
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

EMILIA CATALDI, LUISA ANNA IERADI

**Localizzazione istochimica della fosfatasi acida in
neuroni gangliari coltivati in vitro**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 51 (1971), n.1-2, p. 93-96.*

Accademia Nazionale dei Lincei

[<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1971_8_51_1-2_93_0>](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1971_8_51_1-2_93_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. — *Localizzazione istochimica della fosfatasi acida in neuroni gangliari coltivati in vitro* (*). Nota (**) di EMILIA CATALDI e LUISA ANNA IERADI, presentata dal Socio A. STEFANELLI.

SUMMARY. — In this research the localisation of acid phosphatase (Gomori's technique) has been described in the rat spinal ganglia neurons cultivated *in vitro*. The reaction is localised in small granules scattered through the cell and displays different characteristics in small and large cells. The localisation of acid phosphatase is similar to that in ganglia neurons *in vivo*.

La fosfatasi acida nelle cellule nervose è stata messa in evidenza con metodi istochimici sufficientemente specifici e precisi ed è stato chiarito che questo enzima non è associato in tutte le cellule ad un particolare organello, ma ha in alcune una localizzazione lisosomiale, in altre anche extralisosomiale [1, 2, 3]. Questa distribuzione differente rende ancora poco chiaro il ruolo di questo enzima nelle cellule nervose, poiché la sua attività può essere messa in relazione sia a processi metabolici che allo stato funzionale della cellula.

La distribuzione citologica della fosfatasi acida nel sistema nervoso durante lo sviluppo è stata studiata nel pollo [4, 5, 6, 7], nella cavia [8], nel ratto [9, 10, 11, 12] e nel feto umano [13, 14]. Da questi studi risulta che l'attività appare nei primissimi stadi di sviluppo, aumenta nei centri con il differenziamento e a differenziamento ultimato l'attività rimane costante.

Di particolare interesse è lo studio della fosfatasi acida nei neuroni dei gangli spinali dove esiste una differente distribuzione enzimatica nei due tipi di cellule grandi e piccole [15, 16, 3, 12].

Lo scopo del nostro lavoro è quello di portare un contributo alla conoscenza del ruolo della fosfatasi acida nelle cellule nervose, per questo abbiamo scelto il metodo delle culture *in vitro* poichè, essendo le cellule in queste condizioni sottoposte ad un isolamento funzionale, si può presumere che il differenziamento istochimico da esse acquisito sia legato a proprietà intrinseche della cellula stessa.

MATERIALE E METODO

Gangli spinali di feto di ratto di 14-18 giorni sono stati coltivati *in vitro* nel doppio coprioggetto di Maximow. I gangli sono stati espianati su vetrini rivestiti di un sottile strato di collagene [17] e nutriti con il seguente mezzo: 50 parti di Minimum Essential Medium Eagle (con glutamina), 40 parti di

(*) Lavoro eseguito nell'Istituto di Anatomia Comparata «G. B. Grassi» dell'Università di Roma con un contributo del C.N.R.

(**) Pervenuta all'Accademia il 16 luglio 1971.

siero placentare umano, 25 parti di estratto embrionale di embrione di pollo di 9 gg. al 50 %, glucosio 600 mg %, acromicina in Gey 1,2 g/ml. Le culture sono state incubate a 35° C e il mezzo è stato cambiato due volte alla settimana. Per la dimostrazione della fosfatasi acida abbiamo usato il metodo di Gomori. Lo stesso metodo è stato applicato a gangli spinali prelevati da ratti di varie età, da 13 gg. «in utero» a 20 gg. dopo la nascita.

Le culture sono state fissate dopo 7, 10, 15, 20 e 27 giorni.

OSSERVAZIONI

Dopo 7 gg. di cultura nei gangli non è ancora possibile una distinzione tra neuroni grandi e piccoli. La reazione di Gomori per la fosfatasi acida a questo stadio è positiva in tutte le cellule dell'espianto e della zona di migrazione e si presenta sotto forma di granuli sparsi nel citoplasma (fig. 4).

I neuroblasti dopo 15 giorni di cultura cominciano ad assumere grandezze diverse e la reazione si presenta in alcuni sotto forma di granuli sparsi nel citoplasma (fig. 1) in altri i granuli sono ammassati intorno al nucleo a formare un anello (fig. 2) o un semianello (fig. 3). La reazione si presenta in alcune cellule più intensa, in altre più debole.

Dopo 20-30 giorni di cultura la distinzione tra cellule nervose grandi e piccole è netta; la reazione è più intensa e uniforme nei neuroni di dimensioni minori; tra i neuroni più grandi alcuni mostrano una reazione negativa, altri debolmente positiva, altri fortemente positiva (fig. 5).

La distribuzione della fosfatasi acida nei neuroni dei gangli spinali coltivati *in vitro* sia durante il differenziamento che a differenziamento ultimato è simile a quella dei gangli spinali *in vivo*.

Dagli studi di Kalina e Wolmann [12] e dalle nostre osservazioni sulla distribuzione della fosfatasi acida nei gangli spinali del ratto durante lo sviluppo è noto che la maturazione dei neuroni è associata ad una attività più alta nelle cellule più piccole rispetto a quelle più grandi. Nei neuroni gangliari del ratto adulto la fosfatasi acida è localizzata nel citoplasma in forma di granuli sparsi o concentrati intorno al nucleo a formare un anello o una semiluna [1 e 15]. Secondo questi autori le cellule piccole hanno una concentrazione maggiore di granuli rispetto alle grandi.

Al microscopio elettronico Kalina e Bubis [3] osservano due differenti tipi di localizzazione della fosfatasi acida: lisosomiale ed extralisosomiale (legata all'apparato di Golgi e al reticolo endoplasmico). La fosfatasi acida extralisosomiale è tipica dei neuroni grandi. Gli Autori suggeriscono l'ipotesi che due enzimi diversi siano responsabili di questa distribuzione.

I nostri dati insieme a quelli precedenti riguardanti la localizzazione dell'acetilcolinesterasi [18] mettono in evidenza che in cultura come *in vivo* i due differenti tipi di neuroni gangliari (grandi e piccoli) mostrano un'attività istochimica diversa e caratteristica.

Tewari e Bourne [15] osservando intensa variabilità di varie reazioni istochimiche applicate a neuroni dei gangli spinali del ratto, hanno in un primo

tempo avanzato l'ipotesi che queste cellule siano sottoposte a un continuo ciclo metabolico probabilmente legato alla sintesi di proteine, acetilcolina, ed altri composti. Lavori successivi [19 e 20] non possono confermare l'ipotesi di un'attività ciclica ma fanno piuttosto ritenere che le differenze enzimatiche siano determinate dal particolare stato funzionale di una cellula in un determinato momento [16 e 3].

Nei gangli spinali del pollo [21] e della pecora [22] sono stati distinti due gruppi di neuroni che differiscono nella grandezza, nella velocità e modalità del differenziamento; prove fisiologiche suggeriscono che i neuroni che si differenziano prima e più rapidamente (neuroni grandi) siano almeno in parte responsabili delle sensazioni esterocettive (tattili); quelli che si differenziano più tardivamente (neuroni piccoli) includerebbero tra gli altri tipi neuroni propriocettivi.

Swanson e coll. [23] all'esame autoptico del sistema nervoso centrale di un bambino affetto da insensibilità al dolore e alla temperatura hanno riscontrato assenza di neuroni piccoli dei gangli dorsali, dovuta probabilmente ad un difetto nell'embriogenesi e avvalorano quindi i dati di Hamburger-Levi-Montalcini [21] e Barron [22].

In conclusione si può constatare dalle nostre culture che anche *in vitro* le cellule nervose (isolate da feti di ratto di 14-18 gg., stadio in cui non esiste attività fosfatasica visibile, né distinzione in due tipi di cellule) assumono grandezze diverse e diversa reattività al metodo istochimico impiegato per la fosfatasi acida.

Molti Autori hanno attribuito ai due tipi di neuroni gangliari una differente attività funzionale, riconoscendo un'attività esterocettiva, propriocettiva e interocettiva. Noi nelle condizioni di cultura non abbiamo nessun modo per verificare queste attività, ma possiamo constatare che le differenze di grandezza cellulare e di attività istochimica rilevate *in vivo* si identificano anche *in vitro* indipendentemente dalla esplicazione di ogni attività funzionale specifica.

BIBLIOGRAFIA

- [1] H. B. TEWARI e G. H. BOURNE, « Acta Hist. », 17, 197 (1964).
- [2] A. B. NOVIKOFF, « The Neuron », ed. H. Hyden, pp. 288 e 319 e sgg. (1967).
- [3] M. KALINA e I. I. BUBIS, « Histochemie », 14, 103 (1968).
- [4] F. MOOG, « Proc. Nat. Acad. Sci. », U.S., 29, 176 (1943).
- [5] F. MOOG, « Biol. Bull. », 86, 51 (1944).
- [6] F. MOOG, « Ann. N. Y. Acad. Sc. », 55, 57 (1952).
- [7] B. BERTOLINI e S. PONS, « Rend. Ist. Sc. Camerino », 2, 220 (1961).
- [8] G. B. FLEXNER e L. B. FLEXNER, « J. Cell. Comp. Physiol. », 31, 311 (1948).
- [9] J. MULNARD, « Arch. Biol. », 66, 525 (1955).
- [10] P. COHN¹ e D. RICHTER, « J. Neurochem. », 1, 166 (1956).
- [11] P. J. ANDERSON e S. K. SONG, « J. Neuropath. Exp. Neurol. », 21, 263 (1962).
- [12] M. KALINA e M. WOLMANN, « Histochemie », 22, 100 (1970).
- [13] P. MEYER, « Acta Neurol. Scand. », 39, 123 (1963).

- [14] D. G. MCKAY, E. C. ADAMS, A. T. HERTIG e S. DANZIGER, « Anat. Rec. », *122*, 125 (1955).
- [15] H. B. TEWARI e G. H. BOURNE, « J. Hist. Cyt. », *10*, 42 (1962).
- [16] T. R. SHANTHA, S. L. MANOCHA e G. H. BOURNE, « Histochemie », *10*, 234 (1967 b).
- [17] M. B. BORNSTEIN, « Lab. Invest. », *7*, 134 (1958).
- [18] L. A. IERADI, E. CATALDI e N. DEL GROSSO, « Rend. Acc. Naz. Lincei », ser. VIII, *48*, 717 (1970).
- [19] E. THOMAS, « Acta Neuropath. », *2*, 231 (1963).
- [20] T. KUMAMOTO e G. H. BOURNE, « Acta Anat. », *55*, 255 (1963).
- [21] V. HAMBURGER e R. LEVI MONTALCINI, « J. Exp. Zool. », *111*, 457 (1949).
- [22] D. H. BARRON, « J. Comp. Neurol. », *81*, 193 (1944).
- [23] A. G. SWANSON, G. C. BUCHAN e E. C. ALVORD, « Arch. Neurol. » *12*, 12 (1965).

SPIEGAZIONE DELLA TAVOLA

Le figure della tavola mostrano la reazione di Gomori per la fosfatasi acida eseguita su gangli spinali coltivati *in vitro*, prelevati da feti di ratto di 14-18 gg.

- Fig. 1. - Cultura di 15 gg. La reazione di Gomori per la fosfatasi acida si presenta sotto forma di granuli sparsi nel citoplasma. 1000×.
- Fig. 2. - Cultura di 15 giorni. I granuli sono ammassati intorno al nucleo a formare un anello. 640×.
- Fig. 3. - Cultura di 15 gg. I granuli formano un semianello. 640×.
- Fig. 4. - Cultura di 8 gg. La reazione si presenta uniforme in tutte le cellule. 640×.
- Fig. 5. - Cultura di 22 gg. Notare la differente intensità di reazione tra i due tipi di cellule nervose (grandi e piccole). 640×.

