
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

MILENA MARINI, PIERLUIGI TREVISAN

**Osservazioni su alcuni voluminosi neuroni dorsali del
midollo spinale di Salamandra**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 61 (1976), n.1-2, p.
127–132.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1976_8_61_1-2_127_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. — Osservazioni su alcuni voluminosi neuroni dorsali del midollo spinale di *Salamandra* (*). Nota (**) di MILENA MARINI e PIERLUIGI TREVISAN, presentata dal Socio A. STEFANELLI.

SUMMARY. — Rohon-Beard cells are detected in the larval spinal cord of a viviparous Amphibian (*Salamandra salamandra salamandra* L.). These elements rarefy in the larvae near the metamorphosis and are lacking in metamorphosed animals. The disagreement with the findings on viviparous Teleosts may be due to different developmental patterns.

Nell'ambito delle indagini embriologico-comparative che da tempo stiamo conducendo sui neuroni gangliari intraspinali degli Anamni, oltre a descrivere le cellule di Rohon-Beard in Teleostei [1-4] ed Anfibi [5-6], abbiamo dimostrato che esse sono assenti in quei Teleostei che si sviluppano completamente isolati dall'ambiente esterno, come i vivipari [7-8] e qualche peculiare oviparo [9].

Questi dati hanno suggerito di estendere le ricerche agli Anfibi vivipari ⁽¹⁾ e pertanto nella presente Nota riferiamo i risultati preliminari emersi dall'esame del midollo spinale di *Salamandra* durante lo sviluppo e nell'adulto.

Va ricordato in proposito che Burckhardt [11], Beard [12], Studnicka [13] e Van Gehuchten [14] segnalano la presenza di grossi neuroni dorsali nel midollo spinale di Anfibi urodeli, ma i loro dati e le loro interpretazioni non sono univoche.

Coghill [15] descrive nel midollo spinale di giovani embrioni di *Ambystoma* neuroni a precoce differenziamento che interpreta come cellule di Rohon-Beard; secondo l'Autore esse assolvono la funzione sensoria (esterocettiva e propriocettiva) prima del differenziamento dei gangli spinali.

Marchesini e Marini [5] e Trevisan e Marini [6] analizzano la citomorfosi delle cellule di Rohon-Beard in *Triturus* con particolare riguardo ai quadri involutivi che portano alla scomparsa di questi neuroni. Gli Autori dimostrano che l'involuzione delle cellule di Rohon-Beard inizia appena formate le radici dorsali dei gangli spinali, ma si protrae per tutta la durata del periodo larvale procedendo in direzione rostro-caudale. Infine Trevisan [16] osserva che le cellule di Rohon-Beard degenerano più rapidamente in larve

(*) Ricerca eseguita nell'Istituto di Istologia generale e speciale della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Bari e nell'Istituto di Anatomia Comparata dell'Università di Modena (Via Berengario, 14).

(**) Pervenuta all'Accademia il 14 luglio 1976.

(1) Va precisato che la distinzione tra vivipari ed ovovivipari è discussa, specie per gli Anfibi; in particolare *Salamandra salamandra* secondo Joly [10] è da considerare ovovivipara in pianura (Sarthe), ove si sviluppa esclusivamente a spese delle scorte vitelline e vivipara in montagna (alti Pirenei) ove presenta fenomeni di adelfofagia.

di *Triturus* trattate con ormone tiroideo e correla tale fenomeno con il più rapido differenziamento dei gangli spinali.

Il materiale impiegato nella presente ricerca è l'Anfibio urodelo viviparo *Salamandra salamandra* L.

Una femmina gravida è stata catturata nei pressi di Recoaro a circa 800 m di altitudine il 1° ottobre ed è stata sacrificata due giorni dopo. I piccoli estratti, in parte sono stati subito fissati in Bouin, in parte sono stati lasciati sviluppare in cristallizzatori a 15 °C; di questi animali, alcuni sono stati fissati in Bouin; poco prima della metamorfosi, altri 18 giorni dopo la metamorfosi.

Cinque femmine gravide sono state catturate in pianura, nei dintorni di Bordeaux tra il 1° ed il 30 dicembre. Di queste una è stata sacrificata dopo la cattura (30 dicembre) ed i piccoli estratti sono stati subito fissati in Bouin; le altre femmine sono state tenute in laboratorio a 15 °C fino all'epoca del parto. Degli animali nati naturalmente, alcuni sono stati fissati subito, altri sono stati posti in cristallizzatori e fissati poco prima della metamorfosi; di questo materiale, oltre a tre serie complete fissate in Bouin, sono stati fissati alcuni esemplari in Sanfelice, Helly e Carnoy. È stato inoltre fissato in Bouin l'intero midollo spinale di due femmine adulte.

Tutto il materiale è stato incluso in celloidina-paraffina e sezionato in serie trasversali dello spessore di 7-8 μ , a partire dall'apice caudale.

Dei preparati istologici, tre serie sono state colorate con il blu di toluidina in mezzo tamponato a pH 4,6 insieme a controlli pretrattati con acido perclorico, una serie è stata colorata con il metodo Mallory-Azan ed una con l'emallume-eosina.

I valori dei diametri cellulari e nucleari riportati nel testo rappresentano la media di almeno dieci misurazioni effettuate sugli elementi meglio orientati sul piano di taglio. Tutte le misurazioni sono state eseguite su materiale fissato in Bouin e colorato con blu di toluidina.

Come è noto, la seriazione degli stadi di sviluppo in *Salamandra* è difficoltosa; secondo Joly [10] la distinzione tra embrioni e larve va basata sull'aspetto dell'arto posteriore che nelle larve presenta il numero completo di dita. Attenendoci a questo criterio il nostro materiale consiste di larve la cui lunghezza è compresa tra i 27 mm delle più giovani ed i 35-40 mm di quelle prossime alla metamorfosi. Per la seriazione di queste larve ci siamo basati sull'aspetto morfologico esterno (testa, arti, branchie, pigmentazione cutanea ecc.), ma soprattutto sulle caratteristiche istologiche di alcuni apparati (digerente, respiratorio, tegumentario ecc.).

Va precisato infine, che in *Salamandra salamandra* la nascita non avviene ad un preciso stadio di sviluppo, ma è influenzata dalle condizioni ambientali. Secondo Joly [10] in pianura l'ovulazione avviene tra giugno e luglio ed il parto si effettua in varie riprese tra ottobre e maggio; in montagna la gestazione inizia a giugno e si protrae per circa un anno (12-13 mesi). Al momento della nascita le larve di pianura sono ad uno stadio di sviluppo più arretrato rispetto a quelle di montagna che sono prossime alla metamorfosi.

Le più giovani larve esaminate sono quelle sacrificate i primi di ottobre (appena estratte dalla femmina proveniente da Recoaro), come risulta dall'esame macroscopico e microscopico; in particolare questi animali presentano tuorlo abbondante e la tipica epidermide larvale bistratificata con cellule di Leydig.

Il midollo spinale nell'apice della coda è costituito da uno strato di cellule con nuclei per lo più ellittici e strutture cromatiniche addensate; tra questi elementi spiccano, in posizione dorsale, alcuni voluminosi neuroni con nucleo rotondeggiante e vescicoloso, nucleoli marcati (1 o 2) e sostanza basofila granulare più addensata ad un polo del nucleo.

Procedendo in direzione rostrale il midollo spinale presenta uno strato di fibre progressivamente più spesso e cellule via via più numerose e diffe-

renziate. Nel grigio dorsale sono evidenti i grossi neuroni già descritti, con basofilia citoplasmatica ancora più marcata. Questi elementi sono disposti, per lo più singolarmente, subito sotto la membrana limitante esterna; essi, per la posizione, le cospicue dimensioni (diametro cellulare medio $21,8 \mu$; diametro nucleare medio $16,5 \mu$), l'aspetto e la distribuzione della sostanza basofila vanno interpretate come cellule di Rohon-Beard (Tav. I, figg. 1 e 2).

Nelle regioni più rostrali alcune di queste cellule presentano sostanza basofila più scarsa e pulverulenta; inoltre nella stessa posizione si osservano sporadicamente delle vescicole contenenti sferule che assumono diverse tonalità con il blu di toluidina. Le misurazioni effettuate sulle cellule di Rohon-Beard localizzate rostralmente al 18° metamero (a partire dall'apice) rivelano un lieve decremento dei diametri cellulare (diametro cellulare medio $18,2 \mu$) e nucleare (diametro nucleare medio $14,9 \mu$).

In queste larve sono state computate in media 140 cellule di Rohon-Beard; l'85 % di esse è distribuito nel midollo della coda ed il restante 15 % è disseminato a livello della cloaca e della porzione posteriore del tronco.

Va precisato infine che nel grigio dorsale si osservano altri voluminosi neuroni (diametro cellulare medio $20,9 \mu$; diametro nucleare medio $16,5 \mu$) in posizione mediale o laterale; essi presentano due robusti prolungamenti, nucleo globoso o ellittico con nucleoli marcati e sostanza basofila abbondante sotto forma di zolle orientate in direzione dei prolungamenti (Tav. I, fig. 5); queste cellule sono del tutto simili a quelle osservate in *Triturus* ed interpretate come associative [17].

I gangli spinali sono presenti sino all'estremità della coda: la prima coppia è rappresentata da due gruppetti di cellule in incipiente differenziamento, la seconda coppia presenta cellule in differenziamento avanzato e la terza coppia a partire dall'apice è collegata con il midollo spinale da evidenti radici dorsali.

Le larve sacrificate il 30 dicembre (estratte da una femmina di Bordeaux) sono ad uno stadio di sviluppo più avanzato rispetto a quelle precedentemente descritte, come lo attestano in particolare la minor quantità di tuorlo e la presenza degli abbozzi delle ghiandole pluricellulari annesse al tegumento. Il midollo spinale è simile a quello delle larve precedenti, ma presenta un numero di cellule di Rohon-Beard decisamente inferiore (70 in media). Queste sono localizzate nella porzione posteriore del midollo caudale, infatti solo il 7 % di esse è stato rinvenuto rostralmente al 16° metamero a partire dall'apice.

Le larve prossime alla metamorfosi (ottenute da femmine provenienti sia da Bordeaux che da Recoaro) sono caratterizzate da testa angolosa simile a quella dell'adulto, branchie ridotte a moncherini, pigmentazione scura con piccole macchie gialle; all'esame istologico il tegumento presenta ghiandole pluricellulari in avanzato differenziamento ed epidermide pluristratificata, ma tra le cellule epidermiche sono ancora presenti cellule di Leydig.

Nell'estremità distale della coda il midollo spinale è costituito da uno strato di cellule piuttosto piccole, tra cui spiccano alcuni neuroni di Rohon-

Beard è da poche fibre; esso conserva quindi l'aspetto osservato nelle larve più giovani, a parte le fibre ora evidenti fino all'apice caudale. Rostralmente al 2° metamero il midollo spinale gradualmente si inspessisce e presenta a tutti i livelli neuroni voluminosi e differenziati. Nel grigio dorsale, oltre alle grosse cellule associative (Tav. I, figg. 3 e 6) che conservano aspetto e dimensioni pressochè invariati (diametro cellulare medio $22,4\ \mu$; diametro nucleare medio $16,4\ \mu$), si osservano in media 35 cellule di Rohon-Beard.

Di queste cellule le più caudali conservano aspetto tipico, le rimanenti presentano per la maggior parte alterazioni a carico del nucleo (diametro nucleare medio $15\ \mu$) e soprattutto del citoplasma che risulta atrofico (diametro cellulare medio $17\ \mu$) e uniformemente basofilo (Tav. I, fig. 3); inoltre nella stessa posizione si osservano saltuariamente vescicole a contorni irregolari contenenti una o più sferule variamente colorate con il blu di toluidina (Tav. I, fig. 4). Per analogia con quanto osservato in *Triturus* questi quadri rappresentano le fasi finali del processo involutivo che porta alla scomparsa delle cellule di Rohon-Beard.

I gangli spinali presentano radici dorsali e neuroni voluminosi fino all'apice caudale.

Il midollo spinale degli animali metamorfosati da 18 giorni (ottenuti dalla femmina di Recoaro) è privo di cellule di Rohon-Beard; esso conserva aspetto simile a quello descritto nelle larve in metamorfosi, a parte un lieve inspessimento della sostanza bianca e la presenza nella regione dorsale di alcuni elementi con nucleo ellittico (diametro nucleare medio $11,5\ \mu$) ed un anello perinucleare intensamente basofilo; essi sono disposti con l'asse maggiore in senso verticale.

Nel midollo spinale degli adulti si osserva un ulteriore aumento ed inspessimento delle fibre sia nello strato marginale, sia tra i neuroni del grigio che appaiono distanziati.

Nel grigio dorsale, oltre alle grosse cellule associative (Tav. I, fig. 7) osservate nelle larve, si notano a livello della coda alcuni voluminosi neuroni ovoidali (diametro cellulare medio $21,8\ \mu$; diametro nucleare medio $16,9\ \mu$) disposti a varie altezze in posizione mediale; questi elementi presentano nucleo vescicoloso con nucleoli marcati e sostanza basofila citoplasmatica abbondante sotto forma di zolle (Tav. I, fig. 8).

Dai dati esposti risulta che nel midollo spinale delle larve di *Salamandra salamandra salamandra* L. sono presenti neuroni che, per la posizione e le caratteristiche morfologiche, abbiamo interpretato come cellule di Rohon-Beard (Tav. I, figg. 1 e 2).

Nelle larve più giovani queste cellule sono in media 140, di cui una ventina disseminate a livello della cloaca e della porzione posteriore del tronco, le rimanenti distribuite lungo il midollo della coda.

La morfologia, la distribuzione ed anche la densità numerica di queste cellule sono simili a quelle descritte in larve di *Triturus* a stadi avanzati. Ricordiamo infatti che nel midollo spinale di *Triturus* [6] le cellule di Rohon-

Beard a livello del tronco si rarefanno gradualmente, mentre a livello della coda conservano aspetto, dimensioni e densità numerica pressochè invariati sino agli ultimi stadi larvali (circa un centinaio a stadio 61 ed un'ottantina a stadio 62) e si involgono nel mese che precede la metamorfosi (tra stadio 62 e 63).

Nelle larve di *Salamandra* prossime alla metamorfosi le cellule di Rohon-Beard sono in media 35, localizzate nella porzione posteriore del midollo caudale, e negli animali metamorfosati sono assenti. Questo fenomeno è stato verificato sia negli animali di pianura che in quelli di montagna.

L'involuzione di questi neuroni esordisce con una modesta atrofia cellulare accompagnata da dissoluzione della sostanza basofila citoplasmatica. Però la percentuale di elementi di Rohon-Beard osservata nelle fasi finali del processo involutivo è molto bassa, come riscontrato in *Triturus*.

Ricerche in corso sono intese ad analizzare nella stessa specie di *Salamandra* il comportamento delle cellule di Rohon-Beard durante l'intero sviluppo; tuttavia in base ai dati esposti si può concludere che cellule di Rohon-Beard nelle larve dell'Urodelo viviparo da noi esaminato sono presenti a livello del midollo spinale caudale e si involgono nell'ultimo periodo larvale con modalità simili a quelle descritte nell'Urodelo oviparo.

Questo fatto sembra differire da quanto osservato nei Teleostei [7, 8, 9]. Va però precisato che nei Teleostei vivipari (*Gambusia* e *Poecilia*) e nello oviparo (*Hippocampus*) risultati privi di cellule di Rohon-Beard, la nascita coincide con il termine dello sviluppo; nell'Anfibio viviparo da noi esaminato, invece, l'epoca del parto è influenzata da fattori ambientali per cui i piccoli possono nascere mesi prima che lo sviluppo sia ultimato. Pertanto si rende indispensabile esaminare Anfibi vivipari in cui la nascita coincida sempre con il termine della metamorfosi. Nell'estendere queste ricerche saranno valutati anche altri fattori quali l'ecologia e la filogenesi delle specie studiate.

Accenniamo che nel midollo spinale di larve ed adulti di *Salamandra* a livello del grigio dorsale si osservano grossi neuroni (Tav. I, figg. 3, 5, 6 e 7) forniti di due robusti prolungamenti del tutto simili a quelli descritti in *Triturus* ed interpretati come cellule associative [17]. Nel midollo caudale degli adulti di *Salamandra* si notano altri grossi neuroni disposti a varie altezze tra il grigio dorsale e la membrana limitante esterna che non sono stati osservati in *Triturus*; essi hanno forma ovoidale, nucleo vescicoso e sostanza basofila a zolle (Tav. I, fig. 8). Ricerche in corso sono intese a precisare la natura di questi neuroni.

BIBLIOGRAFIA

- [1] I. BENEDETTI e M. MARINI (1972) - « Rend. Acc. Naz. Lincei », ser. VIII, 52, 101-105.
- [2] M. MARINI e I. BENEDETTI (1972) - « Rend. Acc. Naz. Lincei », ser. VIII, 52, 579-582.
- [3] I. BENEDETTI e M. MARINI (1973) - « Rend. Acc. Naz. Lincei », ser. VIII, 54, 157-161.
- [4] M. MARINI e I. BENEDETTI (1973) - « Rend. Acc. Naz. Lincei », ser. VIII, 55, 600-602.
- [5] D. MARCHESINI e M. MARINI (1968) - « Rend. Acc. Naz. Lincei », ser. VIII, 45, 84-89.

- [6] P. TREVISAN e M. MARINI (1972) - « Rend. Acc. Naz. Lincei », ser. VIII, 52, 965-968.
- [7] I. BENEDETTI e M. MARINI (1970) - « Rend. Acc. Naz. Lincei », ser. VIII, 49, 223-228.
- [8] M. MARINI e I. BENEDETTI (1971) - « Rend. Acc. Naz. Lincei », ser. VIII, 51, 260-263.
- [9] I. BENEDETTI e M. MARINI (1975) - « Rend. Acc. Naz. Lincei », ser. VIII, 59, 836-840.
- [10] J. JOLY (1968) - « Ann. Sci. Natur. Zool. », 10, 303-366.
- [11] K. R. BURCKHARDT (1889) - « Arch. mikr. Anat. », 34, 131-156.
- [12] J. BEARD (1889) - « Proc. Roy. Soc. London », 46, 108-118.
- [13] F. K. STUDNICKA (1895) - « Sitz.-ber. Kon. Gesell. Wiss. Math.-Nat. », 51, 1-32.
- [14] A. VAN GEHUCHTEN (1897) - « Bull. Acad. Roy. Belg. », 34, 24-38.
- [15] G. E. COGHILL (1914) - « J. Comp. Neurol. », 24, 161-233.
- [16] P. TREVISAN (1972) - « Rend. Acc. Naz. Lincei », ser. VIII, 53, 217-220.
- [17] P. TREVISAN (1973) - « Rend. Acc. Naz. Lincei », ser. VIII, 55, 771-774.

SPIEGAZIONE DELLA TAVOLA I

Cellule di Rohon-Beard nelle larve più giovani (figg. 1, 2); cellule di Rohon-Beard in degenerazione poco prima della metamorfosi (figg. 3, 4); voluminosi neuroni dorsali in larve (figg. 3, 5, 6) e adulti (figg. 7, 8).

(Tutte le foto allo stesso ingrandimento: fiss. Bouin; col. blu di toluidina).

