
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

IVAN BENEDETTI, MILENA MARINI

**Le cellule gangliari intraspinali nei Teleostei. - I.
Gambusia affinis**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 49 (1970), n.3-4, p.
223-228.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1970_8_49_3-4_223_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)

Biologia. — *Le cellule gangliari intraspinali nei Teleostei.* — I. *Gambusia affinis* (*). Nota (***) di IVAN BENEDETTI e MILENA MARINI, presentata dal Socio A. STEFANELLI.

SUMMARY. — The Rohon-Beard cells are not detected in the developing spinal cord of an ovoviviparous fish, *Gambusia affinis*. The lack of this embryonal sensitive system is supposed to be due to the development within the maternal body, the embryo being isolated from the external environment. In the cervical spinal cord of adult fishes some large dorsal neurons are found, similar to the "suprasedullary neurons" already described in other species of adult Teleosts.

Nei Pesci e negli Anfibi in sviluppo è nota la presenza di neuroni gangliari intraspinali comunemente denominati cellule di Rohon-Beard. Questi neuroni iniziano precocemente il loro differenziamento nella regione dorso-laterale del midollo spinale e quindi si portano nella tipica posizione dorso-mediale (cfr. Harrison [1]; Coghill [2]; Hughes [3]; De Filippis [4]; Marchesini e Marini [5]) ove spiccano per le cospicue dimensioni e per la forma simile a quella delle cellule gangliari. Ad un certo momento dello sviluppo le cellule di Rohon-Beard cominciano ad involversi e scompaiono prima che esso sia ultimato (cfr. Beard [6]; Harrison [1]; Nieuwkoop e Faber [7]; De Filippis [4]; Marchesini e Marini [5]).

Questi neuroni sono attualmente ritenuti di natura sensitiva; le ricerche di Coghill [2] su *Ambystoma*, indicano che essi assolvono la funzione sensoria (esterocettiva e propriocettiva) prima che si differenzino i gangli spinali. A conferma di ciò, in una ricerca condotta da uno di noi (Marchesini e Marini [5]) su di un altro anfibio urodelo (*Triturus cristatus*), è stato verificato che l'involuzione delle cellule di Rohon-Beard inizia appena i gangli spinali hanno raggiunto un certo grado di differenziamento.

Da questo schema generale si discostano i Teleostei, i quali presentano delle condizioni particolari che variano da specie a specie.

A) Alcuni gruppi (esempio i Salmonidi) presentano infatti tipici neuroni gangliari intraspinali transitori (o cellule di Rohon-Beard) il cui ciclo vitale si compie durante lo sviluppo con le modalità già accennate (cfr. Rohon [8]; Studnicka [9]; Van Gehuchten [10]; Johnston [11]; Harrison [1]; Insa-

(*) Ricerca eseguita nell'Istituto di Anatomia comparata dell'Università, via Berengario 14, 41100 Modena.

(***) Pervenuta all'Accademia il 29 ottobre 1970.

bato [12]). Di recente Tracy [13] ha segnalato la presenza di cellule di Rohon-Beard in *Opsanus tau* rilevando però, che esse hanno uno sviluppo inferiore rispetto a quanto osservato in altre specie; l'Autore, ha supposto che ciò fosse dovuto al fatto che gli embrioni sono protetti da involucri ovulari particolarmente robusti.

Weis [14] infine asserisce che in *Brachidanio rerio* il sistema sensorio dei giovani embrioni è costituito dalle cellule di Rohon-Beard; però gli elementi da lui interpretati come tali occupano una posizione atipica in quanto sono laterali ed extramidollari.

B) Altri gruppi di Teleostei presentano, invece, nel midollo spinale degli adulti, neuroni dorsali di aspetto gangliare, i quali diventano vieppiù voluminosi con l'età (cfr. Fritsch [15]; Tagliani [16]; Dahlgren [17]; Kolster [18]; Sargent [19]). Questi elementi, indicati come «neuroni sopramidollari» (cfr. Ariens Kappers, Huber e Crosby [20]), in alcune specie sono raccolti in uno o due gruppi a livello del midollo cervicale, in altre sono disposti in un'unica fila nella fessura dorsale, in altre, infine, costituiscono due file simmetriche rispetto al piano sagittale mediale; essi in ogni caso sono più voluminosi e addensati nella porzione rostrale del midollo spinale. I neuriti di queste cellule si portano ventralmente e penetrano nei fascicoli dorsali del midollo spinale, ma il loro ulteriore percorso è discusso. Gli Autori sono discordi sul significato funzionale di questi neuroni e sulla loro omologia con le cellule dorsali transitorie.

Come risulta da questa breve scorsa bibliografica, nei Teleostei, le cellule di Rohon-Beard sono state descritte solo in poche specie e non in tutte hanno aspetto e posizione tipica; inoltre la possibilità prospettata da alcuni Autori che questi neuroni possano persistere nell'adulto solleva dei dubbi sulla loro identità e sulla possibilità di attribuire loro quel significato funzionale che sembra accertato per le cellule di Rohon-Beard degli altri Anamni.

L'insieme di questi fatti ci ha indotto a prendere in esame il problema dei neuroni dorsali dei Teleostei con osservazioni embriologico-comparative su specie ovipare ed ovovivipare con diverso *habitat*.

Nella presente Nota vengono riferiti i risultati preliminari relativi ad un Teleosteo ovoviviparo di acqua dolce.

Ai fini della presente ricerca sono stati impiegati embrioni di lunghezze progressive (da 1,5 mm a 7,5 mm) di *Gambusia affinis* (Baird e Girard 1854) prelevati da femmine gravide allevate in laboratorio. Poiché un criterio di seriazione basato sulla lunghezza (l'unico possibile in questo caso) ha il nòto inconveniente che embrioni di uguali dimensioni possono presentarsi a stadi diversi della morfogenesi, ci siamo tutelati correlando le dimensioni alla morfologia esterna degli embrioni ed al differenziamento di alcuni organi.

Di ogni stadio sono stati fissati almeno 9 individui parte in Helly, parte in Bouin e parte in Sanfelice; sono stati inoltre fissati 6 giovani (12 gg. dopo la nascita) e 4 adulti.

Tutto il materiale, incluso in celloidina-paraffina, è stato sezionato in serie trasversali dello spessore di 5-10 μ . Oltre alle comuni colorazioni istologiche, quali l'emallume-cosina e il Mallory-Azan e all'impregnazione argentica secondo il metodo di Bodian, sono stati impiegati trattamenti istochimici quali il bleu di toluidina in mezzo tamponato (a pH 4,5) con controlli pretrattati in acido perclorico, il metodo del bleu di bromofenolo, la PAS-reazione e il metodo dell'ematossilina cromica-floxina di Gomori-Bargmann.

Sono stati inoltre esaminati per controllo alcuni embrioni e avanotti di Trota (*Salmo gairdneri* Richardson 1836) trattati con gli stessi metodi.

Le osservazioni da noi condotte si possono così riassumere:

In embrioni di *Gambusia* di 1,5 mm il midollo spinale presenta un canale endimale ampio ed è costituito quasi esclusivamente dallo strato mantellare, con cellule per lo più allungate e talora in attività mitotica; alla periferia, scaglionati a varie altezze, si distinguono per le maggiori dimensioni e l'aspetto dei nuclei (rotondeggianti e a cromatina meno compatta) elementi in incipiente differenziamento (Tav. I, fig. 1); alcuni di essi occupano una posizione molto dorsale, ma il loro aspetto e le loro dimensioni (diametro nucleare medio 5 μ) sono simili a quelli di elementi laterali e ventrali (diametro nucleare medio 5,3 μ).

Lo strato marginale, o velo, è rappresentato solamente da poche esili fibre. Le cellule dei gangli spinali hanno in massima parte raggiunto la sede tipica, ma conservano l'aspetto indifferenziato.

Negli embrioni di 3 mm il midollo spinale presenta il canale endimale più stretto; attorno allo strato mantellare si è costituito uno strato marginale che, abbastanza spesso nella porzione rostrale, va assottigliandosi caudalmente. Ai bordi dello strato mantellare si osservano numerosi elementi a vari stadi del differenziamento. Nella metà rostrale del midollo spinale (midollo cervicale e del tronco) qualche elemento voluminoso (circa una decina) è disseminato anche tra le cellule del grigio dorsale, dalle quali differisce, oltre che per le dimensioni (diametro nucleare medio 5,9 μ), simili a quelle dei grossi neuroni ventrali (diametro nucleare medio 6,1 μ), anche per l'aspetto vescicoloso del nucleo, per la presenza di un grosso nucleolo e per un alone perinucleare di sostanza basofila (Tav. I, fig. 2). Nei gangli spinali si osservano alcuni elementi in differenziamento, come lo denotano l'aspetto vescicoloso dei nuclei e la presenza di sostanza basofila; sono inoltre abbozzate le radici ventrali mentre non vi è traccia di quelle dorsali.

Nei successivi stadi di sviluppo (3,5 mm-7,5 mm) il midollo spinale si ispessisce progressivamente, soprattutto per l'aumento della sostanza bianca, mentre la sostanza grigia assume il disegno di una Y rovesciata, tipico dei Teleostei. Nella sostanza grigia spiccano per le cospicue dimensioni e l'abbondante sostanza basofila, oltre ai neuroni motori, anche alcuni elementi del grigio laterale e talora anche dorso-laterale che vanno interpretati come grosse cellule associative (Tav. I, fig. 3). Le altre cellule del grigio hanno dimensioni modeste e sostanza basofila scarsa.

Con il procedere del differenziamento, l'ampiezza del canale endomidollare si riduce progressivamente e viene ad assumere la forma circolare. Durante questo processo, nella regione dorso-midollare del midollo spinale si viene a formare una sorta di cuneo scarsamente colorato e di aspetto fibroso che si insinua tra il grigio dorsale; esso è presente lungo tutto il midollo, ma è ampio solo nella regione cervicale. L'esame dello sviluppo ha dimostrato che questa struttura è formata dalle cellule endomidollari della placca dorsale, le quali, a misura che il canale si restringe, si allungano e si assottigliano; tale processo interessa essenzialmente il prolungamento in rapporto con il canale endomidollare, che si riduce ad un sottile filamento, mentre i nuclei conservano pressappoco la posizione iniziale (in prossimità della membrana limitante esterna) ed il prolungamento sottonucleare resta largo e breve. Il citoplasma di queste cellule è cromofobo; i loro nuclei, di forma e dimensioni variabili (diametro nucleare medio compreso tra 4,8 e 5,7 μ), sono molto chiari e presentano un piccolo nucleolo. Tra le cellule endomidollari, oltre a piccoli elementi di probabile natura gliale, si osservano, nella regione cervicale, alcune cellule di piccole e medie dimensioni che, per l'aspetto dei nuclei e della sostanza basofila, risultano simili a quelle del grigio circostante. Tali elementi diventano più numerosi negli stadi avanzati e nei giovani inoltre, durante lo sviluppo, nella formazione dorso-midollare si insinuano dei vasi provenienti dalla contigua meninge (Tav. I, fig. 4).

Il differenziamento dei gangli spinali procede più lentamente rispetto al midollo e le radici dorsali divengono evidenti solo in embrioni di 4,5 mm.

In animali a 12 gg. dopo la nascita, la morfologia del midollo spinale ricorda più quella degli ultimi stadi embrionali che quella dell'adulto: infatti negli adulti di *Gambusia* si verifica un ulteriore aumento ed ispessimento di fibre e le cellule del grigio si distanziano. I tipi cellulari restano quelli già individuati al termine dello sviluppo, fatta eccezione per la regione cervicale ove, nella formazione dorso-midollare, riccamente vascolarizzata, spiccano alcuni neuroni rotondeggianti di dimensioni variabili: i più grossi di questi neuroni (diametro nucleare medio 7,1 μ) raggiungono le dimensioni dei più grossi neuroni motori (diametro nucleare medio 7,3 μ) e sono provvisti di abbondante sostanza basofila e di un grosso nucleolo (Tav. I, figg. 5 e 6).

In base ai risultati esposti, i dati più salienti si possono riassumere nei seguenti punti:

A) Nel midollo spinale di *Gambusia* a nessuno stadio di sviluppo si osservano neuroni i quali presentino le dimensioni, l'aspetto e la posizione che caratterizzano le cellule di Rohon-Beard. La possibilità che i pochi elementi voluminosi osservati tra il grigio dorsale degli embrioni più giovani (1,5-3 mm) siano cellule di Rohon-Beard in differenziamento (quando non hanno ancora raggiunto la posizione dorso-midollare) appare poco verosimile, poiché in tal caso avremmo dovuto individuare tali cellule negli stadi successivi, come abbiamo verificato negli embrioni di Trota; infatti in *Salmo gairdneri* le cellule di Rohon-Beard si distinguono oltre che per la forma e

la posizione tipica, specialmente per le dimensioni (diametro nucleare medio $10,2 \mu$), che sono nettamente superiori anche a quelle dei più grossi neuroni motori (diametro nucleare medio $7,7 \mu$). Non è neppure possibile supporre che in *Gambusia* le cellule di Rohon-Beard si involvano appena iniziato il differenziamento perché in questo caso avremmo dovuto trovare alcuni elementi in degenerazione nel grigio dorsale, cosa che non si verifica.

Siamo quindi portati a ritenere che gli elementi voluminosi disseminati nel grigio dorsale degli embrioni più giovani, siano i neuroblasti che si differenzieranno nei grossi neuroni associativi, individuati nei successivi stadi di sviluppo con la stessa localizzazione (Tav. I, fig. 3).

Da questi dati deriva che nel Teleosteo ovoviviparo da noi esaminato, le cellule di Romon-Beard sono assenti.

Questo reperto, che è nuovo per i Teleostei, trova riscontro in alcune osservazioni di Beard [21] le quali indicano uno sviluppo deficitario delle cellule di Rohon-Beard nei Selaci ovovivipari.

La rudimentazione o l'assenza delle cellule di Rohon-Beard in tutti i pesci ovovivipari finora esaminati, ribadisce che questi elementi costituiscono l'apparato sensorio dei giovani embrioni prima del differenziamento dei gangli spinali [5]. Solo su questa base si può spiegare come questi neuroni divengano superflui negli embrioni che, sviluppandosi nel corpo materno, sono isolati dagli stimoli esterni.

A questo proposito va ricordata un'osservazione di Tracy [13] la quale sembra indicare che anche nei Teleostei ovipari il sistema delle cellule di Rohon-Beard può avere uno sviluppo incompleto, qualora la presenza di spessi involucri ovarici riduca la percezione degli stimoli.

B) In *Gambusia*, durante il differenziamento del midollo spinale, le cellule ependimali dorsali si allungano e si assottigliano costituendo una sorta di cuneo che divarica il grigio dorsale. Una simile formazione è stata descritta da Insabato [12] nel midollo spinale degli avanotti di Trota, ove essa accoglie le cellule di Rohon-Beard.

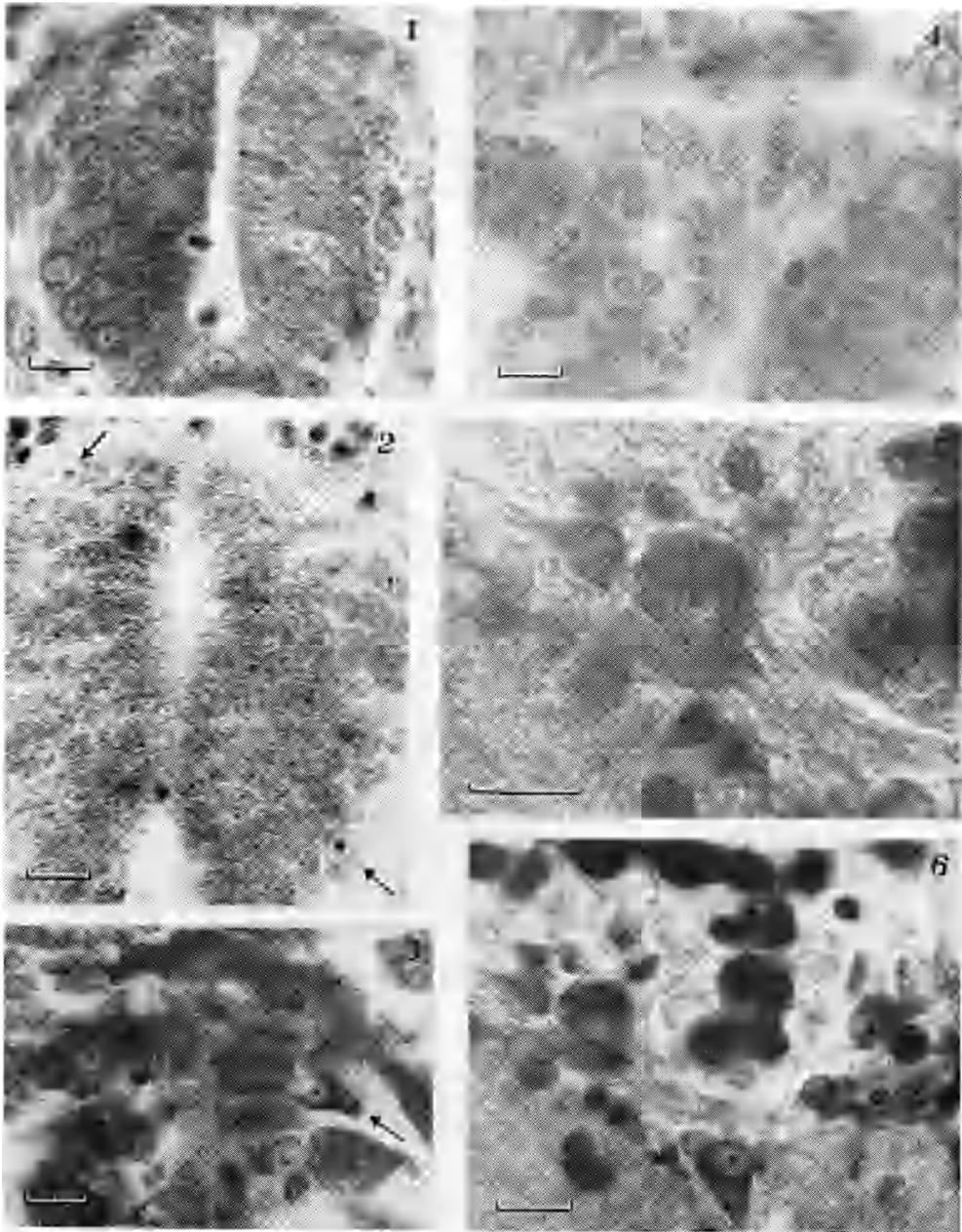
In *Gambusia*, invece, questa formazione è appariscente solo a livello del midollo cervicale ove, nel corso dello sviluppo compaiono degli elementi simili a quelli del grigio circostante, e nell'adulto sono chiaramente individuabili neuroni di medie (diametro nucleare medio $5,1 \mu$) e grandi (diametro nucleare medio $7,1 \mu$) dimensioni; questi hanno forma rotondeggiante e sono provvisti di abbondante sostanza basofila. La posizione e l'aspetto morfologico di tali cellule ricordano i « neuroni sopramidollari » descritti in altre specie di Teleostei adulti.

Sono in corso osservazioni intese a precisare la morfologia dei neuroni dorsali di *Gambusia* durante il loro differenziamento; infatti, individuare la natura di questi neuroni riveste un certo interesse poiché, essendo *Gambusia* priva di cellule di Rohon-Beard, la presenza di neuroni sopramidollari nell'adulto dimostrerebbe che i due tipi di cellule non sono omologhi, nonostante presentino qualche somiglianza riguardante la sede e l'aspetto morfologico.

BIBLIOGRAFIA

- [1] HARRISON R. G., « Arkiv mikr. Anat. Entwick. », 57, 354-444 (1901).
[2] COGHILL G. E., « J. Comp. Neurol. », 24, 161-233 (1914).
[3] HUGHES A., « J. Anat. », 91, 323-338 (1957).
[4] DE FILIPPIS S., « La Ric. Sci. », 28, 967-972 (1958).
[5] MARCHESINI D. e MARINI M., « Rend. Acc. Naz. Lincei », Ser. VIII, 45, 84-89 (1968).
[6] BEARD J., « Proc. Roy. Soc. » (London), 46, 108-118 (1889); « Anat. Anz. », 7, 191-206 (1892); « Zool. Jahrb. » (Abt. f. Anat.), 9, 319-426 (1896).
[7] NIEUWKOOP P. D. e FABER J., *Normal table of Xenopus laevis (Daudin), A systematical and chronological survey of the development from the fertilized egg till the end of metamorphosis* (North-Holland Pu. Co., Amsterdam, 1967).
[8] ROHON J. V., « Sitz. Ber. Akad. » (Munchen), 14, 39-57 (1884).
[9] STUDNICKA F. K., « Sitz. ber. Kön. Gesell. Wiss. Math. Nat. », 51, 1-32 (1895).
[10] VAN GEHUCHTEN A., « Bull. Acad. Roy. Sci. » (Belg.), 30, 495-519 (1895); 34, 24-38 (1897).
[11] JOHNSTON J. B., « J. Comp. Neurol. », 10, 375-381 (1900).
[12] INSABATO L., « Arch. Ital. Anat. Embriol. », 18 (Suppl.), 11-28 (1922).
[13] TRACY H. C., « J. Neurol. », 116 291-315 (1961).
[14] WEIS J. S., « J. Embryol. exp. Morph. », 19, 109-119 (1968).
[15] FRITSCH G., « Sitz. Ber. Akad. » (Berlin), 2, 1145-1151 (1884); « Arch. mikr. Anat. Entw. Mech. », 27, 13-31 (1886).
[16] TAGLIANI G., « Monit. Zool. Ital. », 5, 248-258, (1894); « Boll. Soc. Nat. » (Napoli), 9, 60-69 (1895); « Monit. Zool. Ital. », 8, 264-275 (1897); « Anat. Anz. », 15, 234-237 (1898).
[17] DAHLGREN U., « Anat. Anz. », 13, 281-293 (1897); « J. Comp. Neurol. », 8, 177-179 (1898).
[18] KOLSTER R., « Anat. Anz. », 14, 250-253 (1898).
[19] SARGENT P. E., « J. Comp. Neurol. », 8, 183-194 (1898); « Anat. Anz. », 15, 212-225 (1899).
[20] ARIENS KAPPERS C. U., HUBER G. C. e CROSBY E. C., *The comparative anatomy of the nervous system of Vertebrates, including Man.* (Hafner Pu. Co., New York, 1960).
[21] BEARD J., « Anat. Naz. », 12, 371-374 (1896).

A. ROSSI-FANELLI e B. FINZI



Midollo spinale in embrioni di *Gambusia* di 1,5 mm (fig. 1), 3 mm (fig. 2), e 4 mm (fig. 3);
formazione dorso-mediata del midollo spinale cervicale in giovani (fig. 4) e adulti (fig. 5 e 6).
(Nella fig. 2 sono indicati un neuroblasto dorsale ed uno ventrale; nella fig. 3 una grossa
cellula associativa dorsale).

(Ogni tratto in calce alle figure = 10 μ).