

---

ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI  
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

# RENDICONTI

---

GUIDO PALLADINI, AMICO BIGNAMI, GIORGIO  
VENTURINI, FRANCA MACCAGNANI, SILVIA CORRER

**Ricerche sulla ATPasi  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  dipendente nella  
ontogenesi. - II. Ricerche nello sviluppo embrionale  
del telencefalo di pollo - Correlazioni morfologiche ed  
elettroencefalografiche**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,  
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 40 (1966), n.5, p. 933-939.*  
Accademia Nazionale dei Lincei

[<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA\\_1966\\_8\\_40\\_5\\_933\\_0>](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1966_8_40_5_933_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.** — *Ricerche sulla ATPasi Na<sup>+</sup>—K<sup>+</sup> dipendente nella ontogenesi.* — II. *Ricerche nello sviluppo embrionale del telencefalo di pollo — Correlazioni morfologiche ed elettroencefalografiche* (\*). Nota di GUIDO PALLADINI, AMICO BIGNAMI, GIORGIO VENTURINI, FRANCA MACCAGNANI e SILVIA CORRER, presentata (\*\*) dal Corrisp. A. STEFANELLI.

SUMMARY. — The activity of Na<sup>+</sup>—K<sup>+</sup>-dependent ATPase rapidly increases in the telencephalon of the chicken from the 17th day of prenatal life to hatching. Morphologic and EEG events in periods of rapid increase of enzymatic activity are discussed.

Si ritiene attualmente che una ATPasi sodio-potassio dipendente, magnesio attivata (NaKA), identificata per la prima volta da Skou [1] 1957 nei nervi degli arti di *Carcinus moenas*, costituisca la base enzimatica per il trasporto attivo del sodio e del potassio attraverso le membrane cellulari (Skou [2] 1965). L'attività della NaKA è assai elevata nel cervello (Bonting [3] 1964), dove la cosiddetta « pompa » del sodio e del potassio mantiene attraverso le membrane cellulari quelle differenze di concentrazione ionica e di potenziale che sono indispensabili per la funzione nervosa (Woodbury [4] 1961).

In una Nota precedente (Palladini e coll. [5] 1965) è stato illustrato l'andamento dell'attività della NaKA nel telencefalo di uccelli a prole atta ed inetta (pollo-piccione), dalla nascita fino all'età adulta.

Negli animali a prole atta l'attività della NaKA per unità di peso secco è alla nascita la stessa di quella dell'adulto, con una accentuazione tra il 7° ed il 30° giorno di vita (circa + 21 % dell'attività dell'adulto al 13° giorno).

Nell'animale a prole inetta invece, l'attività della NaKA, estremamente bassa al 3° dì, raggiunge solo al 16° giorno valori pari a 1/2 di quelli dell'adulto. Dati comparabili a quanto osservato nel piccione sono stati riportati nel ratto, mammifero a prole inetta (Samson e coll. [6] 1964).

Nella presente Nota riferiamo sull'andamento dell'attività della NaKA durante lo sviluppo embrionale del pollo dal X giorno di incubazione fino alla schiusa. Faremo inoltre alcune considerazioni sui rapporti tra lo sviluppo dell'attività della NaKA e la maturazione, pre- e post-natale, morfologica ed elettroencefalografica (EEG) del telencefalo di pollo. Queste considerazioni sono suggerite dai dati della letteratura e dalle prime osservazioni di uno studio in corso nell'Istituto di Anatomia Comparata dell'Università di Roma.

La ricerca biochimica nell'embrione del pollo è stata eseguita su uova di razza Livornese bianca, incubate artificialmente in condizioni standard.

(\*) Ricerca eseguita nell'Istituto di Anatomia Comparata « G. B. Grassi » e nel Centro di Neuroembriologia del C.N.R. dell'Università di Roma, con il contributo del Gruppo di Embriologia del C.N.R.

(\*\*) Nella seduta del 14 maggio 1966.

I telencefali, prelevati ed isolati dal resto del nevrasso subito dopo la morte, sono stati, a gruppi più o meno numerosi a seconda dell'età (cfr. Tabella I) omogenati a 0° in potter di vetro con acqua distillata, liofilizzati e mantenuti a -11°. La determinazione dell'attività NaKA è stata eseguita secondo il metodo di Bonting e coll. [7] 1961, con le accortezze di cui alla nostra Nota precedente (Palladini e coll. [5] 1965). Come per la nota precedente, è stato utilizzato un ATP fornito dalla industria chimica BDH, ed abbiamo avuto cura di utilizzare anche in questo caso per tutta la durata dell'esperienza, sempre lo stesso lotto di produzione. L'attività enzimatica è stata espressa in mM di PO<sup>4</sup>/g di peso secco/ora di incubazione a 37°. Le determinazioni sono state eseguite sempre contemporaneamente in doppio ed ogni punto del grafico rappresenta la media delle due determinazioni; alcuni pools sono stati determinati, sempre in duplex, più di una volta.

TABELLA I.

Giorni di incubazione	Pool di	N° degli embrioni	N° determinaz. (in doppio)
10	5	10	2
17	3	6	2
19	3	9	5
21	2	6	3

Lo studio EEG è stato compiuto su polli di età variabile da 0 a 20 giorni dopo la schiusa. Sono stati applicati sulla calotta, mediante cemento a presa rapida (Formatray R) 5 elettrodi ad ago: 1 elettrodo mediano indifferente sulla cera nasale; due elettrodi anteriori frontali e due posteriori parietali (per la disposizione degli elettrodi e le derivazioni usate vedi fig. 2 nel testo).

Lo studio morfologico è stato condotto su encefali di pollo di età compresa fra il X giorno di incubazione fino all'età adulta. Gli encefali sono stati fissati con il liquido di Bouin, inclusi in paraffina e tagliati in serie. Sezioni rappresentative sono state colorate con l'ematosilina-eosina e con il metodo di Nissl alla tionina. Sezioni al congelatore di materiale fissato in formalina bromurata sono state impregnate con il metodo di Cajal al cloruro d'oro per gli astrociti e di del Rio Hortega al carbonato forte per la microglia e l'oligodendroglia.

*Ricerca biochimica.* - Le osservazioni fatte dimostrano chiaramente che l'attività NaKA, quasi assente al X d'incubazione, va gradatamente elevandosi, raggiungendo un massimo, che corrisponde poi a quello del telencefalo adulto, in corrispondenza della schiusa (cfr. fig. 1 nel testo).

*Osservazioni EEG.* — Al XIII *d* d'incubazione i lobi cerebrali del pollo iniziano a manifestare una attività elettrica spontanea. Fra il XVII *d* e la schiusa, in un periodo di rapido incremento della NaKA, l'ampiezza delle attività bioelettriche diventa notevolmente più grande (Peters e coll. [8] 1960). Alla nascita l'attività EEG del pulcino è caratterizzata dalla presenza di attività lente 4/6 c/s abbastanza regolari; nel pollo adulto (Key e Marley [9] 1962) sono invece predominanti attività di frequenza rapida. Le attività rapide caratteristiche dell'adulto sono scarsamente rappresentate nel neonato;

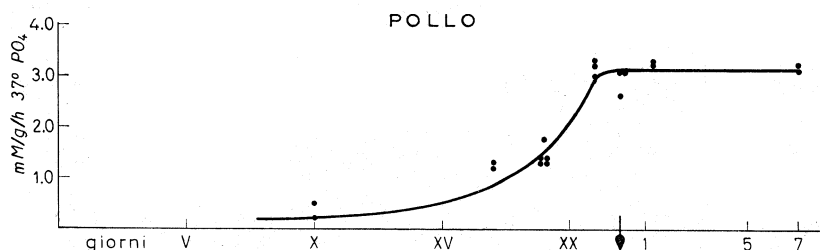


Fig. 1. — Andamento dell'attività enzimatica dell'ATPasi Na—K dipend. nel telencefalo di embrione di pollo.

In ascisse l'età in giorni (la freccia indica la schiusa), in ordinate l'attività espressa in mM PO<sub>4</sub>/g peso secco/h a 37°. Per completezza sono riportati i dati dopo la schiusa ricavati dalla precedente esperienza. Per spiegazione vedi testo.

esse aumentano con l'evoluzione dei giorni successivi. Al 10° *d* esse sono già abbondanti, sia pure con una certa variabilità individuale e nel corso della registrazione; al 20° *d* diventano decisamente dominanti tanto che non è più distinguibile una frequenza di base inferiore. In questo periodo, tra il 10° ed il 20° *dd* di vita si ha un notevole incremento dell'attività NaKA (Palladini e coll. [5] 1965).

In questa breve Nota riferiremo solo alcune delle osservazioni preliminari sulla maturazione morfologica del telencefalo di pollo in rapporto allo sviluppo dell'attività enzimatica.

A X *d* d'incubazione, quando l'attività NaKA è ancora assai bassa, sono ancora mal riconoscibili le parti in cui si divide il telencefalo di pollo (Tav. I, fig. A). Nei preparati colorati con il metodo di Nissl le cellule nervose hanno scarso citoplasma basofilo e spesso sono mal riconoscibili dagli elementi gliali (Tav. I, fig. B). La matrice sottopendimaria è ancora ben riconoscibile e presenta numerose mitosi.

A XII *d* d'incubazione, nel periodo di rapido incremento dell'attività NaKA, sono ben riconoscibili le parti in cui si suddivide il corpo striato del pollo (Tav. I, fig. C). La matrice subependimaria è notevolmente ridotta di spessore con scarse mitosi. Nei preparati colorati con il metodo di Nissl le cellule nervose sono facilmente riconoscibili dagli elementi gliali, con zolle tigroidi ben sviluppate (Tav. I, fig. D). È frequente il reperto di cellule gliali con nucleo piuttosto piccolo e ricco di cromatina, circondato da un

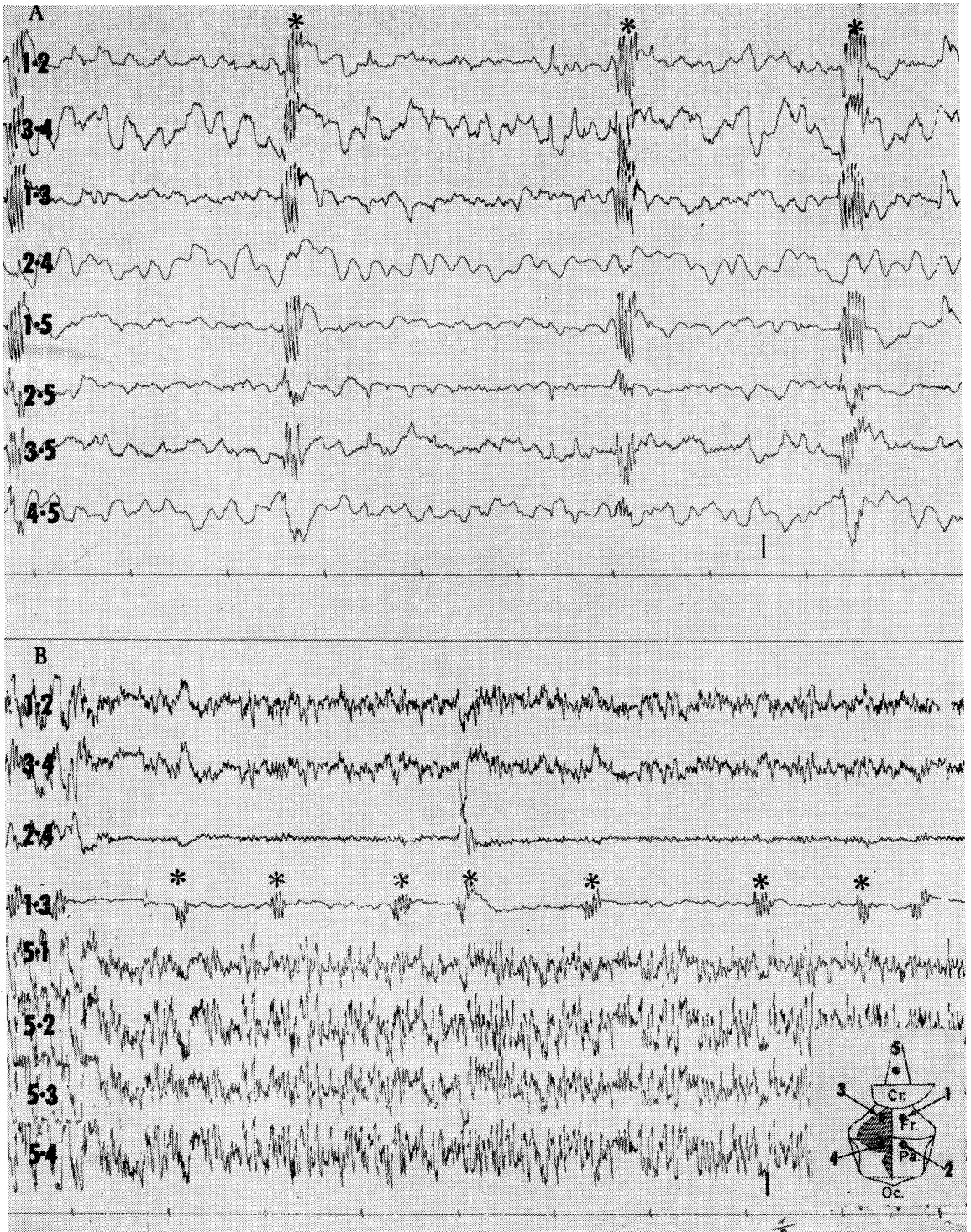


Fig. 2. - Reperti EEG su giovani polli. Il tratto verticale = 50 mV. C.t. 0,3 sec.

A - Pollo alla schiusa. Attività di frequenza prevalente a 4 c/s, voltaggio 25-50 mV, lievemente asimmetrico, con prevalenza Sn su Dx. Tale reperto si mantiene a lungo nel corso della registrazione: rare e lievi modificazioni indotte dalla comparsa di scarse attività rapide. L'asterisco marca gli artefatti da membrana nitrificante (PAULSON [20] 1964). B - Pollo di 20 dd di vita. Attività rapide rilevabili diffusamente: frequenza determinabile 18-25 c/s. Il voltaggio è maggiore nelle derivazioni a grande distanza interelettrica. L'asterisco marca gli artefatti da membrana nitrificante.

sottile alone di citoplasma chiaramente basofilo. Alcuni di questi elementi sono addossati alla parete di capillari sanguigni.

A XIX *d* d'incubazione, quando l'attività della NaKA ha quasi raggiunto i valori dell'adulto (per unità di peso secco), l'aspetto morfologico degli elementi gliali è molto simile a quello del pollo maturo, pur esistendo una differenza che riteniamo importante. Le cellule nervose satellitate, e precisamente i neuroni a diretto contatto con un nucleo gliale, sono meno numerosi che nell'adulto. I nuclei della glia satellite, inoltre, hanno forme più irregolari e dimensioni generalmente maggiori che nell'adulto. Reperti simili si osservano 1 giorno dopo la schiusa. In una ricerca condotta su sezioni di telencefalo di pollo neonato dello spessore di 7 micron e colorate con il metodo di Nissl, abbiamo contato in media 10 neuroni satellitati su 100, contro 20 su 100 dell'adulto. A 7 giorni di vita, quando ha inizio l'incremento dell'attività della NaKA che raggiungerà il suo massimo al 13° *d* (Palladini e Venturini [5] 1965) il numero dei neuroni satellitati è pressoché eguale a quello dell'adulto; sono inoltre più numerosi i satelliti che, come nel pollo maturo, hanno nucleo piccolo e rotondo con cromatina disposta a blocchetti. Con i metodi argentici (carbonato forte del Rio Hortega) non ci è stato possibile impregnare i satelliti prima dello 11° *d*; l'impregnazione inoltre non era soddisfacente come nell'adulto (cfr. Tav. II).

Queste osservazioni preliminari sembrano dimostrare l'esistenza di stretti rapporti tra l'andamento dell'attività della NaKA, la maturazione morfologica e quella EEG nello sviluppo del telencefalo di pollo. A periodi di rapido aumento dell'attività enzimatica sembrano infatti corrispondere periodi critici nella maturazione morfologica ed EEG.

Vogliamo qui sottolineare i rapporti che sembrano esistere fra incremento della attività NaKA e maturazione gliale. Nell'encefalo adulto le cellule nervose sono completamente isolate dai processi gliali, eccetto dove esistono contatti sinaptici (Peters e Palay [10] 1965). Nel cervello immaturo, invece i neuroni sono a diretto contatto fra di loro e con i capillari, senza interposizione di membrane gliali (Pappas e Purpura [11] 1964). Si può supporre in via ipotetica che i periodi di maggiore aumento dell'attività NaKA corrispondano allo sviluppo delle membrane gliali, con formazione dei rapporti glio-vascolari e glio-neuronali. In mancanza di un metodo istochimico adatto ad evidenziare la fine localizzazione della NaKA (Bonting e coll. [12] 1962; Novikoff e coll. [13] 1961; Palladini e coll. [14] 1965) l'evidenza di una forte attività di questo enzima nelle cellule gliali non può essere che indiretta. Si è già detto dei rapporti che sembrano esistere fra incremento dell'attività della NaKA e maturazione gliale durante lo sviluppo del pollo. In precedenti ricerche sull'inibizione *in vivo* della NaKA mediante iniezione intracranica di ouabaina in diversi vertebrati (Mammiferi, Uccelli, Rettili, Anfibi) abbiamo osservato un cospicuo rigonfiamento della glia (Bignami e Palladini [15] 1965; Palladini e coll. [16] 1965). Reperti analoghi sono stati ottenuti con questo glucoside nell'encefalo di rana sopravvivate (Zadunaisky e coll. [17] 1963) ed in colture di gangli spinali di pollo (Stefanelli e coll. [18] 1965).

L'esistenza di una forte attività della NaKA nelle cellule gliali potrebbe corrispondere a due requisiti funzionali:

in primo luogo lo spazio intercellulare nella sostanza grigia è assai ristretto, per cui il passaggio d'acqua e ioni dal capillare alla cellula nervosa avverrebbe, attivamente, attraverso le membrane gliali;

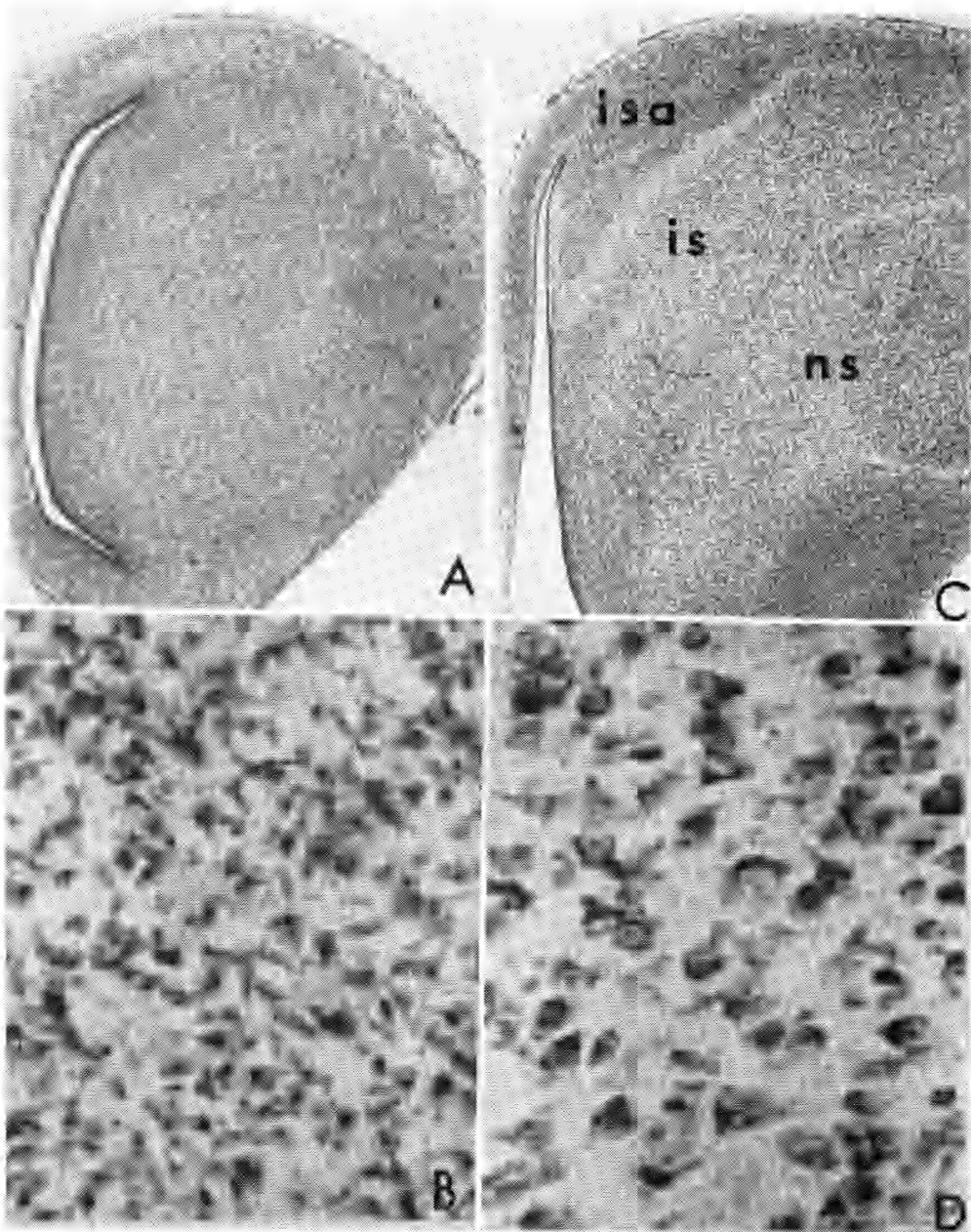
in secondo luogo le cellule gliali ed in particolare i satelliti avrebbero la funzione di mantenere la stabilità del *milieu interieur* del neurone, rappresentato dallo spazio intercellulare perineuronale. Come si è detto, questo spazio è molto piccolo, ma è pur sufficiente perché avvengano gli scambi jonici che sono alla base dell'attività nervosa.

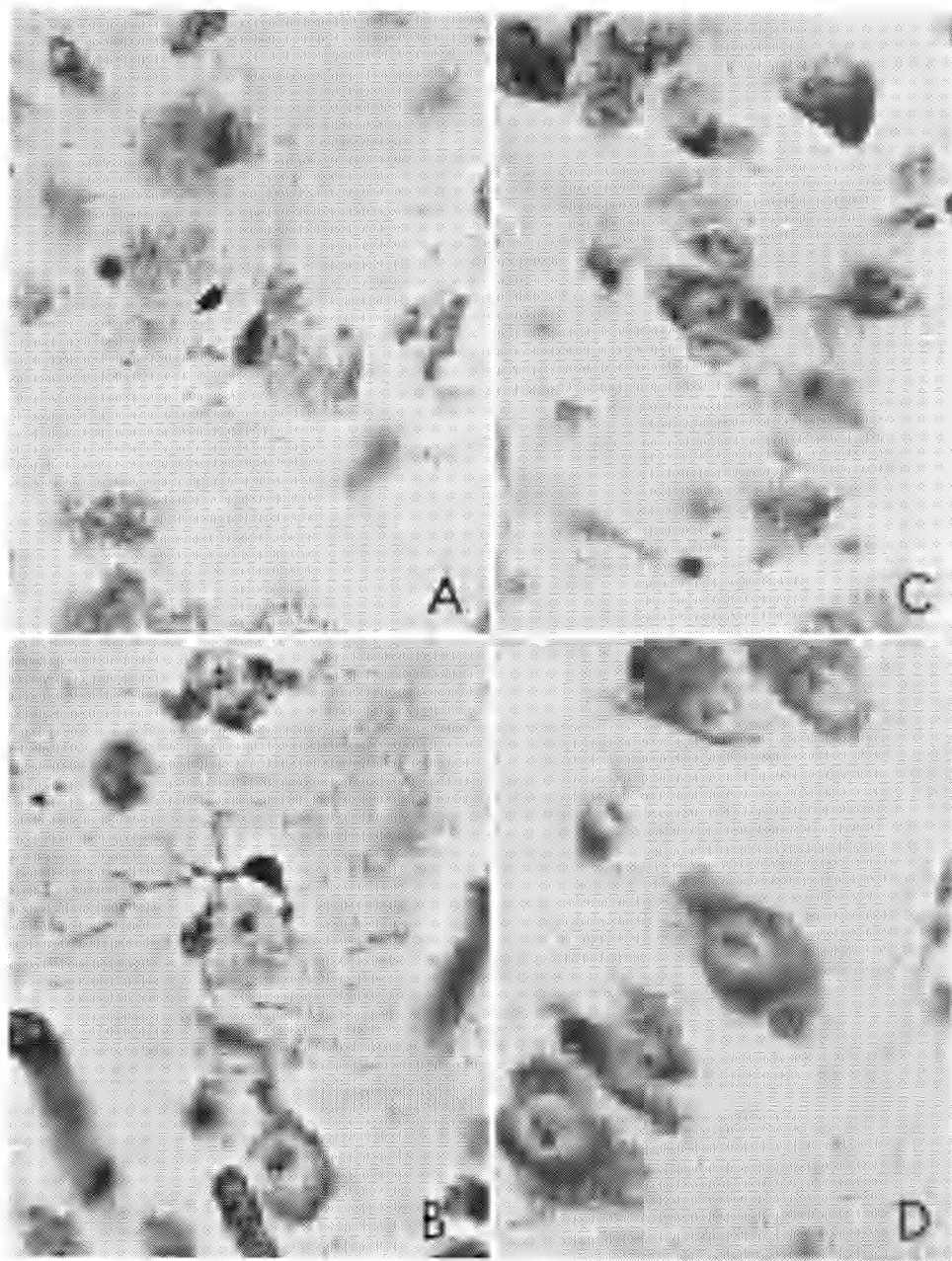
Secondo vedute recenti una funzione della glia sarebbe quella (Wendell-Smith e Blunt [19] 1965) di allontanare il potassio che fuoriesce dai neuroni durante il potenziale di azione, impedendo così una continua depolarizzazione e la diffusione fra aree sinaptiche confinanti e lungo la membrana assonale.

#### BIBLIOGRAFIA.

- [1] J. C. SKOU, « Biochim. Biophys. Acta », 23, 394 (1957).
- [2] J. C. SKOU, « Physiol. Rev. », 45, 596 (1965).
- [3] S. L. BONTING, in *Water and Electrolyte Metabolism (II)*, edit. de Graeff J. e Leijnse B. 35 (1964).
- [4] W. WOODBURY, in *Neurophysiology*, pp. 1-30. Philadelphia & London, Saunders (1961).
- [5] G. PALLADINI e G. VENTURINI, « Rend. Acc. Naz. Lincei », ser. VIII, 39, 572 (1965).
- [6] F. E. SAMSON, H. C. DICK e W. M. BALFOUR, « Life Science », 3, 511 (1964).
- [7] S. L. BONTING, K. A. SIMON e N. M. HAWKINS, « Arch. Bioch. Biophys. », 95, 416 (1961).
- [8] J. J. PETERS, A. R. VONDERHAE e A. A. HUESMAN, « Physiol. Zool. », 33, 225 (1960).
- [9] B. S. KEY e E. MARLEY, « Electroenceph. clin. Neurophysiol. », 14, 90 (1962).
- [10] A. PETERS e S. L. PALAY, « J. Anat. » (Lond.), 99, 419 (1965).
- [11] G. D. PAPPAS e D. P. PURPURA, « Progress in Brain Research », 4, 176 (1964).
- [12] S. L. BONTING, L. L. CARAVAGGIO e N. M. HAWKINS, « Arch. Bioch. Biophys. », 98, 413 (1962).
- [13] A. B. NOVIKOFF, J. DRUCKER, W. Y. SHIN e S. GOLDFISCHER, « J. Histochem. Cytochem. », 9, 434 (1961).
- [14] G. PALLADINI, A. BIGNAMI e G. VENTURINI, « Rend. Accad. Naz. Lincei », ser. VIII, 39, 372 (1965).
- [15] A. BIGNAMI e G. PALLADINI, *Vth Intern. Congr. Neuropath.*, Zurigo (1965) (in stampa).
- [16] G. PALLADINI, G. VENTURINI e F. BORGHI, « Boll. Zool. » 32, 311 (1965).
- [17] J. A. ZADUNAIKJ, F. WALD e E. D. P. DE ROBERTIS, « Experim. Neurol. », 8, 290 (1963).
- [18] A. STEFANELLI, G. PALLADINI e L. IERADI, « Experientia », 21, 717 (1965).
- [19] C. P. WENDELL-SMITH e M. J. BLUNT, « Nature », 208, 600 (1965).
- [20] G. PAULSON, « Electroenceph. clin. Neurophysiol. », 16, 611 (1964).







## SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE I-II

## TAVOLA I.

- A - Sezione trasversa del telencefalo di pollo a 10 *d* di incubazione. Em/eos.
- B - Corpo striato di pollo a 10 *d* di incubazione. Nissl × 300.
- C - Sezione trasversa del telencefalo di pollo a 17 *dd* di incubazione (ingrandimento leggermente inferiore alla foto A). isa = iperstriato accessorio; is = iperstriato; ns = neo-striato.
- D - corpo striato di pollo a 17 *dd* di incubazione. Ben riconoscibili le cellule gliali. Nissl × × 300.

## TAVOLA II.

- A - Satellite perineuronale nel corpo striato del pollo a 11 giorni dopo la chiusa. Impregnazione argentica sec. del Rio Hortega per la microglia e l'oligodendrogli. × 600.
- B - Satellite perineuronale nel corpo striato del pollo adulto. Impregnazione argentica sec. del Rio Hortega. × 600.
- C - Satellite perineuronale nel corpo striato del pollo neonato. Nissl × 800.
- D - Satellite perineuronale nel corpo striato del pollo adulto. Nissl × 800.