
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

ALDO ROSSI

**Sul valore prospettico dello strato esterno e di quello
interno della placca neurale di *Rana esculenta*.
Esperienze di espianto**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 39 (1965), n.1-2, p.
136-142.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1965_8_39_1-2_136_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. — *Sul valore prospettico dello strato esterno e di quello interno della placca neurale di Rana esculenta. Esperienze di espianto* (*).
Nota (**) di ALDO ROSSI presentata dal Corrisp. A. STEFANELLI.

La placca neurale di *Rana esculenta*, di *Bufo bufo* e di *Bufo viridis*, a differenza di quella di *Triturus* è formata da uno strato esterno monocellulare (*periectoderma neurale*) e da uno intero a più ordini di cellule (Ruffini 1925 [1]). Lo studio delle potenze prospettiche di questi due strati è stato oggetto di precedenti ricerche (Rossi 1960, 1961, 1964; Rossi e Nista 1963 [2, 3, 4, 5]) da cui è risultato che gli elementi cellulari di ambedue gli strati hanno la capacità di differenziarsi in cellule endodermali e in cellule nervose. Dall'esperienza di trapianto (Rossi e Nista 1963 [5]) è risultato che dallo strato esterno della placca neurale di *Rana esculenta* si formano delle strutture neurali aspecifiche a simmetria bilaterale, mentre dalle vari regioni dello strato profondo con il sottostante substrato ento mesodermico (previamente private dello strato esterno della placca) si formano delle strutture nervose la cui organizzazione corrisponde alla sede da cui sono state prelevate.

Al fine di studiare le capacità di differenziamento autonomo degli strati esterno e interno della placca neurale di *Rana esculenta* sono state eseguite esperienze di espianto i cui risultati sono l'oggetto del presente lavoro; in una precedente ricerca, comparsa su questi Rendiconti (« Rossi » 1964 [4]), si è osservato che dallo strato esterno della placca neurale di *Bufo bufo* allevato in soluzione fisiologica, si possono differenziare delle strutture neurali la cui organizzazione è aspecifica.

MATERIALE E METODO.

Gli strati esterno e interno della placca neurale sono stati prelevati da embrioni di *Rana esculenta* allo stadio di fine gastrula-inizio del sollevamento delle pieghe neurali; lo strato esterno è stato ablato su tutta la placca neurale mentre dallo strato interno sono stati prelevati alcuni settori con il substrato entomesodermico, ma privi dello strato esterno della placca. Una parte degli espianti dello strato interno sono stati racchiusi in un sandwich di ectoderma ventrale prelevato da embrioni dello stesso stadio, mentre un altro gruppo

(*) Lavoro eseguito nell'Istituto di Anatomia comparata « G. B. Grassi » della Università di Roma con i contributi del Centro di Neuroembriologia del C.N.R. e del Gruppo di ricerca per lo studio del differenziamento del C.N.R.

(**) Pervenuta all'Accademia il 12 luglio 1965.

è stato allevato senza il rivestimento ectodermico. Quest'ultimo gruppo non è stato preso in considerazione poiché le strutture neurali hanno avuto una morfogenesi disorganica in quanto aderendo sul fondo della capsula Petri molti elementi cellulari abbandonano l'espianto. Gli espienti dello strato esterno non sono stati mai racchiusi in un sandwich ectodermico poiché questi lembi di perineuroderma si appallottolano come gli espienti di ectoderma ventrale. Sono stati allestiti controlli facendo degli espienti di solo ectoderma ventrale.

Le parti dello strato interno espiantate, sono le seguenti (vedi fig. 1): piega neurale trasversa anteriore, che negli espienti è stata divisa in due metà (B' e B''); regione centrale anteriore della placca che è stata suddivisa in un terzo cefalico (C) e in due terzi caudali (D); parte anteriore della piega neurale laterale (E). Gli espienti sono stati allevati nella soluzione fisiologica di Steinberg (sec. Jones e Elsadle 1963 [6]) per una settimana. Alla soluzione fisiologica sterile sono stati aggiunti 0,02 ml per cento di sulfodiazina di Na (May-Bauer). Gli espienti sono stati fissati in Bouin acetico e le sezioni seriate di 7 μ sono state colorate con emallume ed eosina. All'allestimento dei preparati istologici ha collaborato la sig.na Anna Vernucci, allieva interna dell'Istituto di Anatomia comparata della Università di Roma.

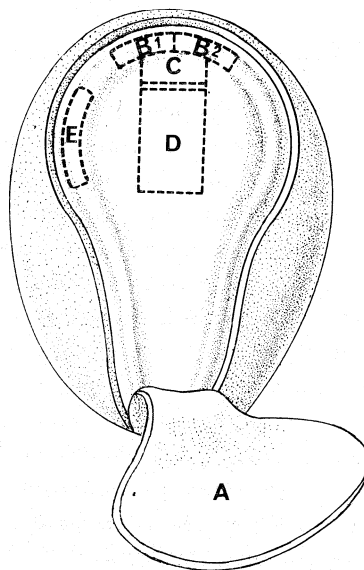


Fig. 1.

DESCRIZIONE DEI RISULTATI.

Espienti dello strato esterno della placca neurale (A).

Sono stati presi in esame complessivamente 12 casi. Lo strato esterno in espianto si appallottola su se stesso in modo da racchiudere verso l'interno la superficie cellulare che si trova a contatto con lo strato profondo della placca neurale. Dopo 24 ore di cultura l'espianto diventa mobile e solo in due casi si è fissato sul fondo della capsula Petri. L'espianto è formato all'esterno da un doppio strato di cellule: quelle interne appiattite hanno l'aspetto connettivale e quelle esterne cuboidali di tipo epiteliale. Nell'interno dell'espianto si è formata una struttura neurale con caratteristiche archiencefaliche; in due casi si è formato l'abbozzo dell'occhio (Tav. I, figg. 6, 7). Nello spazio fra la struttura neurale e lo strato esterno vi sono cellule di aspetto mesenchimatico. Nei due casi in cui l'espianto si è fissato sul fondo della capsula Petri, lo strato esterno aderisce alla struttura neurale che ha una organizzazione massiva e presenta una sottile cavità in via di formazione.

Le strutture neurali di aspetto archiencefalico presentano pareti di differente spessore che possono essere formate da cellule nervose, da neuroblasti e da sostanza bianca; la cavità ventricolare unica e in qualche caso duplice, è delimitata in gran parte da cellule di aspetto di ependima embrionale.

Espianti dello strato interno della placca neurale.

Sono stati presi in esame complessivamente 24 casi. Dagli espianti della metà della piega neurale trasversa anteriore (B' e B'') e dal terzo cefalico della parte centrale della placca neurale (C) si sono formate strutture con caratteristiche archiencefaliche e frequentemente anche l'occhio (Tav. I, figg. 1, 2). Le pareti del neurasse sono costituite da sostanza bianca, da neuroblasti e da cellule nervose con caratteri di differenziamento generale; le cavità sono delimitate da cellule con caratteristiche dell'ependima embrionale. L'occhio sempre privo di cristallino, è formato, nei casi ottimali dal tappeto nero e dai tre tipici strati della retina. L'occhio in alcuni casi si è nettamente staccato dalla struttura neurale mentre in altri le cellule della retina si continuano con le cellule del tessuto nervoso.

Dagli espianti della parte centrale della placca (D) si sono formate delle strutture neurali a simmetria bilaterale (Tav. I, fig. 3) mentre in altri si è formata una struttura neurale disorganizzata la cui volta è prevalentemente sterile. Nelle strutture neurali a simmetria bilaterale si possono identificare regioni archiencefaliche e deuteroencefaliche. Il materiale neurale è costituito da cellule nervose con caratteri di differenziamento generale, da neuroblasti e da sostanza bianca; le cavità ventricolari sono delimitate da cellule con caratteristiche dell'ependima embrionale.

Le strutture neurali che si sono differenziate dagli espianti di una parte della piega neurale laterale (E), hanno la forma di tubo chiuso e un'organizzazione che tende al raggiungimento della simmetria bilaterale. In un paio di casi una delle pareti è più inspessita dell'altra ed è formata da sostanza bianca, da neuroblasti e da cellule nervose; la parete meno spessa è formata solo in parte da sostanza bianca e da cellule nervose mentre il rimanente è formato da neuroblasti (Tav. I, figg. 4, 5). Tali strutture neurali sono molto simili a quelle già descritte in un precedente lavoro [5] in cui sono stati fatti trapianti della metà interna della piega neurale laterale della stessa zona delle presenti esperienze.

Tutti gli espianti dello strato interno della placca neurale si sono sviluppati dentro un sandwich di ectoderma prelevato dalla parte ventrale di un embrione allo stadio di fine gastrula-inizio del sollevamento delle pieghe neurali. I sandwichs di controllo si sono sviluppati come delle ampie vescicole che all'esame microscopico risultano costituite da uno strato esterno formato di due ordini di cellule ectodermiche e da uno interno costituito da uno strato di cellule di tipo mesenchimatico. Nell'interno dell'espianto la cavità è solo in piccola parte occupata da cellule di aspetto mesenchimatico e tra queste sono riconoscibili alcuni eritroblasti (Tav. I, fig. 8).

Attività mitotica.

È stata studiata l'attività mitotica degli elementi cellulari delle strutture neurali che si sono differenziate dallo strato esterno (A) e dalle varie zone (B, C, D, E) dello strato interno della placca neurale. Sono state prese in esame solo quelle strutture neurali che presentano una cavità delimitata da pareti inspessite. Il computo dell'attività mitotica è stato fatto in modo da distinguere le mitosi endodiali da quelle profonde. Dall'esame della Tabella I risulta che l'attività mitotica degli elementi endodiali è superiore a quella degli elementi cellulari profondi. Non vi sono differenze significative fra le medie dell'attività mitotica degli elementi endodiali delle strutture neurali che si sono differenziate dalla varie zone dello strato interno della placca. Diversamente si constata che l'attività mitotica degli elementi endodiali delle strutture neurali che si sono differenziate dallo strato esterno della placca è superiore all'attività mitotica degli elementi endodiali delle strutture neurali derivate dallo strato interno; il test del *t di Student* ha dimostrato che è significativa la differenza fra le due medie. Inoltre in base al test del χ^2 si è dimostrato che vi è una differente distribuzione dell'attività mitotica nello strato endodiale e in quello profondo anche in quei casi in cui le due percentuali sono relativamente vicine (zona D).

TABELLA I.

Zona	Casi positivi	Medie mitosi		Mitosi totali	% mitosi endodiali
		endodiali	profonde		
A	5	19,0 ± 2,1 (*)	4,6 ± 3,1 (*)	23,6 ± 3,1 (*)	81,2 ± 2,9 (*) (± 8)(**)
B+C (***)	6	68,8 ± 18,4	26,2 ± 6,13	95,0 ± 22,7	70,6 ± 3,7 (± 9,7)
D	7	96,6 ± 28,2	46,2 ± 13,7	143,0 ± 41,5	66,8 ± 2,3 (± 5,6)
E	5	27,6 ± 8,6	11,2 ± 2,7	38,8 ± 11,05	70,6 ± 2,9 (± 8)

(*) Errore standard; (**) limite fiduciale; (***) le zone B e C sono state considerate unitamente data la somiglianza dei risultati morfologici.

Nelle strutture neurali derivate dallo strato profondo della placca neurale si è osservato che spesso le mitosi profonde si trovano raggruppate in zone dove è in atto la formazione di cavità secondarie che con ogni probabilità confluiranno in seguito nella cavità ventricolare; tuttavia si trovano anche mitosi isolate fra i neuroblasti profondi in zone dove è evidente che non è in formazione alcuna cavità. Nelle strutture neurali derivate dallo strato esterno della placca neurale, dove l'attività mitotica è prevalentemente endodiale, si è osservato che le mitosi profonde non si trovano in zone dove siano in via di formazione delle cavità.

DISCUSSIONE.

I dati della attuale ricerca sono in accordo con i risultati delle precedenti esperienze di trapianto (Rossi e Nista 1963 [5]) poiché anche in condizione di espianto si sono formate delle strutture neurali ed ottiche dalle cellule sia dello strato interno che esterno della placca neurale di *Rana esculenta*. Le strutture neurali derivate dall'espianto dello strato esterno hanno raggiunto tutte una identica organizzazione di tipo archiencefalico, mentre quelle derivate dallo strato interno hanno avuto un'organizzazione più specifica alla sede da cui sono state prelevate, verosimilmente per la presenza di una parte del substrato entomesodermico.

Almeno per i dati finora ottenuti appare chiaro che lo strato esterno della placca neurale di *Rana esculenta* ha una potenza istogenetica maggiore di quella dello strato interno. Infatti dall'espianto dello strato esterno, che nello sviluppo normale va a delimitare la cavità ventricolare del neurasse, si formano diversi tipi di cellule: all'esterno si differenzia un rivestimento ectodermico e all'interno si sviluppano cellule mesenchimatiche, e una struttura neurale le cui pareti sono formate da neuroblasti, da cellule nervose con caratteri di differenziamento generale, da sostanza bianca, e, nello strato che delimita la cavità ventricolare, da cellule con caratteri dell'ependima embrionale.

Le cellule dello strato interno della placca neurale, con il sottostante entomesoderma, hanno invece una potenzialità limitata solo in senso neurale; pertanto necessitano di un rivestimento ectodermico esterno senza il quale la morfogenesi delle strutture neurali avviene in modo disorganico. In precedenti ricerche (Rossi 1960, 1961; Rossi e Nista 1963), come nelle attuali, si è potuto constatare che dopo l'ablazione dello strato esterno della placca neurale, le cellule più superficiali dello strato interno, affacciate alla cavità ventricolare, si differenziano in cellule ependimali embrionali. Questa potenzialità viene manifestata anche da cellule più profonde in zone dove è in atto la formazione di cavità secondarie. Frequenti sono però le mitosi anche in sedi dove è chiaro che non è in atto un processo cavitario, da cui possono derivare sia neuroblasti che altre cellule di nevroglia.

È evidente che l'accrescimento delle strutture neurali derivate dall'espianto dello strato esterno e da parti dello strato interno della placca neurale è dovuto principalmente all'attività mitotica delle cellule divenute periventricolari. Infatti in tutti i casi si è dimostrato che l'attività mitotica degli elementi periventricolari è superiore a quella degli elementi cellulari profondi e il calcolo χ^2 ha dimostrato che le cariocinesi ependimali prevalgono su quelle profonde anche in quegli espianti (zona D) in cui la percentuale media dell'attività mitotica ependimale poteva lasciar supporre la coesistenza di una indifferente attività mitotica in ambedue le sedi.

BIBLIOGRAFIA.

- [1] A. RUFFINI, *Fisiogenia - La biodinamica dello sviluppo ed i fondamentali problemi morfologici dell'embriologia generale*. Casa Editrice F. Vallardi, Milano (1925).
- [2] A. ROSSI, *Esperienze di asportazione dell'ependima presuntivo in embrioni di Anfibii anuri*, « Rend. Acc. Naz. Lincei » (ser. 8^a), 29, 438 (1960).
- [3] A. ROSSI, *Nuove esperienze sull'asportazione dello strato dell'ependima presuntivo in embrioni di Anfibii anuri*, « Rend. Acc. Naz. Lincei » (ser. 8^a), 30, 565 (1961).
- [4] A. ROSSI, *Osservazioni preliminari sulle capacità di differenziamento in vitro dello strato esterno della placca neurale pluristratificata di Bufo bufo (L.)*, « Rend. Acc. Naz. Lincei » (ser. 8^a), 36, 572 (1964).
- [5] A. ROSSI e A. NISTA, *Analisi sperimentale della placca neurale pluristratificata di Rana esculenta*, « Rend. Ist. Sci. Camerino », 4, 53 (1963).
- [6] K. W. JONES and T. R. ELSADLE, *The culture of small aggregates of amphibian embryonic cells in vitro*, « J. Embryol. exp. Morph. », 11, 135 (1963).

SUMMARY. — Explants from the external and internal layer of the multilayered neural plate were carried out on embryos of *Rana esculenta* at the stage of late gastrula-beginning of neural folds, with the following results:

1) the cells of the external layer of the neural plate displayed a greater histogenetic power than the cells of the internal layer. The nervous tissue cells differentiated from the cells of the external layer;

2) neural structures were formed both by the external and internal layer of the neural plate. The walls of such structures consisted of white matter, neuroblasts and differentiating neurons. The ventricles were delimited by embryonal ependyma like cells;

3) an eye may differentiate from the cells of the external and internal layer (anterior transverse neural fold and adjoining part of the neural plate); this eye was better differentiated if it originated from the cells of the internal layer;

4) the organization of the neural structures developed from the external layer was of the archiencephalic kind, while that one of the neural structures originated from the different parts of the internal layer of the plate was more strictly corresponding to that of the original site in the neural plate;

5) the growth of the neural structures derived from the explants of the external layer and of parts of internal layer of the neural plate was mainly due to the mitotic activity of the periventricular cells.

SPIEGAZIONE DELLA TAVOLA I

Figg. 1-5. - Strutture neurali e occhi che si sono differenziati da espianti di parti dello strato interno della placca neurale (previamente private dello strato esterno) con il substrato entomesodermico, di embrioni di *Rana esculenta* allo stadio di fine gastrula-inizio del sollevamento delle pieghe neurali. Gli espianti si sono sviluppati entro un sandwich di ectoderma ventrale di embrioni dello stesso stadio. Nelle figg. 1-2, strutture neurali e occhi che si sono differenziati rispettivamente dalla piega neurale trasversale anteriore e dal quarto anteriore della placca neurale. Nella fig. 3, struttura neurale a simmetria

bilaterale con il substrato cordomesodermico, che si è differenziato dall'espianto dei 2/3 della parte anteriore della placca neurale. Nelle figg. 4-5, strutture neurali sviluppate dall'espianto della piega neurale laterale anteriore.

Figg. 6-7. - Strutture neurali e abbozzo dell'occhio che si sono differenziati dall'espianto dello strato esterno della placca neurale di embrioni di *Rana esculenta* allo stadio di fine gastrula-inizio del sollevamento delle pieghe neurali.

Fig. 8. - Controllo. Espianto di ectoderma ventrale di un embrione di *Rana esculenta* allo stadio di fine gastrula-inizio del sollevamento delle pieghe neurali.

Didascalie: a.o. = abbozzo occhio; c = corda dorsale; c.e. = cellule epiteliali; c.m. = cellule mesenchimatiche; v.o. = vescicola ottica.

Ogni unità delle scale di ingrandimento in calce alla tavola, corrisponde a 100 μ . La scala di ingrandimento della figura 7 è valevole per le figg. da 1 a 7.

A. ROSSI-FANELLI e B. FINZI.

