
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

ANNAMARIA ZACCHEI, FABIO NOBILI, GIUSEPPE GENTILI

**Analisi morfologica di aggregati di cellule embrionali
nervose e muscolari in coltura**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 80 (1986), n.4, p. 226–232.*
Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1986_8_80_4_226_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. — *Analisi morfologica di aggregati di cellule embrionali nervose e muscolari in coltura* (*). Nota di ANNAMARIA ZACCHEI, FABIO NOBILI e GIUSEPPE GENTILI, presentata (**) dal Socio A. STEFANELLI.

SUMMARY. — Nervous cells from chick embryo (6 $\frac{1}{2}$ days of incubation) spinal cord and muscular cells from quail embryo (9 days) and chick embryo (11 days) breast have been enzymatically dissociated and cultured in vitro in a giratory shaker. Myogenic cells were cultured for 2 days and then the spinal cord cells suspension was added to each flask. Control cultures of nervous or muscular cells alone were also set at the same density (7×10^6 cell/ml). A good differentiation was observed both in control cultures and in co-cultures of the two types of cells; thus indicating that in all cases factors necessary for differentiation are present in the medium. Some contacts between the two types of cells have been observed in mixed cultures; further observations (ultrastructural and histochemical) are in progress to provide a more complete picture of these contacts.

La dissociazione di tessuti embrionali in sospensione di singole cellule e la loro successiva riaggregazione in coltura è stata usata efficacemente come modello per lo studio del differenziamento sia del tessuto nervoso (vedi mon. di Moscona *et al.*, 1980; Stefanelli *et al.*, 1982) che del tessuto muscolare (vedi: Konigsberg, 1963; Yaffe, 1969; Garber, 1977; Crain, 1980; Inestrosa, 1982) coltivati da soli o misti, in una fase di sviluppo precoce o avanzata.

Le cellule isolate generalmente manifestano un alto grado di autonomia nella loro capacità di differenziare; nello studio delle cellule nervose e muscolari si è visto però che tale capacità è la conseguenza di un periodo di stretta dipendenza tra i due tessuti (Bonner, 1978, 1980).

Nella formazione di una sinapsi interviene durante l'embriogenesi, una complessa serie di interazioni tra le cellule nervose e il loro potenziale organo bersaglio (Bennett e Nurcombe, 1980; Bennett, 1983; Oh 1975, 1976; Oh e Markelonis, 1980). Queste interazioni possono essere anterograde (Changeux 1978; Sohal e Holt, 1983) come per esempio l'effetto del nervo sulla distribuzione e il metabolismo dei recettori nella membrana della cellula bersaglio, o viceversa retrograde; è stato infatti postulato per molti sistemi che la cellula bersaglio liberi fattori solubili dai quali il neurone dipende, oltretutto per la sua sopravvivenza, anche per la differenziazione biochimica e morfologica (Henderson *et al.*, 1981, Hsu *et al.*, 1982).

(*) La ricerca è stata eseguita nel Dipartimento di Biologia animale e dell'Uomo della Università di Roma « La Sapienza ».

(**) Nella seduta del 12 aprile 1986.

La formazione di connessioni sinaptiche ed il differenziamento del tessuto nervoso e dei neuroni sono stati studiati estesamente nel nostro laboratorio (per una bibliografia vedi Stefanelli, 1975, Stefanelli *et al.*, 1979), in particolare nella retina, nei glomeruli cerebellari, nei bulbi olfattori, ecc.

Queste ricerche hanno portato a concludere che la capacità di formare sinapsi sembra intrinsecamente acquisita al momento della determinazione istogenetica dei neuroblasti (Stefanelli, 1947); se le condizioni fisiche in cui avviene la coltura lo permettono, come in un aggregato, le sinapsi si formano indipendentemente da una specifica necessità funzionale che *in vitro* ovviamente manca.

La formazione di contatti tra elementi nervosi e fibre muscolari scheletriche è stata studiata in molti laboratori (Fischbach, 1974; Nelson, 1975; Shimada e Fischman, 1975; Fischbach *et al.*, 1976) con un notevole numero di sistemi differenti; essa è stata riconosciuta principalmente con metodi elettrofisiologici e diversi Autori hanno descritto potenziali sinaptici e potenziali di placca in miniatura in co-culture di cellule nervose e muscolari.

Morfologicamente contatti neuromuscolari, quali terminazioni assonali sui miotubi, sono state messe in evidenza con tecniche di impregnazione argentea da Shimada, Fischman e Moscona (1969), Shimada e Fischman (1973), Koenig (1973); aree di attività colinesterasica sulla membrana di cellule coltivate sono state identificate con metodi istochimici da Veneroni e Murray (1969); studi elettrofisiologici e ultrastrutturali sono stati compiuti da Nakajima *et al.* (1980). Bird (1981), osservazioni istochimiche e autoradiografiche da Koenig (1979).

In questa Nota riferiamo i risultati preliminari di una analisi sperimentale e descrittiva di cellule nervose e muscolari in aggregati di embrioni di quaglia e di pollo.

MATERIALI E METODI

Le cellule miogeniche sono state ottenute dalla dissociazione di muscoli pettorali di quaglia di nove gg. (st. 26 secondo la classificazione di Zacchei; 1961) e di pollo di undici gg. (st. 37 H.H.); le cellule nervose provenivano dal tratto cervico-toracico del midollo spinale di embrione di pollo di 6^{1/2} gg. (st. 29 H.H.).

I muscoli, liberati dai tessuti circostanti sono stati tagliati in piccoli pezzi e posti in una soluzione $< \text{Ca}$ e Mg (CMF) per 30', quindi in una soluzione di tripsina (Worthington, 3 $\times$ cristallizzata) allo 0,05%. Dopo incubazione per 30' a 37 °C l'azione della tripsina è stata bloccata aggiungendo siero di cavallo (GIBCO) alla concentrazione finale del 10%. Dopo accurati lavaggi in CMF i frammenti sono stati dissociati nel mezzo mediante ripetute aspirazioni con pipette Pasteur di diametro sempre più piccolo (0,1 mm), e la sospensione è stata filtrata attraverso un filtro di 30 mesh. Le cellule contaminate con la camera di Thoma-Zeiss, sono state diluite alla concentrazione finale di 7×10^6 per ml; 3 ml della sospensione posti in beute da 25 ml e gassate con CO_2 al 5% sono poste in un agitatore rotante a 70 rpm.

La dissociazione delle cellule nervose è stata ottenuta con la stessa tecnica.

Sono state preparate colture di soli mioblasti, di sole cellule nervose e miste. Queste ultime sono allestite in due tempi: prima sono preparate le colture di mioblasti; dopo 48 h, al momento di rinnovare il mezzo di coltura viene aggiunta Ara-C (D-arabinofuranosilcitosina) 10^{-5} M. Al successivo cambio, dopo altre 48 h la sostanza viene rimossa e sono aggiunte le cellule nervose appena dissociate.

Il mezzo di coltura è costituito da Dulbecco MEM mod. (GIBCO) 63%, siero di cavallo (GIBCO) 10%, estratto embrionale (EE- 9 gg. al 50% in GEY) 5%, Hank's 20%, glucosio al 20% 2 ml, glutamina 2 mM, penicillina 50 U/ml, streptomycin 50 µg/ml.

Le colture di soli mioblasti sono state allestite anche con il metodo di Oh (1975); in questo caso, l'EE è preparato con di embrioni privi di cervello e midollo, la soluzione di Hank's è dimezzata e il volume finale del mezzo è raggiunto con aggiunta di estratto di cervello embrionale di 12 gg.

Dopo 10 e 25 gg. di coltura gli aggregati sono stati fissati in liquido di Bouin e successivamente inclusi in paraffina; le sezioni di 7 e 10 µ sono state colorate con em. eosina, blu di toluidina, Bodian, tricromica di Gabe e Martoja.

RISULTATI

Al momento delle operazioni, cioè a 9 gg. di incubazione nella quaglia o a 11 nel pollo, i muscoli pettorali sono composti da mioblasti e da pochi miotubi contenenti non più di quattro nuclei.

Negli aggregati di cellule miogeniche fissati dopo 10 gg. di coltura, alla osservazione al microscopio ottico è possibile evidenziare fibre muscolari disposte prevalentemente nell'area periferica anche se non marginale dell'aggregato isolate o raggruppate in nidi più o meno eccentrici (Tav. I, fig. 1); fibre isolate possono ritrovarsi anche nella parte centrale o all'estrema periferia dell'aggregato (Tav. I, fig. 2). Le fibre muscolari risultano inserite in un complesso di elementi fibroblastici piuttosto lasso che costituisce la trama dell'aggregato. In quegli aggregati in cui le cellule fibroblastiche sono molto rade e disposte a costituire una sorta di trabecolatura contenente un essudato non strutturato le fibre muscolari sono particolarmente ben differenziate. Negli aggregati fissati dopo tempi di coltura più lunghi, fino a 25 gg., l'osservazione mostra numerosi fasci di fibre muscolari con striatura ben sviluppata e nuclei tipicamente periferici (Tav. II, fig. 1-4).

Negli aggregati di sole cellule nervose che, appena poste in coltura sono rotondeggianti e con le terminazioni troncate, si possono osservare cellule di grande varietà di forme (monopolari e multipolari) e dimensioni e la presenza di numerosi prolungamenti assonici che attraversano l'intero aggregato; in molti casi è evidente la formazione di plessi ad andamento circolare, simili a quelli che Stefanelli *et al.* (1982) hanno trovato negli aggregati che si costituiscono dalla dissociazione di embrioni interi al 3^{1/2} gg. di sviluppo. La fig. 3 (Tav. I) mostra un aggregato ottenuto dalla disgregazione del solo midollo spinale.

Gli aggregati che si ottengono da colture miste mostrano un aspetto particolare. Infatti abbiamo osservato che allorché si introducono nelle beutine contenenti aggregati muscolari già formati da 48 e 72 ore le cellule nervose, queste, anziché attaccarsi al bordo esterno a formare una corona tendono a produrre piccoli aggregati costituiti esclusivamente da elementi nervosi. Solo in un secondo tempo questi aggregati nervosi prendono contatto e si fondono in uno o più punti con quelli muscolari; la formazione dei veri aggregati misti si osserva in genere dopo 24 h.

L'osservazione dei preparati istologici mostra chiaramente (Tav. III, fig. 1-3) che le cellule nervose del midollo spinale inviano assoni che si insinuano tra le cellule muscolari, con vari aspetti di compenetrazione dei due tessuti. Le fibre nervose corrono lungo la fibra muscolare per un certo tratto. L'osservazione al microscopio ottico non consente di descrivere con maggior precisione il tipo di rapporto che si stabilisce tra i due elementi.

DISCUSSIONE

La tecnica delle colture in vitro come già detto, è stata molto usata per studiare lo sviluppo della cellula muscolare ed in particolare il modo in cui l'inervazione interviene nel suo differenziamento (Sohal et Holt, 1980).

Mentre in alcuni casi le cellule muscolari sono state dissociate meccanicamente o con trattamento enzimatico, in altri sono stati coltivati piccoli frammenti di tessuto muscolare di embrioni di pollo o di quaglia (Stockdale *et al.*, 1973; Peirone e Filogamo, 1980; Fremont *et al.*, 1983; ecc.).

Le colture formate da mioblasti dissociati e coltivati in piastra offrono una maggiore facilità di osservazione perché le cellule si sviluppano separatamente; alcuni autori ritengono però che queste condizioni siano troppo diverse da quelle in cui avviene lo sviluppo in vivo (Betz, 1976). Ugualmente discussa è l'azione dissociante degli enzimi in quanto certamente modifica la superficie mediante la quale le cellule stabiliscono rapporti tra loro; Bischoff (1979) ha comunque osservato che la tripsina mantiene le caratteristiche strutturali delle fibre muscolari.

Abbiamo utilizzato per queste nostre ricerche la tecnica della aggregazione perché essa consente alle cellule dissociate di ricostituire una struttura tridimensionale nella quale evidentemente esistono condizioni più « fisiologiche » che in un monostrato.

A 9 giorni di incubazione nella quaglia o a 11 nel pollo gli abbozzi muscolari sono già individualizzati dal loro primordio iniziale mentre le giunzioni neuromuscolari non sono ancora stabilite. Risulta peraltro dalle ricerche di Königsberg (1979) che i mioblasti di quaglia si sviluppano in vitro meglio di quelli del pollo e che i fibroblasti proliferano meno rapidamente. Le cellule muscolari che si differenziano nelle nostre colture da mioblasti di quaglia raggiungono infatti un livello di organizzazione strutturale simile a quello che si osserva nello sviluppo normale dopo la nascita.

Abbiamo usato il trattamento con Ara-C per bloccare il ciclo cellulare e prevenire la proliferazione di cellule che normalmente sono capaci di dividersi (cellule fibroblastiche e mioblasti); l'Ara-C è stata perciò aggiunta dopo 48 ore, quando cioè la fusione dei mioblasti è certamente avvenuta. Nelle colture nervose l'Ara-C riduce inoltre lo sviluppo della glia e permette la sopravvivenza selettiva di neuroni differenziati (Damberg *et al.*, 1978).

Per quanto riguarda gli aggregati misti, nei quali le cellule nervose sono state aggiunte alla coltura dopo 72/96 h dalla semina degli elementi muscolari abbiamo ottenuto aggregati da prima separati e successivamente fusi; va osservato a questo proposito che anche quando non si sono stabiliti rapporti morfologicamente identificabili, le cellule nervose sono comunque presenti nel mezzo ed avevano quindi presumibilmente rilasciato fattori influenzanti il differenziamento ed il mantenimento delle cellule muscolari. Negli aggregati di sole cellule muscolari lo stesso effetto è stato raggiunto per la presenza nel mezzo di coltura di estratto di cervello e midollo (Oh 1975, 1976).

In alcuni esperimenti preliminari avevamo tentato di stabilire fin dall'inizio una coltura mista dei due tipi cellulari (cellule miogeniche e neuroblasti); abbiamo però desistito dopo aver constatato che si verificava lo stesso inconveniente osservato da Shimada (1968) e da Nameroff e Holtzer (1969): quando una sospensione di cellule miogeniche viene messa in coltura in presenza di cellule eterotipiche (nervose, epatiche, cartilaginee, ecc.) la miogenesi appare infatti bloccata. Per ottenere una adeguata miogenesi è perciò necessario che le cellule muscolari siano coltivate da sole per 2-4 gg. prima di aggiungere le cellule nervose dissociate (Shimada e Fischman, 1973).

Nel complesso i risultati delle nostre osservazioni mostrano che i mioblasti ottenuti dalla dissociazione di muscolo pettorale possono esprimere in vitro alcuni dei loro aspetti caratteristici, indipendentemente dalla innervazione; riteniamo che ciò possa dipendere dal fatto che al momento dell'inizio della coltura (9 o 11 gg.) avevano già subito una determinazione sufficiente al successivo differenziamento e al mantenimento duraturo (almeno 25 gg., tempo massimo delle nostre osservazioni) della struttura differenziata.

Al fine di chiarire il tipo dei contatti neuromuscolari ed il momento della loro formazione ulteriori ricerche al ME, che prevedono anche lo studio istochimico della localizzazione della attività colinesterasica, sono attualmente in corso.

BIBLIOGRAFIA

- BENNETT M.R. (1983) - « *Physiol. Rev.* », 69, 917-1037.
BENNETT M.R., LAI K. and NURCOMBE V. (1980) - « *Brain Res.* », 190, 537-542.
BETZ W. (1976) - « *J. Physiol.* », 254, 63-73.
BIRD M.M. (1983) - « *Cell Tissue Res.* », 217, 647-659.
BISCHOFF R. (1979) - In: *Muscle Regeneration*, pp. 13-30, Raven Press-New York.
BONNER P.H. (1978) - « *Dev. Biol.* », 66, 207-219.
BONNER P.H. (1980) - « *Dev. Biol.* », 76, 79-86.

- CHANGEUX J.P. (1978) - In: *The Neurosciences Fourth Study Programm* (MIT Press, Cambridge, MA), pp. 749-748.
- CRAIN S.M. (1980) - In: *Tissue culture in Neurobiology*, 169-187, Raven Press, New York.
- DAMBERGS R., LEATT J. and KIDSON C. (1978) - « *Exp. Neurol.* », 59, 296-303.
- FISCHBACH G.D. (1974) - *The cell communication*. Cox R.P. and Willey J. and Sons eds., 43-66.
- FISCHBACH G.D., BERG D.K., COHEN S.A. and FRANK E. (1976) - « *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* », 40, The synapse, 347-357.
- FREMONT P.H., FOURNIER LE RAY C. and LE DOUARIN G.H. (1983) - « *Cell Differentiation* », 13, 325-339.
- GARBER B. (1977) - In: *Cell Tissue and organ cultures in Neurobiology* (S. Fedoroff and L. Hertz), pp. 515-537, Acad. Press.
- HENDERSON C.E., HUCHET M. and CHANGEUX J.P. (1981) - « *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)* », 78, 2625-2628.
- HSU L., NATYZAK D. and TRUPIN G.L. (1982) - « *J. Embryol. exp. Morphol.* », 71, 83-95.
- KOENIG J. (1973) - « *Brain Res.* », 62, 361-365.
- KOENIG J. (1979) - « *Biol. Cellulaire* », 35, 147-152.
- KONIGSBERG I.R. (1963) - « *Science* », 140, 1273-1284.
- KONIGSBERG I.R. (1979) - « *Methods in Enzymology* », 58, 511-521, W.B. Jakoby and I.H. Pastan (Acc. Press, New York).
- INESTROSA N.C. (1982) - « *Cell Struct. Funct.* », 7, 91-109.
- MOSCONA A.A., MAYERSON P., LINSEY P. and MOSCONA M. (1980) - In: *Tissue culture in Neurobiology*, 111-128, Raven Press-New York.
- NAKAJIMA Y., KIDIKORO Y. and KLIER G. (1980) - « *Dev. Biol.* », 77, 52-72.
- NAMEROF M. and HOLTZER H. (1969) - « *Dev. Biol.* », 19, 380-396.
- NELSON P.G. (1975) - « *Physiol. Rev.* », 55, 1-61.
- OH T.H. (1975) - « *Exp. Neurol.* », 46, 432-438.
- OH T.H. (1976) - « *Exp. Neurol.* », 50, 376-386.
- OH T.H. and MARKELONIS G.J. (1980) - « *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)* », 77, 6922-25.
- PEIRONE S.M., FILOGAMO G. (1980) - « *Arch. Anat. Micr. Morphol. Exp.* », 69, 81-90.
- SHIMADA Y., FISCHMAN D.A. and MOSCONA A.A. (1969) - « *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)* », 62, 715-721.
- SHIMADA Y., FISCHMAN D.A. (1973) - « *Dev. Biol.* », 31, 200-225.
- SHIMADA Y., FISCHMAN D.A. (1975) - « *Dev. Biol.* », 43, 42-61.
- SOHAL G.S., HOLT R.K. (1983) - « *Cell Tissue Res.* », 210, 383-393.
- STEFANELLI A. (1975) - « *Rend. Acc. Naz. Lincei* », ser. VIII, 59, 831-835.
- STEFANELLI A., ZACCHEI A.M., CATALDI E. and IERADI L.A. (1979) - « *Rend. Acc. Naz. Lincei* », ser. VIII, 65, 206-212.
- STEFANELLI A., CATALDI E. and IERADI L.A. (1982) - « *Memoria Acc. Naz. Lincei* », ser. VIII, sez. III, XVII, 1-16.
- STOCKDALE F.E. and O'NEILL M.C. (1973) - « *In vitro* », 8, 212.
- VENERONI G. and MURRAY M.R. (1969) - « *J. Embryol. exp. Morphol.* », 21, 369-382.
- YAFFE D. (1969) - « *Curr. Top. Dev. Biol.* », 4, 37-77.
- ZACCHEI A.M. (1961) - « *Arch. It. Anat. Embriol.* », 66, 36-62.

SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE I-III

TAVOLA I.

- Fig. 1. – Nido di cellule muscolari in un aggregato di pollo in coltura di 25 gg.
Fig. 2. – Cellula muscolare periferica in un aggregato di pollo in coltura di 25 gg.
Fig. 3. – Neurone motore in un aggregato di sole cellule nervose in coltura di 10 gg.

TAVOLA II.

- Fig. 1. – Aggregato di cellule muscolari di quaglia dopo 25 gg. di coltura.
Fig. 2-3-4. – Vari ingrandimenti della fig. 1.

TAVOLA III.

- Fig. 1. – Aggregato di cellule muscolari e nervose di quaglia in coltura da 25 gg. Le frecce indicano le fibre nervose penetrate tra le cellule muscolari.
Fig. 2. – Aggregato della fig. 1. Notare il contatto tra le fibre nervose e le cellule muscolari come indicato dalle frecce.
Fig. 3. – Aggregato di cellule muscolari e nervose in coltura di 25 gg. Numerose fibre muscolari.





