

---

ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI  
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI  
**RENDICONTI**

---

SERGIO FILONI, VITO MARGOTTA

**Ulteriore contributo allo studio sul determinismo  
della stratificazione del tetto ottico degli Anfibi anuri  
durante il processo rigenerativo: asportazione totale  
del mesencefalo in larve di Rana dalmatina e di  
Rana esculenta**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,  
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 53 (1972), n.1-2, p.  
221-226.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<[http://www.bdim.eu/item?id=RLINA\\_1972\\_8\\_53\\_1-2\\_221\\_0](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1972_8_53_1-2_221_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.** — *Ulteriore contributo allo studio sul determinismo della stratificazione del tetto ottico degli Anfibi anuri durante il processo rigenerativo: asportazione totale del mesencefalo in larve di Rana dalmatina e di Rana esculenta* (\*). Nota (\*\*) di SERGIO FILONI e VITO MARGOTTA, presentata dal Socio A. STEFANELLI.

SUMMARY. — Removal of the whole midbrain was performed in larvae of *Rana dalmatina* at stage 32 and of *Rana esculenta* at stage 33 (according to Manelli and Margaritora).

The results show that the regeneration of the mesencephalon and particularly of the optic tectum is possible also from non-mesencephalic regions and is accomplished by pluripotent elements the determination and differentiation of which take place during the regenerative process.

#### INTRODUZIONE

In precedenti ricerche sulla rigenerazione del mesencefalo in larve di varie specie di Anfibi anuri (*Xenopus laevis*, *Discoglossus sardus*, *Rana esculenta*), sottoposte ad asportazione unilaterale di questo settore del neurasse, è stata dimostrata una rigenerazione pressoché totale della parte asportata (Filoni, 1964, 1969; Filoni e Margotta, 1970, 1972).

In particolare, il tetto ottico neoformato che rigenera soprattutto a spese degli elementi endodermici situati nel tetto ottico residuo (Filoni, 1968 *a*), presenta una tipica organizzazione in strati. Tale stratificazione si realizza per gradi, in seguito alla migrazione degli elementi del grigio periventricolare dall'interno verso l'esterno ed inizia in concomitanza con l'arrivo delle fibre al tetto ottico rigenerante. Tuttavia questo processo di stratificazione non è esclusivamente determinato dalle fibre ottiche che rappresentano l'afferente tectale più cospicua, poiché anche in loro assenza il tetto ottico rigenerato, malgrado presenti una notevole ipoplasia (particolarmente accentuata negli strati più esterni), si stratifica ugualmente (Filoni, 1968 *b*; Filoni, Gibertini e Margotta, 1972). D'altra parte, questo processo non è neppure dovuto ad una proprietà intrinseca degli elementi tectali ad organizzarsi in strati, poiché si è constatata la rigenerazione di un tetto ottico stratificato anche quando, come si verifica in seguito ad asportazione bilaterale dei lobi ottici, esso rigenera a spese di regioni mesencefaliche non tectali (toro semicircolare e corpo mesencefalico) (Filoni, 1968 *b*; Filoni, Margotta e Gibertini, 1972).

Ciò induce a ritenere che la rigenerazione del tetto ottico avvenga a spese di elementi indeterminati che subiscono la determinazione ed il differenzia-

(\*) Ricerca eseguita nell'Istituto di Anatomia comparata « G. B. Grassi » dell'Università di Roma con un contributo del Consiglio Nazionale delle Ricerche.

(\*\*) Pervenuta all'Accademia il 26 luglio 1972.

mento durante il processo rigenerativo. Fino a che punto tali elementi sono «totipotenti»? Elementi provenienti da regioni non mesencefaliche possono dare una struttura di tipo tettale, una volta che si trovino in territorio mesencefalico?

Volendo chiarire questi interrogativi, abbiamo sottoposto larve di differenti specie di Anfibi anuri (*Xenopus laevis*, *Bufo bufo*, *Rana dalmatina*, *Rana esculenta*) ad asportazione totale del mesencefalo per stabilire la natura del rigenerato, nel caso si fossero verificati anche dopo un così drastico intervento fenomeni rigenerativi cospicui.

In questa Nota preliminare esporremo i primi risultati di cui disponiamo relativi alla *Rana dalmatina* ed alla *Rana esculenta*.

#### MATERIALE E METODO

La presente ricerca è stata eseguita su larve di *Rana dalmatina* Bonaparte allo stadio 32 e di *Rana esculenta* L. allo stadio 33, ottenute dallo sviluppo di uova raccolte nei dintorni di Roma. Lo stadio larvale è stato determinato secondo le tavole di sviluppo di Manelli e Margaritora (1961). Le larve sono state operate di asportazione totale del mesencefalo, lasciando *in situ* l'infundibolo e l'ipofisi.

Le operazioni, eseguite su animali non anestetizzati, sono state compiute al binoculare da dissezione con l'ausilio di pinzette da orologiaio, sottilissimi aghi di tungsteno e forcicette da iridectomia.

Sono stati operati 65 individui di *Rana dalmatina* e 20 individui di *Rana esculenta*. Inoltre 5 individui di *Rana dalmatina* sono stati fissati subito dopo l'intervento per controllare che l'asportazione del mesencefalo fosse totale (Tav. I, fig. 1).

Dopo l'intervento tutte le larve sono state tenute alla temperatura ambiente (20-25° C) in acqua abbondantemente aereata e nutrita, a partire dal 3° giorno post-operatorio, con lattuga bollita.

Le larve operate sono state sacrificate dopo 30-50-55 giorni dall'intervento. Tutte le fissazioni sono state compiute in Bouin. Le sezioni trasversali seriate, di 8-10  $\mu$  di spessore, sono state colorate con emallume-eosina.

#### RISULTATI

##### *Rana dalmatina*.

Dopo 30 gg. dall'operazione (8 casi).

In sei casi, in corrispondenza della regione mesencefalica, si osserva una vasta cavità ventricolare delimitata da una parete di diversa natura e di diverso spessore. Infatti la sua porzione più ventrale è costituita dalla regione infundibolare residua, mentre le porzioni intermedia e dorsale sono neoformate. Quella intermedia, corrispondente al corpo mesencefalico, è notevolmente ispessita ed è formata, oltre che da numerosi elementi neurali, anche da scarsa

sostanza bianca periferica; quella dorsale, corrispondente al tetto ottico, è molto assottigliata ed in alcuni punti è costituita esclusivamente da un monostrato di elementi neurali ed in altri dalla sola pia madre primitiva che delimita completamente tutta la regione neoformata e deriva principalmente dalla pia madre primitiva della porzione infundibolare residua (Tav. I, figg. 2, 3 e 4).

In un altro caso il volume della regione rigenerata è molto più considerevole rispetto ai casi precedenti ed anche la lamina tettale è molto ispessita. Essa risulta costituita, oltre che da un abbondante grigio periventricolare, anche da sostanza bianca periferica. In essa si osservano numerosi elementi che, distaccatisi dal grigio periventricolare, sono migrati verso l'esterno e che partecipano alla costituzione dei primordi degli strati tettali più esterni (Tav. I, fig. 5).

Nell'ottavo caso, infine, dorsalmente alla regione infundibolare residua si è costituito un rigenerato anomalo, volumetricamente molto esiguo, delimitato dorsalmente da una tela corioidea.

Dopo 50 gg. dall'operazione (9 casi).

Mentre nella maggior parte dei casi sacrificati dopo 30 giorni dall'intervento la regione infundibolare contribuisce, unitamente alla porzione rigenerata, alla formazione di una parete ventricolare che delimita un unico ampio ventricolo, negli encefali fissati dopo 50 giorni dall'operazione si osserva, in corrispondenza dell'area operata, una netta delimitazione tra l'infundibolo, (la cui cavità ventricolare non è più unita a quella mesencefalica, ma rappresenta una continuazione caudale della porzione ventrale del III ventricolo) e la regione mesencefalica neoformata.

In quattro casi il rigenerato ha una struttura chiaramente mesencefalica ed è possibile fare una netta distinzione tra la regione tegmentale e la regione tettale. Nella prima, costituita, procedendo verso l'esterno, oltre che dal grigio periventricolare anche da file di cellule e fibre che si continuano con gli strati tettali più interni e da cospicua sostanza bianca periferica, si riscontrano sovente aree profondamente anomale che presentano protrusioni di cellule e fibre nella cavità ventricolare e numerosi ventricoli soprannumerari, in genere circondati da ependima. Nella regione tettale si sono costituiti tutti gli strati tipici nell'intera estensione del rigenerato (Tav. I, fig. 6). In un caso (dei quattro suddetti) si è formato un unico lobo ottico impari mediano (Tav. II, fig. 7).

In altri tre casi, mentre la regione tegmentale è simile a quella riscontrata nei quattro casi precedentemente descritti, la stratificazione del tetto ottico non è ancora completa, specie in corrispondenza del polo posteriore del lobo ottico, dove si osservano solo gli strati tettali più esterni: *stratum opticum* (9), *stratum fibrosum et griseum superficiale* (8), *stratum album centrale* (7).

Nei rimanenti due casi, la rigenerazione è meno notevole, specie a livello della regione tettale che risulta ancora costituita da grigio periventricolare e da sostanza bianca periferica.

In tutti i casi esaminati si è riscontrata una notevolissima attività mitotica a livello del polo posteriore dei due lobi ottici (Tav. II, fig. 8).

*Rana esculenta.*

Dopo 30 gg. dall'operazione (5 casi).

In tutti i casi esaminati, dorsalmente alla regione infundibolare, si è venuto a formare un rigenerato volumetricamente piuttosto esiguo, la cui cavità ventricolare, che ricorda come forma la fossa romboidale è delimitata dorsalmente da una tela corioidea (Tav. III, fig. 9). La porzione basale del rigenerato è formata, oltre che dal grigio periventricolare, anche da abbondante sostanza bianca disseminata di numerose cellule. In un caso, la struttura di tale porzione ha raggiunto una organizzazione più complessa, molto simile a quella riscontrabile nel corpo del mesencefalo di una larva normale.

Dopo 55 gg. dall'operazione (3 casi).

In questi casi il rigenerato ha un volume più considerevole e dorsalmente non è delimitato da una tela sterile, ma da una sottile parete costituita da grigio periventricolare e da scarse fibre periferiche. In tutti i tre casi esaminati a livello di questa regione dorsale non si è mai riscontrata una organizzazione in strati neppure incipiente.

## DISCUSSIONE

I dati riportati nella presente Nota dimostrano che, dopo asportazione totale del mesencefalo, si può avere un rigenerato che, malgrado si presenti profondamente anomalo, manifesta una struttura chiaramente mesencefalica. In particolare, a livello del tetto ottico è possibile osservare la neoformazione di tutti gli strati tettali.

Malgrado non sia stato compiuto un accurato studio dell'attività mitotica a livello della regione diencefalica e romboencefalica, le osservazioni fatte in questo lavoro ci inducono a ritenere che il maggior contributo alla rigenerazione della parte asportata sia fornito dalla regione infundibolare residua. Esperienze in corso, concernenti l'asportazione oltre che dell'intero mesencefalo anche dell'infundibolo, contribuiranno a chiarire il problema.

In una prima fase del processo rigenerativo, la vasta cavità che si è venuta a creare nella sede di asportazione risulta delimitata dalla pia madre primitiva, cui si accollano elementi neurali in continuità con l'ependima che tappezza la cavità infundibolare. Successivamente la regione infundibolare si separa nettamente da quella neoformata ed in quest'ultima si viene a distinguere una porzione tegmentale ed una tettale. Il differenziamento del tetto è più tardivo di quello del tegmento. Infatti fino a 30 giorni dall'intervento la lamina tettale risulta costituita dal solo grigio periventricolare e da sostanza bianca periferica; la netta separazione degli strati del tetto è ben visibile solo intorno al cinquantesimo giorno post-operatorio.

La rigenerazione di una regione con struttura chiaramente mesencefalica è più frequentemente riscontrabile in *Rana dalmatina* che in *Rana esculenta*. In quest'ultima specie, infatti, soprattutto nei casi fissati dopo 30 giorni dall'operazione, dorsalmente alla regione infundibolare si è osservata la formazione di un piccolo rigenerato con una cavità ventricolare, paragonabile per

forma alla fossa romboidale, delimitata dorsalmente da una tela corioidea. Tale tipo di struttura è interpretabile come un rigenerato mesencefalico abortivo in cui si è formato solo un primordio della base del mesencefalo, mentre dorsalmente non si è costituita una lamina tettale, ma una tela corioidea su cui non si sono disposti i neuroblasti provenienti dalle regioni residue.

Asportazioni totali di regioni encefaliche negli Anfibi allo stato larvale sono state compiute da Srebro (1959, 1961) allo scopo di studiare l'influenza delle varie regioni encefaliche sullo sviluppo degli Anuri. Tale Autore ha completamente asportato in larve di *Xenopus laevis* o il telencefalo o il diencefalo. In entrambi gli esperimenti non ha osservato una rigenerazione della parte asportata, ad esclusione di tre casi in cui ha constatato una qualche rigenerazione del lobo olfattorio, del pallio o del setto. Tuttavia, bisogna rilevare che negli esperimenti suddetti non era stato asportato l'organo olfattorio e che Weissfeiler (1924), sperimentando su Axolotl e Tritoni, aveva osservato che il nervo olfattivo residuo diveniva la sede di una rigenerazione centripeta che determinava la neoformazione di un nervo olfattivo il quale, prima di mettersi in connessione con gli emisferi telencefalici, conteneva già dei neuroblasti, evidentemente migrati dalla mucosa olfattoria.

Dalla nostra ricerca è chiaramente emerso che, qualora sia possibile ottenere la realizzazione di un processo rigenerativo, anche dopo asportazione totale di una regione encefalica, come si verifica per il mesencefalo, la struttura del rigenerato non dipende dalla provenienza degli elementi a carico dei quali si attua la rigenerazione, ma dal territorio in cui essi migrano. Ciò dimostra che la rigenerazione dell'encefalo degli Anfibi anuri allo stato larvale avviene ad opera di elementi totipotenti, classificati da Stefanelli (1960) come elementi a « determinazione tardiva », la cui determinazione ed il cui differenziamento avvengono durante il processo rigenerativo.

Holtzer (1951), in uno studio sulla rigenerazione del midollo spinale in seguito ad asportazione unilaterale, in embrioni di varie specie di Anfibi urodela, giunge alla conclusione che la rigenerazione della parte asportata avviene ad opera di cellule già determinate che, dopo essersi attivamente moltiplicate, si differenziano non secondo la sede che vengono ad occupare, ma secondo il proprio destino. Questo Autore ha infatti osservato che quando la parte rigenerata derivava dalla regione dorsale del lato intatto, essa era priva delle cellule motorie; l'assenza delle cellule sensitive si verificava quando la rigenerazione avveniva a spese della porzione ventrale. Holtzer ha anche constatato che la capacità del lato intatto a fornire i vari tipi cellulari decresce con l'età dell'embrione al momento dell'operazione, secondo un ordine ben preciso, diverso per i vari neuroni.

Dal confronto tra i nostri dati e quelli ottenuti da Holtzer, emerge la netta differenza delle modalità con cui si attua la rigenerazione nell'embrione e nella larva. Nell'embrione si ha una condizione prevalentemente a mosaico, determinata dall'influenza dell'azione induttrice in atto. Nella larva, la persistenza di elementi totipotenti consente all'organismo possibilità morfogenetiche paradossalmente maggiori che permettono di reintegrare, ove possibile, l'equilibrio perduto.

## BIBLIOGRAFIA

- FILONI S., « Rend. Acc. Naz. Lincei », ser. VIII, 37, 521 (1964).  
 FILONI S., « Rend. Acc. Naz. Lincei », ser. VIII, 45, 90 (1968 a).  
 FILONI S., « Boll. Zool. », « Atti XXXVII Convegno U.Z.I. », 35, 396 (1968 b).  
 FILONI S., « Arch. Ital. Anat. e Embriol. », 74, 89 (1969).  
 FILONI S. e MARGOTTA V., « Arch. Ital. Anat. e Embriol. », 75, 171 (1970).  
 FILONI S. e MARGOTTA V., « Rend. Acc. Naz. Lincei », ser. VIII, 52, 228 (1972).  
 FILONI S., GIBERTINI G. e MARGOTTA V., « Arch. Ital. Anat. e Embriol. », 77, 1 (1972).  
 FILONI S., MARGOTTA V. e GIBERTINI G., « Monit. Zool. Ital. », (1972) (in corso di stampa).  
 HOLTZER H., « Jour. Exp. Zool. », 117, 523 (1951).  
 MANELLI H. e MARGARITORA F., « Rend. Acc. Naz. dei XL », ser. IV, 12, 3 (1961).  
 SREBRO Z., « Folia Biol. », 7, 191 (1959).  
 SREBRO Z., « Folia Biol. », 9, 119 (1961).  
 STEFANELLI A., « Riv. Biol. », 53, 41 (1960).  
 WEISSFEILER J., « Comp. Rend. Soc. Biol. », 91, 543 (1924).

## SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE I-II

## TAVOLA I

- Fig. 1. - Controllo dell'operazione di asportazione totale del mesencefalo in larve di *Rana dalmatina*. È visibile la sola regione infundibolare ( $\times 100$ ).
- Figg. 2, 3, 4 e 5. - Vari gradi della rigenerazione del mesencefalo in larve di *Rana dalmatina*, sacrificate dopo 30 gg. dall'operazione.
- Fig. 2. - Si è costituito un unico ventricolo, delimitato da una parete ventricolare formata nella parte ventrale dalla regione infundibolare residua, nella parte intermedia (che rappresenta il primordio del corpo mesencefalico) da elementi neurali e fibre nervose e nella parte dorsale (corrispondente al primordio del tetto ottico) dalla pia madre primitiva e da un monostrato di elementi neurali. (I = infundibolo; C = corpo mesencefalico; T = tetto ottico) ( $\times 90$ ).
- Fig. 3. - Incipiente separazione tra la cavità infundibolare (C.I.) ed il ventricolo mesencefalico (V.M.) ( $\times 90$ ).
- Fig. 4. - Si è completata la separazione tra la cavità infundibolare (C.I.) ed il ventricolo mesencefalico (V.M.) ( $\times 90$ ).
- Fig. 5. - In questo caso la lamina tettale è molto ispessita e sul lato destro della fotografia è visibile la formazione degli strati tettali più esterni ( $\times 90$ ).
- Fig. 6. - Rigenerazione del mesencefalo in una larva di *Rana dalmatina*, sacrificata dopo 50 gg. dall'operazione. Nella parte sinistra della fotografia si osserva un corpo mesencefalico profondamente anomalo; a livello del tetto ottico si sono costituiti tutti gli strati tettali ( $\times 50$ ).

## TAVOLA II

- Fig. 7. - Rigenerazione del mesencefalo in una larva di *Rana dalmatina*, sacrificata dopo 50 gg. dall'operazione. Si è costituito un lobo ottico impari mediano, in cui tuttavia si sono formati tutti gli strati tettali ( $\times 50$ ).
- Fig. 8. - Attività mitotica a livello del polo caudale dei due lobi ottici rigenerati di una larva di *Rana dalmatina*, sacrificata dopo 50 gg. dall'operazione ( $\times 350$ ).
- Fig. 9. - Rigenerazione abortiva del mesencefalo di una larva di *Rana esculenta*, sacrificata dopo 30 gg. dall'operazione. Dorsalmente alla regione infundibolare si è costituito un piccolo rigenerato delimitato dorsalmente da una tela corioidea ( $\times 70$ ).



