nella sostanza gelatinosa delle macule ove resterebbero invischiati.

I cristallini di CaCO_3 che si accumulano durante lo sviluppo larvale degli Anfibi anuri negli otricoli del sacco endolinfatico vanno incontro durante la metamorfosi ad una riduzione che varia di entità a seconda della specie (Guardabassi, 1952). È stata prospettata l'ipotesi (Guardabassi, 1952, 1953, 1956) che essi partecipino alla calcificazione delle ossa in via di accrescimento e possano anche rappresentare una specie di riserva tampone per la regolazione del pH del sangue che, durante la metamorfosi, tenderebbe all'acidosi.

Per Carus (1841) anche nel sacco endolinfatico degli embrioni di serpente si avrebbe un temporaneo deposito di sali di Ca che sarebbero utilizzati per la formazione delle ossa. Interessante a tale riguardo è anche un dato di Ruth (1918) secondo il quale la riserva di CaCO_3 delle ghiandole del Ca (da identificare con i sacchi endolinfatici) di alcuni lacertidi delle Filippine (*Cosmybotus platyurus* e *Peropus mutilatus*) sarebbero mobilizzate durante il processo di accrescimento delle uova per la formazione del guscio. Una volta che questo è formato le ghiandole apparirebbero praticamente prive di calcio.

MATERIALI E METODI

Le osservazioni sul sacco endolinfatico di *Lacerta s. sicula* sono state condotte su embrioni, giovani lucertole ♂♂ e ♀♀ e su lucertole adulte durante la vitellogenesi. Per determinare i vari stadi di sviluppo è stata utilizzata la lunghezza totale degli embrioni. Sono stati esaminati embrioni di 5, 9, 10, 13, 16, 17, 19, 20, 22, 25, 26, 28, 45, 70 mm di lunghezza totale, giovani animali di 35-45 mm di lunghezza (testa+tronco) e lucertole adulte di lunghezza 50-65 mm (testa+tronco). Sono stati esaminati quattro embrioni per ciascuno stadio di sviluppo ed otto esemplari sia di animali giovani che adulti.

Nella presente ricerca si è utilizzato soltanto materiale non fissato. Le teste venivano tagliate a fresco al criostato in fette da 20μ a -22°C . Le sezioni venivano poi attaccate a coprioggetti per microscopia elettronica a scansione (SEM). Le tecniche di allestimento dei campioni e le condizioni di lavoro erano identiche a quelle già utilizzate in precedenti ricerche (Marmo *et al.*, 1981).

Alcune sezioni prima di essere ombreggiate con oro e carbone, per le osservazioni al SEM, erano sottoposte a breve decalcificazione con puffer acetato a pH 5 per 5 m.p.

RISULTATI

Quello che sorprende durante l'isolamento dell'embrione di lucertola è la particolare voluminosità del sacco endolinfatico che spicca nella regione nucale dell'embrione per il suo colore biancastro dovuto al suo contenuto, di aspetto

lattiginoso, di materiale calcareo; il volume dell'organo va aumentando nel corso dello sviluppo embrionale per ridursi all'approssimarsi della schiusa.

Le osservazioni al SEM hanno mostrato che il sacco endolinfatico, già in embrioni di 10 mm, è pieno di cristalli pseudoesagonali con estremità appuntite che costituiscono il caratteristico geminato di aragonite. Mentre negli stadi più precoci di sviluppo i cristalli sono piccoli e di dimensioni pressoché uguali, procedendo lo sviluppo compaiono notevoli differenze nelle loro dimensioni. In genere i più piccoli occupano la porzione centrale del lume del sacco mentre quelli più voluminosi sono disposti alla periferia a contatto con l'epitelio del sacco e del dotto e mostrano spesso chiari segni di erosione. Tali cristalli, come dimostrato dalle osservazioni mediante diffrazione ai raggi X (Marmo *et al.*, 1981) sono formati di aragonite che, come è noto, rappresenta una fase cristallina del CaCO_3 (fig. 1).

In prossimità della schiusa, in embrioni di 45 mm, si osserva che i cristalli attraverso il dotto cadono nel sacco (fig. 2) andando a depositarsi al di sopra di quelli di calcite (cristalli cilindrici con due estremità, ciascuna fornita di tre facce romboedriche) presenti nell'abbozzo dell'organo, già in embrioni di 16 mm, e che sino a questo momento vi costituivano la sola popolazione cristallina (Marmo *et al.*, 1981), venendo a formare la parte prevalente e più superficiale della membrana otolitica del sacco che appare già completa in embrioni di 70 mm e cioè alla schiusa (fig. 3).

Nelle giovani lucertole ♂♂ e ♀♀ di 35-45 mm la parete del sacco endolinfatico appare ripiegata in grosse pliche ed il lume dell'organo è pressoché virtuale con la presenza di pochi grossi cristalli di aragonite (fig. 4) la cui superficie mostra zone di erosione presentandosi del tutto simile a quella di cristalli di aragonite sottoposti sperimentalmente a breve decalcificazione con puffer acetato a pH 5 per 5 m.p. (fig. 5).

Lo stesso quadro si osserva in lucertole adulte di 50-65 mm durante la vitellogenesi che precede la ovodeposizione estiva (fig. 6). Da segnalare che tali immagini, riferibili a processi di decalcificazione per riassorbimento di Ca, non sono mai state osservate nei cristalli delle membrane otolitiche delle macule acustiche.

DISCUSSIONE

L'insieme delle osservazioni riportate ci induce ad avanzare l'ipotesi che il sacco endolinfatico dei rettili, accanto ad eventuali altre funzioni, svolga un duplice ruolo: 1) quello di organo implicato nella morfogenesi di una parte degli otoliti, 2) quello di organo di riserva del Ca.

Il suo intervento nella morfogenesi otolitica ci sembra dimostrato dalla chiara osservazione del passaggio, all'approssimarsi della schiusa, dei cristalli di aragonite dal sacco endolinfatico al sacco dove vanno a completare la membrana otolitica che fino a quel momento presentava una popolazione monomorfa

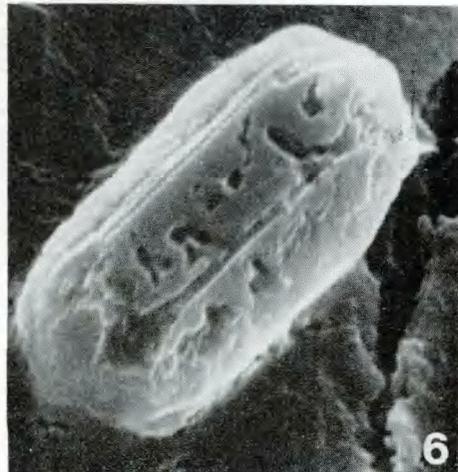
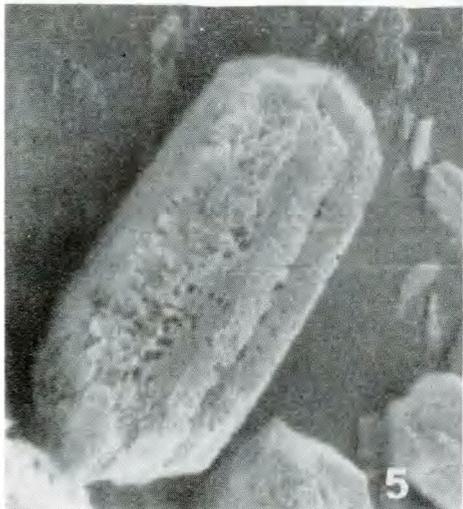
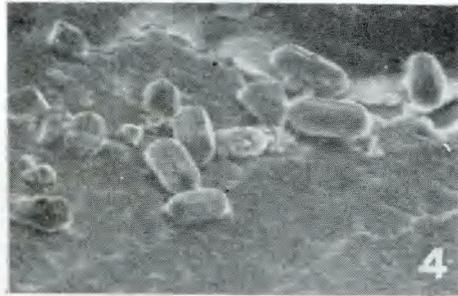
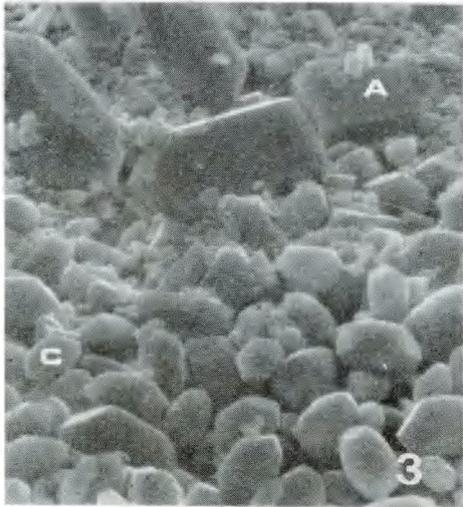
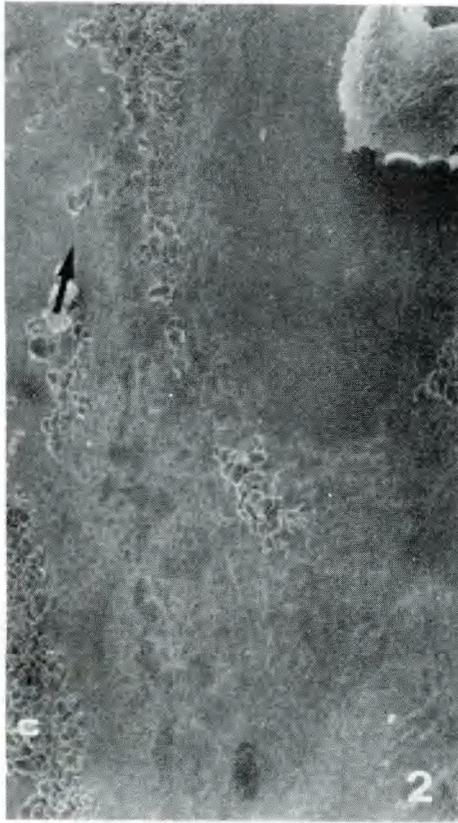
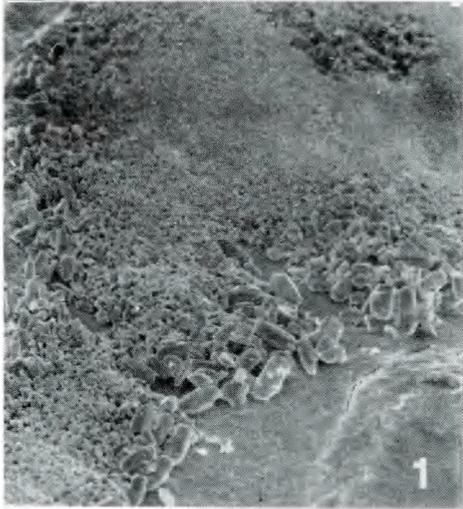
di cristalli di calcite (Marmo *et al.*, 1981) facilmente individuabili per il loro abito. Le osservazioni al SEM e la diffrazione ai raggi X (Marmo *et al.*, 1981) hanno dimostrato, infatti, che nel sacco, già prima della schiusa, sono presenti due tipi di cristalli: a ridosso dell'epitelio sensoriale strettamente serrati tra loro vi sono i cristalli di calcite, stratificati su questi vi è l'altra popolazione di cristalli di aragonite che sono pervenuti in questa sede dal sacco per la via del dotto endolinfatico. L'ammettere due sedi di origine, la calcite *in situ* e l'aragonite migrata dal sacco endolinfatico, darebbe una logica spiegazione alla sorprendente anche se non unica dimostrazione di due fasi cristalline del carbonato di calcio (calcite e aragonite) a livello dello stesso organo. La presenza di due fasi cristalline è, infatti, nota negli invertebrati: le conchiglie di alcuni molluschi e le perle sono formati da strati di calcite e di aragonite (Wilbur, 1960).

La funzione di organo di riserva del calcio trova appoggio nel particolare comportamento durante la vita embrionale in cui veramente assai precoce e cospicua è la quantità di cristalli di CaCO_3 che si accumula nell'organo rispetto alla massa dell'embrione, cristalli la cui presenza non può essere ricollegata ad una funzione sensoriale dell'organo ed il cui numero si riduce notevolmente all'approssimarsi della schiusa. Altro dato che appoggia tale modo di vedere è la presenza di chiare immagini di decalcificazione sia nei grossi otoliti periferici del sacco endolinfatico di embrioni prossimi alla schiusa sia in quei pochi otoliti che si osservano nel sacco endolinfatico di giovani lucertole e di quelle adulte durante la vitellogenesi.

La riserva calcarea del sacco endolinfatico potrebbe rappresentare una modalità di accumulo del calcio in una forma facilmente mobilizzabile da utilizzare nei momenti critici del ciclo biologico dell'animale quali l'ossificazione dello scheletro e la vitellogenesi. A riguardo di quest'ultima è noto, infatti, (Simkiss, 1961) che i rettili accumulano il calcio necessario per lo sviluppo embrionale essenzialmente nel tuorlo a differenza degli uccelli che utilizzano a tale scopo il guscio dell'uovo. Il fatto poi che tali immagini di decalcificazione non siano mai state osservate nelle stesse condizioni negli otoliti maculari potrebbe essere un'ulteriore riprova del differente metabolismo del Ca legato a funzioni diverse nel sacco endolinfatico e nel restante labirinto membranoso.

BIBLIOGRAFIA

- ALLEN G. W. (1964) - « Arch. Otolaryng. », 79, 322.
BAST T. H. e ANSON R. J. (1950 a) - « Ann. Otol. Rhinol. Laryng. », 59, 1088.
BAST T. H. e ANSON R. J. (1950 b) - « Trans. Amer. Otol. Soc. », 38, 160.
CARUS C. G. (1841) - citato da Guardabassi A. - in « Arch. Ital. Anat. Embriol. », 57, 241 (1952).
DAVIS R. A. e ANSON B. J. (1951) - « Quart. Bull. Nth. West. Univ. Med. School. », 52, 336.
DE VINCENTIIS M. e MARMO F. (1966) - « J. Embryol. exp. Morph. », 15, 349.
DE VINCENTIIS M. e MARMO F. (1968) - « Experientia », 24, 818.
EGMOND A. A. J. VAN e BRINKMANN W. F. B. (1956) - « Acta Otolaryng. », 46, 285.
GARDABASSI A. (1952) - « Arch. Ital. Anat. Embriol. », 57, 241.



- GUARDABASSI A. (1953) - « Arch. Anat. micr. Morph. expér. », 42, 143.
GUARDABASSI A. (1956) - « Arch. Ital. Anat. Embr. », 61, 278.
GUILD S. R. (1927) - « Amer. J. Anat. », 39, 57.
LUNDQUIST P. G., KIMURA R. e WERSÄLL J. (1964) - « Acta Otolaryng. », 57, 65.
MARMO F. (1965) - « Boll. Zool. », 32, 231.
MARMO F. (1966) - « Acta Embryol. et Morphol. exp. », 9, 118.
MARMO F., FRANCO E. e BALSAMO G. (1981) - *Cell and Tissue Research* (in corso di pubblicazione).
RUTH E. S. (1918) - « Philipp. J. Sci. », 13 B, 311.
SAXÈN A. (1948) - « Bull. schweiz. Akad. Med. Wissensch. », 3, 250.
SAXÈN A. (1951) - « Acta Otolaryng. », 40, 23.
SIMKISS K. (1961) - « Biol. Rev. », 36, 321.
VASQUEZ C. S. (1955) - « Ann. Otol. Rhinol. Laryng. », 64, 1019.
VILSTRUP T. (1951) - « Ann. Otol. Rhinol. Laryng. », 60, 974.
WATZKE D. e BAST T. H. (1950) - « Anat. Rec. », 106, 361.
WILBUR K. M. (1960) - in (R. F. Sognaes ed.), *Calcification in Biological Systems*, « Am. Ass. for the Adv. of Science », Washington, D.C. pp. 15-40.

SPIEGAZIONE DELLA TAVOLA I

- Fig. 1. - Cristalli di aragonite di porzione del sacco e del dotto endolinfatico di embrione di lucertola (lunghezza totale 45 mm). × 1300.
- Fig. 2. - Embrione di lucertola (lunghezza totale 45 mm). Ansa del dotto endolinfatico. Si osservano i primi cristalli di aragonite (freccia) caduti nel lume del sacco dove è già presente la primitiva membrana otolitica di cristalli di calcite C. × 250
- Fig. 3. - Porzione di membrana otolitica del sacco. Lucertola di 40 mm (testa + tronco). A: cristalli di aragonite; C: cristalli di calcite. × 1200.
- Fig. 4. - Lucertola di 40 mm (testa + tronco). Sezione di sacco endolinfatico. Si osserva la presenza di pochi grossi cristalli di aragonite. × 250.
- Fig. 5. - Otoliti del sacco di lucertola durante la vitellogenesi sottoposti a breve decalcificazione con tampone acetato a pH 5 per 5 m.p. × 2200.
- Fig. 6. - Cristallo di aragonite del sacco endolinfatico di lucertola durante la vitellogenesi. Si osservano chiari segni di erosione della superficie del cristallo. × 1800.