
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

EMILIA CATALDI, LUISA ANNA IERADI

**Aspetti del differenziamento muscolare in somiti
coltivati in vitro**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 76 (1984), n.1, p. 46–51.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1984_8_76_1_46_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. — *Aspetti del differenziamento muscolare in somiti coltivati in vitro* (*). Nota di EMILIA CATALDI e LUISA ANNA IERADI, presentata (**) dal Socio A. STEFANELLI.

SUMMARY. — Somites of chick embryos from stage 18-19 HH were cultured *in vitro* for about one month.

Explants and cell aggregates were prepared. Light microscope observations of the aggregates revealed: multinucleated myotubes often of remarkable dimension and with peripheral nuclei, tubule or vesicle-shaped epithelia, connective elements. In the explants myotubes, myosacs, some striated fibers, epithelia, connective elements and cartilage nodules were observed.

In the discussion embryo age, tissue integrity and cell interactions have been considered.

INTRODUZIONE

La maggior parte degli studi sul differenziamento muscolare è stata eseguita su esperienze *in vitro* di espianti e culture di cellule dissociate dell'arto e di muscoli pettorali prelevati da embrioni di 11-12 giorni di incubazione. Queste esperienze hanno dimostrato in maniera inequivocabile che mioblasti mononucleati provenienti dalla dissociazione del muscolo formano in cultura miotubi polinucleati e successivamente fibre striate. Tuttavia va sottolineato che nei muscoli degli embrioni di 12 gg. gli elementi muscolari in gran parte sono differenziati; pertanto il differenziamento muscolare osservato *in vitro* potrebbe essere più simile al processo che avviene nella rigenerazione, che a quello che avviene durante lo sviluppo del muscolo (Yaffe *et al.*, 1972).

Gli studi eseguiti *in vitro* prelevando abbozzi di arti e somiti da embrioni a stadi precoci di sviluppo hanno messo in evidenza che esistono numerosi fattori (età del prelievo, mezzo di coltura, densità della popolazione cellulare, integrità del tessuto prelevato, influenza di altri tessuti) che possono interferire in alcune tappe del differenziamento muscolare.

(*) Gli autori desiderano dedicare questa ricerca al loro Maestro, Prof. Alberto Stefanelli, in occasione del Suo anno giubilare. La ricerca è stata eseguita nel Dipartimento di Biologia animale e dell'Uomo dell'Università di Roma « La Sapienza ».

(**) Nella seduta del 14 gennaio 1984.

Il differenziamento *in vitro* degli elementi miogenici di somiti precoci sembra dipendente particolarmente da fattori ambientali (Ellison, 1969) e dai rapporti con il sistema nervoso (Peirone *et al.*, 1977); ma in certi stadi di sviluppo, anche l'integrità del tessuto prelevato sembra un fattore determinante; infatti mentre il differenziamento muscolare è stato ottenuto negli espianti di somiti integri prelevati da embrioni allo stadio 11 (Ellison, 1969), nelle colture di cellule dissociate si osserva solamente quando i somiti da dissociare sono prelevati da embrioni ad uno stadio di sviluppo molto più avanzato (Stokdale e Holtzer, 1961). Anche coltivando *in vitro* abbozzi di arto è stato osservato il differenziamento muscolare in espianti prelevati allo stadio 17 (Dienstmann *et al.*, 1974; Rutz e Hauscka, 1982), mentre solo allo stadio 21 cellule dell'arto dissociate e coltivate in «monolayer» sono capaci di dare cloni che si differenziano in miotubi (Bonner e Hauschka, 1974; Rutz e Hauschka, 1982). Quindi è stata avanzata l'ipotesi che almeno fino a questo stadio di sviluppo, sia necessaria l'integrità del tessuto per il differenziamento muscolare *in vitro* (Bonner e Hauschka, 1974).

L'assenza di differenziamento muscolare nelle colture «monolayer», in questi casi, più che al processo di dissociazione e randomizzazione degli elementi cellulari potrebbe essere legata alle condizioni di coltura; infatti nelle colture «monolayer» cellule omotipiche potrebbero non avere la possibilità di instaurare quelle interazioni ritenute necessarie per il differenziamento a stadi precoci di sviluppo (Moscona, 1975).

In questo lavoro si intende valutare sia l'influenza della dissociazione e randomizzazione delle cellule che l'importanza delle interazioni cellulari nelle prime tappe del differenziamento muscolare dei somiti coltivati *in vitro*.

MATERIALE E METODO

I somiti sono stati prelevati da embrioni di pollo allo stadio 18-19 H.H.; a questo stadio non ha ancora avuto inizio la fusione dei mioblasti (Przbylski e Blumberg, 1966).

Sono stati allestiti due tipi di colture: aggregati ed espianti.

Aggregati: I somiti sono stati dissociati con tripsina all'1% in CMF; la sospensione cellulare (5-6 milioni di cellule per ml) è stata trasferita in aliquote di 3 cc. in fiasche di Erlenmeyer da 25 cc. che sono state poste in un giratory shaker, a 70 rpm per le prime 24 ore, e a 90 per il periodo successivo (30 gg.) in termostato a 37°C.

Il mezzo di coltura era costituito da MEM (Minimum essential medium Eagle) con glutamina allo 0,1%, siero di cavallo al 10%, estratto embrionale di pollo al 2%, glucosio in proporzione di 600 mg%. L'estratto embrionale, al 50% in Gey, è stato preparato utilizzando embrioni di pollo di 9 gg. di incubazione ai quali era stato tolto il cervello e il midollo spinale. Il mezzo di coltura è stato rinnovato a giorni alterni.

Si sono ottenute in ogni fiasca diverse centinaia di sferule di cellule riaggregate di diametro variabile da 200 a 300 μ .

Espianti: I somiti sono stati tagliati in frammenti approssimativamente delle stesse dimensioni degli aggregati; i piccoli espianti sono stati coltivati in sospensione nelle fiasche di Erlenmeyer alla medesima velocità di rotazione e con lo stesso mezzo di coltura usato per gli aggregati.

Gli aggregati e gli espianti sono stati fissati dopo 15 e 30 gg. di coltura in liquido di Bouin e colorati con emallume — eosina e bleu Alcian.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Le osservazioni istologiche eseguite sugli aggregati di somiti dopo 15 gg. di coltura hanno messo in evidenza in tutte le sferule la presenza di miotubi multinucleati, alcuni dei quali provvisti solo di tre o quattro nuclei (Tav. I, fig. 2), altri con un numero più elevato (Tav. I, fig. 3). Alcuni miotubi presentano i nuclei disposti alla periferia. Si osservano anche miotubi sacciformi contenenti numerosi nuclei (miosacchi) (Tav. I, fig. 1). Si osservano inoltre elementi epiteliali organizzati in tubuli e vescicole. Gli epiteli di origine ectodermica formano a volte ampie corneificazioni; sono anche presenti elementi connettivali.

Le osservazioni eseguite dopo 30 gg. di coltura non mettono in evidenza un ulteriore differenziamento del muscolo e nel complesso la struttura degli aggregati non subisce modificazioni.

Le osservazioni eseguite sugli espianti dopo 15 giorni di coltura, rivelano che gli elementi muscolari si fondono e formano miotubi multinucleati come negli aggregati. Sono presenti, anche se in casi rari, fibre multinucleate provviste di una evidente striatura (Tav. I, fig. 4). Oltre a tubuli e vescicole epiteliali, epiteli corneificati ed elementi connettivali è stata osservata la presenza di noduli cartilaginei.

Negli espianti coltivati per 30 gg. non sono stati notati ulteriori segni di differenziamento muscolare.

Dai risultati ottenuti si evidenzia che allo stadio di sviluppo preso in esame (18-19 H.H.) il processo di fusione dei mioblasti si ottiene in coltura sia negli aggregati che negli espianti di somiti; la perdita dell'integrità del tessuto determinata dalla dissociazione, non sembrerebbe quindi influenzare il processo di fusione.

Di particolare interesse è, a nostro avviso, il differenziamento muscolare ottenuto negli aggregati, dove è stata rilevata la presenza di numerosi miotubi multinucleati, in relazione all'assenza di differenziamento muscolare osservata da Stockdale e Holtzer (1961) nelle colture «monolayer» ottenute da somiti prelevati da embrioni dello stesso stadio di sviluppo. Infatti dal momento che in ambedue i casi i somiti sono stati dissociati e le cellule disperse a caso, si può ritenere che la dissociazione e randomizzazione non interferiscano sulle capacità

differenziative degli elementi miogenici, ma potrebbe piuttosto essere importante valutare il ruolo delle interazioni cellulari che si possono instaurare nelle due diverse condizioni di coltura. Secondo alcuni Autori (Moscona, 1975; Solursh e Reiter, 1980) in colture di cellule dissociate provenienti da embrioni a stadi precoci di sviluppo, per ottenere il differenziamento è necessaria l'interazione di cellule omotipiche. Negli aggregati, diversamente dal « monolayer » si realizzano condizioni di coltura che consentono alle cellule di interagire e, raggruppandosi per effetto del sorting-out, raggiungere quella « massa critica » necessaria per il differenziamento. La necessità di una massa critica di cellule miogeniche per ottenere il differenziamento muscolare è stata messa in evidenza da Moscona (1961) in aggregati di abbozzi di arto e da noi confermata (Stefanelli *et al.*, 1982) in esperienze eseguite coltivando *in vitro* aggregati di embrioni interi di pollo.

Negli aggregati tuttavia non sono state osservate fibre striate mentre, anche se raramente, sono state osservate negli espianti, dove il tessuto conserva l'integrità dei rapporti. Si potrebbe quindi supporre che i rapporti intercellulari che si vengono a stabilire negli aggregati, mentre consentono la fusione, non sono sufficienti per il completamento del processo differenziativo, anche se non si può del tutto escludere l'interferenza della dissociazione e randomizzazione delle cellule.

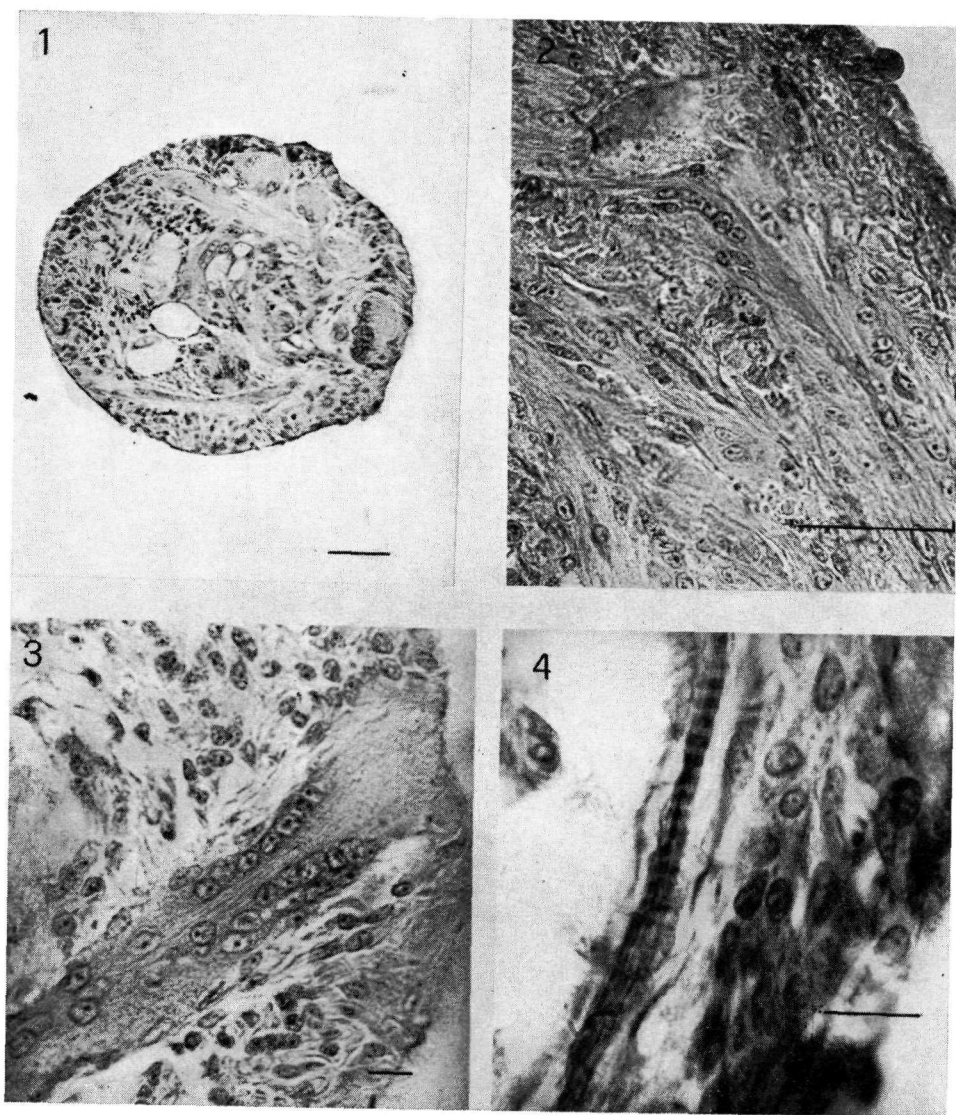
Inoltre per una valutazione più esatta dei risultati, va sottolineato che nel tentativo di eliminare altri fattori influenzanti il differenziamento, i somiti sono stati coltivati *in vitro* senza elementi nervosi e senza estratti di sistema nervoso. Numerosi studi infatti mettono in evidenza che il sistema nervoso, mentre non influenza direttamente il processo di fusione dei mioblasti, invece è indispensabile per una loro più attiva proliferazione e differenziazione, per la successiva maturazione dei miotubi e per la sopravvivenza del muscolo differenziato (Hunt, 1932; Peterson e Crain, 1970-1972; Giacobini-Robecchi *et al.*, 1975; Oh, 1975; Oh e Markelonis, 1979; Popiela, 1978; Bonner, 1978-1980).

I risultati da noi ottenuti mettono in evidenza che il differenziamento *in vitro* di miotubi e di fibre striate è indipendente dalla presenza del sistema nervoso. Si deve tenere però presente che, allo stadio da noi preso in esame, i somiti hanno già avuto contatti con il sistema nervoso (Filogamo e Sisto-Daneo, 1977), pertanto il differenziamento del muscolo, ottenuto nelle nostre colture potrebbe essere dipendente dal precedente rapporto. Questa ipotesi è avvalorata dalle esperienze di Peirone *et al.* (1977) che non hanno osservato nessun elemento muscolare differenziato, coltivando *in vitro* somiti prelevati a uno stadio di sviluppo (9-10 HH) più precoce di quello in cui è avvenuto questo contatto.

Nella valutazione dei risultati va considerato che sia negli espianti che negli aggregati di somiti, sono presenti oltre alle cellule miogeniche altri tipi cellulari (epiteliali, connettivali). Pertanto stiamo svolgendo ulteriori indagini per valutare le possibili influenze di questi tessuti sul differenziamento del muscolo. L'influenza della ectoderma è stata ipotizzata da Searls e Smith (1982) che coltivando *in vitro* abbozzi di arto hanno ottenuto il differenziamento del muscolo solo quando l'ectoderma non era rimosso.

BIBLIOGRAFIA

- BONNER P.H. (1978) - *Nerve-dependent changes in clonable myoblasts population*. « Dev. Biol. », 66, 207.
- BONNER P.H. (1980) - *Differentiation of chick embryo myoblasts is transiently sensitive to functional denervation*. « Dev. Biol. », 76, 79.
- BONNER P.H. e HAUSCHKA S.D. (1974) - *Clonal analysis of vertebrate myogenesis. I Early developmental events in the chick limb*. « Dev. Biol. », 37, 317.
- DIENSTMANN S.R., BIEHL J., HOLTZER S. e HOLTZER H. (1974) - *Myogenic and chondrogenic lineages in developing limb buds grown in vitro*. « Dev. Biol. », 39, 83.
- ELLISON M.L., EASTY G.C. e AMBROSE G.C. (1969) - *Myogenesis in chick embryo somites in vitro*. « J. Embr. exp. morph. », 21, 341.
- FILOGAMO G. e SISTO DANELO L. (1977) - *Nervous projections and myotome maturation*. « J. submicr. cytol. », 9, 307.
- GIACOBINI-ROBECCHI M.G., GIACOBINI G., FILOGAMO G. e CHANGEUX J.P. (1975) - *Effects of the type A toxin from Clostridium botulinum on the development of skeletal muscles and of their innervation in chick embryo*. « Brain Res. », 83, 107.
- HUNT E.A. (1. 32) - *The differentiation of chick limb buds in chorioallantoic grafts, with special reference to the muscles*. « J. exp. Zool. », 62, 57.
- MOSCONA A.A. (1961) - *Rotation-mediated histogenetic aggregation of dissociated cells. A quantifiable approach to cell interaction in vitro*. « Exp. cell Res. », 22, 455.
- MOSCONA A. (1975) - *Cell recognition, histotypic adhesion and enzyme induction in embryonic cells*. In « Extracellular matrix influences on gene expression » (H.C. Slavkin and R.C. Greulich Eds.), pp. 52-67. Acad. Press N.Y.
- OH T.H. (1975) - *Neurotrophic effects; characterization of the nerve extract that stimulates muscle development in culture*. « Exp. Neurol. », 46, 432.
- OH T.H. e MARKELONIS G.J. (1979) - *Neurotrophic effects of a protein fraction isolated from peripheral nerves on skeletal muscle in culture*. In « Muscle Regeneration », Eds. A. Mauro et al., pp. 417. Raven Press N.Y.
- PEIRONE S., SISTO DANELO L. e FILOGAMO G. (1977) - *Myogenic imprinting of early somites by nerve fibers in vitro*. « J. submicr. cytol. », 9, 311.
- PETERSON E.R. e CRAIN S.M. (1970) - *Innervation in cultures of fetal rodent skeletal muscle by organotypic explants of spinal cord from different animals*. « Zeit. Zellfor. », 106, 1.
- PETERSON E.R. e CRAIN S.M. (1972) - *Regeneration and innervation in cultures of adult mammalian skeletal muscle coupled with foetal rodent spinal cord*. « Exp. Neurol. », 36, 136.
- PRZYBYLSKI R. e BLUMBERG J.M. (1966) - *Ultrastructural aspects of myogenesis in the chick*. « Lab. Invest. », 15, 863.
- POPIELA H. (1978) - *Trophic effects of adult peripheral nerve extract on muscle cell growth and differentiation in vitro*. « Exp. Neurol. », 62, 405.
- RUTZ R. e HAUSCHKA S. (1982) - *Clonal analysis of vertebrate myogenesis. VII) Heritability of muscle colony type through sequential subclonal passages in vitro*. « Dev. Biol. », 91, 103.
- SEARLS R.L. e SMITH A.A. (1982) - *Evidence that ectoderm influences the differentiation of muscle in the limb of the embryonic chick*. « J. Exp. Zool. » 220, 343.
- SOLURSH M. e REITER R'S. (1980) - *Evidence of histogenic interactions during in vitro limb chondrogenesis*. « Dev. Biol. », 78, 141.
- STEFANELLI A., CATALDI E. e IERADI L.A. (1982) - *L'evoluzione architetturale di riaggregati di embrioni interi di pollo coltivati in vitro*. « Memoria Acc. Naz. Lincei ». ser. VIII, 17, 1.



STOCKDALE F. E. e HOLTZER H. (1961) – DNA *synthesis and myogenesis*. «Exp. Cell Res.», 24, 508.

YAFFE D., SHAINBERG A. e DYM. H. (1972) – *Studies on the prefusion stage during formation of multinucleated muscle fibers in vitro*. In: *Research in muscle development and the muscle spindle*, pag. 110. Eds. B.Q. Banker *et al.*, Excerpta Medica.

SPIEGAZIONE DELLA TAVOLA I

Fig. 1. – Aggregato di somite dopo 15 gg. di cultura. Barra = 50 μ .

Fig. 2. – Aggregato di somite dopo 15 gg. di cultura. Miotubo multinucleato. Barra = 50 μ .

Fig. 3. – Aggregato di somite dopo 15 giorni di cultura. Miotubo multinucleato. Barra = 10 μ .

Fig. 4. – Espianto di somite dopo 15 gg. di cultura. Miofibra striata. Barra = 10 μ .