
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

ALBERTO STEFANELLI, EMILIA CATALDI, LUISA ANNA
IERADI

**Morfogenesi di nefroni in aggregati di metanefro
embrionale di pollo in coltura in vivo e in vitro**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 78 (1985), n.6, p. 326–329.*
Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1985_8_78_6_326_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. — *Morfogenesi di nefroni in aggregati di metanefro embrionale di pollo in coltura in vivo e in vitro* (*). Nota di ALBERTO STEFANELLI, EMILIA CATALDI e LUISA ANNA IERADI, presentata (**) dal Socio A. STEFANELLI.

SUMMARY. — Reassembled spherules, obtained from cell suspension of scrambled metanephric kidney from a 11 day old chicken embryos, after mild centrifugation and subdivision of the sediment, where a part is cultured *in vitro*, reared into Erlenmayer flasks for 10 days in gyratory shaker, and the other *in vivo* after transplanted into allanto-chorion membrane of a host embryo of 8-9 days incubation and allowed to grow for 10 days.

Not only *in vivo*, with a good vascularization of the implant, but also *in vitro*, with the absolute absence of any blood vessel – and so completely isolated from any “inductive instruction from outside” – we ascertain not only histological differentiation of kidney cells but also the morphogenesis, according to the typical architectural pattern of nephronic elements of the kidney isosystem composed of convolute tubules and the Malpighian corpuscle. The most striking event is the morphogenesis of the glomerulus by podocytic immigration into the Bowman capsule without any capillary participation. But the grafts cultured *in vivo* show the need for the vascularization to complete the functional structure of the glomerulus: the kidney cells compel the capillaries of the host membrane to invade the glomerulus and thus perform the entangled union (now well known by electron microscopy) between podocytic and endenchymal cells. Only at this stage is it possible to discuss on functional activity, or better “prospectic” functional activity, of the reconstituted organ.

In precedenti lavori sulla riorganizzazione strutturale di riaggregati, per autoaggregazione, di embrioni interi di pollo disaggregati al terzo giorno e mezzo di incubazione, coltivati *in vitro*, in fiaschette di Erlenmeyer in *gyratory shaker* per oltre due mesi (Stefanelli e coll., 1980, 1982), abbiamo potuto constatare – e abbiamo comunicato i risultati nelle riunioni del 1981 e del 1983 del GEI – che il differenziamento specifico cito- e istologico si manifesta in modo assai elevato mentre non si è manifestata alcuna tendenza a formare abbozzi organotipici.

L'architettura pluricellulare che si è realizzata, in modo peculiare, era solo rispondente ad evidenti fattori di necessità fisica, imposti dalla forma e

(*) Lavoro eseguito nel Dipartimento di Biologia animale e dell'Uomo (ex Istituto di Anatomia comparata) della Università « La Sapienza » di Roma, con un contributo del C.N.R.

(**) Nella seduta del 28 giugno 1985.

dalle dimensioni degli aggregati, e di necessità biologica, derivati dalle esigenze metaboliche e di espletamento della funzione specifica per cui le cellule si sono differenziate.

Una causa di questa incapacità organoformativa, indipendentemente da fattori morfogeni, poteva dipendere dalla esiguità del materiale specifico (numero di cellule) contenuto in ogni sferula autoaggregata di diametro medio di 300–400 μ . Un'altra causa era da ritenersi legata alla obbligata distribuzione dei vari tipi cellulari secondo il gradiente di concentrazione centro-periferia della sferula, determinato dalla mancanza di vascolarizzazione e quindi dalla necessità degli scambi metabolici esclusivamente con il mezzo nutritivo esterno; in effetti, vascolarizzando le sferule con il loro trapianto su allanto-chorion, come abbiamo constatato (1983), si ripristina la normale seriazione delle matrici embrionali. Era inoltre attribuibile alla rete vascolare un effetto morfogenetico, anche inteso come semplice supporto meccanico, soprattutto in quegli organi dove i vasi non hanno solo una funzione nutritiva, ma sono strettamente integrati con il tessuto specifico per l'espletamento della specifica attività funzionale.

Per superare questi inconvenienti e per poter avere una migliore possibilità di valutazione degli eventi morfogenetici, ci siamo rivolti alla disgregazione di un organo specifico, quale è il rene embrionale metanefrico di pollo prelevato da embrioni di 11 giorni (Tav. I, fig. 1), i cui isosistemi, i nefroni, hanno una ben definita organizzazione strutturale e dove, soprattutto nella costituzione del glomerulo vi è una intima unione vascolare specializzata, necessaria all'espletamento della funzione specifica.

Abbiamo eseguito due tipi di riaggregazione: per autoaggregazione in sferule, tenute in sospensione con blanda agitazione; per aggregazione forzata con la costituzione di un sedimento (*pellet*) con la centrifugazione (Tav. I, figg. 2, 3). Il *pellet*, ridotto in frammenti di dimensioni simili a quelle delle sferule per autoaggregazione, veniva, o coltivato *in vitro* in fiasche rotanti (in *giratory shaker*, (1981), o trapiantato sulla membrana allanto-coriale di un embrione ospite al 7°–8° giorno di incubazione quando è raggiunta una buona vascolarizzazione della membrana. Poiché la permanenza del materiale trapiantato era condizionata dalla nascita del pulcino ospite, abbiamo limitato, per un più preciso confronto, le colture sia *in vivo* che *in vitro* a 10 giorni.

Negli autoaggregati si sono differenziati tuboli di epitelio cubico, come aveva già osservato Moscona (1962), ma non abbiamo mai osservato corpuscoli Malpighiani (Tav. II, fig. 4). Invece nei frammenti di sedimentazione forzata (*pellets*) coltivati *in vitro*, oltre a tuboli meglio organizzati in sistemi nefronici si sono potuti osservare abbozzi di corpuscoli Malpighiani. La Tav. II, fig. 5 mostra l'estremità di un tubolo contorto di epitelio cubico, dilatata, seppure modestamente, in una capsula di Bowman (di epitelio pavimentoso) entro cui si introflette una gemma di cellule epiteliali podocitiche, naturalmente non accompagnate da capillari (del tutto assenti *in vitro*). La morfogenesi del glomerulo è quindi indipendente dalla partecipazione vascolare.

Il diverso risultato tra autoaggregati e aggregati forzati può far supporre che nell'autoaggregazione vi sia già una segregazione e che non si uniscano tutti i tipi cellulari necessari per la morfogenesi del corpuscolo e che sono invece presenti nella aggregazione forzata.

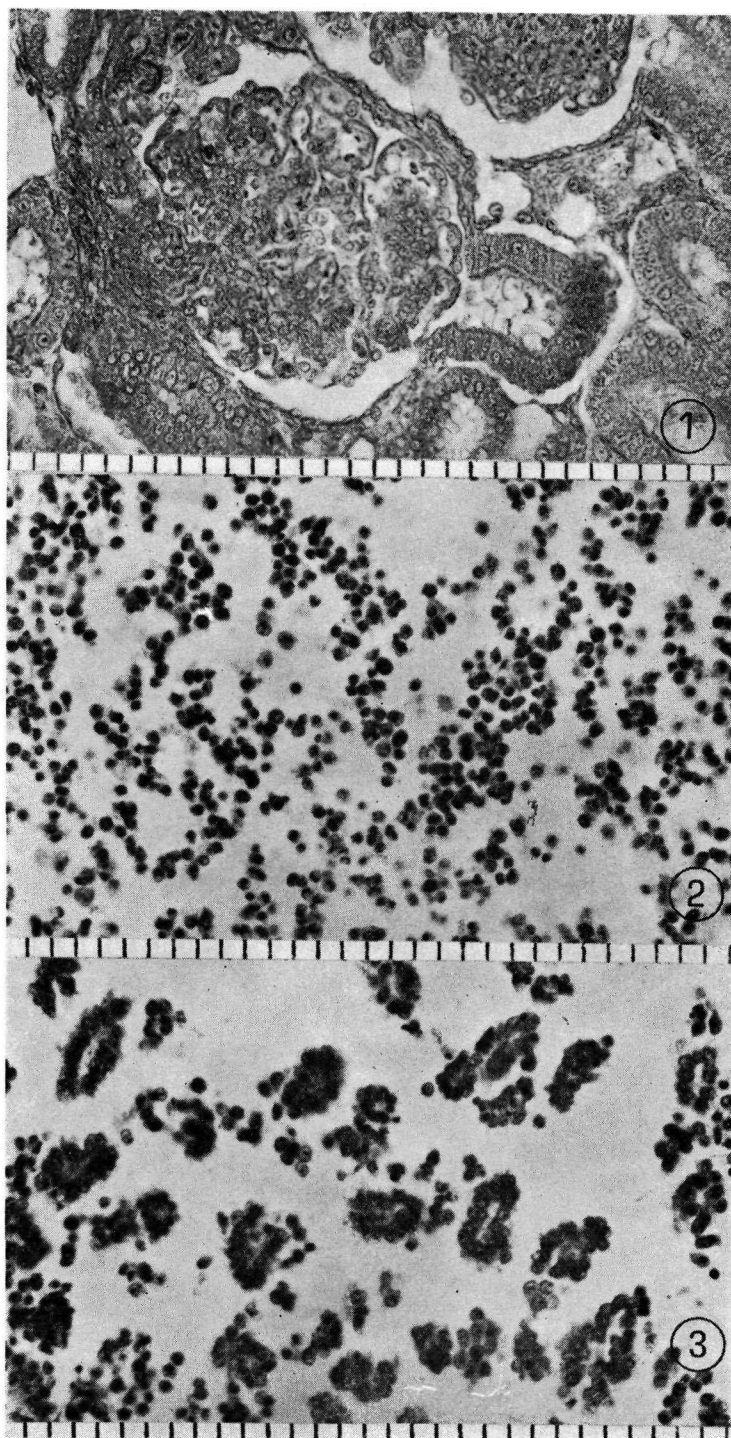
Il fatto fondamentale che deriva da queste esperienze è che le forze morfogenetiche che portano alla ricostituzione di isosistemi complessi, quali sono i nefroni metanefrici, sono intrinseche alle cellule renali, indipendenti dalla vascolarizzazione, e che sono ancora attive in elementi differenziati quali sono quelli del metanefro di embrioni di 11 giorni (Tav. I, fig. 1).

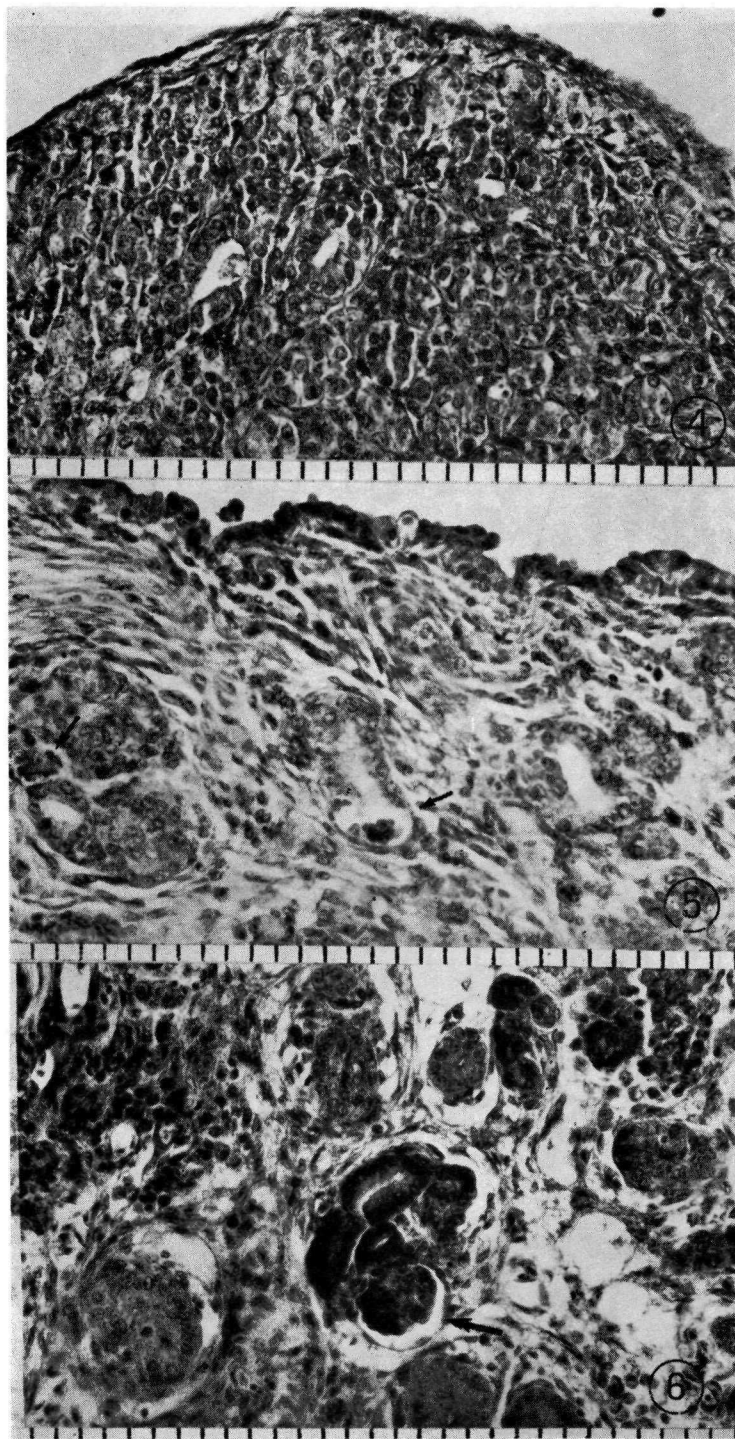
Un altro gruppo di aggregati derivati dalla frammentazione del sedimento di centrifugazione è stato trapiantato in allanto-corion di un embrione ospite di 7-8 giorni di incubazione, ma disgregando metanefro differenziato e non «... still largely in a blastematos state» (Weiss e Taylor, 1962).

In queste condizioni, la ricca vascolarizzazione ad opera dei vasi dell'ospite, ha permesso la morfogenesi di numerosi sistemi nefronici costituiti dal tubolo contorto e dal terminale corpuscolo di Malpighi (Tav. II, fig. 6). I corpuscoli sono più grandi di quelli ottenuti *in vitro* e il glomerulo si presenta organizzato per la penetrazione nell'interno della capsula di capillari (riconoscibili anche per la presenza di globuli rossi) in intima unione con i podociti. Tuttavia questi corpuscoli dopo 10 giorni di soggiorno sulla membrana allanto-coriale sono ben lungi dalle dimensioni già raggiunte dai corpuscoli normali al momento della disgregazione (Tav. I, fig. 1), ma ciò è spiegabile tenendo presente l'interruzione dello sviluppo provocata con la disgregazione.

Fatto importante è che la rete capillare non specializzata della membrana allanto-coriale sia stata indotta dalle cellule renali a penetrare nel glomerulo non per espletare solo una esigenza trofica, ma per adattarsi alle peculiari condizioni di rapporto con i podociti completando così quella organizzazione strutturale del fondamentale apparato di filtrazione emuntoria che solo così diviene adatto per una possibile funzione.

L'esperimento di Weiss e Taylor (1962) di trapianto di riaggregato di rene embrionale di pollo su membrana allanto-coriale, ha portato alla conclusione di una «... self-organization without instructive outside intervention». Questo è stato da noi ottenuto per riaggregati di cellule di metanefro differenziato, dimostrando che il « modello » del nefrone è raggiunto in coltura *in vitro* anche in completa assenza di vascolarizzazione. Nelle colture *in vivo* la vascolarizzazione, a spese dei vasi allanto-coriali, risulta « guidata » dalle cellule nefrogene. Pertanto, per il completo raggiungimento di una possibile attività funzionale specifica, occorre, per i riaggregati, l'intervento esterno della rete vascolare dell'ospite per il completamento della struttura filtrante del glomerulo, oggi ben nota dalle osservazioni substrutturali (vedi Rhodin, 1963, Elias, 1970), costituita dalla intima e caratteristica unione (Rodewald e Karnowsky, 1975), podociti-endenchima dei capillari. Anche così l'attività funzionale rimane solo « in prospettiva » essendo necessario l'inserimento dell'organo in un sistema organico con mutue relazioni normali.





BIBLIOGRAFIA

- ELIAS H. (1970) - *El glomerulo renal*. Wander Mexico city.
- MOSCONA A. (1952) - *Cell suspension from organ rudiments of chick embryo*. « *Exper. Cell Res.* », 3, 535.
- MOSCONA A. (1965) - *Recombination of dissociated cells and development of cell aggregate*. In « *Cell and tissue culture* ».
- RHODIN J. (1958) - *Electron microscopy of the kidney*. « *Amer. J. Med.* », 24, 661.
- RHODIN J. (1963) - *Atlas of ultrastructure*. Saunders Phil.
- RODEWALD R. e KARNOWSKY M.J. (1975) - *Porous substructure of the glomerular slit diaphragm in the rat and mouse*. « *J. Cell Biol.* », 60, 423-43.
- ROMANOFF A.L. (1960) - *The avian embryo* MacMillan.
- STEFANELLI A., IERADI L. e CATALDI E. (1980) - *Differentiation of reaggregates of whole chick embryo cultured in vitro*. « *Acta Embryol. Morphol. Exper. n.s.l.* », 59-71.
- STEFANELLI A., CATALDI E. e IERADI L. (1982) - *L'evoluzione architetturale di riaggregati di embrioni interi di pollo coltivati in vitro*. « *Mem. Acc. Naz. Lincei* », Ser. VIII, 17, 3-16.
- STEFANELLI A., CATALDI E. e IERADI L. (1983) - *Morphogenesis of whole chick embryos reaggregated spherules*. « *Acta Embryol. Morphol. Exper.* », n.s. 4, 213-214.
- WEISSP e TAYLOR A.C. (1960) - *Reconstitution of complete organs from single cell suspension of chick embryos in advanced stages of differentiation*. « *Proc. Nat. Ac. Sci.* », 46, 1177-1885.

SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE I-II

TAVOLA I

- Fig. 1. - Corpuscolo Malpighiano di embrione di pollo di 11 giorni di incubazione, al momento della disgregazione. Ogni tratto delle scale in calce alle figure = 10 μ .
- Figg. 2 e 3. - Stato delle cellule disgregate, filtrate e centrifugate dopo un'ora dalla fine della centrifugazione.

TAVOLA II

- Fig. 4. - Riaggregato autonomo, in blanda agitazione, dopo 10 giorni di coltura. Notare la presenza di tuboli di epitelio cubico. Ogni tratto della scala in calce = 10 μ .
- Fig. 5. - Riaggregato forzato con centrifugazione coltivato *in vitro* (in *giratory shaker*) per 10 giorni. Notare la formazione di tuboli renali e di abbozzi di corpuscoli Malpighiani, con glomeruli costituiti da soli elementi podocitici, per la assenza di vascolarizzazione.
- Fig. 6. - Riaggregato forzato con centrifugazione, trapiantato su membrana allanto-coriale di un embrione ospite (di 8 giorni di incubazione), fissato dopo 10 giorni. Notare la costituzione di nefroni con tubulo contorto e corpuscolo di Malpighi. Nel glomerulo sono penetrati capillari dell'ospite.