
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

LUCIA CERESA CASTELLANI

**Osservazioni ultrastrutturali e istochimiche sulla
pelle del *Triturus cristatus* Laur**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 46 (1969), n.3, p. 279–285.*

Accademia Nazionale dei Lincei

[<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1969_8_46_3_279_0>](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1969_8_46_3_279_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)

Zoologia. — *Osservazioni ultrastrutturali e istochimiche sulla pelle del Triturus cristatus Laur.* Nota preliminare (*) di LUCIA CERESA CASTELLANI, presentata (**) dal Corrisp. S. RANZI.

SUMMARY. — The ultrastructural characteristics of the skin of *Triturus cristatus* Laur. are described. The mucopolysaccharidic content in the cytoplasmic granules, present in all epidermal cells, was analyzed by means of "staining" with PTA. The presence of tyrosinase activity was evidenced by Dopa incubation in the same kind of cells; the intensity of the reaction, however, is different in the different cells and in the structures where this reaction appears.

L'epidermide degli Anfibi presenta differenze notevoli, sia rispetto alla epidermide degli Ittiopsidi, sia rispetto a quella dei Mammiferi.

Negli Anfibi compare uno strato corneo, che non esisteva negli Ittiopsidi; tale strato, però, è formato solo da uno o due ordini di cellule, mentre nei Mammiferi esso è molto più cospicuo. Dei sei o sette strati di cellule che formano l'epidermide degli Anfibi, solo lo strato germinativo è comparabile al corrispondente strato dell'epidermide dei Mammiferi; gli strati superiori differiscono notevolmente, e la differenza principale è data dal fatto che non vengono prodotti dalle cellule epidermiche i granuli di cheratoialina, caratteristici dello strato granuloso dei Mammiferi; tuttavia le cellule degli strati intermedi contengono granuli, che sono stati descritti da vari autori come granuli di muco. L'epidermide degli Anfibi differisce inoltre da quella dei Mammiferi per le modalità di rinnovo; mentre nei Mammiferi le cellule vengono continuamente rinnovate, negli Anfibi questo avviene a intervalli regolari.

La pelle degli Anfibi è stata ampiamente studiata, sia dal punto di vista strutturale che fisiologico (Milloning, 1958; Charles e Ingram, 1959; Pillai, Guénin e Gautier, 1960; Kelly, 1966; Bani, 1966) e, sebbene tali studi riguardino prevalentemente Anfibi che conducono vita terrestre, non mancano le osservazioni su Anfibi che vivono normalmente nell'acqua; anche la cute di Anfibi allo stato larvale è stata studiata al microscopio elettronico (Camatini e Lanzavecchia, 1965).

(*) Laboratorio di Embriologia e Morfologia Sperimentale dell'Università Statale di Milano (Gruppo Ricerca per l'Embriologia del C.N.R.).

(**) Nella seduta dell'8 marzo 1969.

La morfologia ultrastrutturale della pelle del *Triturus cristatus* Laur. (cui si riferiscono le osservazioni di questa Nota) non si discosta sostanzialmente da quella di altri Anfibi studiati da vari autori e mi limiterò quindi a darne una breve descrizione, prima di considerare alcuni problemi riguardanti la presenza e la natura di particolari sostanze nel citoplasma delle cellule epidermiche. Pillai (1962) descrive la presenza di melanociti intraepidermici; Zavarella ⁽¹⁾ osserva l'esistenza di tirosinasi diffusa nel citoplasma delle cellule dello strato intermedio e superficiale. Le presenti ricerche intese ad appurare la natura e la localizzazione di tali sostanze e attività enzimatiche sono state effettuate con mezzi di indagine istochimici e in questa Nota vengono esposti i primi risultati fin qui ottenuti.

MATERIALI E METODI.

Sono stati prelevati da Tritoni (*Triturus cristatus* Laur.) pezzi di pelle nera sul dorso, in una regione localizzata tra tronco e coda, e pezzi di pelle gialla sul ventre. Per le osservazioni della pelle normale, è stata eseguita una prefissazione in glutaraldeide al 3% in tampone cacodilato 0,1 M, contenete CaCl_2 (Cardell e coll. 1967), seguita da una fissazione in acido osmico all'1% secondo Millonig. L'inclusione è stata fatta in Vestopal W. Le sezioni ultrafini, eseguite con un microtomo Ultratome LKB, sono state osservate col microscopio elettronico Hitachi HS-7, dopo una doppia colorazione con acetato di uranile (Brody, 1959) e citrato di piombo (Reynolds, 1963).

Alcune sezioni ultrafini sono state colorate con acido fosfotungstico (PTA) secondo Marinozzi, dopo ossidazione con H_2O_2 o con HIO_4 . La colorazione con PTA è stata fatta su sezioni montate su normali griglie di rame, ombreggiate con oro a varie angolature, invece che su fette flottanti ⁽²⁾; ciò semplifica considerevolmente la tecnica e, nello stesso tempo, non comporta spese eccessive, che si avrebbero utilizzando griglie d'oro o di platino. Sono stati eseguiti controlli, su sezioni ossidate, ma non colorate col PTA.

Per la dimostrazione dell'attività tirosinasi, è stata effettuata una incubazione in «Dopa», seguendo questi procedimenti:

i pezzi di pelle appena prelevati vengono fissati in glutaraldeide al 3% in tampone fosfati 0,1 M, a pH 7,4 per 45'. Dopo un lavaggio in tampone (30-60') i pezzetti di pelle, non congelati, vengono sezionati in fette di 40-50 μ di spessore, con il microtomo Sorvall TC-2; le fette vengono poi lasciate dalle 12 alle 18 ore in tampone a 0°C.

L'incubazione viene effettuata in Dopa 0,1% in tampone fosfati 0,1 M a pH 7,4 per 6 ore, e la soluzione viene rinnovata ogni ora, onde evitare fenomeni di auto-ossidazione. Terminata l'incubazione, dopo un lavaggio in tampone per 30', le fette sono fissate in acido osmico (secondo Millonig) per 45', disidratate rapidamente e incluse in Vestopal W. Per i controlli è stata eseguita l'incubazione in mezzo privo di substrato.

OSSERVAZIONI.

Nell'epidermide del tritone si possono riconoscere quattro strati: corneo, sottocorneo, intermedio e germinativo. Lo strato corneo (fig. 1) è formato di solito da una sola fila di cellule, con nucleo appiattito e ridotto; il citoplasma è

(1) Dati non pubblicati.

(2) La tecnica in questione è stata messa a punto con la collaborazione del sig. Sergio Salimbeni, che vivamente ringrazio.

occupato quasi interamente da tonofilamenti, che formano una sorta di feltro compatto; sono visibili inoltre scarsi vacuoli, qualche mitocondrio in degenerazione e talvolta dei granuli di pigmento. Le cellule dello strato corneo sono a stretto contatto l'una con l'altra, con forte riduzione degli spazi intercellulari e notevole estensione dei desmosomi.

Al di sotto dello strato corneo, si trova uno strato sottocorneo (fig. 2) formato da una o due file di cellule che presentano caratteri di transizione tra le cellule cornee e le cellule tipiche dello strato intermedio. Le cellule dello strato sottocorneo prendono contatto con le sovrastanti cellule cornee per mezzo di desmosomi a forma di semiluna, con la concavità rivolta verso la superficie esterna (fig. 1, →); nel citoplasma i tonofilamenti sono abbondantissimi, per lo più aggregati in fasci disposti in tutte le direzioni; gli organuli cellulari sono scarsamente visibili e gli spazi intercellulari sono ancora piuttosto ridotti. Sono molto numerosi i ribosomi liberi e sono visibili talvolta dei granuli di pigmento intracitoplasmatici; sono presenti inoltre, sebbene spesso oscurati dalla grande quantità di tonofilamenti, dei granuli di modica densità, che appaiono più numerosi ed evidenti nelle cellule dello strato intermedio.

Lo strato intermedio è formato da più file di cellule, comprese tra lo strato sottocorneo e lo strato germinativo; queste cellule hanno un nucleo voluminoso e un citoplasma contenente ancora molti tonofilamenti, che però non si presentano più in fasci spessi come nel caso delle cellule dello strato sottocorneo; nel citoplasma inoltre sono ben visibili gli organuli caratteristici. Granuli di modica densità, di forma rotondeggiante od ovale, di dimensioni oscillanti tra i 100 e i 300 μ , appaiono sempre nel citoplasma di queste cellule; vanno tuttavia decrescendo di numero via via che ci si avvicina allo strato germinativo.

Qualche differenza si può rilevare tra pelle nera dorsale e pelle gialla ventrale per quanto riguarda lo strato intermedio dell'epidermide. Il citoplasma delle cellule della pelle gialla appare più chiaro, contiene un minor numero di filamenti e i granuli prima descritti mostrano una maggior variabilità, sia di forma che di dimensioni. I margini cellulari delle cellule dello strato intermedio sono sempre molto frastagliati e negli spazi intercellulari si proiettano numerosissimi prolungamenti citoplasmatici che sono particolarmente abbondanti nella pelle gialla.

Molto raramente tra le cellule dello strato intermedio si osservano taluni elementi con citoplasma notevolmente più chiaro; essi sono privi di desmosomi e sono probabilmente le cosiddette «cellule chiare» descritte da molti autori (Clark e Hibbs, 1958; Pillai, 1962; Charles e Ingram, 1959) e interpretate da Pillai come probabili melanociti intraepidermici.

Le cellule dello strato basale o germinativo non differiscono molto dalle cellule sovrastanti; nel citoplasma di esse si osservano ancora taluni granuli, sebbene in numero minore. Sulla membrana plasmatica rivolta verso il derma, vi sono tratti ispessiti (emidesmosomi), da cui partono fasci di tonofilamenti (fig. 15); alternati a questi vi sono tratti di membrana plasmatica caratterizzati dalla presenza di vescicole di pinocitosi. Al di sotto della membrana pla-

smatica, secondo la terminologia di Salpeter e Singer (1959), si nota lo « spazio adepidermico » in cui si intravedono dei sottili filamenti, e quindi la « membrana adepidermica » o membrana basale. Al di sotto di queste formazioni, che nel loro insieme costituiscono il complesso adepidermico, si trova una zona formata da fibrille collagene, visibile anche al microscopio ottico, che separa l'epidermide dal derma (lamella basale).

Nel derma sono localizzati i cromatofori e cioè melanofori, guanofori e xantofori. Mentre questi ultimi sono stati da me osservati molto raramente, gli altri due tipi cellulari sono abbondanti, sia nella pelle gialla, sia nella pelle nera (fig. 4). È noto che i melanofori posseggono numerose espansioni dendritiche e tali ramificazioni risultano evidenti in tutti i preparati osservati. Lunghe ramificazioni appaiono però anche nel caso dei guanofori (fig. 4); nel citoplasma di queste cellule si trovano sottili placchette di guanina, disposte parallelamente l'una all'altra (fig. 6). Tali placchette scompaiono spesso durante la preparazione per l'osservazione al microscopio elettronico, lasciando degli spazi vuoti, per cui il citoplasma assume un aspetto fenestrato.

Nel corso di questo lavoro ho cercato di accertare la natura dei granuli presenti nel citoplasma delle cellule epidermiche mediante trattamento con PTA, che mette in evidenza i mucopolisaccaridi. Osservando questi preparati si nota (fig. 7) che i granuli reagiscono positivamente e che gli spazi intercellulari tra i vari strati sono anch'essi positivi al trattamento con PTA (fig. 7 →).

Nel citoplasma di molte cellule epidermiche, sia di pelle nera che di pelle gialla, si notano, in seguito a incubazione con Dopa, formazioni peculiari di notevole densità agli elettroni (figg. 8, 9, 10); esse non appaiono nei controlli non incubati con Dopa. Queste formazioni sono a forma di bastoncino, diritto o sinuoso, oppure di granuli rotondeggianti ovali; la densità maggiore appare nei granuli, mentre le formazioni bastoncellari presentano, a forte ingrandimento, un aspetto piuttosto granuloso.

Anche la cisterna perinucleare reagisce positivamente a tale reazione istochimica (figg. 9; 11).

DISCUSSIONE DEI RISULTATI.

I due principali problemi presi in esame in questa Nota, si riferiscono al significato ed alla natura chimica delle granulazioni citoplasmatiche delle cellule epidermiche, ed all'eventuale partecipazione dell'epidermide nei processi melanosintetici.

I granuli che si trovano nel citoplasma delle cellule epidermiche in numero sempre più elevato man mano che si procede verso lo strato corneo, sono stati variamente descritti: Parakkal e Matoltsy (1964) in *Rana pipiens*, parlano di un unico tipo di granuli Pas-positivi, il cui contenuto si verserebbe negli spazi intercellulari. Farquhar e Palade (1963) descrivono invece due tipi di granuli: un tipo di piccole dimensioni (100-150 m μ) si trova in tutte le cellule dello strato intermedio (che Farquhar e Palade chiamano « granuloso », rife-

rendosi appunto alla presenza di questi granuli), ad eccezione delle più esterne.

I granuli del secondo tipo di Farquhar e Palade, di dimensioni molto maggiori (300–900 μ), si trovano solo nelle cellule situate immediatamente al di sotto dello strato corneo, in posizione paranucleare; il loro contenuto appare più denso di quello dei granuli più piccoli e il loro destino non è ben chiaro.

Nel materiale da me studiato non ho notato una netta distinzione dei granuli nei due tipi sopra indicati; le loro dimensioni variano infatti da 100 a 300 μ , senza che differenze di grandezza corrispondano ad una determinata localizzazione.

Tali granuli hanno un contenuto mucopolisaccaridico, come risulta dalla « colorazione » con PTA; una sostanza simile a quella dei granuli è inoltre presente in tutti gli spazi intercellulari nell'intero spessore dell'epidermide. Una reazione più intensa al PTA è tuttavia evidenziabile negli spazi più superficiali, e ciò è verosimilmente da porsi in relazione alla maggior quantità di granuli nelle cellule degli strati più esterni.

Per quanto riguarda la melanogenesi e più propriamente la messa in evidenza di attività tirosinasi, usando come substrato la Dopa (Diidrossifenilalanina), una reazione positiva era ovvia nel caso dei melanofori dermici e di eventuali melanofori epidermici.

Infatti i premelanosomi presenti in queste cellule sono sede di attività tirosinasi e, in seguito all'incubazione in Dopa, si ha in essi formazione di pigmento melanico e conseguente trasformazione in melanosomi, con netto aumento di densità agli elettroni.

Risultati simili sono stati riportati da vari autori (Mishima, Loud e Schaub, 1962; Perotti, 1965).

Nel corso delle presenti ricerche la tirosinasi è stata tuttavia messa in evidenza, oltre che nei melanofori, anche nelle cellule epidermiche, chiaramente riconoscibili per la presenza di desmosomi e tonofilamenti. L'intensità della reazione è diversa nelle diverse cellule e nelle diverse strutture in cui si manifesta; è infatti di intensità minore nella cisterna perinucleare e nei corpi a bastoncino ed è maggiore nei granuli. Questi ultimi non devono essere confusi con quelli contenenti mucopolisaccaridi, che chiaramente non reagiscono a questa reazione enzimatica. Sulla base di queste osservazioni, sembra possibile avanzare l'ipotesi che nelle cellule epidermiche sia presente la tirosinasi, che non può tuttavia essere utilizzata in processi melanosintetici per mancanza di substrato utilizzabile. Questa ipotesi è in accordo con dati di istochimica al microscopio ottico; Zavanella ⁽³⁾ ha infatti rilevato la presenza di tirosinasi nelle cellule dell'epidermide di tritoni, sia usando come substrato la tirosina, sia la Dopa.

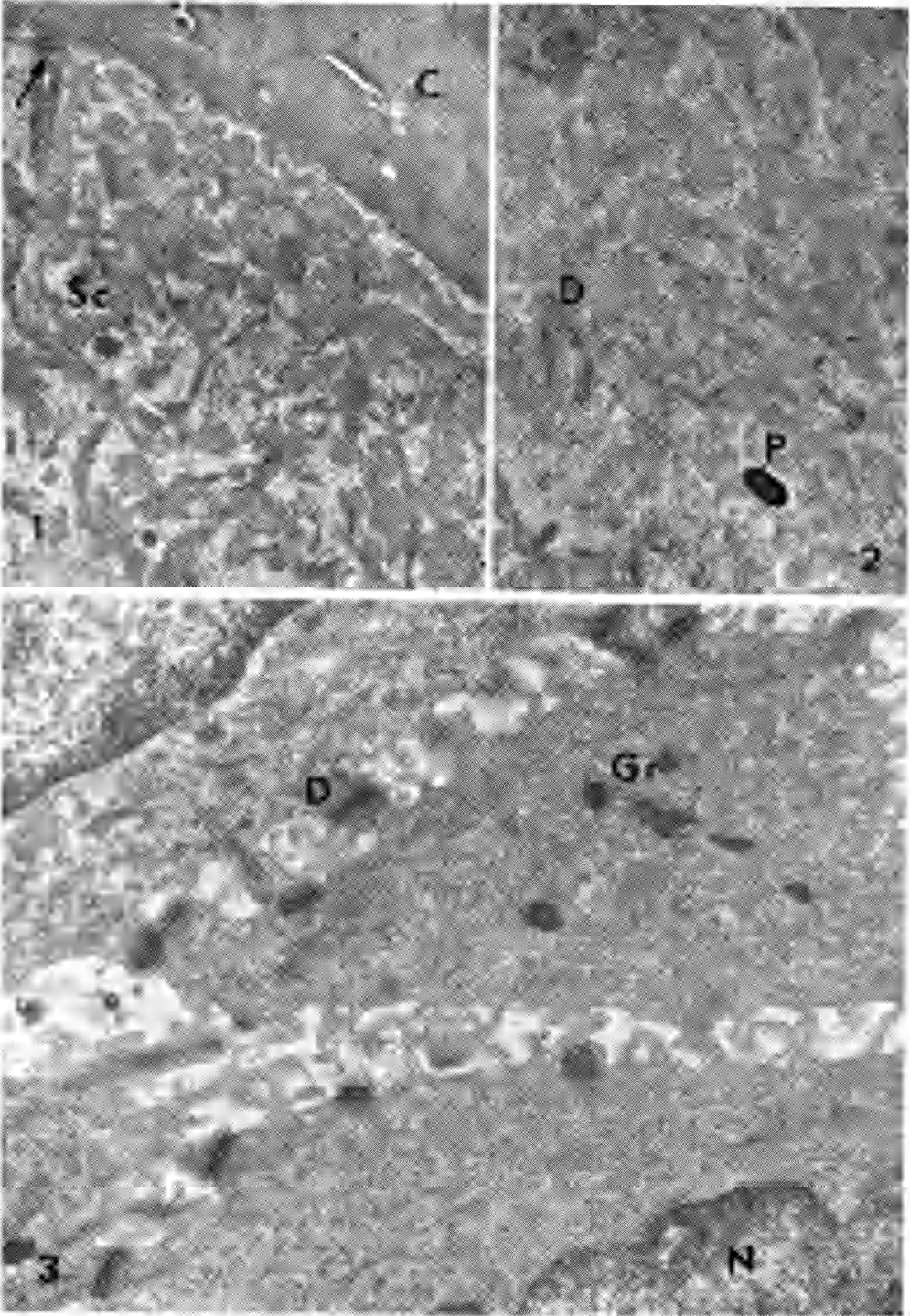
Secondo lo schema proposto da Seiji (1966), la tirosinasi sarebbe sintetizzata dai ribosomi del reticolo ruvido, da qui trasferita alla zona di Golgi, ove si formerebbero i premelanosomi. Applicando tale schema alle immagini

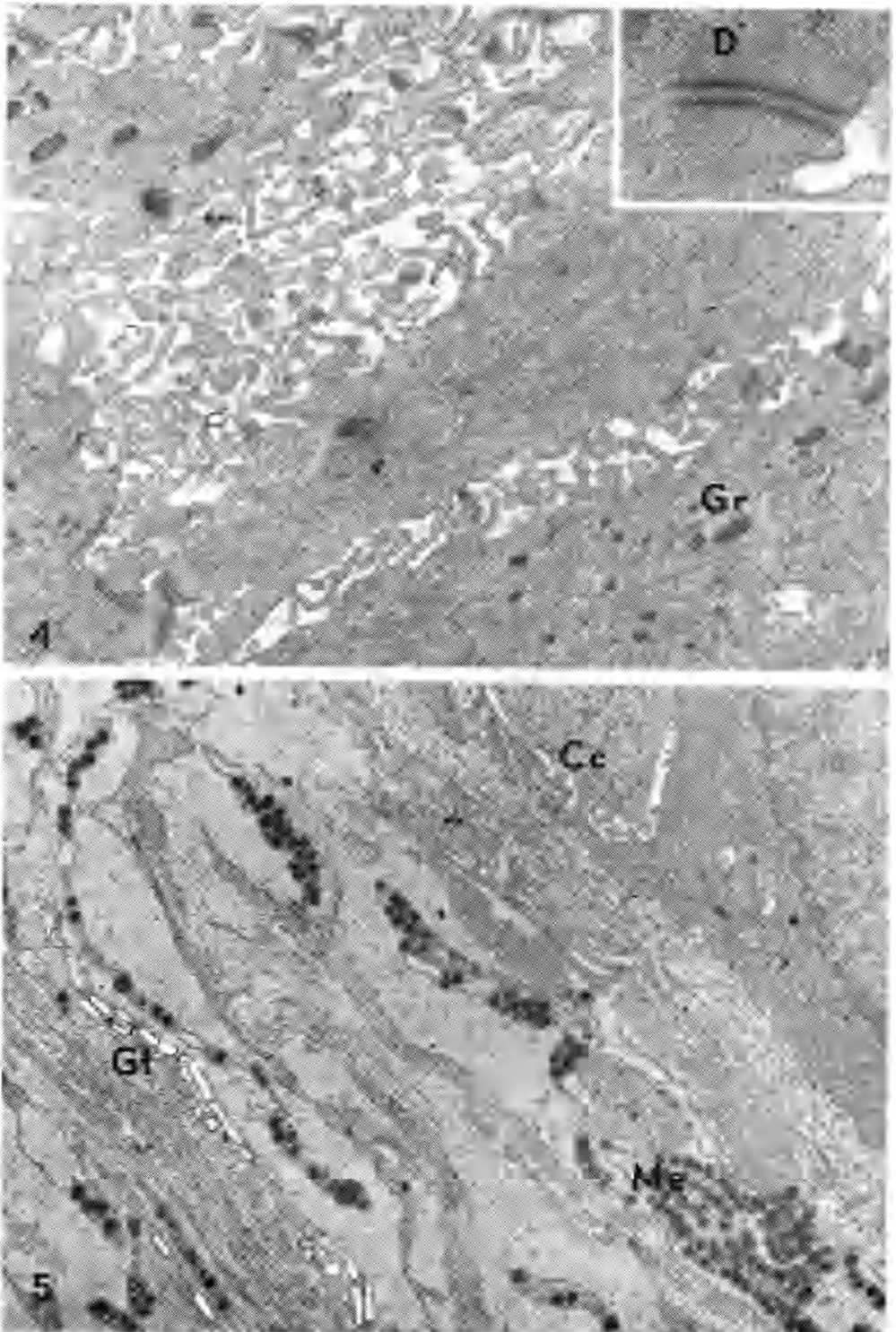
(3) Dati non pubblicati.

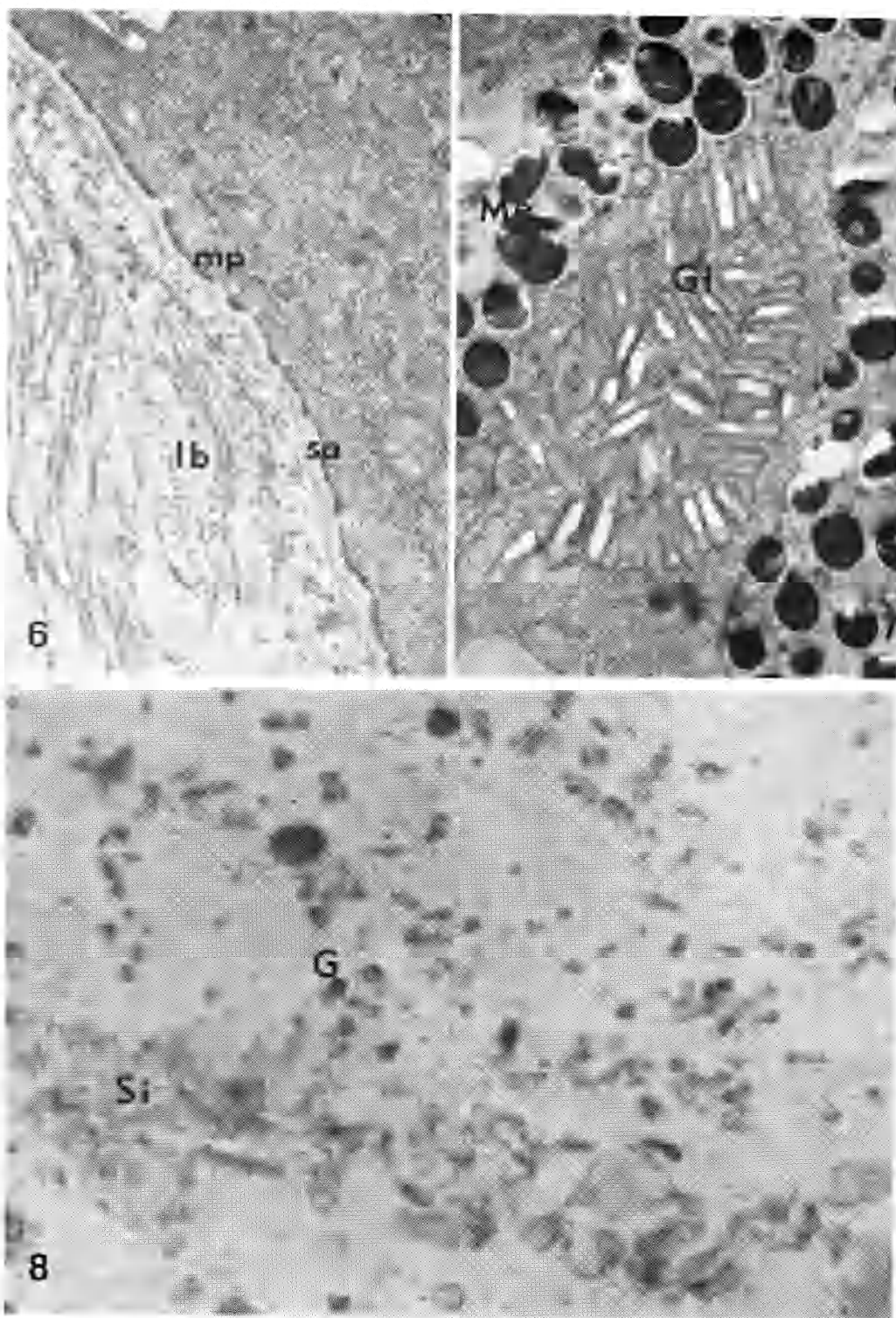
ottenute nella presente ricerca, l'esistenza di tirosinasi nella cisterna perinucleare è da porre in relazione al fatto che quest'ultima è, nelle cellule epidermiche studiate, una parte importante, dal punto di vista quantitativo, del reticolo ruvido. Più difficile da interpretare è invece la natura dei corpi a bastoncino che potrebbero essere ancora cisterne del reticolo ruvido, ovvero cisterne dello apparato di Golgi che si stanno trasformando in premelanosomi.

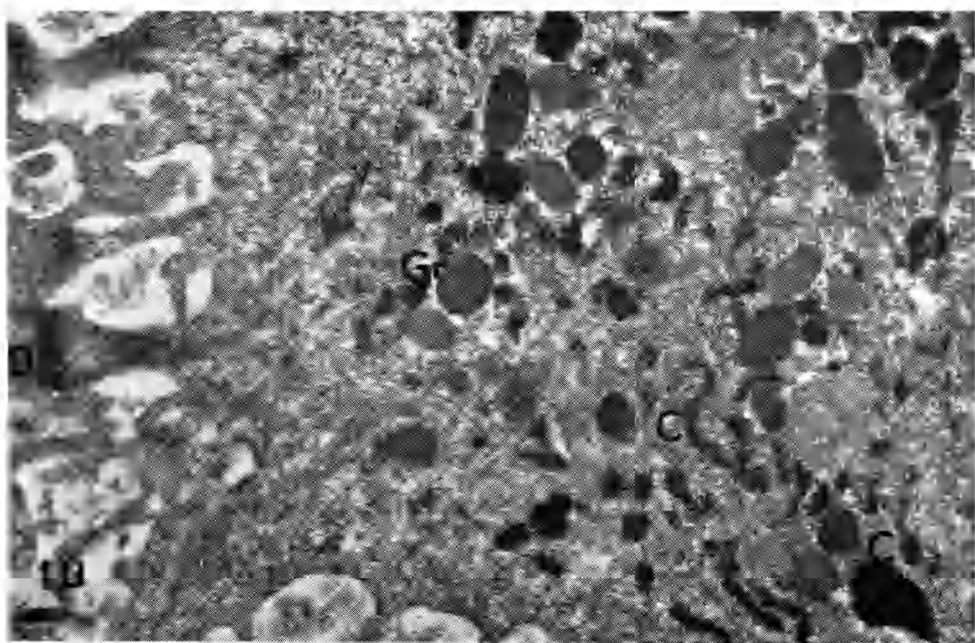
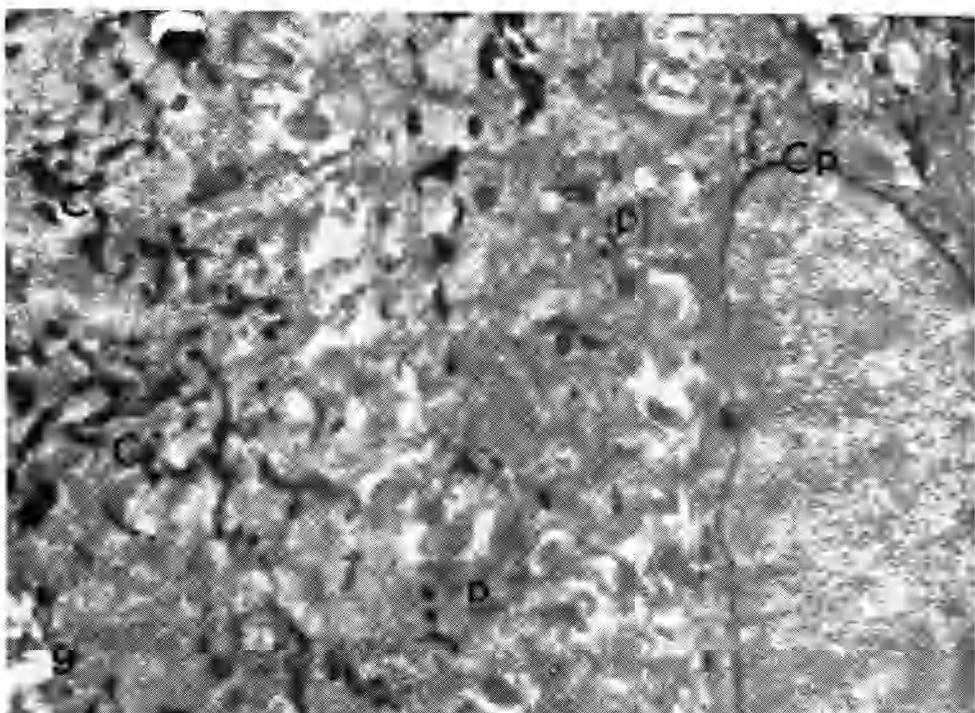
LAVORI CITATI.

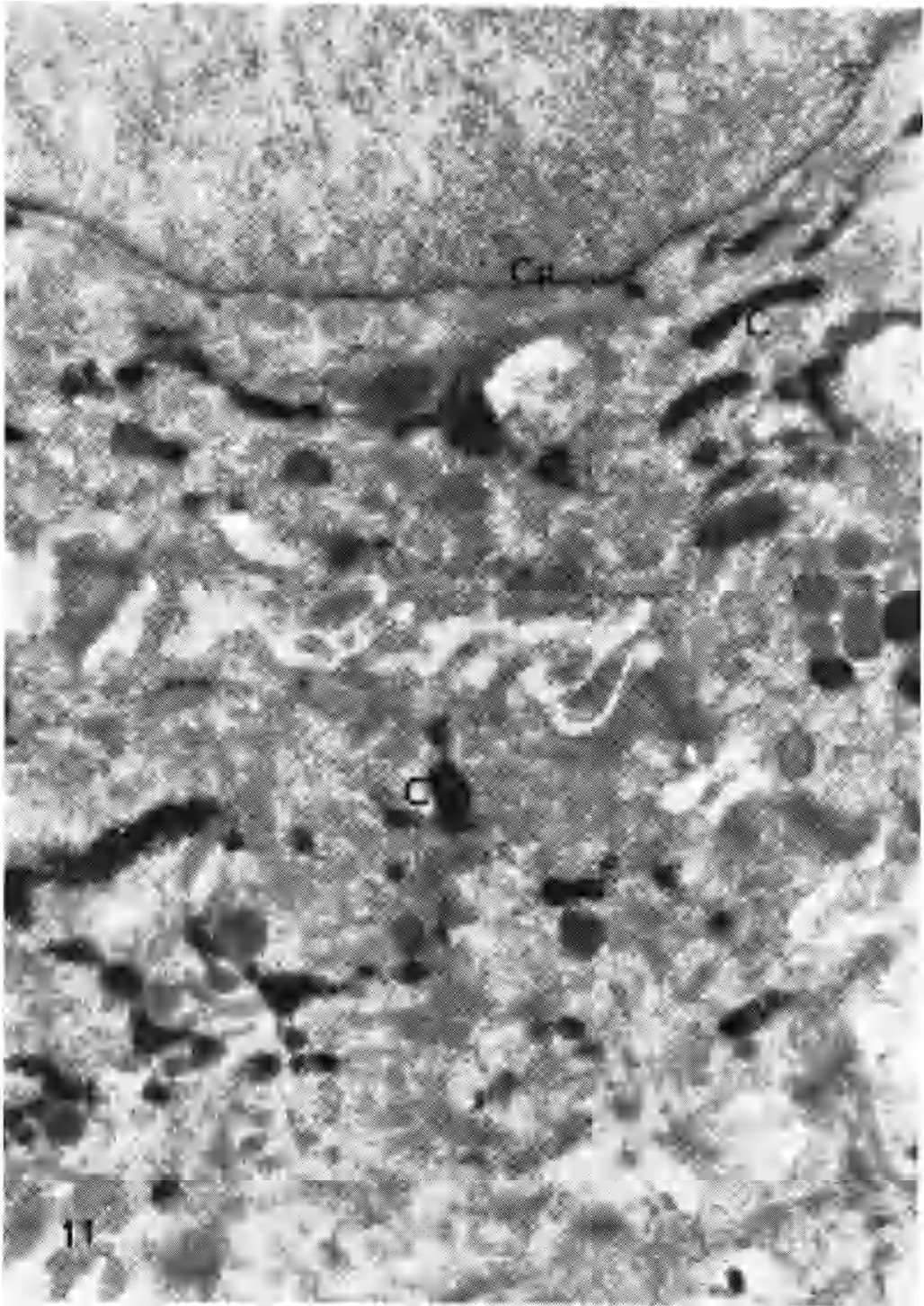
- BANI G., *Osservazioni sulla ultrastruttura della cute di Bufo bufo (L.) e modificazioni a livello dell'epidermide, in relazione a differenti condizioni ambientali*, «Monitore Zool. It.», 74, 93-112 (1966).
- BRODY J., *The keratinization of epidermal cells of normal Guinea Pig skin as revealed by electron microscopy*, «J. Ultrastructure Res.», 2, 482-511 (1959).
- CAMATINI M. e LANZAVECCHIA G., *Osservazioni sull'ultrastruttura dell'epidermide in embrioni e larve di Rana esculenta L.*, «Accademia Naz. dei XL», 15, 1-18 (1965).
- CARDELL R. R., BADENHAUSEN S. e PORTER K. R., *Intestinal triglyceride absorption in the rat.*, «J. Cell. Biol.», 34, 123-155 (1967).
- CHARLES A. e INGRAM J. T., *Electron microscope observations of the melanocyte of the human epidermis*, «J. Biophys. Biochem. Cytol.», 6, 41-44 (1959).
- CLARK W. H. JR. e HIBBS R. G., *Electron microscope studies of the human epidermis. The clear cell of Masson (dendritic cell or melanocyte)*, «J. Biophys. Biochem. Cytol.», 4, 679-684 (1958).
- FARQUHAR M. G. e PALADE G. E., *Cell junctions in Amphibian skin*, «J. Cell Biol.», 26, 263-291 (1965).
- KELLY D. E., *Fine structure of desmosomes, hemidesmosomes, and an adepidermal globular layer in developing newt epidermis*, «J. Cell Biol.», 28, 51-72 (1966).
- MARINOZZI V., *Phosphotungstic Acid (PTA) as a stain for polysaccharides and glycoproteins in electron microscopy*. «Electron Microscopy», Proc. 4th European Regional Conference on Electron Micr., Roma, Tipografia Poliglotta Vaticana, 55 (1968).
- MILLONIG G., *Further observations on a phosphate buffer for osmium solutions in fixation*, in «Electron Microscopy», «Proc. 5th Inter. Congress for Electron Micr., Philadelphia, Academic Press éd., New York, 2, P-8 (1962).
- MISHIMA Y., LOUD A. V. e SCHAUB F. F. JR., *Electron microscopy of premelanin*, «J. Invest. Dermatol.», 39, 55-62 (1962).
- PARAKKAL P. F. e MATOLTSY A. G., *A study of the fine structure of the epidermis of Rana Pipiens*, «J. Cell Biol.», 20, 85-94 (1964).
- PEROTTI M. L., *Gytochemical techniques in electron microscopic studies of melanin synthesis*, «Atti 5th Congress It. Microscopia Electr.», 37-40 (1965).
- PILLAI P. A., *Electron microscopic studies on the epidermis of newt with an enquiry into the problem of induced neoplasia*, «Protoplasma», 55, 10-62 (1962).
- SALPETER M. M. e SINGER M., *The fine structure of the adepidermal reticulum in the basal membrane of the skin of the newt Triturus*, «J. Biophys. Biochem. Cytol.», 6, 35-40 (1959).
- SALPETER M. M. e SINGER M., *Differentiation of the submicroscopic adepidermal membrane during limb regeneration in adult Triturus, including a note on the use of the term basement membrane*, «Anat. Rec.», 136, 27-40 (1960).
- SEIJI M., *Subcellular particles and melanin formation in melanocytes*, in «The Pigmentary System», Montagna éd., Pergamon Press, 8, 189-222 (1966).
- REYNOLDS E. S., *The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy*, «J. Cell Biol.», 17, 208-212 (1963).
- ZAVANELLA T., Comunicazione personale.











SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE I-V

TAVOLA I.

- Fig. 1. - Parte di citoplasma di una cellula dello strato corneo (C), e parte di citoplasma di una cellula dello strato sottocorneo (Sc). È visibile un desmosoma a forma di semiluna (\rightarrow). $\times 14.750$.
- Fig. 2. - Cellule dello strato sottocorneo: D = desmosoma; P = granulo di pigmento; $\times 14.750$.
- Fig. 3. - Pelle nera: cellule dello strato intermedio dell'epidermide dorsale: D = desmosoma; Gr = granuli di muco; N = nucleo; $\times 18.700$.

TAVOLA II.

- Fig. 4. - Pelle gialla: cellule dello strato intermedio dell'epidermide ventrale. Gli spazi intercellulari sono molto sviluppati: D = desmosoma; Gr = granulo di muco; $\times 12.000$; Inserto $\times 46.500$.
- Fig. 5. - Pelle gialla: parte di cellula dello strato basale e parte di derma. Nell'epidermide è visibile una porzione di citoplasma appartenente a una « cellula chiara » (Cc). Nel derma appaiono prolungamenti di melanofori (Me) e di guanofori (Gf); $\times 6.000$.

TAVOLA III.

- Fig. 6. - Limite tra cellule dello strato basale dell'epidermide e derma: mp = membrana plasmatica; sa = spazio adepidermico; lb = lamella basale; $\times 19.500$.
- Fig. 7. - Porzioni di cromatofori: Gf = guanoforo; Me = granuli di melanina; $\times 15.000$.
- Fig. 8. - Epidermide trattata con PTA: G = granuli a contenuto mucopolisaccaridico; Si = spazi intercellulari, in cui è visibile una sostanza omologa a quella dei granuli; $\times 28.000$.

TAVOLA IV.

- Fig. 9. - Cellule epidermiche dopo incubazione con Dopa. Si notano corpi di forma varia, a bastoncino o a granulo, che hanno reagito positivamente all'incubazione (C): Cp = cisterna perinucleare; D = desmosoma; $\times 13.200$.
- Fig. 10. - Cellule epidermiche dopo incubazione con Dopa. Accanto ai corpi (C) che hanno reagito positivamente all'incubazione, sono visibili granuli di muco (Gr): D = desmosoma; $\times 28.000$.

TAVOLA V.

- Fig. 11. - Nelle cellule epidermiche, reagiscono positivamente all'incubazione con Dopa sia alcune formazioni citoplasmatiche (C), sia la cisterna perinucleare (Cp): $\times 28.000$.