
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

GIUSEPPE COLOMBO, GIOVANNI SBRENNNA, FRANCESCO
FONTANA

**Ricerche sull'aggregazione di cellule dissociate di
embrioni di cavalletta (*Schistocerca gregaria*,
Forskål). III. Studio istologico degli aggregati di
cellule di embrioni a stadi diversi di sviluppo**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 56 (1974), n.6, p. 989-995.*
Accademia Nazionale dei Lincei

http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1974_8_56_6_989_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/>

Embriologia sperimentale. — *Ricerche sull'aggregazione di cellule dissociate di embrioni di cavalletta* (*Schistocerca gregaria*, *Forskål*). III. *Studio istologico degli aggregati di cellule di embrioni a stadi diversi di sviluppo* (*). Nota di GIUSEPPE COLOMBO, GIOVANNI SBRENNIA e FRANCESCO FONTANA, presentata (**) dal Socio A. STEFANELLI.

SUMMARY. — The structures of aggregates obtained *in vitro* from cell suspensions of locust embryos were studied by light microscope on Epon-sections. The aggregates show an internal pattern which is the result of a sorting out and a specific association of embryonic cells. True aggregates are formed. A general characteristic is that no outer cellular boundary and no inner mesenchyme-like structure are present.

The size and the structure of the aggregates differ according to the developmental stage of the embryos which provide the cells.

At the earlier stages aggregation occurs but cell association seems to be at random. With embryos just before or after blastokinesis different structures inside the aggregates are observed. At developmental stages when histological differentiation begins or is going, aggregation does not occur or consists mainly of clumps of cells.

In due Note precedenti (Fontana *et al.* [1], Rossi *et al.* [2]) abbiamo descritto l'autoaggregazione di cellule embrionali dissociate di cavalletta poste in coltura *in vitro*.

Una informazione che serve a chiarire i meccanismi di interazione delle cellule embrionali e la loro organizzazione multicellulare è l'osservazione istologica degli aggregati. Come è stato infatti osservato da diversi Autori (cfr. Moscona [3]) cellule embrionali di tessuti diversi, dopo essersi raggruppate tendono a segregarsi selettivamente e ad orientarsi ricostituendo alcune strutture caratteristiche degli organi dai quali sono state prelevate.

In questa Nota vengono descritti i primi risultati delle osservazioni sulla organizzazione strutturale delle cellule che formano gli aggregati e come questa capacità di aggregazione sia da correlarsi al diverso stadio di sviluppo degli embrioni e quindi al diverso stato funzionale dei tessuti dai quali sono prelevate le cellule.

MATERIALI E METODI

Le tecniche usate per l'allestimento delle colture e per l'osservazione degli aggregati in contrasto di fase sono, a parte alcune modifiche, sostanzialmente le stesse descritte nelle Note precedenti.

(*) Ricerche eseguite con il contributo del Consiglio Nazionale delle Ricerche (Contratto N. 710190604) presso l'Istituto di Zoologia dell'Università di Ferrara.

(**) Nella seduta del 29 giugno 1974.

La dissociazione degli embrioni è stata fatta a temperatura ambiente in un soluzione allo 0,1 per cento di tripsina nella soluzione salina di Hoyle. È stato adoperato questo metodo perché con embrioni a stadi avanzati di sviluppo, dallo stadio 27 secondo le tavole di sviluppo di Micciarelli-Sbrenna in poi [4], la dissociazione meccanica dà una resa cellulare ridotta probabilmente per la presenza della cuticola e di altre strutture già differenziate.

Con embrioni degli stadi più avanzati la sospensione cellulare è stata filtrata prima attraverso garza e poi attraverso un retino da plancton. Le cellule sono state lavate sospendendole e centrifugandole più volte in terreno di coltura fresco sia per eliminare la tripsina sia per eliminare i residui di cellule morte o danneggiate.

Si è usato un solo terreno di coltura e cioè quello indicato nelle precedenti Note come terreno HGL, modificato con l'aggiunta di una miscela di aminoacidi nelle proporzioni corrispondenti a quelle degli aminoacidi liberi trovati negli embrioni di *S. gregaria* (Colombo *et al.* [5]) e di una miscela di vitamine e di metaboliti simile a quella del terreno di Grace [6]; la sua composizione è indicata nella Tabella I.

Il sedimento di cellule isolate è stato sospeso in terreno di coltura ad una concentrazione finale di 750.000 cellule per ml e 0,75 ml di tale sospensione sono stati seminati per ogni pozzetto di un « tray » della Falcon (Mod. FB-16-24-TC).

Le colture sono state incubate per 48 ore in termostato a 30° C, esaminate e fotografate al microscopio rovesciato. Per ogni esperimento, alcune colture sono state fissate in glutaraldeide al 2% in tampone fosfato a pH 7 (Millonig [7]), altre in glutaraldeide al 2% in tampone cacodilato 0,05 molare, a pH 7,2 con aggiunta di saccarosio. Dopo lavaggio nei rispettivi tamponi a 4° C, sono state postfissate in osmio all'1% disidratate ed incluse in Epon-Araldite (Anderson e Ellis [8]). Le sezioni di 1-2 μ ottenute con l'ultramicrotomo Reichert Om U 2 sono state colorate sia con Blu di toluidina sia con azzurro II-blu di metilene.

RISULTATI

Sono state dissociate e poste in coltura cellule di embrioni di 2 stadi preblastocineticici e di 3 postblastocineticici; gli aggregati sono risultati molto diversi come forma e dimensioni in relazione agli stadi di sviluppo.

Con cellule degli stadi che precedono la blastocinesi, stadio 10 e stadio 18, si hanno aggregati relativamente grandi, con differenze che, come vedremo in seguito, riguardano principalmente la struttura istologica degli aggregati stessi (Tav. I, figg. 1-2). Con cellule di embrioni allo stadio 24 gli aggregati sono di dimensioni minori ed in maggior numero sono le cellule che rimangono isolate o formano piccoli ammassi (Tav. I, fig. 3). Con quelle di stadi successivi non si ha aggregazione ma solo pochi e piccoli ammassi di cellule (Tav. I, fig. 4).

Negli embrioni « in ovo » allo stadio 10, salvo i neuroblasti non è facile distinguere al microscopio ottico le cellule dei diversi foglietti, in quanto sono molto poco rilevanti le loro differenze citologiche.

Nelle sezioni semifini degli aggregati di questo stadio si osservano raggruppamenti di cellule con aspetto poco differente tra loro e non facilmente distinguibili per cui sembra trattarsi di raggruppamenti prevalentemente casuali (Tav. II, fig. 1).

Negli embrioni che hanno raggiunto lo stadio 18 si distinguono con relativa facilità le cellule del sistema nervoso, neuroblasti e cellule ganglionari, quelle ectodermiche che daranno epidermide, le mesodermiche che formano le diverse parti dei somiti e quelle entodermiche che spesso si confondono con quelle germinali. Anche nelle sezioni degli aggregati si riescono a distinguere diversi tipi di cellule che presentano una associazione preferenziale e formano strutture cave a rosetta o con cordoni (Tav. II, fig. 2). Le strutture cave, sono di due tipi: uno con parete costituita di cellule di altezza uniforme, le quali si possono considerare epidermiche in quanto vi sono indicazioni che nel margine rivolto verso il lume si forma una cuticola, l'altro tipo che si può paragonare ai somiti embrionali ha margini cellulari da una parte spessi e dall'altra sottili e quasi sempre si trova alla periferia dell'aggregato. I cordoni sono di forma varia, alcuni con cellule con poco citoplasma basofilo e denso e poste molto vicine tra loro, si trovano di solito all'interno degli aggregati; altri formati da cellule a citoplasma chiaro non strettamente unite tra loro si trovano prevalentemente alla periferia. Si può ritenere che i primi siano formati da cellule mesodermiche gli altri da cellule entodermiche e da cellule germinali. Difficili da riconoscere sono le cellule nervose, sono evidenti solo grosse cellule ganglionari di solito singole, o circondate da una o più cellule gliali.

Negli embrioni giunti « in ovo » allo stadio 24, e ancor più in quelli giunti a stadi successivi, alcuni tessuti iniziano a differenziarsi da un punto di vista istologico mentre altri hanno già completato tale differenziamento. È pertanto in essi presente tutta una gamma di tipi cellulari che, mentre risultano facilmente riconoscibili nei tessuti degli embrioni interi, lo divengono molto meno una volta dissociati.

Nelle sezioni degli aggregati di tale stadio si osservano strutture costituite da formazioni cave rotondeggianti a lume piccolo ed esternamente vi sono cordoni cellulari talora formati da cellule differenziate in adipociti, cellule ganglionari ed altre cellule di cui è difficile riconoscere l'origine e la differenziazione (Tav. II, fig. 3).

Con cellule di embrioni di stadi più avanzati, come si è visto, non si formano aggregati ed anche lo studio istologico delle sezioni mostra che si formano piccoli ammassi di cellule che non sembrano prendere contatto tra loro (Tav. II, fig. 4).

Poiché in seno agli embrioni dello stesso stadio gli organi e i tessuti raggiungono un grado di differenziazione diverso, e poiché è tecnicamente difficile ottenere un numero sufficiente di cellule da organi embrionali si è cercato di ovviare a ciò separando a partire dallo stadio 18 le diverse regioni, testa,

torace e addome in ciascuna delle quali sono prevalenti determinati abbozzi embrionali in un dato grado di differenziazione. Si sono quindi dissociate e messe in coltura separatamente le cellule delle diverse parti e gli aggregati ottenuti hanno presentato dimensioni ed aspetto diversi a seconda delle regioni da cui provengono le cellule (Tav. III), confermando così che l'entità dell'aggregazione è in rapporto col grado di differenziazione. Tali dati sono apparsi ancora più evidenti quando si sono confrontate le sezioni semifini di aggregati ottenuti dalle diverse regioni. Allo stadio 18, negli aggregati formati da cellule dissociate della regione cefalica, le strutture cave non sono molto numerose e prevalentemente di tipo epidermico, in quelli formati da cellule delle regioni toraciche-addominali le strutture sia di tipo epidermico che mesodermico prima descritte sono più abbondanti come pure i cordoni di varia forma (Tav. IV, figg. 1-2). Allo stadio 24 mentre è difficile, con sospensioni di cellule derivate dai segmenti cefalici e toracici, riconoscere nell'interno dell'aggregato strutture particolari, con sospensioni cellulari dei segmenti addominali si osservano invece sebbene poche di numero quelle strutture di cui si è precedentemente parlato e di cui è difficile stabilire la derivazione mesodermica o ectodermica (Tav. IV, figg. 3-4). Questa diversa frequenza della presenza di queste formazioni può essere messa in relazione al grado di differenziazione maggiore dei segmenti cefalici e toracici rispetto a quelli addominali al momento dell'espanto.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I risultati degli esperimenti descritti in questa Nota mostrano che cellule dissociate di embrioni di cavalletta, formano veri aggregati, cioè non soltanto le cellule si ammassano ma si osserva segregazione di tipi cellulari e formazione di alcune strutture. Gli aggregati hanno caratteristiche istologiche peculiari, non presentano all'esterno uno strato cellulare di rivestimento ed all'interno non si osserva un mesenchima ma cellule e strutture sono disposte vicine le une alle altre.

La incompleta conoscenza della struttura citologica degli abbozzi embrionali precoci rende difficile il riconoscimento preciso di tutte le strutture e forse anche il breve tempo di coltura non permette di raggiungere una organizzazione degli abbozzi con una differenziazione strutturale sufficiente, ma il confronto della struttura istologica degli aggregati ottenuti con cellule di embrioni di stadi differenti e con cellule provenienti da segmenti embrionali diversi permette di riconoscere tipi di organizzazione caratteristici.

Gli aggregati più organizzati si sono ottenuti con cellule di embrioni allo stadio 18 che hanno completato la segregazione dei foglietti e la formazione dei principali abbozzi embrionali. In essi si notano tipi di organizzazione probabilmente caratteristici: alla periferia sembrano situarsi strutture cave che si possono considerare di derivazione mesodermica e cellule probabilmente entodermiche. Strutture cave di probabile derivazione ectodermica si trovano prevalentemente all'interno od alla base degli aggregati, appoggiate al sub-

strato e spesso circondate da cellule di tipo fibroblastico. Elementi nervosi, facilmente riconoscibili, si trovano sia isolati sia circondati da una o più cellule gliali. Con cellule di stadi embrionali più giovani pur formandosi grossi ammassi cellulari non è risultata molto evidente una segregazione di cellule ed una organizzazione strutturale.

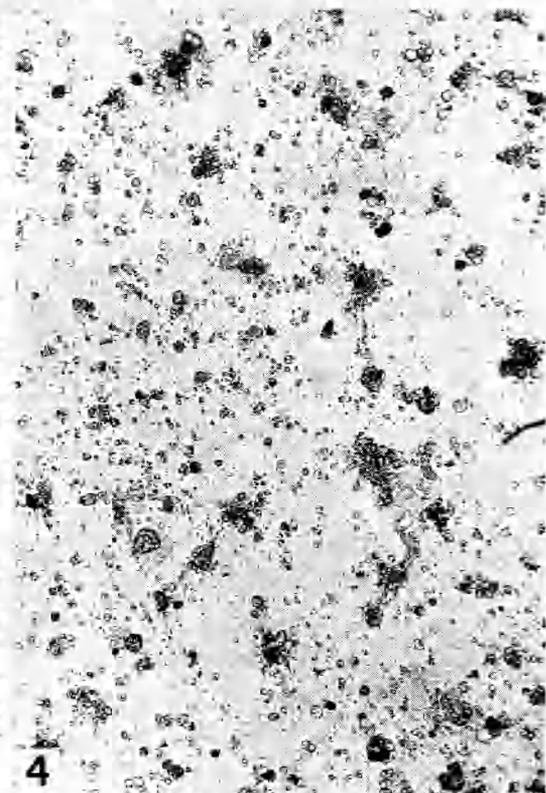
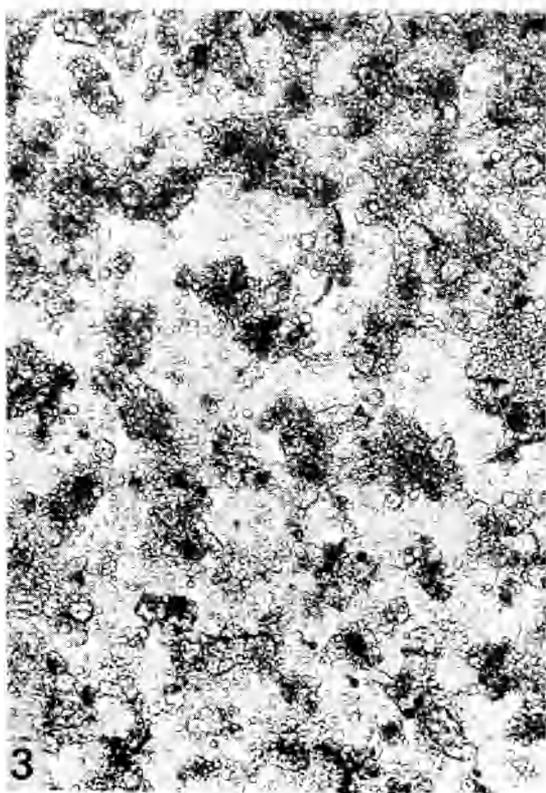
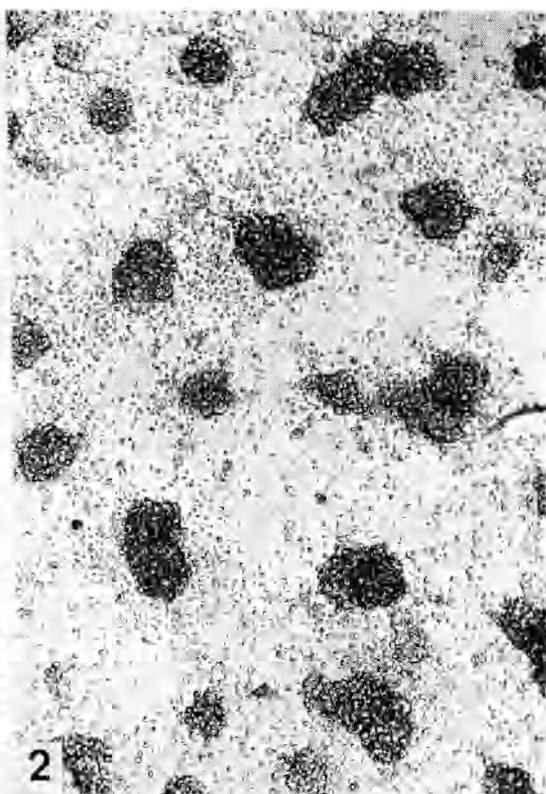
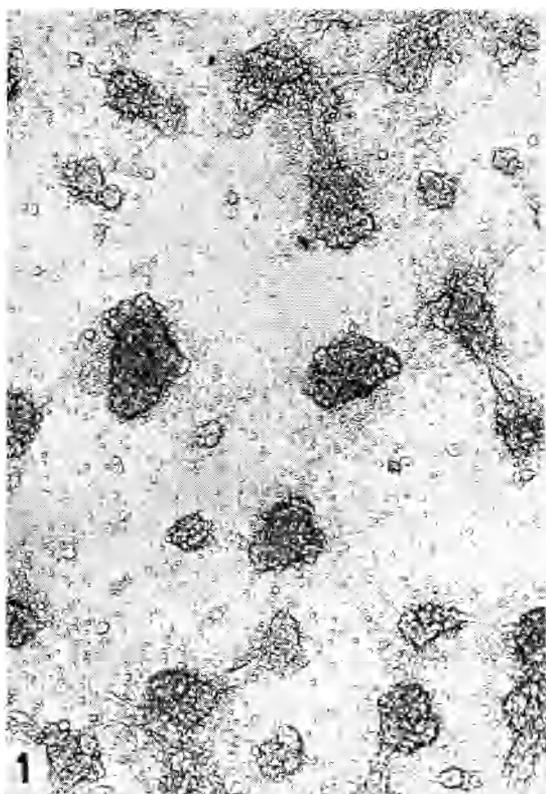
Con cellule di stadi postblastocineticici si ha una progressiva riduzione dell'aggregazione in diretta relazione con il grado di differenziamento istologico raggiunto dagli abbozzi ed organi embrionali. Solamente negli stadi postblastocineticici più giovani infatti si notano alcune strutture accanto a cellule isolate, o cordoni cellulari assieme a singole cellule differenziate.

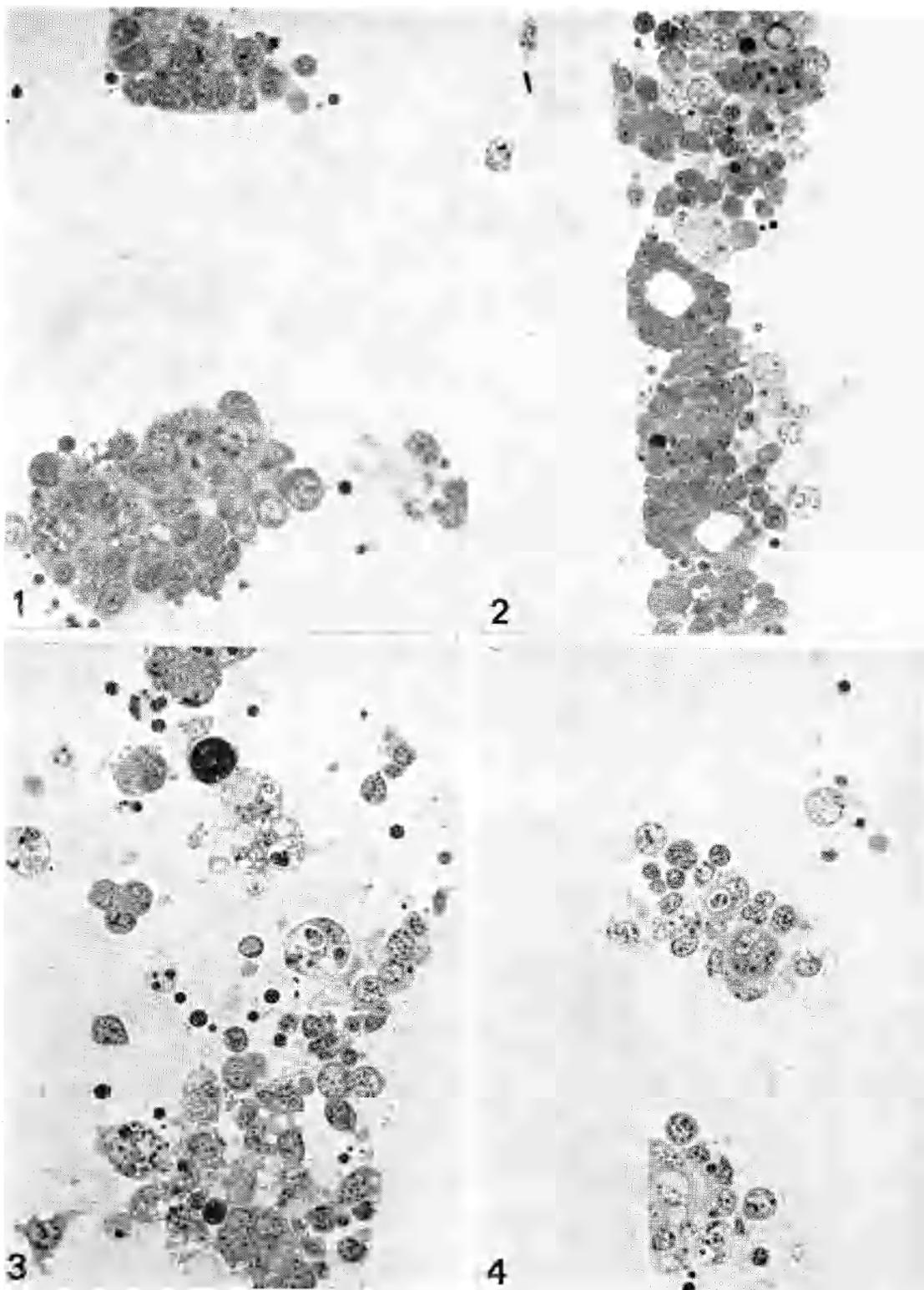
L'aggregazione delle cellule embrionali delle cavallette e probabilmente anche di altri ordini di Insetti, da quanto risulta dalla descrizione spesso sommaria degli esperimenti di altri Autori (Eide e Chang [9], Ling *et al.* [10]), presenta caratteristiche peculiari che appaiono in rapporto con le caratteristiche dello sviluppo embrionale e con quelle della struttura istologica di questo gruppo di animali, soprattutto se sono confrontate con quelle di altri gruppi, per esempio dei Vertebrati, di cui sono meglio noti e lo sviluppo embrionale e l'istologia.

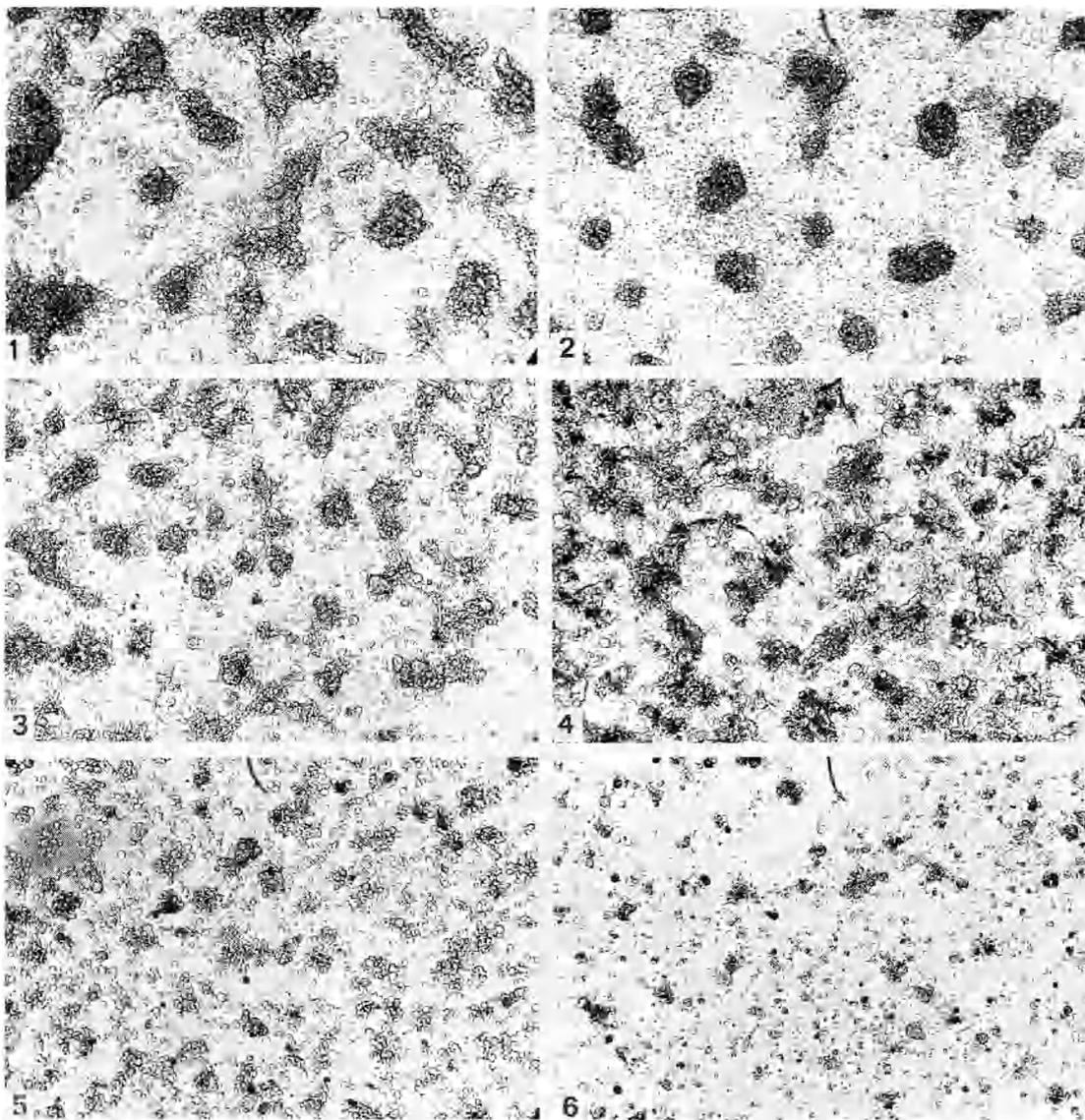
È da ricordare che le diverse regioni degli embrioni degli insetti sono determinate precocemente (cfr. Krause [11]) e la differenziazione viene evocata sia da una programmazione delle cellule stesse sia dal gioco del sistema endocrino che controlla il manifestarsi (cfr. Wigglesworth [12]) delle caratteristiche di sviluppo già fissate in un dato momento dello sviluppo embrionale. Ciò implica una ridotta capacità di sdifferenziazione e ridifferenziazione ed è lasciato poco margine all'effetto delle influenze reciproche delle cellule. Queste caratteristiche di sviluppo concordano con il tipo e la struttura degli aggregati che si ottengono da sospensioni monocellulari di alcuni stadi dello sviluppo embrionale. Dalle osservazioni sopra descritte risulta che le cellule si accostano, si riconoscono e si uniscono a formare strutture pluricellulari e i rapporti che si vengono a stabilire sono in relazione allo stadio dello sviluppo degli embrioni da cui provengono le cellule, ai tipi di cellule che si incontrano ed alle strutture che esse formeranno. Ricerche ultrastrutturali in corso sembrano confermarlo.

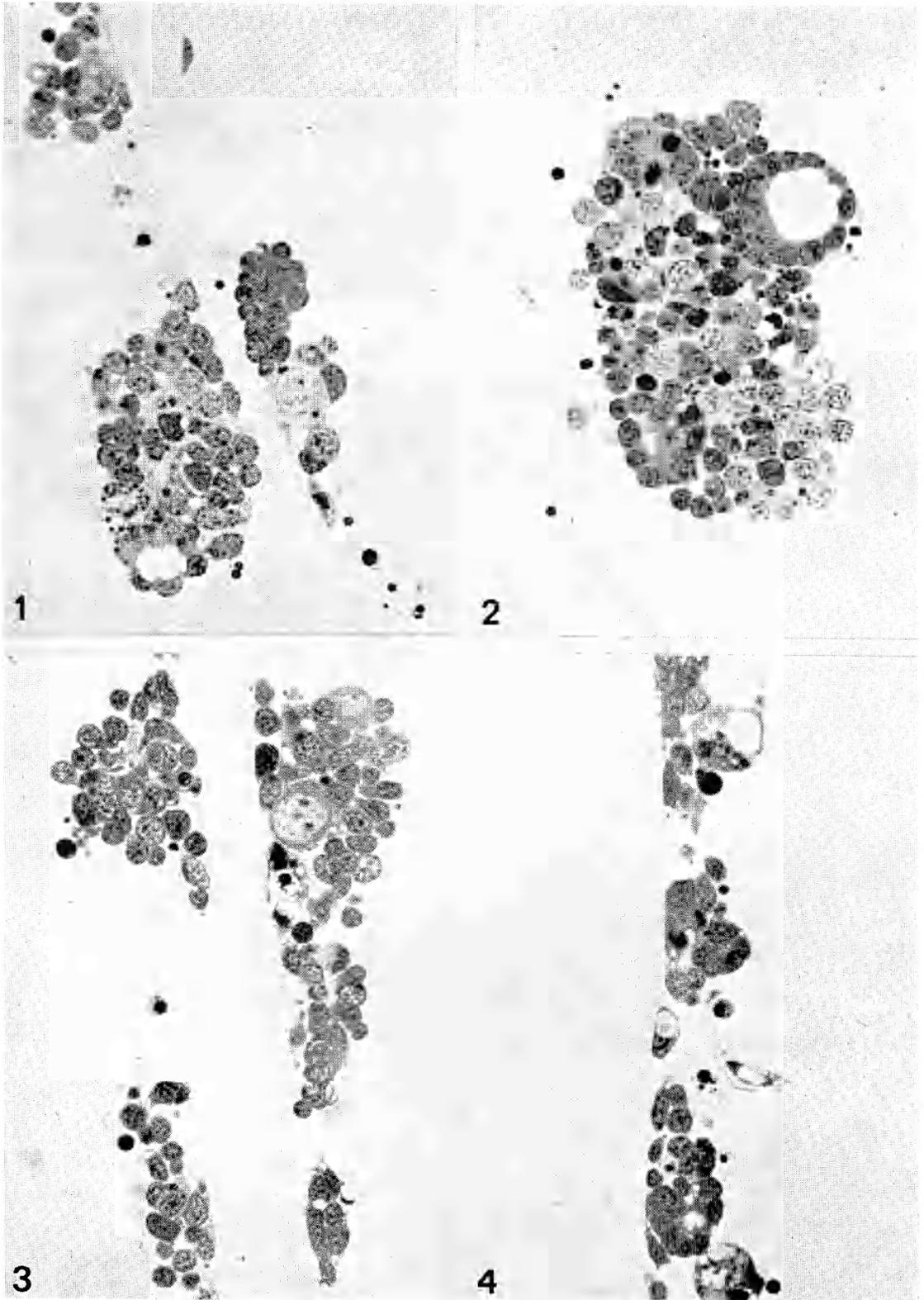
BIBLIOGRAFIA

- [1] F. FONTANA, R. ROSSI e G. COLOMBO (1973) - *Ricerche sull'aggregazione di cellule dissociate di embrioni di cavalletta* (Schistocerca gregaria, Forskål). I. *Autoaggregazione (self-aggregation) in colture e in terreni diversi*, « Rend. Acc. Naz. Lincei », 54, 795-802.
- [2] R. ROSSI, F. FONTANA e G. COLOMBO (1973) - *Ricerche sull'aggregazione di cellule dissociate di embrioni di cavalletta* (Schistocerca gregaria, Forskål). II. *Effetto del siero sull'aggregazione in colture stazionarie*, « Rend. Acc. Naz. Lincei », 54, 970-975.
- [3] A. A. MOSCONA, (1965) - *Recombination of dissociated cells and the development of cell aggregates*, in « Cells and Tissue in Culture », ed. by E. N. Willmer, vol. I, 489-529.
- [4] A. MICCIARELLI-SBRENNNA (1959) - *Gli stadi normali di sviluppo degli embrioni di Schistocerca gregaria* (Forskål), « Boll. Zool. », 36, 77-95.









- [5] G. COLOMBO, C. A. BENASSI, G. ALLEGRI e E. LONGO (1962) - *Free amino-acids in eggs of Schistocerca gregaria Forsk. (Orthoptera) during development*, «Comp. Biochem. Physiol.», 5, 83-93.
- [6] T. D. C. GRACE (1962) - *Establishment of four strains of cells from insect tissues grown in vitro*, «Nature», 195, 788-789.
- [7] G. MILLONIG (1961) - *The advantages of a phosphate buffer for OsO₄ solutions in fixation*, «J. App. Physics», 32, 1637.
- [8] W. A. ANDERSON e R. A. ELLIS (1965) - *Ultrastructure of trypanosoma lewisi: flagellum, microtubules and the kinetoplast*, «J. Protozool.», 12, 483-499.
- [9] P. E. EIDE e T. H. CHANG (1969) - *Cell cultures from dispersed embryonic house fly tissues technique, mitosis and cell aggregates*, «Exptl. Cell Res.», 54, 302-308
- [10] L. N. LING, M. HORIKAWA e A. S. FOX (1970) - *Aggregation of dissociated cells from Drosophila embryos*, «Develop. Biol.», 22, 264-281.
- [11] G. KRAUSE (1960) - *Preformed ooplasmic reaction systems in insect eggs*, in «Symposium on germ cells and development», Institut Intern. d'Embryologie e Fondazione A. Basselli, 302-337.
- [12] V. B. WIGGLESWORTH (1959) - *The control of growth and form: a study of the epidermal cell in a insect*, Cornell Univ. Press, Ithaca, New York.
- [13] G. HOYLE (1955) - *The effects of some common cations on neuromuscular transmission in insect*, «J. Gen. Physiol.», 127, 90-105.

SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE I-IV

TAVOLA I

Microfotografie al microscopio rovesciato di colture di cellule di embrioni: 1) dello stadio 10; 2) dello stadio 18; 3) dello stadio 24; 4) dello stadio 29.

TAVOLA II

Sezioni semifine di aggregati corrispondenti alle microfotografie della Tav. I - di cellule da embrioni: 1) dello stadio 10; 2) dello stadio 18; 3) dello stadio 24; 4) dello stadio 29.

TAVOLA III

Microfotografie al microscopio rovesciato di colture cellulari dopo 48 ore: 1) dai segmenti cefalici di embrioni dello stadio 18; 2) dai segmenti toracici e addominali di embrioni dello stadio 18; 3) dai segmenti cefalici di embrioni dello stadio 24; 4) dai segmenti addominali di embrioni dello stadio 24; 5) dai segmenti cefalici di embrioni dello stadio 29; 6) dai segmenti addominali di embrioni dello stadio 29.

TAVOLA IV

Sezione semifine di aggregati di cellule embrionali: 1) dai segmenti cefalici dello stadio 18; 2) dai segmenti toracici e addominali dello stadio 18; 3) dai segmenti cefalici dello stadio 24; 4) dai segmenti addominali dello stadio 24.