
Università degli Studi di Napoli
“Federico II”

Facoltà di Scienze Matematiche e Fisiche

Dottorato in Biologia Avanzata
XXXIII ciclo

Tesi

**L'ONTOGENESI DEL SISTEMA OLFATTIVO E
VISIVO DEI VERTEBRATI**

Antonietta Morgillo

Tutor
Ch. mo
Luciano Gaudio

Co-Tutor
Ch. mo
Biagio D'Aniello

Anno accademico 2010-2011

Indice generale

Abstract

Capitolo 1 : Il sistema visivo

- 1.1. Struttura dell'occhio dei vertebrati
- 1.2. Morfogenesi dell'occhio dei vertebrati
- 1.3. La retina dei vertebrati: morfologia e sviluppo
- 1.4. Due diversi destini della vita cellulare: mitosi ed apoptosi nella neuroretina in via di sviluppo

Capitolo 2 : Il sistema olfattivo

- 2.1. L'olfatto
- 2.2. Il sistema olfattivo principale
- 2.3. Il sistema olfattivo accessorio
- 2.4. Attività neurogenetica durante lo sviluppo e differenze degli organi olfattivi

Capitolo 3 : Marker di proliferazione ed apoptosi

- 3.1. Antigene nucleare di proliferazione cellulare.
- 3.2. La poli (ADP-ribosio) polimerasi
 - 3.2.1. La poli (ADP-ribosilazione)
 - 3.2.2. Ruolo della PARP nella riparazione di danni al DNA
 - 3.2.3. PARP nell'apoptosi e nella necrosi cellulare

Capitolo 4 : Scopo della ricerca

Capitolo 5 : Materiali e metodi

- 5.1. Animali utilizzati
 - 5.1.1. *Cichlasoma nigrofasciatum*
 - 5.1.2. *Xenopus laevis*
 - 5.1.3. *Rana esculenta*
 - 5.1.4. *Bufo bufo*
 - 5.1.5. *Coturnix coturnix*
- 5.2. Cattura ed allevamento
- 5.3. Prelievi
- 5.4. Fissazione
- 5.5. Inclusione in paraffina e taglio al microtomo
- 5.6. Tecnica immunohistochimica

-
- 5.7. Colorazione con ematossilina
 - 5.8. Western Blotting e Immunorilevazione con anticorpo anti-PARP
 - 5.8.1. Estrazione e quantizzazione proteica
 - 5.8.2. Elettroforesi in condizioni denaturanti (SDS-PAGE)
 - 5.8.3. Elettroblotting
 - 5.8.4. Blocking
 - 5.8.5. Incubazione con anticorpo primario e secondario e rilevazione della PARP frammentata
 - 5.9. Osservazione e Fotodocumentazione
 - 5.10. Quantificazione di mitosi ed apoptosi nella retina e stime morfologiche dell'occhio

Capitolo 6 : Risultati

- 6.1. *Cichlasoma nigrofasciatum*
 - 6.1.1. Sviluppo dell'occhio di *Cichlasoma nigrofasciatum* 2 giorni dopo la fecondazione
 - 6.1.2. Sviluppo dell'occhio di *Cichlasoma nigrofasciatum* 3 giorni dopo la fecondazione
 - 6.1.3. Sviluppo dell'occhio di *Cichlasoma nigrofasciatum* 4 giorni dopo la fecondazione
 - 6.1.4. Sviluppo dell'occhio di *Cichlasoma nigrofasciatum* 5 giorni dopo la fecondazione
 - 6.1.5. Sviluppo dell'occhio di *Cichlasoma nigrofasciatum* 6 giorni dopo la fecondazione
 - 6.1.6. Sviluppo dell'occhio di *Cichlasoma nigrofasciatum* 7 giorni dopo la fecondazione
 - 6.1.7. Risultati della quantificazione di mitosi ed apoptosi nella retina e delle stime morfologiche dell'occhio di *Cichlasoma nigrofasciatum*
- 6.2. *Xenopus laevis*
 - 6.2.1. Sviluppo dell'occhio di *Xenopus laevis* allo stadio 29
 - 6.2.2. Sviluppo dell'occhio di *Xenopus laevis* allo stadio 35
 - 6.2.3. Sviluppo dell'occhio di *Xenopus laevis* allo stadio 42
 - 6.2.4. Sviluppo dell'occhio di *Xenopus laevis* allo stadio 44
 - 6.2.5. Sviluppo dell'occhio di *Xenopus laevis* allo stadio 46
 - 6.2.6. Sviluppo dell'occhio di *Xenopus laevis* allo stadio 49
 - 6.2.7. Sviluppo dell'occhio di *Xenopus laevis* allo stadio 53
 - 6.2.8. Sviluppo dell'occhio di *Xenopus laevis* allo stadio 59
 - 6.2.9. Sviluppo dell'occhio di *Xenopus laevis* allo stadio 63
 - 6.2.10. Sviluppo dell'occhio di *Xenopus laevis* allo stadio 66
 - 6.2.11. Sviluppo della mucosa olfattiva di *Xenopus laevis* allo stadio 33
 - 6.2.12. Sviluppo della mucosa olfattiva di *Xenopus laevis* allo stadio 37/38
 - 6.2.13. Sviluppo della mucosa olfattiva di *Xenopus laevis* allo stadio 42
 - 6.2.14. Sviluppo della mucosa olfattiva di *Xenopus laevis* allo stadio 52
 - 6.2.15. Sviluppo della mucosa olfattiva di *Xenopus laevis* allo stadio 57
 - 6.2.16. Sviluppo della mucosa olfattiva di *Xenopus laevis* allo stadio 66

-
- 6.2.17. Risultati della quantificazione di mitosi ed apoptosi nella retina e delle stime morfologiche dell'occhio di *Xenopus laevis*
- 6.3. *Rana esculenta*
- 6.3.1. Sviluppo della mucosa olfattiva di *Rana esculenta* allo stadio 25/26
- 6.3.2. Sviluppo della mucosa olfattiva di *Rana esculenta* allo stadio 27/28
- 6.3.3. Sviluppo della mucosa olfattiva di *Rana esculenta* allo stadio 29/30
- 6.3.4. Sviluppo della mucosa olfattiva di *Rana esculenta* allo stadio 31/32
- 6.3.5. Sviluppo della mucosa olfattiva di *Rana esculenta* allo stadio 33
- 3.6. Sviluppo della mucosa olfattiva di *Rana esculenta* allo stadio neometamorfosato
- 3.7. Localizzazione della PCNA nell'occhio di *Rana esculenta*
- 6.4. *Bufo bufo*
- 6.4.1. Sviluppo dell'occhio di *Bufo bufo* allo stadio 10
- 6.4.2. Sviluppo dell'occhio di *Bufo bufo* allo stadio 13
- 6.4.3. Sviluppo dell'occhio di *Bufo bufo* allo stadio 15
- 6.4.4. Sviluppo dell'occhio di *Bufo bufo* allo stadio 21
- 6.4.5. Sviluppo dell'occhio di *Bufo bufo* allo stadio 25
- 6.4.6. Sviluppo dell'occhio di *Bufo bufo* allo stadio 28
- 6.4.7. Sviluppo dell'occhio di *Bufo bufo* allo stadio 31
- 6.4.8. Sviluppo dell'occhio di *Bufo bufo* allo stadio neometamorfosato
- 6.4.9. Risultati della quantificazione di mitosi ed apoptosi nella retina e delle stime morfologiche dell'occhio di *Bufo bufo*
- 6.4.10. Quantificazione della PARP frammentata nell'occhio di *Bufo bufo*
- 6.4.11. Quantificazione della PARP frammentata nella mucosa olfattiva di *Bufo bufo*
- 6.5. *Coturnix coturnix*
- 6.5.1. Sviluppo dell'occhio di *Coturnix coturnix* allo stadio E4
- 6.5.2. Sviluppo dell'occhio di *Coturnix coturnix* allo stadio E5
- 6.5.3. Sviluppo dell'occhio di *Coturnix coturnix* allo stadio E6
- 6.5.4. Sviluppo dell'occhio di *Coturnix coturnix* allo stadio E7
- 6.5.5. Sviluppo dell'occhio di *Coturnix coturnix* allo stadio E8
- 6.5.6. Sviluppo dell'occhio di *Coturnix coturnix* allo stadio E9
- 6.5.7. Sviluppo dell'occhio di *Coturnix coturnix* allo stadio E10
- 6.5.8. Sviluppo dell'occhio di *Coturnix coturnix* allo stadio E11
- 6.5.9. Sviluppo dell'occhio di *Coturnix coturnix* allo stadio E12
- 6.5.10. Sviluppo dell'occhio di *Coturnix coturnix* allo stadio E13
- 6.5.11. Sviluppo dell'occhio di *Coturnix coturnix* allo stadio E14
- 6.5.12. Sviluppo dell'occhio di *Coturnix coturnix* allo stadio E15
- 6.5.13. Sviluppo dell'occhio di *Coturnix coturnix* allo stadio E16
- 6.5.14. Sviluppo dell'occhio di *Coturnix coturnix* allo stadio E17
- 6.5.15. Risultati della quantificazione di mitosi ed apoptosi nella retina e delle stime morfologiche dell'occhio di *Coturnix coturnix*
- 6.5.16. Quantificazione della PARP frammentata nell'occhio di *Coturnix coturnix*

Capitolo 7 : Discussioni

-
- 7.1. Considerazioni metodologiche
 - 7.2. Analisi comparativa dello sviluppo dell'occhio dei vertebrati
 - 7.2.1. Analisi dello sviluppo dell'occhio di *Cichlasoma nigrofasciatum*
 - 7.2.2. Analisi dello sviluppo dell'occhio di *Xenopus laevis*
 - 7.2.3. Analisi dello sviluppo dell'occhio di *Bufo bufo*
 - 7.2.4. Analisi dello sviluppo dell'occhio di *Coturnix coturnix*
 - 7.3. Analisi comparativa dello sviluppo del sistema olfattivo dei vertebrati
 - 7.3.1. Analisi dello sviluppo del sistema olfattivo di *Xenopus laevis*
 - 7.3.2. Analisi dello sviluppo del sistema olfattivo di *Rana esculenta*
 - 7.4. Conclusioni

Capitolo 8 : Bibliografia

Abstract

The mechanisms of differentiation within the nervous system including proliferation and differentiation, migration cell growth and development of axonal and dendritic synaptic connections. Are fundamental processes that generate a remarkably complex neuronal and, to a large extent, still poorly understood.

As drafted by the neurotrophic theory, another important process involved in determining the morphology and physiology of neural "programmed cell death (PCD) or apoptosis, which acts both on different types of neuronal and glial cells (Kuan et al. , 2000; Roth and D'Sa, 2001; Davies, 2003, Buss et al, 2006). Although recently this early stage of cell death is the subject of numerous studies, the cell populations involved, the regulatory mechanisms involved, its scale and its functional implications are still far from being characterized as appropriate.

The retina is an easily accessible part of the central nervous system and therefore has become a classic model for studies of neural development and apoptosis (Cepko et al., 1996, Harris 1997, Marquardt and Gruss, 2002; Adler, 2005) . In fact, the visual system, while preserving the intense proliferative activity ontogenetic, passes through a number of significant apoptosis (Cook et al 1998; Biehlmaier et al., 2001; Candal et al., 2005; Alunni et al., 2007) .

The development of the olfactory system in vertebrate species studied morphogenetic level requires an intense proliferative activity, as witnessed by strong business PCNA_{sica} (Ino et al., 2000) which tends to decline proceeding with development. Likewise, the olfactory mucosa presents events of apoptosis, but as a pattern appears to differ from those that occur in the eye (Ohsawa1 et al., 2008).

Of course for each group of vertebrates on this basic scheme, is part of the variants characteristics that determine a unique pattern of development.

The data concerning the differentiation of embryonic olfactory and visual system of vertebrates are uncommon and those conducted as in *Bufo bufo* and *X. laevis*, do not provide data on the numbers of cells in apoptosis and mitosis (Mathis et al., 1988; Straznicky and Nguyen, 1989; Stiemke and Hollyfield, 1995).

The counts of apoptotic cells and mitotic figures are estimates of the degree of remodeling of the organ. Then from these estimates can be inferred, first functional correlations of the other, comparing the data with those in litteratura, including the evolving nature of information.

For this reason, in this work were studied in detail the various stages of development of some vertebrates (*Cichlasoma nigrofasciatum*, *Xenopus laevis*, *Rana esculenta*, *Bufo bufo*, *Coturnix coturnix*) in order to broaden knowledge on the morphogenesis of the eye and smell and try to get a picture on the evolutionary mechanisms underlying the events of proliferation and remodeling of these organs by comparing related species also from the point of evolution, but have a different ecology (for example, animals such as

Xenopus laevis, *Rana esculenta* and *Bufo bufo*, which all belong to the same order of amphibians, but have a different degree of hydrophilicity).

For this purpose, were stained with hematoxylin sections of these organs during their differentiation to detect and count apoptotic and mitotic figures as indicators of proliferative activity and rearrangement of the structures.

Also, has also been used for PCNA immunohistochemistry to consolidate the data on observations of cells in active proliferation, and to confirm the apoptotic peaks observed through the reading of histological sections was evaluated nuclear protein level of PARP fragmentation.

The most innovative aspect of this research is the attempt to correlate a system during development undergoes a profound and continuous rearrangement, as in the visual system, a system with a bit less dynamic as the olfactory organ.

The comparison of results obtained in this study with those produced by other authors is complicated by the fact that the ontogeny of different vertebrates, as such, follows patterns that are fairly typical of the group.

In *Cichlasoma nigrofasciatum* eye development starts very early, starting 2 days after fertilization, the eye in this stage of development consists of a cluster of cells in proliferation, where the lens is separated from the start of the retina formation of the vitreous humor. The exponential growth of the eye throughout its development. The retina has this trend to a standstill on the seventh day after fertilization, by which time the animal has almost completed its anatomical development.

The number of mitoses found in the retina of the animal is always high with the occurrence of a strong proliferative activity especially during the early development stages of fish, at 4 days 3 days after fertilization.

In addition, during the development of retinal *Cichlasoma nigrofasciatum* two explosions occur apoptotic at 2 days and 5 days after fertilization (as demonstrated by the total counts of apoptosis made and confirmed by the presence of two apoptotic indices in these days of development).

The presence of the first explosion apoptosis may be explained by the need to eliminate excess cells that were formed during the earliest phases of development of the eye of the fish (in fact, these days also occur strong proliferative phenomena)

Approximately 5 days after fertilization, the eye of *Cichlasoma nigrofasciatum* is the stratification of the retina, and this event is likely to induce a second wave of apoptosis in the tumor with the plexiform layers of cells in excess are induced programmed cell death.

In *Xenopus laevis* has been studied the development of both sensory systems. *Xenopus laevis* eye development starts from the stage 29; at this stage the eye is booming, with the presence of a strong proliferative activity and a crystal clear just sketched. Throughout the development of the eye grows exponentially.

Analyzing the graphs of retinal growth and the number of cells observed, there was a growth of the retina from the stage 29 to stage 59 and then later in a slight decrease. In parallel there was an increase in the number of total cells

during development except for two drops that occur after stage 42 and stage 63, a stage next to the metamorphosis.

This decrease can be attributed to its peak apoptotic stage 42. This hypothesis is strengthened by the observation of cell density, which decreases in the retina following the events of cell death.

Instead, the eye of *Bufo bufo* follows the pattern of differentiation typical of other vertebrates, of course, with a timetable that is characteristic of the species.

The early stages of development studies covered newly hatched embryos: looking at the growth chart is also comparable to the increase in the number of cells counted in sections, it is observed that the retina does not undergo a substantial increase of the size of the stage between 10 and 13. Starting from the stage 15, however, the eye grows gradually considering that at this stage begins the secretion of the vitreous humor. In parallel, there is also increasing the number of cells in the retina was also confirmed by the intense mitotic activity occurred between stage 13 and 15. Thus, this figure contrasts with the literature which shows the increase in size more important in the early stages of development.

However, proceeding in the development, the retina resumes its normal growth until the stagnation observed at the stage of metamorphic climax.

Regarding the proliferative activity of the retina, the neuronal elements of the eye, after an initial phase where it is produced throughout the retina, are located in a concentrated area directly facing the lens, MCZ.

This phenomenon in the toad is also confirmed by the expression of PCNA, which follows the same pattern of mitosis, although it is expressed in a greater number of nuclei.

In addition, during the development process of programmed cell death and cell differentiation coexist in the retina.

In the common toad is an increase in the number of apoptotic stage 21 which then tends to decrease, followed by a second peak at stage 28, the figure is confirmed by both histological and biochemical analysis.

The differentiation of the retina of the toad does not proceed synchronously, but follows a gradient that goes from the lens opposite (proximal region of the retina) to the region move closer to the lens, ciliary marginal zone (MCZ).

The area of the retina grows progressively until stage 31, which represents the metamorphic climax. Highly significant increases are recorded at the stadium just 28 and 31. A similar trend can be observed for the number of total cells that make up the retina, but they, having achieved a significant increase in stage 28, growth arrest. This is not surprising, since growth of the retina is also related to the counterpart of fiber, of course, continue to increase until stage 31.

As expected, the strong mitotic activity in the early stages of development and suffers a decrease up to the stage 21 and then increased to 28, after which suffers a terminal decline after metamorphosis in which mitotic figures become more sporadic.

The minimum mitotic stage 21 does not correspond to a slowdown in growth in the number of cells, but the significant increase in the number of cells observed at the stage 28, is concordant with the second increase in mitotic index.

The development of apoptosis in two waves does not leave visible signs on the growth of the retina, even if this first wave coincides with a minimum mitotic apoptosis, as evidenced also based on the graph of PARP-1 fragmentation.

The second wave of apoptosis, however, shall determine, in conjunction with the fall of mitotic activity, a drastic decrease in cells of the retina.

In *Coturnix coturnix* in the early stages of eye development studies covered an embryo after 4 days of incubation, where you look at the outline of the eye and the whole body is in full training.

The eye of *Coturnix coturnix* has experienced rapid growth followed by a downturn towards the latter stages of development of the animal, close to hatching. The retina of *Coturnix coturnix* grows in size during development, with a standstill on the seventeenth day of incubation.

The number of total cells in the retina observed in development has increased in numbers until the eleventh day of incubation and then decreased on days 12, 14 and 16 days after incubation, but not significant. However, these decreases are not entirely correlated with apoptotic events, because only the reduction of cells at the stage 12 is due to an apoptotic peak.

The first event of programmed cell death in *Coturnix coturnix* occurs at the beginning of his retinal development in an embryo after 4 days of incubation and an 'other apoptotic event occurs after 11 days of incubation.

The development of the olfactory system was studied in two amphibians: *Xenopus laevis*, *Rana esculenta*.

To summarize briefly the most important events are found to contain an undifferentiated olfactory placode to the stage 38. The next stage sees the start of dell'invaginazione placode. During stage 42 is medially the vomeronasal organ primordium. Finally, stage 50 begins to form the side room. The later stages can only see the progressive morphological differentiation of these three rooms and the opening of the choanae, which coincides with the metamorphosis.

At the beginning of differentiation of the peripheral olfactory system in all the nuclei are intense proliferative activity. Then after this activity tends to localize progressively in the basal level in the rooms smell and fall.

Later in development the expression of PCNA remains more or less the same amount in the sensory part of the three rooms. What we see is that the olfactory organs appear more complex and all the sensory areas have an PCNA-sica very fine, but mainly localized in basal regions of the mucosa. This obviously means that their development goes hand in hand. Even the non-sensory areas that constitute the respiratory epithelium of the rooms have many olfactory cells PCNA-ir.

During metamorphosis, while the epithelium and the vomeronasal organ side of the room are substantially similar to themselves, the epithelium of the main chamber is undergoing a profound change (Hansen et al., 1998). This is

reflected in the fact that this will become a hollow "air nose" in metamorphosis, where the role of "water nose" will be hired by the chamber of training later, lying side (Altner, 1952; Weiss, 1986).

Regarding the study on the development of olfactory mucosa of *Rana esculenta*, it was observed that the stage 20, the olfactory placode is still undifferentiated and only then begins a process of differentiation through a process of invagination that starts in the stadium 23. At stage 25, the gills are covered with skin and communicate with the outside through the opening and an oral specific trap. They will be active at least until the climax metamorphic. At this stage, a first draft it identifies olfactory mucosa seems directed toward the differentiation of sensory elements, as they are already these lashes, although very short. The activity PCNAasica intense in all subdivisions of the olfactory mucosa places obviously in favor of an intense proliferative activity.

The primordium of the vomeronasal appears around stage 27.

In the green frog, the vomeronasal organ is clearly visible as a diverticulum which originates from the regions interior side of the mucosa. Its formation is characterized by its strong proliferative activity at the level of intussusception. In the remaining parts of the olfactory, the activity keeps ir a pattern similar to that previously analyzed. The vomeronasal pushing medially continues to increase, as evidenced by the increased proliferative activity media. Meanwhile, also appear in the structures that will be differentiated microvilli. Even the respiratory epithelium increases progressively increasing the epithelial surface affected the exchange of oxygen. Evident, in fact, the formation of a diverticulum located dorsal to the vomeronasal compared with the presence of activity.

The olfactory organ takes on characteristics similar to those found in the adult stage 30, when they appear glands of Bowman. This is supported by the analysis of proliferative activity associated with them. The presence of Bowman's glands is a very important indicator that announces the start of the functionality of the aerial olfactory mucosa. The fact that it is very early in the frog may be due to a simple time difference between the two species, or the fact that the tadpole of the frog begins to use the olfactory system in ambient air before the metamorphosis. Structurally, the remaining course of development, the olfactory organ does not undergo any significant change. Ir activity is still very fine, even after metamorphosis: the olfactory system, although functional, yet increases in parallel to increasing animal body.

In conclusion of this work can be said that during the development of vertebrates, all organs are subjected to the phenomenon of programmed cell death and cell differentiation coexist. The duration of both processes was analyzed in different species of vertebrates and has been observed at different times and in different regions of structures like the retina (etal Valenciano., 2009).

The reason for the phenomenon of apoptosis remains an enigma.

It 'been postulated that cell death occurs due to lack of sufficient targets brain areas that receive the optical fibers. In practice, if the number of retinal

afferent fibers that reach is higher than the number of available sites in the roof of the optical termination, fiber "supernumerary" degenerate (Rager and Rager, 1978).

One could speculate that the transition from aquatic life to the air would require extensive reworking of the visual structures, but the idea was immediately contradicted by studies on fish products, which also undergo apoptosis. What is quite certain is that during development the eye produces a strong surplus of cells, which must be eliminated.

In the frog (and other amphibians studied) the second wave of apoptosis occurs when the individual is still at the stage of tadpole stage where the eye is already working. It's possible then, that in the tadpole's vision has not yet been perfected and that it refers primarily olfactory sensory system as the main reference. This hypothesis is supported by the fact that the olfactory system does not undergo massive apoptosis during development.

Summing up the comparative data is noted that all vertebrates have a restructuring early apoptotic eye and ends in reptiles and birds during embryogenesis. This could be caused by the need to have a visual organ already differentiated and fully functional at birth. In fish and amphibians, but the apoptotic phenomenon stops just before the metamorphosis, which still corresponds to the event of birth or hatching of the amniotes, as demonstrated by the study of the levels of the hormone thyroxine (Stubbe et al., 1978; Tata, 1993; Wassenaer and Kok, 2004).

It is well known that these vertebrates and especially birds and fish use the view as the main body and is therefore natural that this body is fully functional even after the birth. Amphibians and fish larvae are already using the eye long before the metamorphosis, but the phenomena of rearrangement affected during this period it is clear that the functionality is not full, but as previously mentioned can apply to other sensory systems (eg system olfactory). In contrast to mammals at birth and they see little or no use to a large extent the smell in the monitoring of environmental signals that surround them (smells of parents, food), what might be true for larval fish and amphibians.

This hypothesis is further reflected in the studies on the olfactory system of *Xenopus laevis* and *Rana esculenta*, where there is a olfactory mucosa during development of the tadpole is not subject to obvious apoptosis and cell rearrangement, then proves to be a very static compared apoptotic and proliferative events which occur in the eye of vertebrates studied show that the presence of a much more dynamic system embryologically as the eye.

Capitolo 1:
Il sistema visivo

1.1. Struttura dell'occhio dei vertebrati.

Visto dall'esterno l'occhio umano assomiglia ad una sfera (globo oculare) del diametro medio di 23-24 mm. Da questa forma, all'incirca sferica, si discosta la parte anteriore, che affiora fra le palpebre aperte ed appare come una calotta sferica di circa 10 mm di diametro, sporgente rispetto al globo, liscia e trasparente: è la cornea (Fig. 1).

Verso l'interno dell'occhio, dietro la cornea, si trova un anello di tessuto colorato, di colore variabile da una persona all'altra, detto iride. Al centro dell'iride vi è un foro, la pupilla, da cui entra la luce. Subito dietro la pupilla, vi è una piccola massa di tessuto gelatinoso trasparente, a forma di lente biconvessa asimmetrica, detta cristallino. La struttura del cristallino è complessa, a strati più o meno concentrici. Esso è sospeso ad una raggiera di filamenti ("zonula di Zinn") che si aggancia ad un anello ingrossato ricco di fibre muscolari, detto corpo ciliare.

Fra la cornea e il cristallino vi è uno spazio ripieno di liquido trasparente (umor acqueo), mentre lo spazio dietro il cristallino, che è la massima parte del volume interno dell'occhio, è occupato da un materiale gelatinoso detto umor vitreo o corpo vitreo.

Dall'esterno all'interno del globo, la parte dell'occhio al di fuori della cornea è costituita da tre strati:

1. **Sclerotica o sclera:** fibrosa, tenace, biancastra, con numerosi vasi sanguigni. La cornea, citata sopra, non è che la parte anteriore, prominente e trasparente, della sclera.
2. **Coroide:** formata da tessuto più tenero, ricchissimo di sostanze coloranti (pigmenti) scuri nonché di capillari. Come per altri casi citati sopra, la coroide ha lo scopo di assorbire tutta la luce che non viene assorbita dalla retina e che, diffondendosi all'interno dell'occhio ridurrebbe il contrasto. L'iride ed il corpo ciliare rappresentano solo la parte anteriore della coroide, che acquista caratteristiche particolari.
3. **Retina:** è formata da cellule e fibre nervose in più strati, il più esterno dei quali, in prossimità della coroide, contiene gli elementi sensibili alla luce chiamati per la loro forma coni e bastoncelli. Più internamente, le cellule fotosensibili (coni e bastoncelli) sono collegate con sottili fibre ad altre cellule, in parte fornite di due prolungamenti e dette perciò "bipolari". Ancora più verso il centro del globo oculare vi è uno strato di cellule nervose ("ganglionari") con molte ramificazioni brevi ("dendriti") a contatto con le cellule bipolari ed una lunga fibra ("neurite" o "cilindrasse" che va a far parte del nervo ottico.

Nella retina dei vertebrati un aspetto che stupisce è il fatto che le cellule dei coni e dei bastoncelli "guardano verso un punto sbagliato". In una retina costituita secondo "logica", le estremità dei fotorecettori dovrebbero essere orientate verso la sorgente luminosa e le parti della retina che trasportano gli impulsi verso l'encefalo, dovrebbero essere più distanti. Gli occhi di alcuni invertebrati sono costituiti secondo tale criterio, ma non quelli dei vertebrati, nei quali la luce deve attraversare tutti gli strati della retina prima di

raggiungere il punto della ricezione (retina inversa). Varie teorie sono state elaborate per spiegare questa situazione anomala. E' possibile che le cellule visive siano comparse per prime nel pavimento (o nelle pareti laterali) della cavita' dell'encefalo dove erano capaci di funzionare con l'estremità volta verso l'alto (e all'interno) perchè nei cordati ancestrali la testa era costituita in modo da essere trasparente. Queste cellule sembrano essere presenti nel midollo spinale dell'Anfiosso. Quando questi gruppi di cellule passano nelle vescicole ottiche estroflesse, gli elementi retinici conservano il loro orientamento.

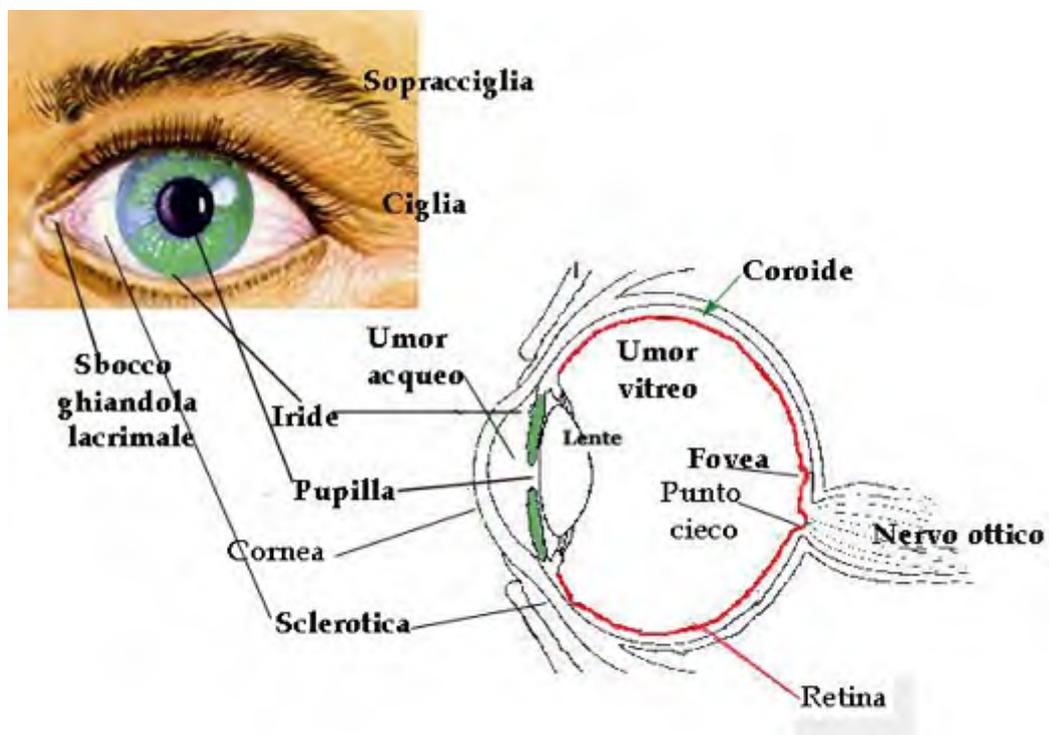


Fig. 1: Struttura dell'occhio umano.

1.2. Morfogenesi dell'occhio dei vertebrati.

Durante lo sviluppo prenatale dei vertebrati sono distinguibili tre periodi principali: un primo periodo che include la formazione dei primi abbozzi degli organi, chiamato embriogenesi; un secondo periodo, chiamato organogenesi, che comprende il completo sviluppo della struttura degli organi, ed infine, sovrapposto temporalmente al secondo, un terzo periodo indicato come il periodo della differenziazione, dove, si assiste alla differenziazione di ciascun primitivo organo in uno funzionante.

Lo sviluppo dell'occhio nei vertebrati, dunque, comprende una serie di eventi che iniziano durante le prime fasi della gestazione, proseguono durante lo sviluppo degli organi e terminano dopo la nascita.

Il primo abbozzo di occhio compare durante la neurulazione, quando, avvenuta la formazione e il differenziamento del tubo neurale nelle varie regioni del sistema nervoso centrale, ha inizio un sequenziale susseguirsi di eventi, spazialmente e temporalmente controllati. Avvenuta la formazione del primo abbozzo del tubo neurale dalla chiusura del foglietto neurale embrionale nella sua parte anteriore, si assiste alla comparsa delle tre vescicole primarie del cervello chiamate lungo l'asse antero-posteriore: prosencefalo, mesencefalo e rombencefalo. Il prosencefalo si divide, poi, ulteriormente in un'altra parte anteriore, il telencefalo ed in una posteriore, il diencefalo, che darà origine alla formazione dell'occhio, mentre il mesencefalo rimane tale e il rombencefalo si divide in metencefalo anteriormente e mielencefalo posteriormente.

Il primo segno morfologico dello sviluppo dell'occhio è l'apparizione bilaterale di un'estroflessione della parete laterale del diencefalo che dà origine a una struttura denominata tasca ottica (Trevor et al., 2007) la quale darà poi origine all'occhio (Fig. 2).

Queste estroflessioni continuano a crescere ai lati del tubo neurale dando origine a una seconda struttura a forma di calice chiamata vescicola ottica, collegata al diencefalo tramite un piccolo canale, il peduncolo ottico. In seguito, l'estensione della vescicola ottica verso la sovrastante superficie ectodermica e il diretto contatto con essa, rappresentano un periodo critico per lo sviluppo dell'occhio, durante il quale avvengono reciproci scambi di segnali di induzione per il proseguimento della differenziazione e maturazione delle principali strutture dell'occhio dell'adulto. Infatti, in questo periodo, il foglietto ectodermico incomincia ad ispessirsi e si osservano i primi segni della formazione dell'abbozzo del cristallino, il cosiddetto placode del cristallino. Esso è molecolarmente caratterizzato dalla perdita da parte delle sue cellule dei diversi organelli, quali il nucleo, i mitocondri ed il reticolo endoplasmatico e dall'inizio dell'espressione delle cristalline, famiglia di molecole richieste per generare e mantenere la trasparenza della lente (Graw, 1996; Wistow e Piatigorsky, 1988; Wride, 1996).

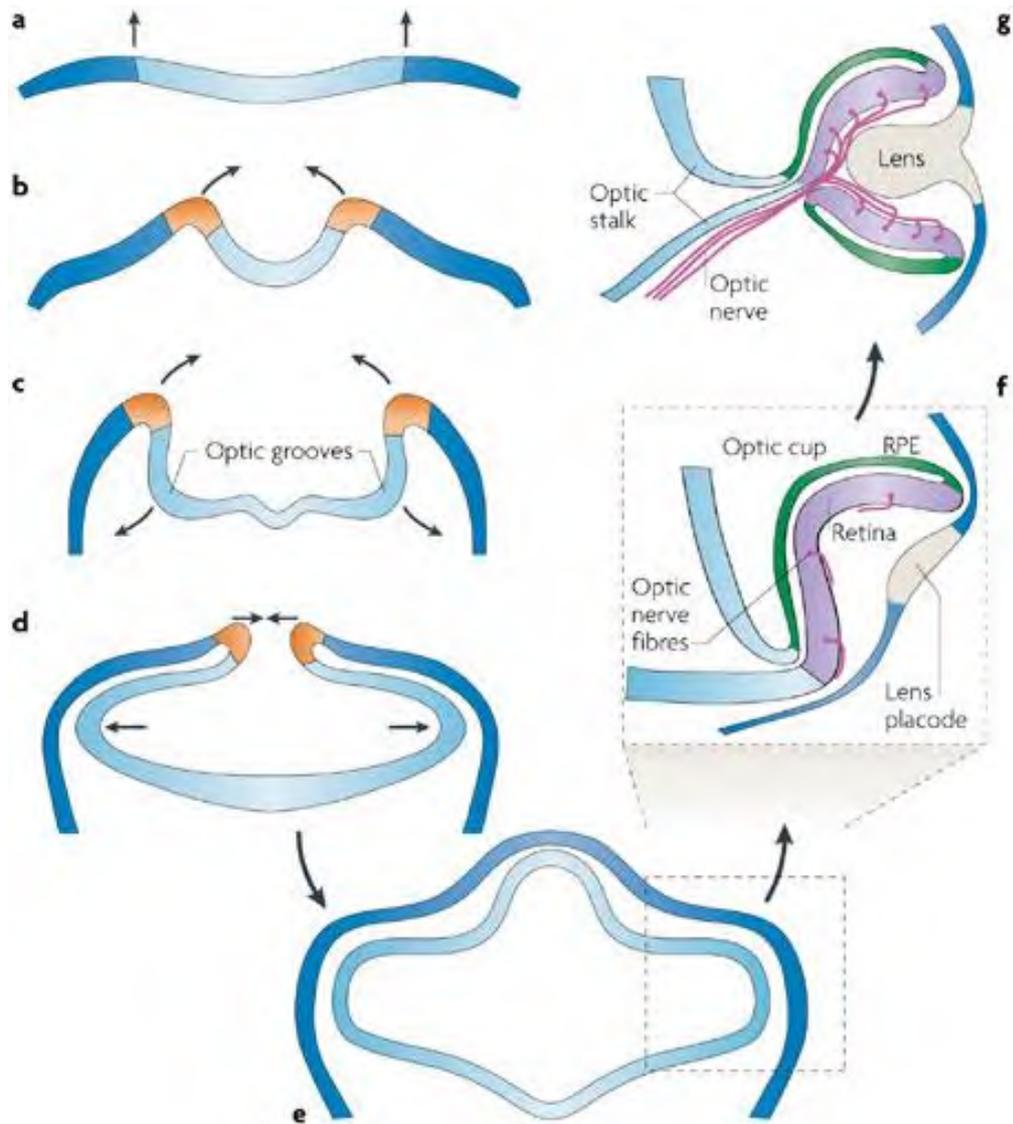


Fig. 2: La placca neurale è il punto d'inizio dello sviluppo della coppa ottica dei vertebrati. b) La placca neurale si ripiega verso l'alto e verso l'interno. c) Il solco ottico evagina. d) Le estremità della placca neurale si avvicinano e le vescicole ottiche si rigonfiano verso l'esterno. e) Dopo che le estremità si congiungono il tubo neurale viene tagliato. A questo stadio il cervello anteriore cresce verso l'alto e le vescicole ottiche continuano a gonfiarsi verso l'esterno: entrano in contatto con la superficie dell'ectoderma e inducono il placode della lente. f) La vescicola ottica ora si invagina cosicché la retina futura si appone al futuro epitelio pigmentato retinico (RPE) e lo spazio ventrale che era tra loro scompare. Le cellule gangliari retiniche che si stanno sviluppando mandano assoni attraverso la superficie retinica. La superficie dell'ectoderma vicino al placode della lente inizia a formare la cavità della lente. g) La coppa ottica cresce in circonferenza, eventualmente oltre la fessura corioide e include gli assoni del nervo ottico. Il tessuto ectodermico continua a differenziarsi e eventualmente forma la lente. (Trevor D., Shaun P., Collin and Edward N., Pugh JR. (2007). Evolution of the vertebrate eye. Opsins, photoreceptors, retina and eye cup. Nature Reviews Neuroscience 8: 960-976).

Una volta formatosi, il placode del cristallino determina a sua volta modificazioni della vescicola ottica. Si osserva, dunque, l'invaginazione del placode della lente e della vescicola ottica che daranno origine rispettivamente alla formazione della vescicola della lente e alla coppa ottica. Con l'invaginazione la coppa ottica assume una conformazione bilaminare, in cui lo strato più prossimale (o esterno) darà origine all'epitelio retinico pigmentato (RPE) che sarà costituito da un singolo strato di cellule contenenti melanina, e quello più distale (o interno) produrrà la retina neuronale. La funzione principale dell'RPE è quella di controllare il flusso di nutrienti e cataboliti con la retina, oltre ad impedire la dispersione dei fotoni che la colpiscono. Durante questo periodo si osserva un ulteriore cambio morfologico della coppa ottica, un'invaginazione lungo l'asse dorso-ventrale che darà la prima indicazione della forma emisferica finale dell'occhio.

Nel corso della sua graduale maturazione in cristallino, il placode della lente assume una forma rotondeggiante ed entra in contatto con il nuovo ectoderma sovrastante inducendolo a formare la cornea trasparente, che avrà la funzione di proteggere l'occhio e focalizzare la luce sul cristallino grazie alla sua trasparenza. Lo sviluppo della cornea è un processo multifasico, fortemente coordinato. Il mesenchima circostante alle vescicole ottiche, che deriva dalle creste neurali, si addensa attorno al RPE e si differenzia nella sclera e nella coroide. Le restanti parti dell'occhio adulto, quali il corpo ciliare e l'iride, sono invece derivati dalla porzione distale della coppa ottica, nel punto dove lo strato interno ed esterno della coppa ottica si incontrano.

Nel processo di differenziamento della retina risultano implicati sia segnali intrinseci che estrinseci, regolati a loro volta dalle possibili interazioni della retina con i tessuti adiacenti, quali l'RPE e la lente.

1.3. La retina dei vertebrati: morfologia e sviluppo.

La retina dei vertebrati è costituita da sei tipi di neuroni, e da un tipo di cellule gliali (le cellule di Muller), che sono organizzate in tre distinti strati cellulari e due strati di terminazioni sinaptiche degli assoni. Lo strato dei nuclei esterno (ONL) contiene i fotorecettori (coni e bastoncelli). Lo strato dei nuclei interno (INL) contiene le cellule interneuroni orizzontali, le cellule bipolari, le cellule amacrine e le cellule di Muller. Infine, lo strato di cellule gangliari (GCL), contiene le cellule gangliari e alcune amacrine. I due strati di terminazioni sinaptiche vengono a loro volta suddivise da strati di fibre: lo strato plessiforme esterno (OPL), che separa l'ONL dall'INL, ed interno (IPL), che separa l'INL dal GCL (Fig. 3).

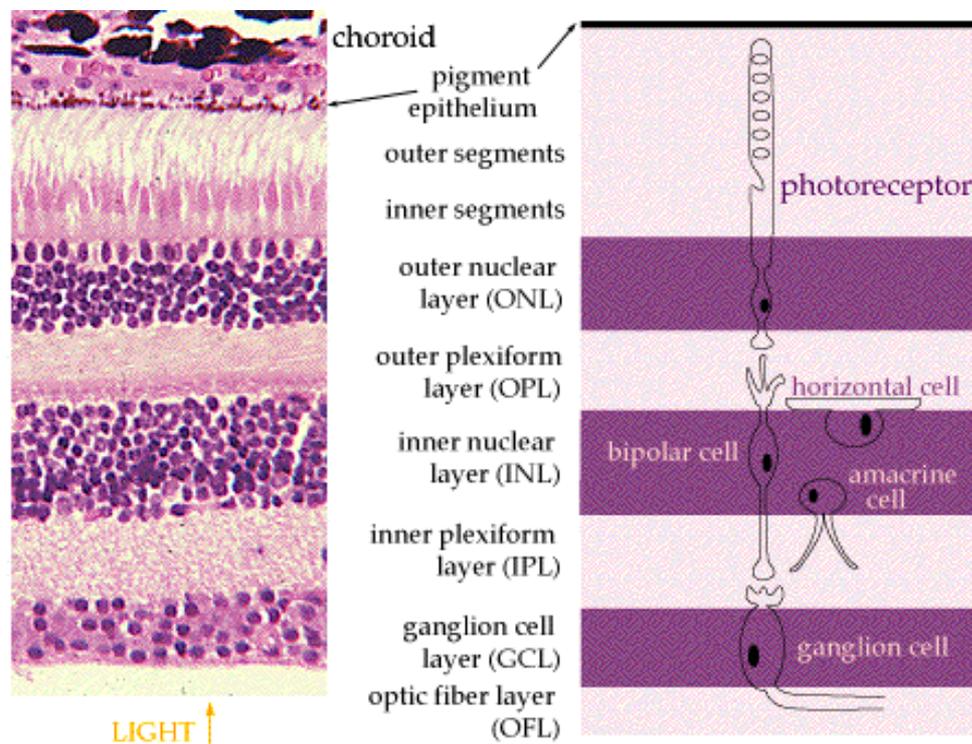


Fig. 3: Sette principali classi di tipi cellulari trovati nella retina dei vertebrati (fotorecettori: coni e bastoncelli; cellule gangliari; cellule bipolari; cellule amacrine; cellule orizzontali; glia di Muller) sono organizzati in tre distinti strati cellulari. I nuclei dei fotorecettori formano lo strato nucleare esterno della retina (ONL). Quando stimolati, essi trasmettono il loro segnale attraverso le cellule bipolari, i cui corpi cellulari sono ritrovati nello strato nucleare interno (INL), alle cellule gangliari. Dallo strato delle cellule gangliari (GCL) questi segnali seguono la strada dal nervo ottico al cervello. Le cellule orizzontali e amacrine nell'INL creano connessioni laterali e modulano il pathway del segnale dai fotorecettori alle cellule gangliari. Le cellule amacrine creano anche una significativa proporzione delle GCL e ci si riferisce ad esse come cellule amacrine dislocate. Le cellule di Muller si trovano al centro del INL e i loro processi si estendono in tutti e tre gli strati della retina. Si pensa che siano coinvolti nella protezione o riparo dei neuroni retinici.

Questa architettura viene raggiunta attraverso un complesso insieme di eventi comprendenti la proliferazione, la migrazione e la morte cellulare programmata di specifiche cellule .

I diversi tipi cellulari, generati nel corso del differenziamento neuronale della retina, presentano un ordine temporale di neurogenesi che risulta ampiamente conservato nel corso dell'evoluzione dai pesci fino ai mammiferi (Belecky-Adams et al., 1996; Carter-Dawson e LaVail, 1979; Cepko et al., 1996; Hu e Easter, 1999; LaVail et al., 1991; Stiemke e Hollyfield, 1995; Young, 1985).

Le cellule gangliari della retina cominciano a differenziarsi per prime, seguite dalle cellule orizzontali, dai coni e dalle amacrine; mentre i bastoncelli, le cellule bipolari e le cellule di Muller si differenziano per ultime (fig. 4). Sebbene venga distinta una temporalità nel differenziamento, durante la retinogenesi, i periodi di differenziamento di ciascun tipo cellulare sono in parte contemporanei a quelli del tipo cellulare che li precede.

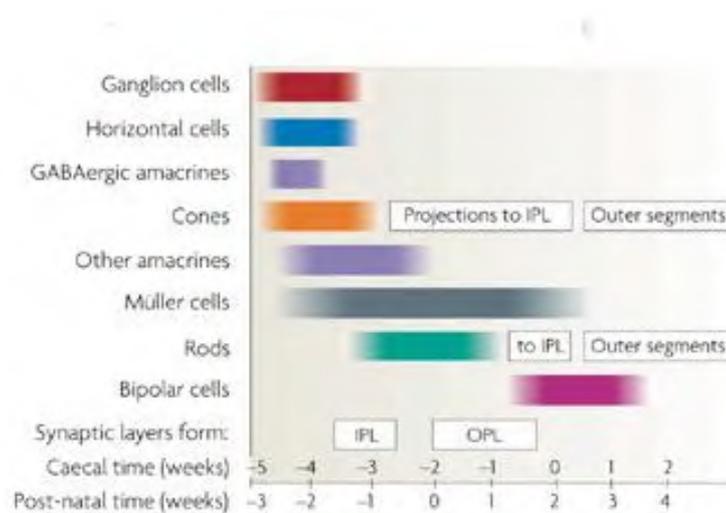


Fig. 4: Ordine temporale di nascita dei diversi tipi cellulari nella retina dei vertebrati. (Trevor D., Shaun P., Collin and Edward N., Pugh JR. (2007). Evolution of the vertebrate eye. Opsins, photoreceptors, retina and eye cup. Nature Reviews Neuroscience 8: 960-976).

Secondo il modello della “competenza”, questi differenti tipi cellulari derivano da un unico progenitore comune, il cui destino è governato da fattori intrinseci ed estrinseci alla cellula (Turner et al., 1990; Wetts e Fraser, 1988; Young, 1985; Austin et al., 1995; Belliveau e Cepko, 1999; Cepko, 1999; Harris, 1997; Livesey e Cepko, 2001; Marquardt e Gruss, 2002).

In questo modello, le cellule progenitrici passano attraverso stati successivi e distinti di competenza, durante i quali ogni cellula è capace di produrre un sottogruppo di cellule retiniche (Livesey e Cepko, 2001). In ogni stato di competenza, la generazione di un particolare tipo cellulare è controllata in parte da segnali estrinseci in parte da segnali intrinseci. Ognuno di questi

segnali può determinare il destino della cellula: la sua morte (per apoptosi o necrosi) o la continuazione del suo sviluppo (mitosi).

Nei vertebrati inferiori, come *Xenopus*, la retinogenesi può continuare per tutta la vita dell'animale grazie alla zona marginale ciliare (MCZ) localizzata nella regione più periferica (vicino al cristallino) della retina neurale. In questa regione sono conservate le cellule staminali retiniche e i progenitori proliferanti.

La retina inversa dei vertebrati presuppone delle cellule sensoriali nello strato più esterno, così che lo stimolo luminoso, che sarà captato dagli apici sensitivi dei coni e dei bastoncelli, deve attraversare prima tutti gli strati della retina.

Una simile disposizione si ritrova anche in qualche invertebrato (per es. in *Pecten*, mollusco bivalve, Kupffer, 1916), ma sono più frequenti le retine converse, con le cellule sensoriali orientate in modo da essere colpite dalla luce per prime e nel loro apice distale.

La retina inversa dei vertebrati funziona ottimamente per la trasparenza degli strati retinici antistanti alle cellule sensoriali; ma può sembrare antropomorficamente, una strana soluzione: certamente, nessun ottico avrebbe mai progettato un tale dispositivo. La ragione è da ricercare nel fatto che la polarità degli elementi retinici si determina precocemente, dallo stadio di placca dorsale, e più precisamente delle foveole ottiche dove già si differenziano in superficie delle cellule cilindriche e pigmentate al loro estremo distale. Questi elementi, quando si chiude il tubo neurale e si estroflettono le vescicole ottiche, vengono a trovarsi sulla superficie interna di queste ultime; ed infine prendono la posizione inversa quando si passa allo stadio di coppe ottiche, e la retina propria, cioè la sua lamina interna, si differenzia in vari strati, con il segmento distale dei coni e dei bastoncelli rivolto verso la lamina retinica esterna.

La distribuzione dei bastoncelli (visione bianco e nero) e dei coni (visione a colori) nei differenti animali e nelle diverse regioni della retina è notevolmente variabile. Prevedibilmente, i bastoncelli dominano negli animali notturni, o nei pesci abissali; i coni sono più abbondanti nelle forme attive di giorno. La maggioranza dei rettili e degli uccelli hanno occhi relativamente ricchi di coni e perciò maggiormente adattati alla vita di giorno.

1.4. Due diversi destini della vita cellulare: mitosi ed apoptosi nella neuroretina in via di sviluppo.

Lo sviluppo del tessuto nervoso è caratterizzato dalla produzione di un eccesso di cellule che sono successivamente rimosse per morte cellulare per permettere in questo modo la corretta funzionalità dell'organismo (Oppenheim, 1991).

La degenerazione cellulare comunemente osservata durante l'embriogenesi è stata chiamata apoptosi (termine che deriva dal greco "cadere") ed è caratterizzata dal restringimento della membrana, dalla frammentazione nucleare e dalla formazione dei "corpi apoptotici" (Kerr et al., 1972; Wyllie, 1981; Bowen, 1993). La superficie cellulare risulta alterata e mostra proprietà che determinano la fagocitosi della cellula morente da parte delle cellule vicine o dai macrofagi prima che il suo contenuto venga liberato. Inoltre, nel processo apoptotico gli organelli intracellulari, come mitocondri e reticolo endoplasmatico, sono relativamente conservati quindi non è prevista alcuna reazione infiammatoria. Al contrario la necrosi è caratterizzata dalla rapida rottura degli organelli e della membrana plasmatica accompagnata da infiammazione in gran parte del tessuto.

Il sistema nervoso contiene un sorprendente insieme di tipi cellulari e connessioni stereotipiche che sono la base della sua sofisticata funzionalità. Gli studi di Santiago Ramon y Cajal (1909) hanno rivelato molti aspetti dell'intricata rete neuronale del sistema nervoso in dettagliati preparati microscopici e meravigliosi disegni. Comunque, ancora un secolo dopo i neuroscienziati non hanno totale comprensione di come tale diversità e complessità sia raggiunta. Gran parte del sistema nervoso origina apparentemente da cellule neuroepiteliali indifferenziate che sono in uno stato di proliferazione. Queste cellule subiscono un processo di sviluppo che le porta attraverso stadi sequenziali di cellule neuronali staminali, progenitori neuronali, neuroblasti o bioblasti, per poi finalmente differenziarsi in neuroni o cellule della glia.

Così, proliferazione e differenziamento, come anche migrazione cellulare, crescita assonale e dendritica e lo sviluppo delle connessioni sinaptiche sono stati chiaramente riconosciuti come processi fondamentali per generare la complessità neuronale e, conseguentemente, questi processi sono stati attivamente studiati durante lo sviluppo neurale.

Come elaborato dalla teoria neurotrofica, un altro rilevante processo che interviene nello stabilire la morfologia e la fisiologia neurale è "la morte cellulare programmata (PCD) o apoptosi", che agisce sia su differenti tipologie neuronali sia sulle cellule della glia (Kuan et al., 2000; Roth e D'Sa, 2001; Davies, 2003; Buss et al, 2006).

Tuttavia, questa non è né la sola né la più precoce morte cellulare che ricorre nel sistema nervoso in via di sviluppo. Infatti, cellule neuronali staminali, progenitori proliferanti, neuroni e cellule della glia neoformate sono tutti interessati da morte cellulare (de la Rosa e de Pablo, 2000; Yeo e Gutier, 2004; Boya e de la Rosa, 2005). Sebbene recentemente questa precoce fase di morte cellulare sia oggetto di numerosi studi, le popolazioni cellulari interessate, i

meccanismi regolatori coinvolti, la sua ampiezza e le sue implicazioni funzionali sono ancora lontani dall'essere caratterizzati in maniera appropriata.

Nello sviluppo degli occhi dei vertebrati, il processo di morte cellulare avviene a diversi stadi dello sviluppo. Negli stadi relativamente precoci, una regione di degenerazione è stata descritta nella retina neurale ventrale. Negli stadi intermedi, la morte cellulare è associata con il differenziamento dei primi neuroni retinali. Negli stadi relativamente avanzati avviene la morte di una larga parte dei neuroni retinali (Cuadros e Rios, 1988; Martin-Partido et al., 1988; Diaz et al., 1999; 2000; Mayordomo et al., 2003). Questo evento viene registrato per lo più nelle regioni centrali e poi man mano nelle regioni periferiche della retina e segue differenti gradienti spazio-temporali (Rager e Rager, 1978; Hughes e McLoon, 1979; Rager, 1980; Cunningham et al., 1982; Sengelaub e Finlay, 1982; Young, 1984; Provis, 1987; Straznicky e Chehade, 1987; Martin-Teva et al., 1999).

La neuroretina dei vertebrati è uno dei classici sistemi modello usato nella neurobiologia dello sviluppo (Cepko et al., 1996; Harris, 1997; Marquardt e Gruss, 2002; Adler, 2005), in quanto è una parte facilmente accessibile del sistema nervoso centrale visto che è localizzata all'esterno del cervello; Inoltre, può essere sottoposta a una varietà di approcci sperimentali, come la manipolazione in vivo usando classiche tecniche embriologiche sperimentali, soprattutto nei vertebrati non-mammiferi.

Lo sviluppo della retina inizia con l'induzione del placode della retina nella placca neurale/tubo neurale e la morfogenesi della vescicola e della coppa ottica, e procede con la proliferazione delle cellule neuroepiteliali, la generazione di neuroni e di cellule della glia differenziati, la migrazione verso lo strato retinale appropriato, la crescita assonale e dendritica, la sinaptogenesi, per terminare con l'attività funzionale (Cepko et al., 1996; Chow e Lang, 2001; Levine e Green, 2004; Harada et al., 2007; Lamb et al., 2007). La morte cellulare programmata (PCD) ricorre simultaneamente a questi processi e probabilmente un processo di sviluppo necessario per raggiungere la piena funzionalità.

Numerosi eventi di morte cellulare sono stati caratterizzati indipendentemente nello sviluppo della retina in diverse specie di vertebrati (Vecino et al., 2004; Farah, 2006; Guerin et al., 2006; Valenciano et al., 2009), sebbene questi studi hanno concentrato l'attenzione su periodi dello sviluppo della retina più tardivi.

Comunque, molti di questi studi hanno evidenziato che la maggioranza, se non tutti i processi di sviluppo prima menzionati sono interessati da PCD, un fatto non ben noto in letteratura.

Le osservazioni disponibili sugli eventi di PCD nella retina dei vertebrati possono essere organizzate in accordo alle fasi di sviluppo in cui essi ricorrono in:

- morte cellulare morfogenica: PCD correlata all'evaginazione della vescicola ottica, invaginazione della coppa ottica e la chiusura della fessura ottica;

-
- precoce morte cellulare neurale: PCD che interessa cellule neuroepiteliali proliferanti e neuroni e cellule della glia neoformate;
 - morte cellulare neurotrofica: PCD che interessa neuroni differenziati in seguito all'assenza di fattori neurotrofici o inappropriata sinaptogenesi.

Lo sviluppo della retina si verifica lungo prominenti gradienti spazio-temporali ed implica che cellule a differente locazione nella stessa retina possono essere coinvolte in processi di sviluppo differenti. In più nei vertebrati non mammiferi c'è una crescita indefinita della retina e, quindi, il suo iniziale sviluppo è significativamente accelerato, producendo una sovrapposizione delle fasi di morte cellulare definite sopra.

Nei diversi gruppi di vertebrati sono evidenti differenze nella composizione cellulare e nei tempi di sviluppo della retina che rendono spesso difficile una diretta comparazione. Un'ulteriore difficoltà di confronto dei dati deriva dal fatto che, negli studi condotti fino ad oggi, sono stati utilizzati differenti metodi: microscopia elettronica, colorazioni su tessuto, analisi whole-mount, ecc. Similmente, quantificazioni assolute e relative (densità cellulare e conte numeriche) spesso non sono state effettuate.

Così, sono disponibili solo tentativi di analisi dei dati descrittivi, come anche di informazioni quantitative per differenti gruppi di vertebrati con l'intento di organizzarli in relazione a distinte fasi di PCD che ricorrono attraverso lo sviluppo della retina (Valenciano et al., 2009).

Mentre la morte cellulare negli stadi iniziali di morfogenesi dell'occhio e di sviluppo della retina è inequivocabilmente documentata (Valenciano et al., 2009), studi quantitativi di questi eventi sono molto scarsi. Così, l'ampiezza relativa della morte cellulare morfogenetica può essere solo estrapolata da studi comparativi che sono stati condotti dagli stessi laboratori usando le stesse metodiche. Nella trota (Candal et al., 2005), la densità delle cellule apoptotiche in precise aree dove la morte cellulare morfogenetica ha avuto luogo è 10 volte maggiore di quella che si verifica per le cellule gangliari (RGCs) in ogni successiva fase. Nel topo (Pequignot et al., 2003), una simile comparazione riporta un 2% di cellule morenti allo stadio E10.5, mentre allo stadio P2, il 3,5% di cellule nello strato gangliare (GCL) subiscono PCD durante la fase di morte neurotrofica. I dati disponibili non possono essere estrapolati per determinare il numero cumulativo di cellule eliminate durante la morte cellulare morfogenetica, la quale tipicamente sembra coinvolgere una elevata densità di cellule morenti secondo coordinate spazio-temporali ristrette e definite.

Capitolo 2:
Il sistema olfattivo

2.1. L'olfatto.

La capacità di percepire stimoli di natura chimica è una caratteristica comune a quasi tutti gli animali, anche se in realtà non è facile stabilire in quali casi si può parlare di senso dell'olfatto paragonabile a quello dei vertebrati.

In alcuni casi si possono riconoscere cellule di senso specializzate alla percezione di sostanze di natura chimica. Gli insetti, ad esempio, presentano degli organi specifici costituiti da sensilli particolari localizzati, soprattutto e in gran numero, sulle antenne, le quali rappresentano il principale organo olfattivo in questa classe.

Nei vertebrati, l'organo olfattivo (fig. 5), situato nelle cavità nasali, contiene sempre strutture nervose e si presenta sotto forma di un paio di lobi olfattivi. Strutturalmente l'organo olfattivo è abbastanza complesso e la sua organizzazione ha uno sviluppo diverso nelle varie classi.

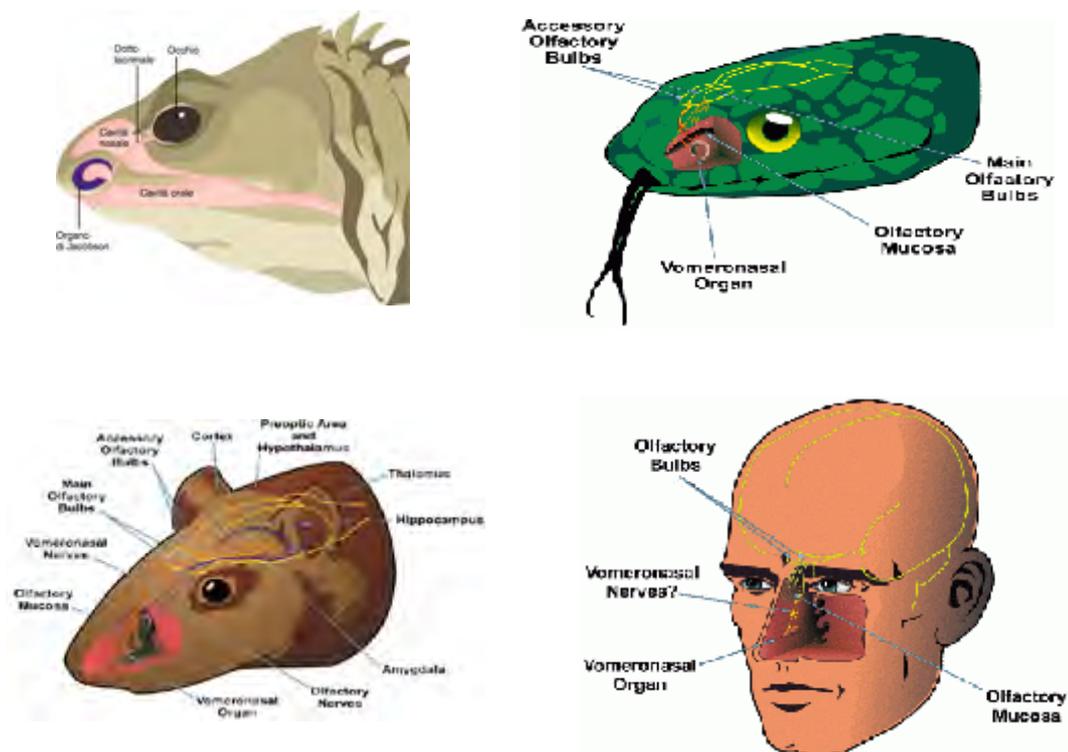


Fig. 5: Anatomia del sistema olfattivo di alcuni vertebrati

Nei mammiferi, il senso dell'olfatto è molto sviluppato in quanto riveste una grande importanza per le interazioni dell'animale con l'ambiente esterno.

L'olfatto è considerato il più antico dei cinque sensi a livello evolutivo. Ciò è confermato dai suoi legami con le zone più remote e primitive del cervello, le quali controllano gli istinti primari e le emozioni, e dalla conservazione del suo livello funzionale.

Agli inizi del XX secolo, fu proposto da alcuni autori che il telencefalo degli anamni fosse, per la maggior parte, sotto il controllo del sistema olfattivo (Herrick, 1910; Backstrom, 1924) e che il cervello dei vertebrati più evoluti derivasse da un primitivo "cervello olfattivo" (Herrick, 1924). Lo stesso Herrick introdusse il termine rinencefalo per indicare la regione dell'encefalo sotto il dominio olfattivo. L'autore considerava che da un telencefalo essenzialmente olfattivo si fosse sviluppato, nel corso dell'evoluzione, il complesso telencefalo dei mammiferi, in cui la regione olfattiva è molto limitata ed oscurata da nuove acquisizioni evolutive.

In realtà, nel telencefalo dei pesci e degli anfibi, aree non olfattive sono già presenti (Ebbesson e Heimer, 1968; Scalia et al., 1968; Royce e Northcutt, 1969; Scalia e Ebbesson, 1971) e mostrano gli stessi collegamenti della corteccia dei mammiferi (Ebbesson and Schroeder, 1971; Northcutt, 1972; Cohen et al., 1973). Questi elementi sono definiti neocorticali equivalenti. In sostanza il piano strutturale del telencefalo dei vertebrati era già definito fin dall'inizio della loro evoluzione.

In ogni modo, nonostante l'enorme sviluppo del telencefalo di regioni non olfattive, il sistema olfattivo ha subito modeste modificazioni evolutive.

Il sistema olfattivo è implicato nella percezione di sostanze chimiche coinvolte nelle funzioni riproduttive, nella regolazione neuroendocrina, le risposte emozionali, il riconoscimento di conspecifici, predatori e prede, nella selezione del cibo, poichè la percezione dei sapori risulta dall'integrazione di segnali olfattivi e gustativi.

I meccanismi molecolari legati alla funzione olfattiva prevedono, a livello periferico, la captazione delle sostanze chimiche e la trasduzione operata da specifici recettori.

La maggior parte di anfibi, rettili e mammiferi, possiede un duplice sistema olfattivo, costituito da differenti reti neuronali che, in base alle conoscenze presenti, assolverebbero diverse e specifiche funzioni. Il primo sistema neuronale mette in comunicazione la cavità nasale con i bulbi olfattivi primari, costituendo, in questo modo, il sistema olfattivo principale. La seconda rete di fibre costituisce il sistema olfattivo accessorio, costituito da un organo sensoriale (vomeronasale o di Jacobson) un nervo vomeronasale e un bulbo olfattivo accessorio. Si ritiene che il sistema olfattivo accessorio sia principalmente coinvolto nella mediazione delle risposte comportamentali e fisiologiche relative alla predazione e/o ai feromoni sessuali.

Accanto a queste due principali vie olfattive, sono state descritte altre vie nervose, la cui funzione è, tuttora, oggetto di vivaci discussioni. Tali sistemi sono, molto spesso, difficili da distinguere e da caratterizzare morfologicamente. Di conseguenza, sono scarse le conoscenze sulle loro implicazioni funzionali.

2.2. Il sistema olfattivo principale.

Il sistema olfattivo principale (Fig. 6) ha origine dal placode olfattivo e consta, a livello periferico, di una mucosa olfattiva dove hanno accesso le sostanze odorose attraverso le narici o le coane. Nella mucosa olfattiva sono presenti recettori olfattivi primari in associazione a cellule secernenti e di supporto. I recettori olfattivi primari sono cellule bipolari dotate di un dendrite nella regione apicale provvisto di microvilli, salvo qualche eccezione. All'opposto emerge il prolungamento assonico che, unendosi a quelli provenienti dagli altri recettori, forma il nervo olfattivo. Questo ultimo termina a livello dei bulbi olfattivi principali telencefalici. All'estremità dei prolungamenti assonici, si presentano ramificazioni che formano sinapsi con l'albero dendritico delle cellule mitrali bulbari costituendo delle strutture caratteristiche, i glomeruli. La struttura dei bulbi olfattivi ha un'organizzazione pressochè laminare: lo strato superficiale è quello del nervo olfattivo che contiene gli assoni dei recettori olfattivi descritti prima, e cellule gliali. Spostandosi verso l'interno, vi si trova lo strato glomerulare, costituito, appunto, dai glomeruli, i quali sono circondati da piccoli neuroni e da cellule gliali. Le cellule mitrali, i cui dendriti sono parte dei glomeruli, costituiscono il terzo strato della struttura.

Infine, si ha lo strato granulare, il più interno della struttura bulbare. Esso è costituito da molte piccole cellule, granulari, prive di assoni, con dendriti che si ramificano nello stesso strato ed un unico dendrite che raggiunge lo strato delle cellule mitrali prendendo contatti sinaptici con esse. Tale descrizione fa riferimento ad uno schema base presente nei ciclostomi. Tuttavia, sono presenti alcune variazioni negli altri gruppi di vertebrati, anche se si tratta di modificazioni specifiche che, sostanzialmente, non cambiano l'organizzazione generale. Ad esempio, negli squalomorfi, tra i pesci cartilaginei, gli strati granulare e mitrale non sono distinguibili; essi costituiscono uno strato unico contenente entrambi i tipi cellulari. Nei pesci non teleostei, sotto allo strato glomerulare, è posta una lamina esterna, costituita da cellule mitrali e periglomerulari; queste ultime contattano, a livello periferico, i recettori dell'epitelio olfattivo. Nei dipnoi la struttura è più complessa per la presenza di due strati di fibre, lo strato plessiforme esterno, posto tra quello glomerulare e quello mitrale, e lo strato plessiforme interno, subito prima di quello delle cellule granulari.

Negli anfibi la struttura dei bulbi olfattivi principali è simile a quella dei dipnoi con l'unica differenza che, in questo gruppo, manca lo strato plessiforme interno.

I bulbi olfattivi di rettili, uccelli e mammiferi sono più complessi, in quanto sono costituiti da un numero maggiore di strati: glomerulare, granulare esterno, plessiforme esterno, mitrale, plessiforme interno e granulare interno.

I bulbi olfattivi inviano informazioni al telencefalo anteriore attraverso le proiezioni olfattive secondarie, anche note come tratti olfattivi.

La lunghezza relativa dei nervi e dei tratti olfattivi è variabile. Nei pesci cartilaginei ed ossei, i bulbi olfattivi possono essere in posizione sessile, in

pratica giustapposti al telencefalo. In questi casi i nervi olfattivi sono, di regola, lunghi, e i tratti olfattivi più brevi. La situazione è diametralmente opposta nelle specie con i bulbi olfattivi pedunculati, in cui i bulbi sono prossimi alla mucosa olfattiva e sono collegati al resto del telencefalo mediante peduncolo olfattivo.

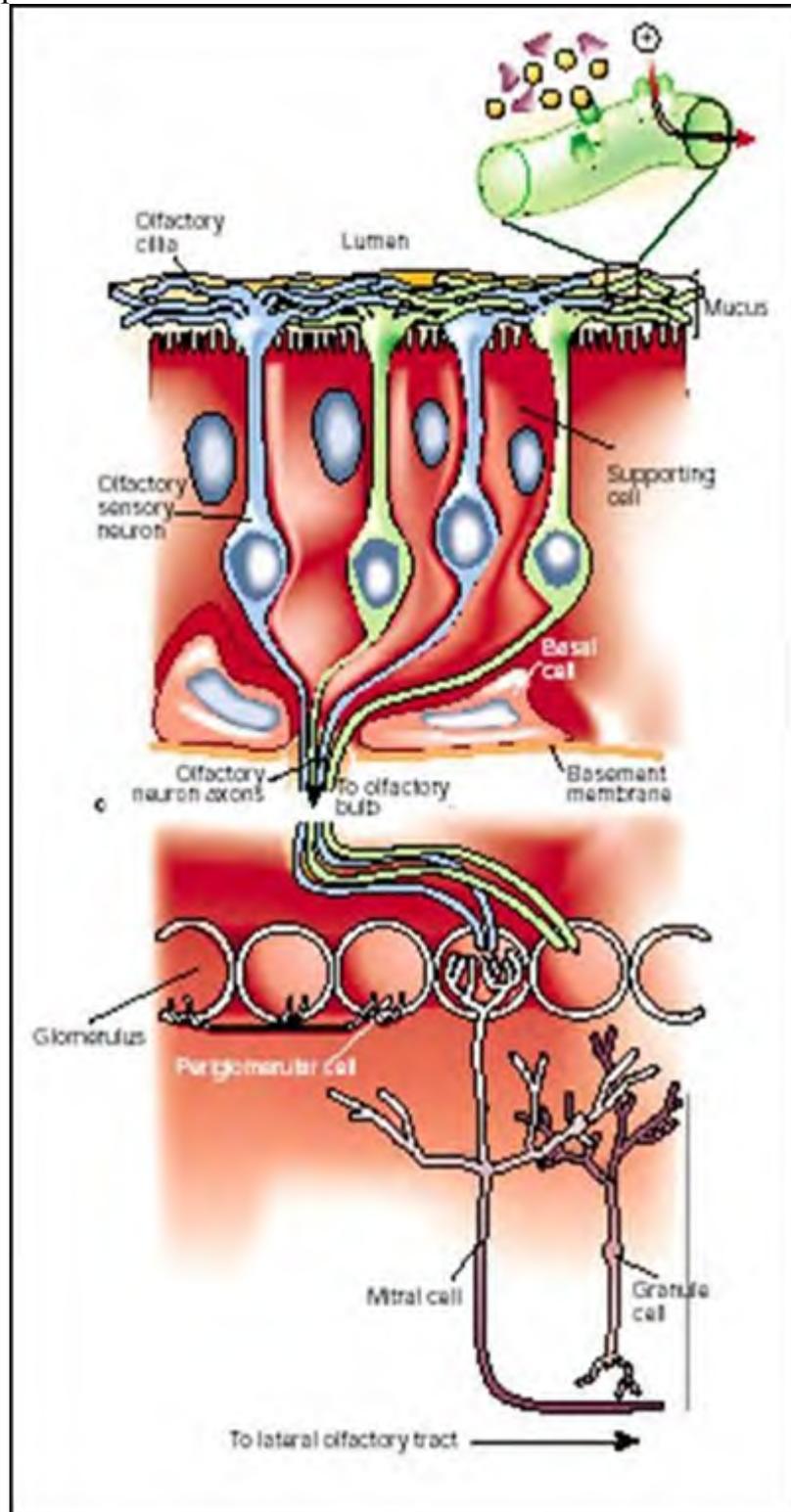


Fig. 6: Sistema olfattivo principale (Stuart F. (2001). How the olfactory system makes sense of scents. Nature 413: 211-218).

2.3. *Il sistema olfattivo accessorio.*

In passato, nonostante non fossero noti i meccanismi molecolari della rilevazione chimica, il quadro complessivo relativo alla fisiologia del sistema olfattivo principale sembrava piuttosto chiara. Con la scoperta del sistema olfattivo accessorio, si pose immediatamente il problema delle competenze funzionali dell'uno e dell'altro sistema.

La componente sensoriale del sistema olfattivo accessorio (o vomeronasale, perchè presente in prossimità dell'osso vomere) fu scoperta per caso nel 1703 da un chirurgo olandese di nome Ruysch. Egli durante l'intervento ad un soldato, nel tentativo di curargli una profonda ferita al viso, si accorse della presenza di un piccolo organo alloggiato in prossimità del setto nasale. Tale organo fu in seguito riscoperto e studiato da Jacobson (1811) in una varietà di mammiferi, anche se ne negò esplicitamente la presenza nell'uomo (forse Jacobson non era nemmeno a conoscenza del dato di Ruysch). Sta di fatto che l'organo periferico preposto alla percezione sensoriale è oggi noto come organo di Jacobson e non di Ruysch. Il nome d'organo di Jacobson si deve a Potiquet (1821), che produsse la prima estesa trattazione dell'organo vomeronasale nell'uomo. Probabilmente, anch'egli era all'oscuro della scoperta di Ruysch.

Questo organo non differisce in maniera sostanziale dall'organo olfattivo principale. Importante porre l'accento sul fatto che i recettori olfattivi secondari presenti nell'organo di Jacobson presentano, a livello del dendrite apicale, ciglia anzichè microvilli (con rare eccezioni). Le sostanze odorose accedono all'organo vomeronasale prevalentemente attraverso aperture specifiche presenti sotto la volta palatina o attraverso doti che sboccano nel canale nasale. Gli assoni dei recettori olfattivi secondari, unendosi, formano il nervo vomeronasale che termina nei bulbi olfattivi accessori, dove si formano i glomeruli vomeronasali.

Sin dagli studi di Jacobson, era stato stabilito che il sistema olfattivo accessorio fosse una caratteristica apparsa durante il percorso evolutivo dai tetrapodi. Di conseguenza, sembrava piuttosto logico legare l'organo vomeronasale alla percezione delle sostanze disciolte nell'aria, come adattamento all'habitat terrestre (Bertmar, 1981). Tuttavia, Broman (1920) notò che l'organo vomeronasale era ripieno di liquido, quindi l'organo percepiva sostanze in soluzione come la mucosa olfattiva dei pesci. Quindi, aveva ipotizzato che la mucosa olfattiva dei pesci fosse omologa all'organo vomeronasale dei vertebrati e il sistema olfattivo principale fosse la nuova acquisizione evolutiva dei tetrapodi. Alla luce delle conoscenze attuali, entrambe le ipotesi sembrano poco sostenibili. Infatti, sono ormai molti i gruppi di ricerca che riportano la presenza d'omologhi vomeronasali nei pesci. In *Protopterus* è stato segnalato da diversi autori un bulbo olfattivo accessorio (Rudebeck, 1945; Schnitzlein e Crosby, 1967). Schnitzlein e Crosby (1967) hanno anche segnalato la presenza di un nervo e di un organo vomeronasali separati. Tuttavia, queste osservazioni non sono state confermate da un altro autore (Derivot, 1984a, b). Nel pesce ratto (*Chimaera*, condroitto non

elasmobranco) sono stati descritti due bulbi olfattivi accessori per lato: uno situato dorsalmente, come quello descritto in *Protopterus*, e uno in posizione ventrolaterale, caso unico finora nei pesci (Faucette, 1969). Inoltre, una porzione del bulbo olfattivo di *Amia* è stata riconosciuta come bulbo olfattivo accessorio (Schnitzlein, 1964).

Altre segnalazioni nei pesci di componenti olfattive accessorie sono state ricavate da studi sugli actinopterigi non teleostei: lo storione (Adair, 1964) e il pesce spatola (Story, 1964) in cui il bulbo olfattivo accessorio è stato identificato come una porzione della parte dorsomediale del bulbo olfattivo principale. In uno studio sui teleostei è stato anche evidenziato che il tratto olfattivo mediale ha delle connessioni molto simili a quelle del bulbo olfattivo accessorio (Dulka, 1993). Tuttavia, non si può dire con certezza che le due strutture siano omologhe, oppure che si siano evolute indipendentemente.

L'organo vomeronasale potrebbe essere presente nei pesci in una forma non segregata. Ciò è supportato dall'osservazione che la mucosa olfattiva dei pesci possiede recettori ciliati (tipici dell'organo vomeronasale) e recettori dotati di microvilli (caratteristici della mucosa olfattiva principale).

Riguardo agli altri vertebrati, il sistema vomeronasale è ben sviluppato in anfibi, mammiferi e nella maggioranza dei rettili squamati (lucertole e serpenti). E' assente nei proteidi (urodeli), nei tecodonti (coccodrilli e uccelli) e in alcuni mammiferi marini. In questi casi si tratta, probabilmente, di una condizione secondaria.

2.4. Attività neurogenetica durante lo sviluppo e differenze degli organi olfattivi.

La neurogenesi è un fenomeno che riguarda la formazione di nuovi neuroni nel corso dello sviluppo e della vita adulta. Studi basati sull'osservazione di fenomeni comportamentali, stagionali o regolati da ormoni, sulla sostituzione di neuroni danneggiati con altri generati *ex novo*, dopo danni indotti sperimentalmente, hanno dimostrato che tutti i vertebrati possiedono la capacità di generare nuovi neuroni (Nottebohm, 1985; Alvarez-Buylla, 1990; Lois and Alvarez-Buylla, 1993; Zupanc and Horschke, 1995; Perez-Canellas and Garcia-Verduco, 1996; Chiasson et al., 1999; Garcia-Verdugo et al., 2002; Alvarez-Buylla et al., 2002; Rodriguez-Perez et al., 2003; Rankin et al., 2004; Romero-Alemann et al., 2004; Dewulf and Bottjer, 2005).

Nel vasto panorama dei vertebrati, il modello degli anfibi (Urodeli e Anuri) ha avuto un ruolo decisivo. La maggior parte degli autori hanno focalizzato la loro attenzione sui processi rigenerativi nel sistema nervoso centrale in seguito a lesioni (Minelli et al., 1982; Del Grande et al., 1984, 1990; Franceshini et al., 1992; Benraiss, 1999; Yoshino and Tochinai, 2004), molti altri hanno approfondito gli aspetti ontogenetici di specifiche parti del cervello: i bulbi olfattivi (Burd and Sein, 1998;), le vie vocali (Gorlick and Kelley, 1987), il cervelletto (Filoni and Margotta, 1971; Gona, 1976; Uray et al., 1987, 1988), il nucleo istmico (Tay and Straznicky, 1980; Dann and Beazley, 1989), l'ipotalamo (Chetverukhin and Polenov, 1993; Polenov and Chetverukhin, 1993), il tetto ottico (Reznikov and Maliovanova, 1979; Dann and Beazley, 1988), il recesso preottico (Onishchenko et al., 1983), telencefalo (Margotta et al., 1999a, 2000), o l'intero encefalo (Bernocchi et al., 1990; Dawley et al., 2000; Wullimann et al., 2005). Per quanto riguarda cambiamenti nell'attività proliferativa, durante lo sviluppo nel cervello dei vertebrati, sono disponibili solo pochi studi: ciclostomi (Villar-Cheda et al., 2002, 2005a, b), pesci (Wullimann and Puelles, 1999; Wullimann and Knipp, 2000; Wullimann and Mueller, 2004), regioni posteriori del cervello degli alligatori (Pritz, 2003), topi (Martinez and Puelles, 2000). Recentemente si è reso disponibile uno studio sul pattern di sviluppo dell'attività proliferativa (con maggior attenzione all'espressione genica neurogenetica e proneurale) nel cervello di un anfibio, la rana africana *X. laevis* (Wullimann et al., 2005).

La proliferazione cellulare nel sistema nervoso agli inizi è stata ampiamente studiata mediante marcatura con timidina triziata e immunoistochimica per la 5-bromo-2'-deossiridina (BrdU). Un altro grado di affidabilità viene tutto oggi enfatizzato per l'antigene nucleare di proliferazione (PCNA). Le prime sono biologicamente dannose, l'uso della PCNA, invece, è sia sicuro che semplice ed è più che soddisfacente in studi del genere (Wullimann and Puelles, 1999; Rankin et al., 2004; Wullimann et al., 2005). La marcatura con PCNA è stata descritta in cellule ependimali/subependimali (cervello adulto), zone ventricolari e subventricolari (nel cervello degli embrioni) del cervello dei vertebrati (Margotta and Morelli, 1996; Ino and Chiba, 2000; Margotta et

al., 1999b; Wullimann and Puelles, 1999; Wullimann et al., 2005). Questi studi hanno dimostrato come l'attività proliferativa neurogenetica durante lo sviluppo sia intensa e diffusa, mentre tende a diminuire e a localizzarsi in aree specifiche dell'encefalo nell'adulto.

In questa analisi degli eventi neurogenetici, i processi proliferativi del sistema olfattivo degli anfibi sono stati soggetti a molti studi.

Gli anfibi rappresentano un gruppo intermedio tra i pesci e gli amnioti. Durante il loro sviluppo in larga maggioranza passano da un tipo di vita acquatico ad uno prettamente terrestre. Naturalmente tutti gli organi sensoriali devono essere riadattati durante la metamorfosi che li porta dall'acqua alle terre emerse. Molti studi, infatti, alcuni datati altri attuali, mostrano che il sistema olfattivo è rimodellato al momento della metamorfosi (Born, 1876; Sevdal 1895; Schuch 1934). Uno degli organismi modello favoriti tra le specie degli anfibi è lo *Xenopus laevis*. Questa specie, secondariamente acquatica, è dotata di un organo olfattivo molto particolare. Esso è costituito da tre cavità: una camera principale disposta mediamente, un'intermedia disposta lateralmente e l'organo vomeronasale disposto lateralmente sotto la camera intermedia (Föske, 1934). La camera laterale è riempita d'acqua ed è nota come water nose (Altner, 1962). Quella mediale percepisce sostanze volatili ed è nota come air nose (Weiss, 1986). L'organo vomeronasale infine, anch'esso ripieno di liquido, sembra essere coinvolto nella percezione dei feromoni in soluzione. La presenza di una camera laterale sembra essere una caratteristica dei pipidi (Meyer et al., 1997) ed è chiaramente collegata con il loro stile di vita prettamente acquatico. Le concamerazioni specializzate del sistema olfattivo di *X. laevis* appaiono in sequenza durante lo sviluppo cosicché dalla camera principale si sviluppa prima l'organo vomeronasale e poi la camera laterale. Al contrario, altri anfibi come la *Rana esculenta*, presentano una sola camera olfattiva principale, che può essere utilizzata in alcune specie in aria e in altre in acqua o contemporaneamente nella stessa specie (Scalia, 1976). La camera aerea è facilmente riconoscibile perché tappezzata da elementi ghiandolari che secernono muco per sciogliere le sostanze presenti nell'aria.

Capitolo 3:
***Marker di proliferazione ed
apoptosi***

3.1. L'antigene nucleare di proliferazione cellulare.

L'antigene nucleare di proliferazione cellulare (PCNA) fu in origine descritta come un cofattore scorrevole sul DNA per la DNA-polimerasi con funzione replicativa e come un componente essenziale del replisoma del DNA cromosomiale eucariotico (Kelman e O'Donnell, 1995; Woman e Botchan, 1995).

Successivi studi, tuttavia, hanno rivelato la sua sorprendente abilità nell'interagire con molteplici "partner", che sono coinvolti in parecchie vie metaboliche, compreso la formazione dei frammenti di Okazaki, la riparazione, la sintesi e la metilazione del DNA, la riorganizzazione della cromatina e la regolazione del ciclo cellulare (Waga et al., 1994).

La PCNA nelle cellule dei mammiferi sembra ricoprire un ruolo chiave nel controllo di diverse reazioni, attraverso la coordinazione e l'organizzazione di diversi "partner" (fig. 7).

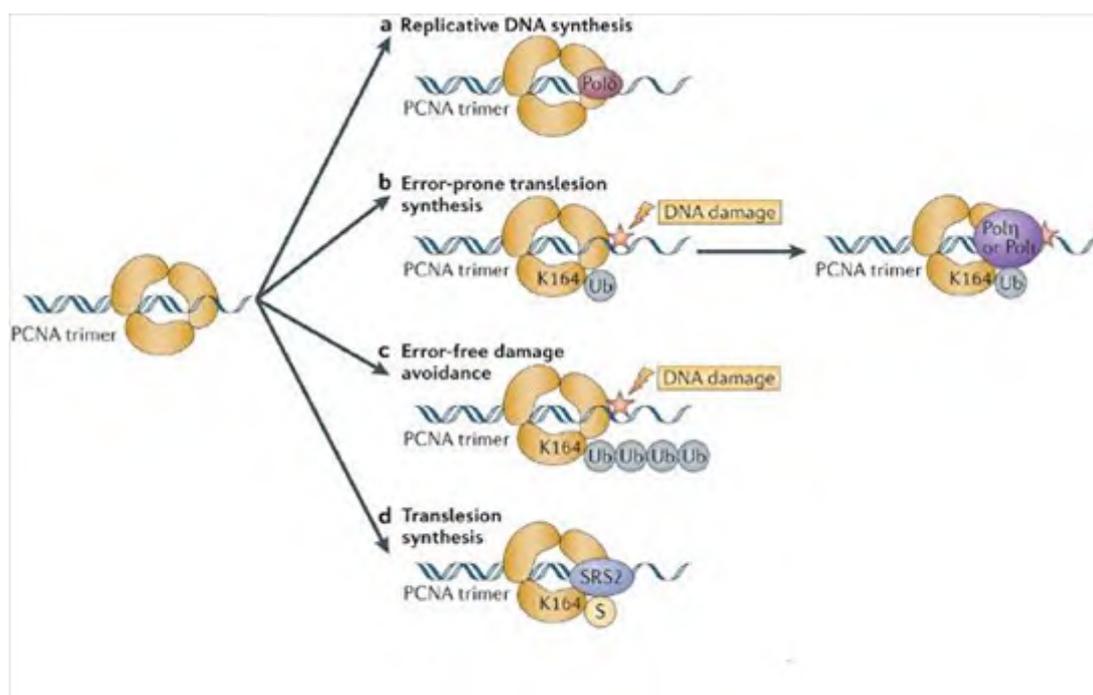


Fig. 7: Varie funzione della PCNA durante l'interazione con molteplici partner (Hoeller D., Hecker C.M., Dikic I. (2006). Ubiquitin and ubiquitin-like proteins in cancer pathogenesis. Nature 6: 776-788).

La PCNA appartiene alla famiglia delle cosiddette proteine che scorrono sul DNA, che includono anche la DNA-polimerasi di *E. Coli* (pol III sub-unità β). Queste proteine svolgono una funzione essenziale nel coadiuvare la polimerasi-replicativa, conferendo un'alta processività necessaria per duplicare un intero genoma.

Studi cristallografici sulla sub-unità β e sulla PCNA, rivelano che tali proteine in soluzione si organizzano a formare strutture ad anello superavvolto (Fig. 8) con uno spazio centrale sufficientemente largo ad accogliere la doppia elica del DNA, anche se queste proteine quasi mai mostrano sequenze simili (Krishna et al., 1994).

La struttura quaternaria della PCNA prevede che tre monomeri identici, ciascuno comprendente due domini simili, siano uniti in un legame testa coda a formare un omotrimerico. Questo è, quindi, composto da sei domini ripetuti e mostra sei ripiegamenti simmetrici. Il risultante anello ha due superfici non equivalenti: una faccia esterna composta da ripiegamenti β e uno strato di α -eliche ricco in residui basici che rivestono il lato interno del "buco"; tali residui sono posizionati perpendicolarmente ai gruppi fosfati del DNA.

Grazie a questa struttura, la PCNA è topologicamente legata alla doppia elica, circondandola, ma ancora capace di muoversi liberamente lungo l'elica grazie alle α -eliche che rivestono il canale interno. Poi la PCNA e i suoi omologhi, incrementano la processività delle polimerasi mediante l'aggancio, nell'interazione proteina-proteina, con la sua superficie esterna e il legame al DNA. Questa proprietà della PCNA previene la dissociazione della polimerasi mentre avanza lungo il DNA "aperto". Questa è la ragione per cui viene chiamata "pinza scorrevole" (Kelman e O'Donnell, 1995).

Il sito di legame sulla PCNA per molti dei suoi partner è stato mappato (Jonsson e Hubscher, 1997; Warbrick, 2000).

Un maggiore sito d'interazione è il loop che connette gli interdomini, una struttura ad elica ad un lato della PCNA che comprende residui da L-121 a E-132. Questo loop è riconosciuto da molte proteine come la polimerasi- δ , la P21, l'endonucleasi flap1 (Fen1), DNA-(citosina)-metil-transferasi (MeCTr) e DNA ligasi 1(Lig1).

Altre importanti sequenze sono la regione N-terminale che comprende le α -eliche più interne che formano parte del sito di legame per la ciclina D, e la coda C-terminale per l'interazione con la polimerasi- ϵ , il fattore di replicazione C (RF-C), la CDK2 e GADD45.

Molte proteine che legano la PCNA, contengono un motivo di legame comune: il PIP-box che ha la sequenza consenso Q-xx-(h)-x-x-(a)-(a), dove "h" rappresenta residui con catena laterale moderatamente idrofobica (esempi L, I, M), "a" rappresenta residui con catena laterale altamente idrofobica aromatica (esempi F,Y) e "x" rappresenta qualsiasi altro residuo (Jonsson et al., 1998; Warbrick, 2000).

Recentemente, esplorando una libreria peptidica, (Xu et al., 2001) hanno identificato un nuovo motivo di legame alla PCNA: K-A-(A/L/Y)-(A/L/Q)-x-x-(L/W), chiamato KA-box. Esso è differente dal classico PIP-box ed è anche presente in molte proteine che interagiscono con la PCNA.

Le proteine che interagiscono con la PCNA, possono essere suddivise in due gruppi: quelle che hanno un'attività enzimatica e quelle che sono coinvolte nell'avanzamento del ciclo cellulare, nei check point di controllo, o differenziazione cellulare.

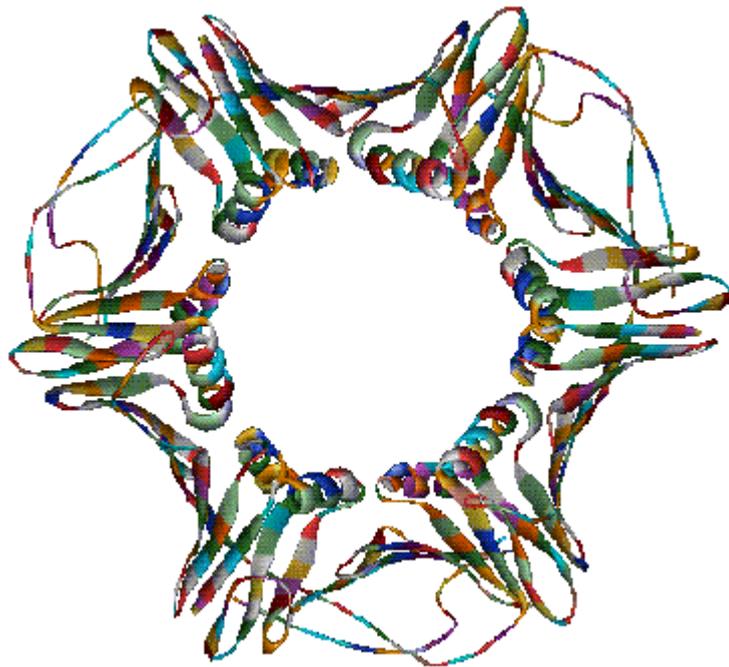


Fig. 8: Struttura tridimensionale della PCNA, formata da tre sub-unità identiche

L'identificazione della PCNA come un fattore di processività per la DNA polimerasi- replicativa, lo pone al cuore del replisoma.

Comunque, altri lavori hanno rivelato ruoli aggiuntivi per questa proteina nel coordinare la complessa rete d'interazioni nella replicazione.

La nostra conoscenza attuale sulla replicazione del DNA negli eucarioti è che la primasi (polimerasi- α) sintetizza i primer a RNA/DNA sul filamento guida. Poi la polimerasi- δ con il suo fattore di processività, la PCNA, induce la sintesi continua del filamento guida; la primasi è coinvolta nella formazione dei primers e nella sintesi discontinua del DNA dell'altro filamento (Waga et al., 1994). Il completamento della sintesi dei frammenti di Okazaki comunque richiede l'oloenzima della polimerasi- δ (oppure la polimerasi- ϵ) costituita da polimerasi- δ / ϵ , RF-C e PCNA. Quindi, sia l'inizio della replicazione del filamento guida del DNA che la sintesi discontinua dell'altro filamento richiedono uno switch dalla polimerasi- α alla polimerasi- δ (oppure polimerasi- ϵ).

È stato mostrato che la PCNA gioca un ruolo centrale nel coordinare questo processo. Infatti, grazie alla sua struttura toroidale, il trimero di PCNA deve essere aperto e poi chiuso intorno al filamento di DNA nascente grazie all'attività enzimatica del "caricatore di pinza" RF-C. Questo evento porta allo spostamento della polimerasi- α e al successivo reclutamento della polimerasi-

δ (o polimerasi- ϵ) per la sintesi processiva (Yuzhakov et al., 1999; Waga et al., 2000).

La presenza della PCNA legata al 3'OH previene che la polimerasi- α si leghi di nuovo. Ciò funge da specifico segnale di reclutamento per le polimerasi- δ ed ϵ .

La sintesi di un frammento di Okazaki è terminata quando l'oloenzima polimerasi- δ o ϵ incontra il 5' della porzione RNA del frammento sintetizzato in precedenza, inducendo la sintesi per spostamento del filamento. Infine, proteine specializzate sono reclutate in modo da rimuovere le parti ad RNA, riempire i gap e legare i due frammenti adiacenti. Due proteine leganti la PCNA, Fen1 e Lig1 sono coinvolte in questo processo (Bae and Seo, 2000; Levin et al., 2000; Bae et al., 2001); in più è stato mostrato che la PCNA stimola l'attività della Fen1 (Jonsson et al., 1998; Tom et al., 2000).

La ricostruzione in vitro del processo di maturazione dei frammenti di Okazaki, ha mostrato che la competizione per il legame alla PCNA tra polimerasi- δ , Fen1 e Lig1, coordina l'azione sequenziale di questi enzimi (Yuzhakov et al., 1999; Maga et al., 2001). Quando l'oloenzima polimerasi- δ incontra il 5' del frammento precedente induce la sintesi per spostamento del filamento in congiunzione con l'elicasi/endonucleasi DNA2. Il filamento spostato genera una struttura flap la quale è legata dalla proteina RP-A che lega il DNA a singolo filamento; quest'ultima in seguito, induce la dissociazione della polimerasi- δ dalla PCNA. In seguito al reclutamento di Fen1, il complesso PCNA-Fen1 rimuove efficientemente la struttura flap lasciando un nick nel DNA a doppio filamento. Questo è seguito dal legame di Lig1 alla PCNA che effettua la fase finale di ligazione chiudendo il nick (Ayyagari et al., 2003; Jean et al., 2003).

L'espressione della PCNA mostra oscillazioni periodiche in relazione alle diverse fasi del ciclo cellulare.

La PCNA è sintetizzata durante la fine della fase G1 e l'inizio della fase S del ciclo cellulare, antecedente l'inizio della sintesi del DNA con andamento crescente durante la fase S e decrescente durante le fasi G2/M (Kurki et al., 1986, 1988).

Tutte queste caratteristiche molecolari fanno della PCNA un ottimo marker per le cellule in attiva fase di sintesi, che prelude alla divisione cellulare. Pertanto, l'utilizzo dell'immunoistochimica per questa molecola consente di evidenziare cellule in attiva proliferazione e, quindi, può essere un valido strumento per studi morfologici su tutti i tessuti.

3.2. La poli (ADP- ribosio) polimerasi.

La Poli (ADP-ribosio) polimerasi (PARP) è una famiglia di enzimi costituita da 18 proteine nucleari che hanno un ruolo importante nella regolazione della riparazione di danni al DNA, nella trascrizione di geni, nella progressione del ciclo cellulare, nella funzione della cromatina, nella stabilità genomica e nella morte cellulare .

L'attività principale che caratterizza questi enzimi è la polimerizzazione di catene lineari o ramificate di ADP-ribosio a partire da molecole donatrici di NicotinammideDinucleotide (NAD⁺) e il trasferimento su proteine accettrici tramite legame covalente (Rolli et al., 2000; Amé et al., 2004).

La Poli (ADP-Ribosio) Polimerasi-1 (PARP-1) è l'isoforma maggiormente studiata di questa famiglia: agisce come sensore del danno al DNA e recluta complessi di proteine riparatrici e di rimodellamento della cromatina (Jagtap e Szabo, 2005; Schreiber et al., 2002; Virag, 2005). La sua struttura primaria presenta un elevato grado di omologia tra i vertebrati: la percentuale di corrispondenza tra l'enzima umano e quello murino è il 92% della sequenza aminoacidica totale e arriva al 100% di omologia nel sito attivo, che costituisce il motivo caratterizzante dell'intera famiglia.

PARP-1 ha un peso molecolare di 116 kDa ed è organizzata in 3 maggiori domini funzionali:

- un dominio ammino-terminale, contenente il sito di legame al DNA (DBD), caratterizzato da due domini a dita di zinco ed uno elica-giro-elica (Mazen et al.,1989), ed una sequenza di localizzazione nucleare (NLS);
- un dominio centrale di automodificazione che funziona come sito accettore primario di pADPR e presenta un modulo BRCT, responsabile delle interazioni proteina-proteina (Bork P. et al.,1997; Nazak T. et al.,1994);
- un dominio carbossi-terminale, che lega il substrato ed è responsabile dell'attività catalitica dell'enzima (Fig. 9).

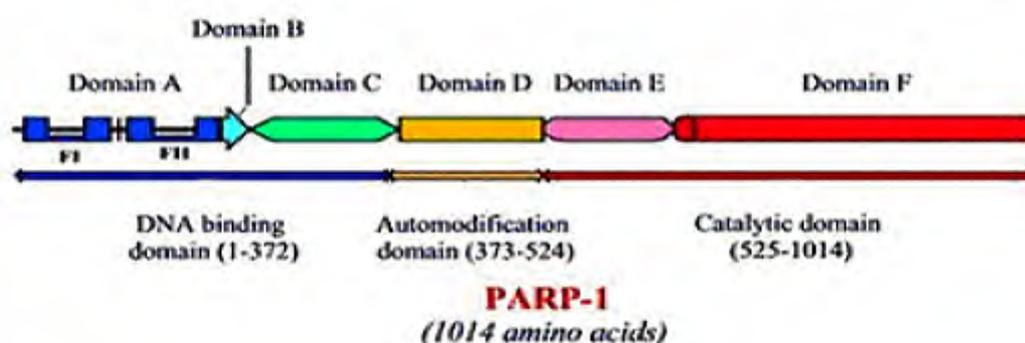


Fig. 9: Struttura della poli (ADP-ribosio) polimerasi (PARP-1).

Il DBD contiene 2 motivi a dita di zinco e 2 motivi elica-giro-elica che riconoscono e legano strutture alterate del DNA (Cepeda et al., 2006). Inoltre dal codone 214 inizia una sequenza riconosciuta dalle caspasi, che tagliano l'enzima durante l'apoptosi, inibendone l'attività.

Il sito di automodificazione, situato nella regione centrale dell'enzima, contiene 15 residui di glutammato ai quali viene attaccato il polimero di ADP-ribosio.

Il dominio catalitico, contenente un sito di legame al nucleotide trifosfato, catalizza la formazione di catene ramificate di ADP-ribosio a partire da NAD⁺. L'attacco del poli(ADP-ribosio) avviene su proteine bersaglio specifiche: è stato dimostrato che in vivo la proteina maggiormente poli(ADP-ribosilata) è PARP-1 stessa. L'auto-poli(ADP-ribosilazione) costituisce un meccanismo importante di regolazione dell'attività della PARP-1 stessa (Tong et al., 2001).

La regolazione di PARP-1 è dipendente anche dall'accumulo nella cellula del metabolita nicotinammide, prodotto dalla scissione di ADP-ribosio dal NAD⁺, che determina una risposta a feedback negativo: infatti, in assenza di NAD⁺, PARP perde la sua attività enzimatica (Zaniolo et al., 2007).

Altri inibitori endogeni di PARP di recente identificazione sono le purine ipoxantina, inosina e adenosina. (Virag e Szabo, 2002).

L'attività catalitica (e la polimerizzazione di ADP-ribosio) è rapidamente innescata dal legame dell'enzima al DNA danneggiato. Una volta avvenuto il legame, PARP-1 dimerizza e catalizza il taglio di NAD⁺ in nicotinammide e ADP-ribosio. La dimerizzazione può avvenire con un'altra PARP-1, con la formazione di un omodimero, o con una molecola di PARP-2, con la formazione di un eterodimero (Schreiber et al., 2002). In seguito alla poli(ADP-ribosilazione), su PARP-1 si accumula un eccesso di cariche negative (ogni monomero di ADP-ribosio contiene 2 gruppi fosfati), che determina il distacco dell'enzima dal DNA a causa delle forze repulsive. L'allontanamento di PARP-1 consente ad altre proteine di accedere ed interagire con il DNA danneggiato (come i complessi enzimatici di riparazione del DNA) (Kim et al., 2005; Smith, 2001).

3.2.1. La poli (ADP- ribosilazione).

La poli(ADP-ribosilazione) è un processo dinamico: i polimeri di ADP-ribosio in vivo hanno un'emivita di circa 1 minuto. Due enzimi, la poli(ADP-ribosio) glicoidrolasi (PARG) e l'ADP-ribosio protein-liasi, sono coinvolti nel catabolismo dei polimeri di ADP-ribosio: PARG taglia i legami ribosio-ribosio sia delle parti lineari che di quelle ramificate ed è in grado sia di idrolizzare unità singole di ADP-ribosio tramite attività esoglicosidica, sia di formare frammenti di oligo(ADP-ribosio) tramite attività endoglicosidica; la liasi rimuove il monomero di ADP-ribosio di legame con la proteina (Davidovic et al., 2001) (Fig. 10).

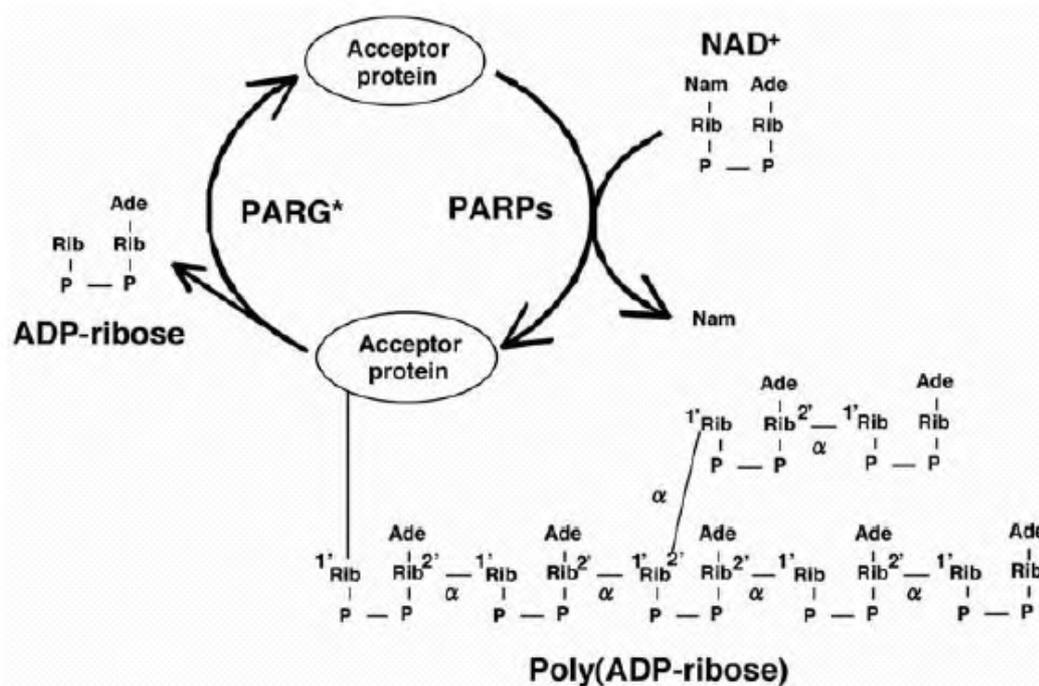


Fig. 10: Reazione di poli (ADP-ribosilazione)

La poli(ADP-ribosilazione) è una modificazione post-traduzionale delle proteine. In seguito ad un danno al DNA, la PARP-1 catalizza il trasferimento di unità di ADP-ribosio dal NAD⁺ alle proteine accettrici per formare polimeri lunghi e ramificati. La poli(ADP-ribosilazione) è una modificazione ampia, ma transiente: infatti le catene polimeriche possono raggiungere più di 200 unità, che possono essere degradate nell'arco di pochi minuti dalla PARG. E' ormai opinione diffusa che l'omeostasi del poli(ADP-ribosio) svolga un ruolo importante nei processi cellulari (Ryabokon et al., 2007). Il ruolo biologico dei polimeri di ADP-ribosio è complesso e può essere illustrato in diverse funzioni principali:

- PARP-1 è implicato nella riparazione del DNA e nel mantenimento della stabilità genomica. (de Murcia et al., 1997; Shall e de Murcia, 2000).

- PARP-1 interviene nella regolazione di varie proteine a livello trascrizionale.

- L'attivazione di PARP-1 può portare a morte cellulare, in seguito ad un danno genotossico: se il danno è sub-letale l'attivazione di PARP facilita la riparazione del DNA e consente la sopravvivenza della cellula; se il danno è eccessivo PARP viene superattivata, determinando l'esaurimento delle riserve di NAD⁺ e ATP. Il consumo di ATP impedisce l'eliminazione della cellula per apoptosi, la cui esecuzione richiede un notevole consumo energetico; viene attivata invece la morte per necrosi durante la quale si ha il rilascio del contenuto cellulare nei tessuti, esponendo le cellule circostanti all'attacco dannoso delle proteasi e di altri fattori correlati (Schreiber et al., 1995; Virag et al., 1998a,b). Per impedire il danno dovuto alla morte per necrosi, durante l'apoptosi le caspasi tagliano la PARP-1 per impedire il depauperamento delle scorte di ATP.

- La poli(ADP-ribosilazione) può costituire un segnale per la degradazione di proteine danneggiate da danni ossidativi, inducendo anche un aumento dell'attività del proteasoma stesso (Ulrich e Grune, 2001; Ulrich et al., 2001a).

Riassumendo, l'attività di PARP-1 è implicata in molteplici processi biologici, tra cui l'escissione di basi durante la riparazione del DNA, il mantenimento dell'integrità genomica, la replicazione, la trascrizione la degradazione di proteine per via proteasomica.

3.2.2. Ruolo della PARP nella riparazione di danni al DNA.

La poli (ADP-ribosilazione) di proteine è una modificazione covalente operata da PARP in risposta a danni al DNA indotti da ossidazioni, alchilazioni e radiazioni ionizzanti. PARP agisce quindi come sensore del danno al DNA. La risposta che ne consegue dipende dall'intensità del danno: se il danno è lieve, PARP interviene come fattore di sopravvivenza, consentendo la riparazione del danno (Fig. 11); se il danno è grave, PARP induce la morte della cellula, principalmente per necrosi, ma probabilmente intervenendo anche in alcune fasi dell'apoptosi. La funzione maggiormente studiata di PARP è il suo ruolo nella morte cellulare, sia per apoptosi che per necrosi.

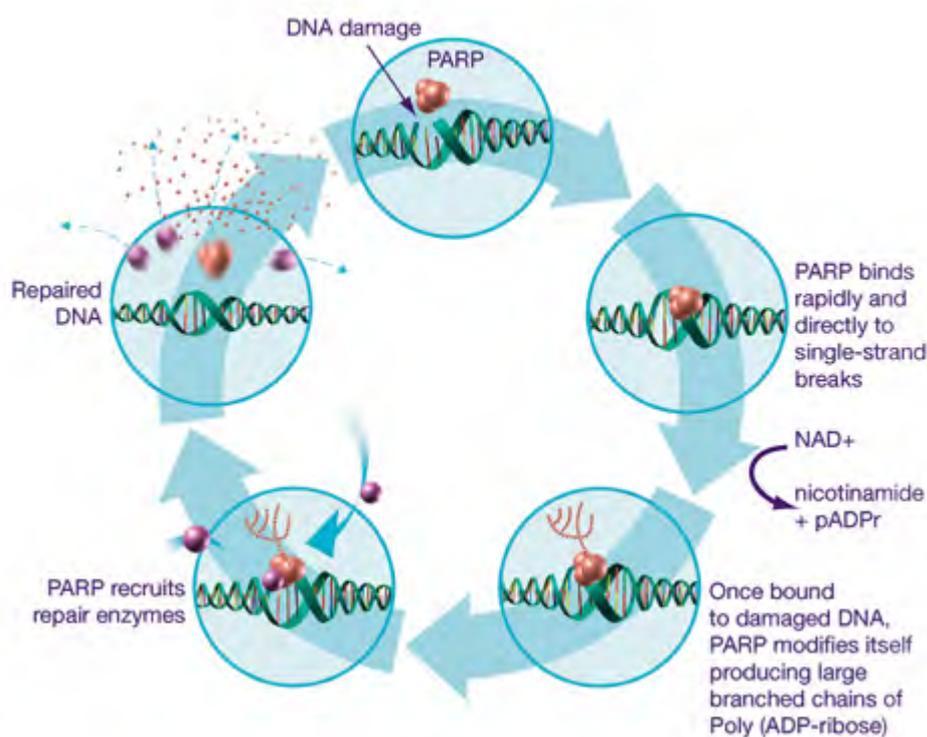


Fig. 11: Intervento di PARP nella riparazione del DNA.

3.2.3. PARP nell'apoptosi e nella necrosi cellulari.

L'apoptosi, o morte cellulare programmata, è un processo biologico fondamentale nello sviluppo e nell'omeostasi dei tessuti degli organismi multicellulari.

Durante l'apoptosi la caspasi 7 e la caspasi 3 attive riconoscono e si legano alla sequenza specifica di PARP DEVD, situata nel dominio di legame del DNA, e tagliano l'enzima in due frammenti: p89 e p24. Il taglio inattiva PARP, impedendone la dimerizzazione e il legame al DNA (fig. 12).

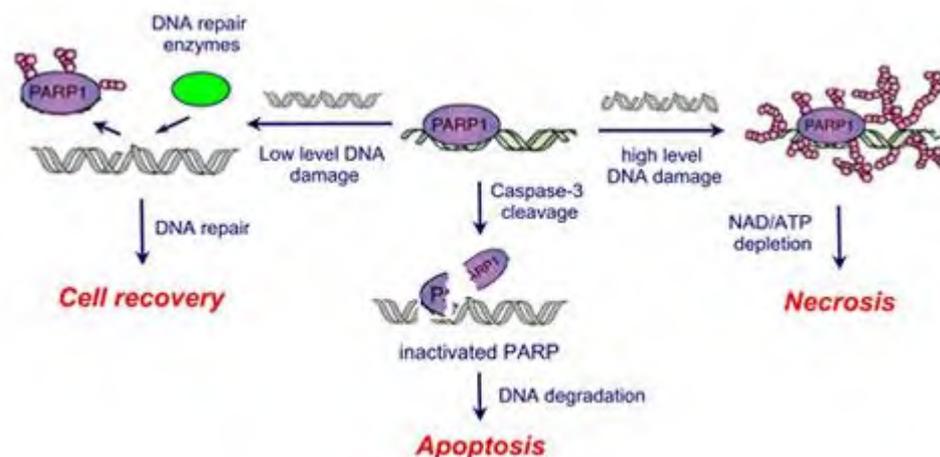


Fig. 12: Ruolo di PARP nella morte cellulare.

Il controllo dell'attività di PARP operato dalle caspasi è importante per il corretto funzionamento del meccanismo apoptotico. Infatti il taglio ha lo scopo di prevenire l'attivazione di PARP dovuto alla frammentazione del DNA e di preservare l'energia cellulare, fondamentale per alcuni passaggi dell'apoptosi.

Attraverso alcuni studi è stato osservato che PARP si attiva nelle prime fasi dell'apoptosi, prima che essa venga inattivata dal taglio operato dalle caspasi. Questo suggerisce che PARP e la poli(ADP-ribosilazione) potrebbero avere un ruolo nell'innescare la fase precoce dell'apoptosi.

PARP-1 potrebbe avere un ruolo nell'induzione della morte cellulare per apoptosi secondo una via indipendente dalle caspasi attraverso AIF (Apoptosis-Inducing Factor), una flavoproteina proapoptotica situata nello spazio intermembrana mitocondriale. È stato visto che in seguito al trattamento di fibroblasti con N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina, un potente agente alchilante che attiva PARP-1, AIF trasloca prima nel citosol e poi nel

nucleo. Esperimenti condotti su fibroblasti PARP-1^{-/-} hanno mostrato una diminuzione della traslocazione di AIF dal mitocondrio al nucleo (Yu et al., 2006).

La necrosi rappresenta, invece, una forma di morte cellulare non geneticamente programmata e dannosa per l'organismo. Infatti la disintegrazione della membrana cellulare provoca il rilascio del contenuto della cellula necrotica nel tessuto circostante, causandone l'infiammazione e danneggiando l'organo, mentre la cellula in apoptosi viene rapidamente eliminata dal tessuto dai macrofagi professionali e dalle cellule circostanti.

Capitolo 4:
Scopo della ricerca

Lo sviluppo del sistema olfattivo nei vertebrati presuppone a livello morfogenetico un'intensa attività proliferativa testimoniata da una forte attività PCNASica (Ino et al., 2000) che tende a scemare procedendo con lo sviluppo, ma non si riscontrano evidenti fenomeni di ristrutturazione e sostituzione cellulare, nonostante il necessario riadattamento del sistema olfattivo, concomitante con la conquista delle terre emerse. Per contro il sistema visivo, fermo restante l'intensa attività proliferativa ontogenetica, passa attraverso una serie di fenomeni apoptotici (Cook et al 1998; Biehlmaier et al., 2001; Candal et al., 2005; Alunni et al., 2007). Questi autori hanno anche segnalato che, durante lo sviluppo, inizialmente tutto il placode ottico mostra attività PCNASica; successivamente le cellule PCNA immunoreattive tendono progressivamente a localizzarsi nella fascia circolare della retina che circonda il cristallino.

Naturalmente per ogni gruppo di vertebrati, su questo schema di base, s'inseriscono delle varianti caratteristiche, che ne determinano un pattern di sviluppo unico.

Il dati riguardanti il differenziamento embrionale del sistema visivo ed olfattivo dei vertebrati sono poco comuni e quelli effettuati, come nel *Bufo bufo* e *X. laevis*, non forniscono indicatori numerici sulle cellule in apoptosi e mitosi (Mathis et al., 1988; Nguyen e Straznicky, 1989; Stiemke e Hollyfield, 1995).

I conteggi delle cellule in apoptosi e delle figure mitotiche sono stime affidabili del grado di rimodellamento dell'organo. Successivamente da tali stime si possono evincere, da un lato correlazioni di tipo funzionale dall'altro, comparando i dati con quelli presenti in letteratura, anche informazioni di carattere evolutivo.

Per tale motivo in questo lavoro sono stati studiati dettagliatamente diversi stadi dello sviluppo di alcuni vertebrati (*Cichlasoma nigrofasciatum*, *Xenopus laevis*, *Rana esculenta*, *Bufo bufo*, *Coturnix coturnix*) con l'intento di allargare le conoscenze sulla morfogenesi dell'occhio e dell'olfatto e cercare di ottenere un quadro evolutivo sui meccanismi che sono alla base degli eventi di proliferazione e rimodellamento dei due sistemi sensoriali; confrontando anche specie affini sotto l'aspetto evolutivo, ma che hanno una diversa ecologia (ad esempio, in animali quali *Xenopus laevis*, *Rana esculenta* e *Bufo bufo*, che appartengono tutti allo stesso ordine di anfibi, ma hanno un diverso grado d'idrofilia).

A tal fine sono state colorate sezioni di questi organi durante il loro differenziamento per rilevare e contare le figure apoptotiche e mitotiche come indicatori di rimaneggiamento e attività proliferativa delle strutture.

Inoltre, è stata anche utilizzata l'immunoistochimica per la PCNA per consolidare il dato sulle osservazioni delle cellule in attiva proliferazione, mentre per confermare i picchi apoptotici osservati attraverso la lettura dei preparati istologici in alcuni casi è stato possibile valutare il livello proteico nucleare della PARP frammentata.

Inoltre, l'aspetto più innovativo di questa ricerca è il tentativo di mettere in

correlazione un sistema che durante lo sviluppo subisce un profondo e continuo rimaneggiamento, come avviene nel sistema visivo, con un sistema un po' meno dinamico come l'organo olfattivo. Questa comparazione è stata operata nel tentativo di ricavare informazioni di carattere evolutivo sullo sviluppo dei sistemi sensoriali.

Capitolo 5:
Materiali e Metodi

4. 1. Animali utilizzati.

Gli organismi utilizzati nel presente studio sono i seguenti: *Cihlasoma nigrofasciatum*, appartenente alla famiglia dei Ciclidi, ordine Peciliformi; *Xenopus laevis*, anuro appartenente alla famiglia dei Pipidae; *Rana esculenta*, anuro appartenete alla famiglia Ranidae; *Bufo bufo*, appartenente alla famiglia Bufonidae; *Coturnix coturnix*, appartenente alla famiglia Phasianidae.



Fig. 13: Animali oggetto di tale studio.

5.1.1. *Cichlasoma nigrofasciatum*.

Cichlasoma nigrofasciatum (Fig. 14) è un bellissimo esemplare rappresentante della famiglia dei Ciclidi americani, noto anche come pesce zebra; in natura nuota nelle acque dei laghi dell'America Centrale, Guatemala, Salvador, Panama, nonché in corsi d'acqua caratterizzati da debole corrente, zone con fondale costituito da sabbia, ghiaia, con la presenza di rocce.



Fig. 14: Esemplare di *Cichlasoma nigrofasciatum*.

E' un pesce robusto, il corpo si presenta ovaliforme, discretamente sviluppato in altezza e compresso sui fianchi. Il capo è convesso, la bocca non è grande ma le labbra sono robuste e di grandi dimensioni proporzionate alla bocca. La pinna dorsale è ben sviluppata, fino quasi a raggiungere in lunghezza quella caudale, che è ampia, arrotondata. Le pinne ventrali e le pettorali sono piuttosto piccole. La colorazione di fondo della livrea si presenta di un grigio-azzurro, più o meno scuro, in alcuni casi grigio-bluastrò. Ai lati riflessi bluastri e violetti, il dorso è più scuro del ventre che risulta biancastro. La bellissima colorazione viene sfoggiata anche sulle pinne, specialmente sulla dorsale, caratterizzata da riflessi lucenti verdastri.

Il corpo è attraversato da numerose bande scure in verticale, che quasi vanno a circondare il corpo del pesce, e nei maschi arrivano sin sulla pinna dorsale.

Cichlasoma nigrofasciatum raggiunge una dimensione massima in lunghezza di circa 10-11 cm, la maturità sessuale è raggiunta quando gli esemplari si sviluppano a circa 7-8 cm.

Nel periodo riproduttivo però, le femmine accentuano la loro colorazione (Fig. 15). Una certa aggressività questo esemplare la dimostra legata all'innata territorialità dei Ciclidi.



Fig. 15: Coppia di *Cichlasoma nigrofasciatum* dove viene evidenziata la forte colorazione della femmina rispetto al maschio, durante il periodo riproduttivo.

Ogni coppia una volta formata, va a presidiare in maniera inequivocabile la sua porzione di territorio; quindi la vasca deve prevedere un arredamento costituito da rocce, anfratti, fondale sabbioso dove sia possibile per il *Cichlasoma nigrofasciatum* biasciare la sabbia, e non è tassativo rinunciare alle piante (Fig. 16). Le piante devono essere poche, grandi e robuste protette magari alla base da qualche sasso per impedire che questa venga sollevata dal fondo dalle escursioni dei pesci. La caratteristica di scavare sul fondo è tipica del genere, dove vengono custoditi i piccoli una volta schiuse le uova (Fig. 17), solitamente deposte su pareti lisce e levigate di sassi o rocce.

La dieta deve essere ricca e variegata, come tutti i ciclidi è un ottimo consumatore di cibo.

Esiste anche una colorazione bianco-rosa della specie, dove la femmina presenta una livrea giallastra uniforme, mentre il maschio è completamente rosa (un rosa blando) con evidenti macchie rosso-arancione nella parte ventrale.



Fig. 16: *Cichlasoma nigrofasciatum* in una vasca che prevede un arredamento costituita da rocce, anfratti e fondale sabbioso.



Fig. 17: Esemplici di uova ed avannotti di *Cichlasoma nigrofasciatum*.

5.1.2. *Xenopus laevis*.

Lo *Xenopus laevis* (Anura, Amphibia) è un importante organismo modello negli studi di biologia evolutiva.

I maschi di *Xenopus laevis* sono lunghi 5-6 cm e raggiungono un peso di circa 600gr., mentre le femmine raggiungono i 12-13 cm e 200gr.

La pelle è liscia e presenta una colorazione variegata dal grigio al verde oliva sul dorso, mentre il ventre è biancastro con sfumature giallastre. Sono state descritte forme albine prive di pigmentazione.

Il corpo è appiattito e la testa di forma triangolare. Sono privi di lingua e di dentatura, e le orecchie esterne sono anch'esse assenti. Nei maschi manca il sacco vocale. Gli occhi, piccoli e situati nella parte anteriore del corpo, sono privi di palpebre. Gli arti anteriori sono piccoli e non palmati e le zampe posteriori sono grandi e palmate e sulle falangi distali delle prime tre dita sono presenti dei piccoli artigli (Fig. 18).



Fig. 18: Esemplare di *Xenopus laevis*.

L'animale è presente dall'Angola meridionale alla provincia del Capo in Sud Africa, comprendendo Zambia, Malati, Mozambico, Zimbabwe, Botswana, Namibia, Lesotho e Swaziland. Inoltre esiste una sottospecie di *Xenopus laevis sudanensis* (considerata una specie a sé stante) che è presente in Nigeria, Camerun, Repubblica Centrafricana e Repubblica Democratica del Congo.

A causa del grande utilizzo come animale da laboratorio e da acquario, si sono diffusi in alcuni stati degli Stati Uniti meridionali (California, Arizona) in

Messico, in Cile, in Galles, in Francia e recentemente in Italia (Sicilia). In Sicilia è presente un'ampia distribuzione di questa specie, rispetto alla distribuzione in Francia: i censimenti condotti negli ultimi anni hanno evidenziato un'estensione di circa 225 km² che include le valli del fiume Jato e del Belice; la specie è rinvenibile inoltre in un grande invaso artificiale e in numerosi stagni artificiali del territorio limitrofo (Fig. 19).

Questi animali hanno dimostrato di avere una notevole capacità invasiva, ma un'influenza negativa sulla riproduzione della specie è da attribuirsi a specie locali di anfibii tra cui *Hyla intermedia*, *Discoglossus pictus* e *Pelophilax hispanica*.



Fig. 19: Distribuzione geografica di *Xenopus laevis* (in rosso sono evidenziate le zone di distribuzione del Sud Africa, le frecce indicano la diffusione in seguito all'utilizzo di *Xenopus laevis* come animale di laboratorio).

Lo *Xenopus laevis* passa la maggior parte del suo ciclo vitale in acqua, che abbandona solo nei periodi di essiccazione, ove può sopravvivere fino ad un anno senza cibo; in altre occasioni può migrare alla ricerca di nuove pozze stagionali.

La sua dieta si basa quasi completamente sulla predazione di organismi acquatici, in prevalenza crostacei, insetti. Una quota inferiore della dieta deriva da animali terrestri caduti accidentalmente in acqua e da cannibalismo nei confronti di uova e larve di altre specie di anfibii.

L'accoppiamento può avvenire durante tutto l'anno, più comunemente in primavera; sono stati documentati sino a quattro cicli riproduttivi per anno.

I maschi emettono il loro richiamo di accoppiamento prevalentemente durante le ore serali. La mancanza del sacco vocale è sopperita da rapide contrazioni dei muscoli laringei, che producono un richiamo caratterizzato dalla

alterazione dei trilli lunghi e corti. Le femmine possono rispondere al richiamo sia con un canto di consenso che con un canto di rifiuto, comportamento assolutamente inusuale tra gli anfibi. Ottenuto il consenso della femmina il maschio la cinge per la vita (amplesso pelvico) e da inizio all'accoppiamento (Fig. 20).

Dopo l'accoppiamento la femmina depone centinaia di uova, attaccandole, singolarmente o in piccoli gruppi, a piante acquatiche, rocce o altre strutture bentoniche. Dalle uova si sviluppano i girini che completano il loro sviluppo in 6-8 settimane.



Fig. 20: Amplesso di una coppia di *Xenopus laevis*

5.1.3. *Rana esculenta*.

La *Rana esculenta*, chiamata anche rana comune o rana verde, è un anfibio della famiglia dei Ranidae (Fig. 21).



Fig. 21: Esempio di *Rana esculenta*.

Questa rana è forse il secondo anuro più comune in Europa, dopo il *Bufo bufo*. Come si sa è un ibrido tra la *Rana lessonae* e *Rana ridibunda*. Si trova in una tale varietà di ambienti, che è inutile elencarli tutti. Le semplici esigenze di questa specie, in natura, sono: la presenza di una folta vegetazione sulle sponde dell'acqua; sul fondo dello specchio d'acqua deve anche essere presente uno strato di limo in cui questa rana trova rifugio per sfuggire ai predatori e per trascorrere il letargo invernale.

La rana è tanto diurna, quanto notturna. Inoltre, di giorno, le rane stanno la maggior parte del tempo sulle sponde, fuori dall'acqua, a prendersi il sole. Quando vogliono rinfrescarsi, si tuffano in acqua restando "distese" a pelo d'acqua con la testa fuori.

La loro dieta naturale è varie; pertanto mangiano un po' di tutto: lombrichi, lumache, insetti acquatici (che mangiano anche sott'acqua), cavallette, farfalle, falene, bruchi, ragni, pesci, ecc. In cattività si possono tranquillamente somministrare camole (adulti e larve); larve di mosche (bigattini o cagnotti) e mosche adulte; grilli; pesciolini e, agli adulti, neonati di topo.

La morfologia di questa rana, è molto interessante: gli occhi sono composti da una pupilla rotonda leggermente orizzontale con iride giallastra; la lingua è corta ma estroflettibile, anche se, quando mangiano, si lanciano con tutto il corpo sulla preda. Le zampe posteriori sono potentissime e palmate (ciò dimostra che sono ottime nuotatrici e saltatrici); la vista è acutissima, riuscendo a vedere prede a una notevole distanza o addirittura che si muovono

sott'acqua, per non parlare dei salti che vengono fatti con estrema precisione e con un margine di errore pressoché nullo. La varietà cromatica di queste rane è davvero grande: il dorso è tipicamente verde, ma a volte è marrone, oppure un miscuglio tra i due; delle bande marroni/nere sono sempre presenti sugli arti posteriori, mentre non sono sempre presenti sui fianchi; spessissimo, invece, sono presenti macchie brune più o meno grandi sul dorso. Il ventre è bianco, bianco/giallastro senza macchie. Le dimensioni di questo anuro sono medie con le femmine, più grandi dei maschi, che raggiungono i 10-12 cm.

In generale il comportamento di quest'anuro è molto nervoso e attento, sono rane in un certo senso "intelligenti" e molto adattabili alla cattività.

In *Rana esculenta* il dimorfismo sessuale è molto accentuato: i maschi, infatti, presentano due sacchi vocali laterali, che possono essere estroflessi tramite un'apertura orizzontale posta subito dietro l'apertura boccale. Basta prenderli in mano, che loro subito si difendono gonfiando questi sacchi. Le femmine sono pure in grado di emettere suoni, ma sono molto meno lunghi e forti di quelli dei maschi, e provengono dalla gola, data la mancanza di sacchi vocali in questo sesso.

Per quanto riguarda l'accoppiamento, si svolgono fra Aprile e Giugno; le deposizioni possono contare da poche centinaia ad alcune migliaia di uova; di solito le uova vengono deposte a gruppi (2-3); l'amplesso è ascellare; i girini (Fig. 22) schiudono in 7-8 giorni (dipende da temperatura e condizioni dell'acqua), e metamorfosano in circa 2-3 mesi. Quando questi animali metamorfosano sono piuttosto grandi, potendo raggiungere i 2,5 cm; infine la maturità sessuale viene raggiunta molto presto: intorno ai 12 mesi di vita.

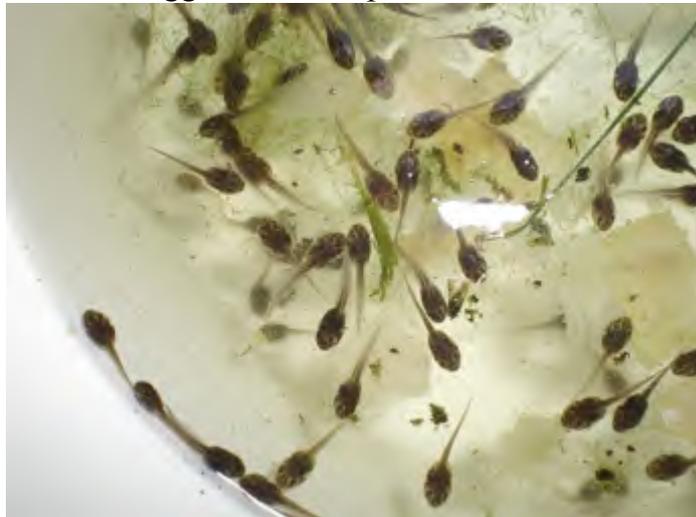


Fig. 22: Girini di *Rana esculenta*

5.1.4. *Bufo bufo*.

“Rospo” è il nome comune degli anfibii anuri (ordine Anura) appartenenti alla famiglia dei bufonidi (famiglia Bufonidae). Di struttura simile a quella delle rane, anch'esse incluse nel medesimo ordine, i rospi se ne differenziano per la pelle verrucosa, il corpo massiccio e le zampe posteriori più corte. Mediamente i rospi sono più grandi delle rane e non saltano con altrettanta agilità.

Il genere più rappresentativo della famiglia Bufonidae è *Bufo*, comprendente più di duecento specie diffuse in tutti i continenti, con la sola eccezione della Groenlandia, dell'Australia, della Nuova Guinea e della Nuova Zelanda.

Il rospo comune (*Bufo bufo*, Linnaeus 1758) (Fig. 23), molto diffuso in Europa, è presente in quasi tutta l'Italia, eccetto la Sardegna. È l'anfibio più grande d'Europa, e raggiunge addirittura i 20 cm (zampe escluse).

La sua colorazione è marrone o grigiastro, che può tendere al rossiccio, il ventre tende ad essere biancastro. La pelle presenta numerose verruche o tubercoli, che secernono muco per inumidire il corpo. La testa è piatta; ai lati del collo si trovano voluminose ghiandole parotoidi, che secernono un liquido velenoso. Gli occhi di color oro scuro o rame, presentano pupille trasversali. La lingua è attaccata sulla parte anteriore della cavità boccale; dotata di una punta appiccicosa, può essere estroflessa rapidamente per catturare gli insetti. A differenza della maggior parte degli anuri, i rospi non hanno denti. Le zampe terminano con dita parzialmente palmate.



Fig. 23: Esemplare adulto di *Bufo bufo*.

I rospi vivono in zone pianeggianti, nei boschi, nei prati e nei campi coltivati, in prossimità di stagni e paludi. Hanno abitudini crepuscolari e notturne; durante il giorno si nascondono in luoghi umidi e ombrosi, da cui emergono

verso sera per cercare insetti, larve, chioccioline, vermi e altri invertebrati di cui si nutrono. Nelle regioni temperate svernano in tane sotterranee, in stato di ibernazione.



Fig. 24: Amplesso. Negli anuri le uova sono fecondate dal maschio appena deposte. Il maschio induce l'ovulazione aggrappandosi alla femmina. In questo caso la presa è ascellare.

Rispetto al rospo smeraldino (*B. viridis*), il rospo comune frequenta ambienti più asciutti e tende a tornare sempre nella stessa pozza d'acqua per riprodursi, a volte percorrendo anche diversi chilometri. Durante questi spostamenti molti individui riproduttori vengono uccisi dalle automobili. A causa di ciò, oltre che alla scomparsa dei siti riproduttivi, questo animale tende a scomparire dalle zone più antropizzate.

Dopo il letargo invernale verso l'inizio di marzo, in concomitanza con la primavera, inizia la stagione degli accoppiamenti, solitamente vicino a corsi d'acqua, pozze o stagni. I maschi si aggrappano alle ascelle delle femmine, che sono visibilmente più grandi, nel cosiddetto "amplesso ascellare" (Fig.24-25). A volte la femmina può essere approcciata da così tanti maschi da restare soffocata e morire. Le femmine depongono nell'acqua nastri gelatinosi di uova (circa 10.000), lunghi anche più di 1 m, contemporaneamente fecondate dal maschio (Fig. 26).



Fig.25: Diverse coppie di rospi in accoppiamento, immersi tra cordoni di uova già deposte.

Dalle uova emergono migliaia di girini, più piccoli e scuri di quelli delle rane. Questi, nutrendosi soprattutto di alghe e altri minuscoli materiali organici, crescono. La temperatura dell'acqua nella zona dove si trovano deciderà la velocità della loro metamorfosi: più è calda l'acqua, più veloce sarà la metamorfosi. Questo perché l'alta temperatura dell'acqua è sintomo che la loro pozza si sta prosciugando.



Fig. 26: Numerosi cordoni di uova deposte intorno alla vegetazione

Ai girini spuntano dapprima le zampe posteriori, e successivamente le zampe anteriori: da questo momento iniziano a digiunare, perché il loro apparato boccale (e digerente) si sta trasformando: infatti da onnivori diverranno insettivori. La metamorfosi dura uno o due giorni; il metamorfosato inizia ad

assorbire la coda, e nel giro di appunto 24 - 48 ore scomparirà. Il neo-metamorfosato è il più piccolo in assoluto fra gli anfi: è lungo circa 1 cm. La sua pelle è ancora liscia per favorire la traspirazione. Digiunerà ancora per circa 4 giorni, dato che utilizzerà come fonte nutrizionale le energie della coda riassorbita.

5.1.5. *Coturnix coturnix*.

La quaglia comune (*Coturnix coturnix*, Linnaeus 1958) è un uccello della famiglia Phasianidae (Fig. 27).

La quaglia comune è bruna con striature trasversali e longitudinali giallo-ruggine sulle parti superiori, più scura sul capo e sul dorso ed ha la gola bruno-ruggine, il gozzo giallo-ruggine, il centro dell'addome bianco-gialliccio e i lati del petto e del ventre rosso-ruggine con strisce longitudinali giallo-chiare.



Fig. 27: Esemplare adulto di quaglia comune (*Coturnix coturnix*).

Nelle femmine tutti i colori sono più sbiaditi e indistinti e particolarmente meno vivace appare la macchia bruno-ruggine della gola; anch'esse hanno gli occhi rossiccio-bruni, il becco grigio-corno e il piede rossiccio o giallo-pallido (Fig. 28) . Le misure vanno dai 18 cm della lunghezza complessiva agli oltre 30 cm dell'apertura alare mentre le singole ali misurano 10 cm e la coda appena 4 cm.

Le regioni del vecchio mondo dove la quaglia è completamente assente sono ben poche: in Europa si incontra dovunque, a parte le regioni più settentrionali; nell'Asia centrale è comune, e dalle une e dalle altre località migra ogni anno verso Sud, attraverso tutte l'Africa settentrionale fino all'equatore e al Capo di Buona Speranza, come pure verso tutti i paesi del Continente Asiatico.

Le migrazioni delle quaglie presentano parecchi aspetti notevoli: esse avvengono ogni anno, ma differiscono considerevolmente da quelle degli altri uccelli. Alcune si trovano già in Egitto alla fine di Agosto, un numero maggiore vi giunge in Settembre, e frattanto, in questo stesso mese, e non molto di raro, si incontrano ancora nel centro Europa delle femmine covanti o dei piccoli coperti di piumino.

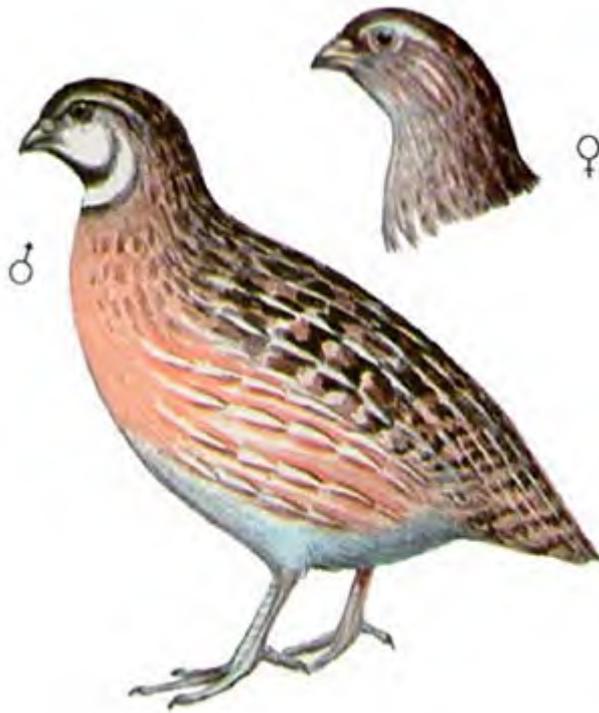


Fig. 28: Differenze di colori tra esemplari maschi e femmine di *Coturnix coturnix*

La migrazione principale ha certamente luogo in Settembre, ma si prolunga per tutto Ottobre e in certi casi anche in Novembre. Prima del viaggio gli uccelli non hanno l'uso di raggrupparsi, e ciascuno si mette in cammino senza curarsi degli altri: solo per la traversata vera e propria si riuniscono a stuoli, già numerosi quanto i viaggiatori hanno raggiunto il meridione europeo, dove le coste del Mediterraneo formicolano, a cominciare da Settembre, di migliaia e migliaia di quaglie. In Grecia, in Turchia, nel sud d'Italia, nella Spagna intorno al Mar Nero e al Mar Caspio, come pure sulle coste dei mari della Cina e del Giappone, nei cespugli lungo i precipizi, lungo i fossi e i prati, nei pruneti e tra le zolle, dovunque i cacciatori si imbattono nelle quaglie, bastano poche ore per riempire i carnieri.

Stando in osservazione sulle coste settentrionali dell'Africa, si può essere spettatori dell'arrivo delle quaglie; si scorge una nuvola scura e bassa aleggiante al di sopra delle onde che rapidamente si avvicina e si abbassa per precipitare al suolo, sul margine estremo delle onde in una mortale stanchezza. Qui le povere creature giacciono dapprima alcuni minuti come sbalordite e quasi incapaci di muoversi e passa parecchio tempo prima che si decidano a mettere nuovamente in esercizio gli spossati muscoli del petto: in genere, ciascuna cerca la sua salvezza correndo a cercarsi un rifugio, ed evita accuratamente di alzarsi in volo nei primi giorni dopo l'arrivo. Da quel momento in poi compiono la maggior parte dei loro spostamenti sul terreno. Al cominciare della primavera si ripreparano a partire e si riuniscono sulle coste del mare; sembra che nel ritorno non scelgano sempre la stessa strada percorsa

all'andata, ed è certo che, dopo aver superato il mare, si spostano lentamente, scomparendo a poco a poco dalle regioni più meridionali alle quali giungono, in genere, durante la primavera, nel mese di Aprile.

La residenza preferita delle quaglie nella stagione estiva è data dalle pianure fertili e ricche di cereali, mentre le regioni elevate e montuose, le paludi e i luoghi acquitrinosi vengono attentamente evitati. Subito dopo il ritorno si trattengono nei campi di frumento ed anche più tardi si mostrano meno esigenti, si può dire che, di regola, non si trovino bene se non laddove vi siano coltivazioni di frumento.

Inoltre *Coturnix coturnix* è un animale che cammina rapidamente dimenandosi, con brutti atteggiamenti perchè ritira la testa, lascia pendere la coda; il suo volo è celere, interrotto e mai troppo prolungato o elevato, a parte quello cui si affida durante le migrazioni; i suoi sensi, soprattutto la vista e l'udito, si possono dire ben sviluppati, mentre l'intelligenza è molto scarsa.

Per quanto riguarda la riproduzione, i maschi anticipano le femmine e difendono il territorio emettendo particolari richiami (richiamo trisillabico) per attirare l'attenzione delle femmine in arrivo. Se queste sono numerose regna la poligamia (ogni maschio si accoppia con più femmine); contrariamente, se scarseggiano ogni maschio è monogamo (si accoppia con una sola partner).

La femmina incomincia a fabbricare il nido piuttosto tardi, mai prima dell'inizio dell'estate: pratica, per lo più nei campi di frumento o nei prati una leggera escavazione, la riveste con qualche frammento di pianta secca e vi depone da otto a quattordici uova, macchiate di scuro o di bruno-nero su fondo bruniccio-chiaro.

Vengono deposte dalle 7 alle 12 uova ed è esclusivamente la femmina che si occupa della cova e della crescita delle giovani quaglie.

Le uova, più piccole delle comuni uova di gallina e dalla colorazione pezzata (Fig. 29), vengono posizionate in un incavo del terreno, previamente rivestito con fili d'erba.

L'incubazione dura per diciotto o venti giorni, e, dopo che i piccoli sono sgusciati, la madre li conduce con cura alla ricerca del cibo e li sorveglia amorevolmente. Si sviluppano molto rapidamente; nella seconda settimana sono già in grado di svolazzare e abbandonano senza complimenti la madre; nella quinta o nella sesta hanno già raggiunto l'intero sviluppo e sono in grado di intraprendere il viaggio autunnale.



Fig. 29: Uova di *Coturnix coturnix* (sulla destra) paragonate ad un uovo di gallina

Il nutrimento della quaglia consiste in semi di vario genere, foglie e gemme, ma soprattutto in ogni specie di insetti ed ha naturalmente bisogno d'acqua per estinguere la sete ma poiché gli bastano le poche gocce di rugiada che riesce a raccogliere sulle foglie, è molto raro che si diriga in luoghi determinati per dissetarsi.

Le quaglie sono oggetto di allevamenti che possono essere di tipo familiare (6-7 coppie all'interno di voliere o piccole gabbie) oppure di tipo industriale, basato sulla produzione di moltissimi soggetti e sull'utilizzo di incubatrici e batterie; vengono in genere allevate per rifornire le riserve di caccia e i ristoranti.

5.2. Cattura ed allevamento degli animali.

Una coppia di *Cichlasoma nigrofasciatum* è stata acquistata da un rivenditore autorizzato e allevata in una vasca delle dimensioni di 30 h x 40 x 30 cm, con adeguato sistema di filtrazione e termoregolazione. Ogni venti giorni la coppia ha deposta circa 200 uova che sono state opportunamente prelevate e ne è stato seguito lo sviluppo dell'avanotto, dalla schiusa fino al settimo giorno di vita.

Ovature di *Xenopus laevis*, gentilmente donate dal laboratorio della prof. Chiara Campanella dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II", sono state allevate in vasche delle dimensioni di 30 h x 40 x 30 cm, in assenza di sistema di filtrazione e alla temperatura di 24° C e ne è stato seguito lo sviluppo.

Ovature di *Rana esculenta* sono state prelevate in campo in prossimità delle foci del fiume Sele, in provincia di Salerno. Le uova sono state allevate in vasche delle dimensioni di 30 h x 40 x 30 cm con adeguato sistema di filtrazione e alla temperatura di 19° C e n'è stato seguito lo sviluppo.

Ovature di *Bufo bufo* sono state prelevate in campo in prossimità dei Monti Piacentini, località in provincia di Avellino. Le condizioni ambientali registrate al momento del prelievo erano: pH dell'acqua 7.6, durezza 230, temperatura dell'aria 17.7°C, temperatura dell'acqua 9°C.

Le uova, trasportate in laboratorio, sono state poste in vasche delle dimensioni di 30 h x 40 x 30 cm con adeguato sistema di filtrazione. Facendo attenzione a riprodurre le caratteristiche chimiche rilevate in condizioni ambientali, le uova sono così state stabulate per un periodo di circa due mesi, consentendo successivamente un campionamento dei girini.

Uova di *Coturnix coturnix*, subito dopo la deposizione, sono state acquistate da un rivenditore autorizzato e incubate in una stufa alla temperatura di 37°C. Ogni giorno sono state opportunamente bagnate e ruotate per permettere il migliore sviluppo dell'animale e successivamente sono state campionate.

Gli animali utilizzati sono stati trattati secondo le linee guida internazionali.

5.3. Prelievi.

Per il prelievo degli occhi e delle capsule olfattive, tutti gli animali sono stati anestetizzati in una soluzione 0,1% di tricaina metansulfonato (MS222, Sigma) ed in seguito sono stati sacrificati per decapitazione.

Nel caso dei Ciclidi, avanotti di *Cichlasoma nigrofasciatum* sono stati campionati a partire dal secondo giorno dopo la fecondazione fino al settimo giorno di vita.

Per ciascun giorno sono stati prelevati e processati almeno sei campioni. I campioni sono stati fissati per diretta immersione nel fissativo (Fig. 30).

Embrioni e girini di *Xenopus laevis* sono stati campionati a diversi stadi di sviluppo in accordo con la tavola di sviluppo di Nieuwkoop e Faber (Nieuwkoop e Faber, 1956). In particolare, sono stati considerati i seguenti stadi di sviluppo: 29, 33, 35, 37, 42, 44, 46, 49, 52, 53, 57, 59, 63, 66 (neometamorfosato), per ciascuno dei quali sono stati prelevati e processati almeno sei campioni.

Gli embrioni dei primi stadi di sviluppo sono stati fissati per diretta immersione nel fissativo, mentre i girini più avanzati nello sviluppo sono stati anestetizzati preventivamente con tricaina metansulfonato (MS222, Sigma) prima della decapitazione e fissazione (Fig. 31).

Nel caso di *Rana esculenta*, sono stati effettuati campionamenti a diversi stadi, in accordo alla tavola di sviluppo di Witschi (1956). Gli stadi di sviluppo considerati sono: 25, 27, 29, 31, 33, neometamorfosato.

Gli stadi embrionali sono stati immersi direttamente nel fissativo. I girini più giovani sono stati prima anestetizzati e poi immersi in fissativo. I girini più avanzati dopo l'anestesia hanno richiesto una procedura di decapsulazione del cervello lasciando attaccata la camera olfattiva mediante i nervi olfattivi. Questa operazione è stata eseguita direttamente nel fissativo. Sono stati utilizzati almeno due campioni per stadio (Fig. 32).

Ovature di *Bufo bufo* sono stati campionati a diversi stadi di sviluppo secondo la tavola di sviluppo di Cambar R. e Gipouloux D., (1956). Sono stati considerati i seguenti stadi di sviluppo: 10, 13, 15, 21, 25, 28, 31, 32 (neometamorfosato), per ciascuno dei quali sono stati prelevati e processati almeno sei campioni.

Gli embrioni (stadi 10 e 13) sono stati fissati per diretta immersione nel fissativo. Le larve a nuoto libero (stadio 15, 21, 25, 28) e con quattro zampe (stadio 31, 32) invece, sono state preventivamente anestetizzate con tricaina metansulfonato (MS222) prima della fissazione.

Infine i campioni destinati all'analisi biochimica sono stati prelevati e congelati a -80°C per poi essere successivamente sottoposti al prelievo di mucosa e occhio per l'analisi mediante l'utilizzo di un microscopio binoculare e di microbisturi (Fig. 33).

Campionamenti di uova di *Coturnix coturnix*, posti in incubazione in stufa a 37°C (Fig. 34) sono stati eseguiti a partire dal quarto giorno di incubazione fino alla schiusa. I campioni fino ad nono giorno di incubazione sono stati fissati in toto mentre a partire dal decimo giorno di incubazione fino alla schiusa, gli occhi, prima di essere fissati, sono stati accuratamente isolati dal cranio con l'ausilio di un microscopio binoculare per dissezione e di microbisturi (Fig.35).

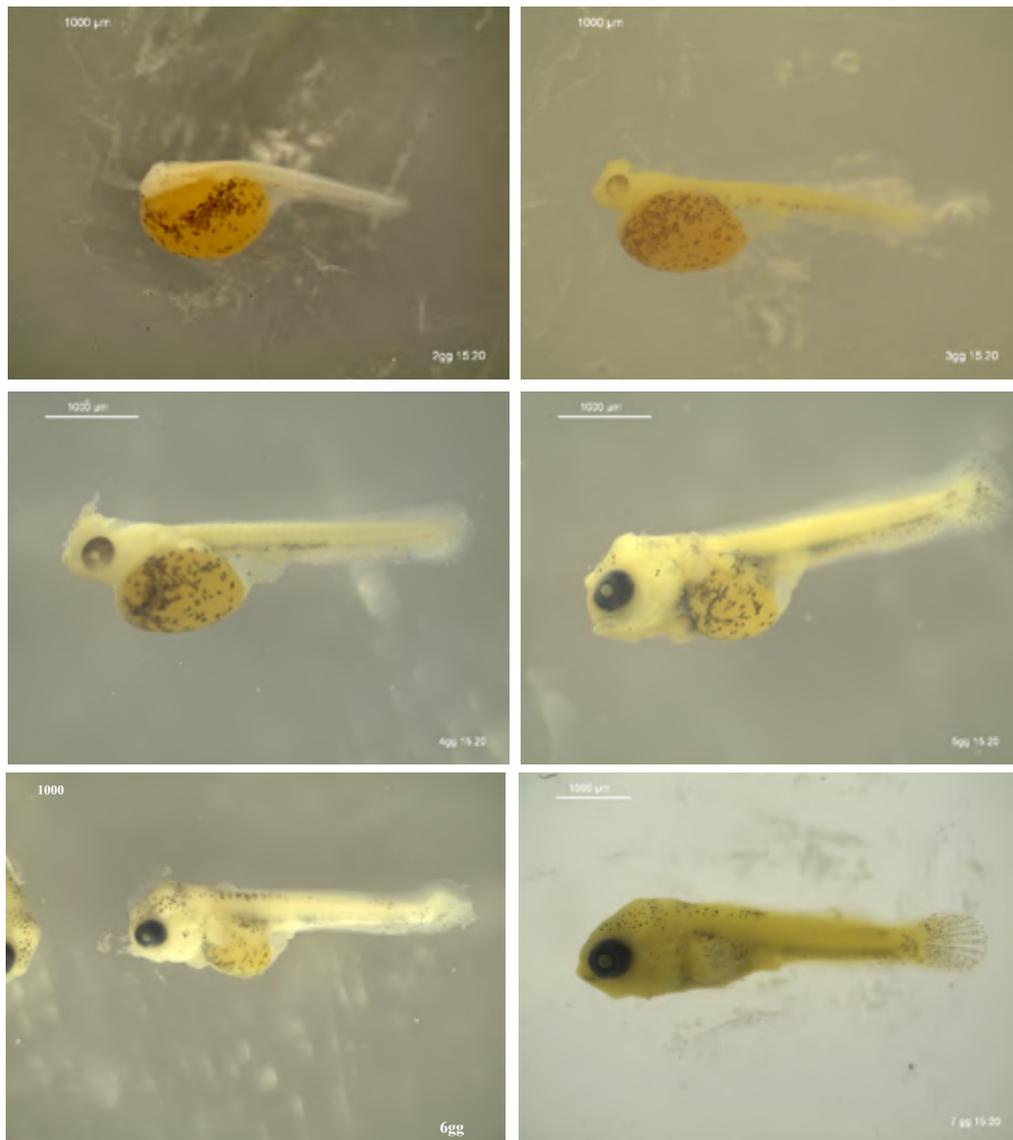


Fig. 30: Tavola di sviluppo di *Cichlasoma nigrofasciatum*, a partire dal secondo giorno dopo la fecondazione fino al settimo giorno dopo la fecondazione:

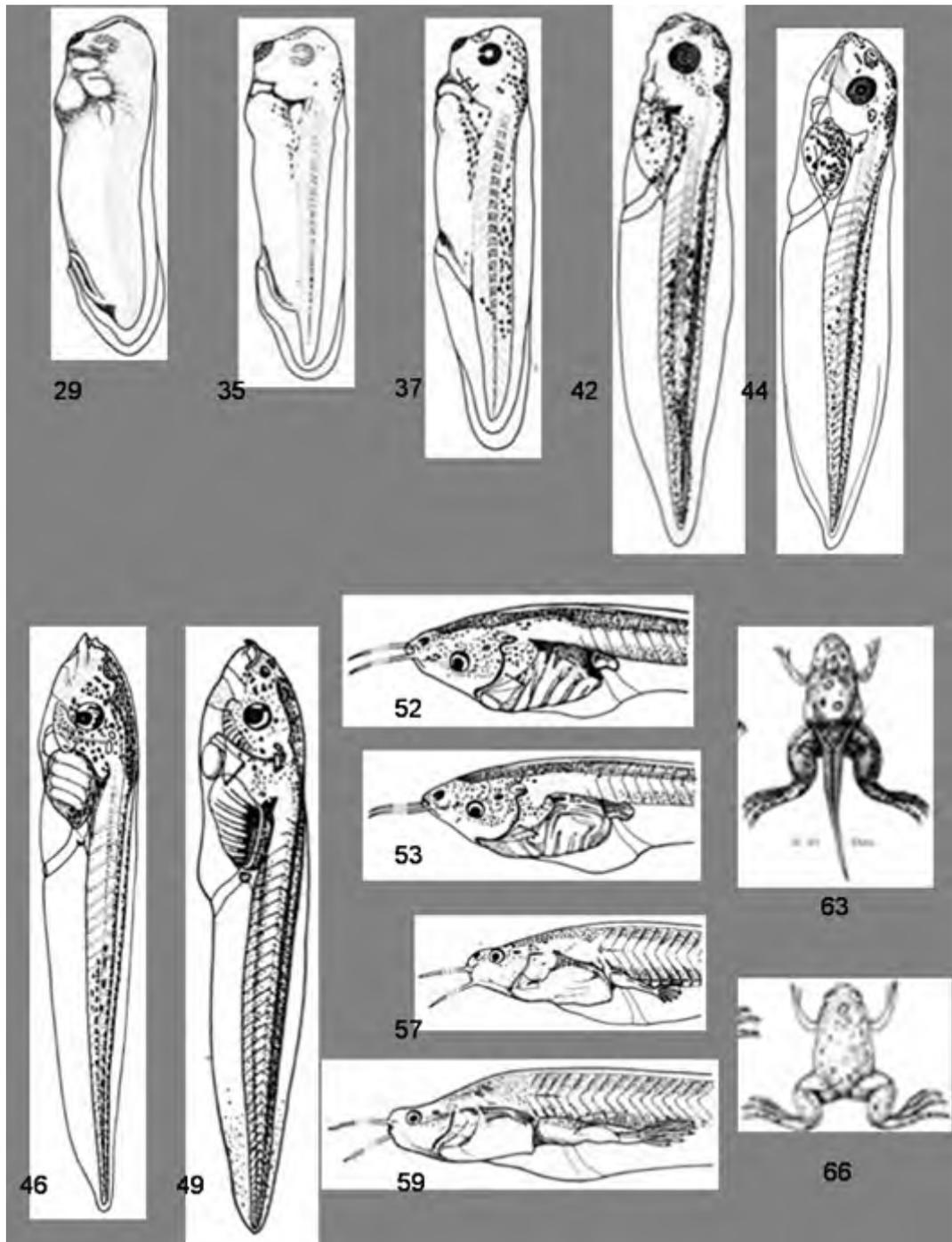


Fig. 31: Tavola dello sviluppo di *Xenopus laevis* (Nieuwkoop e Faber, 1956).

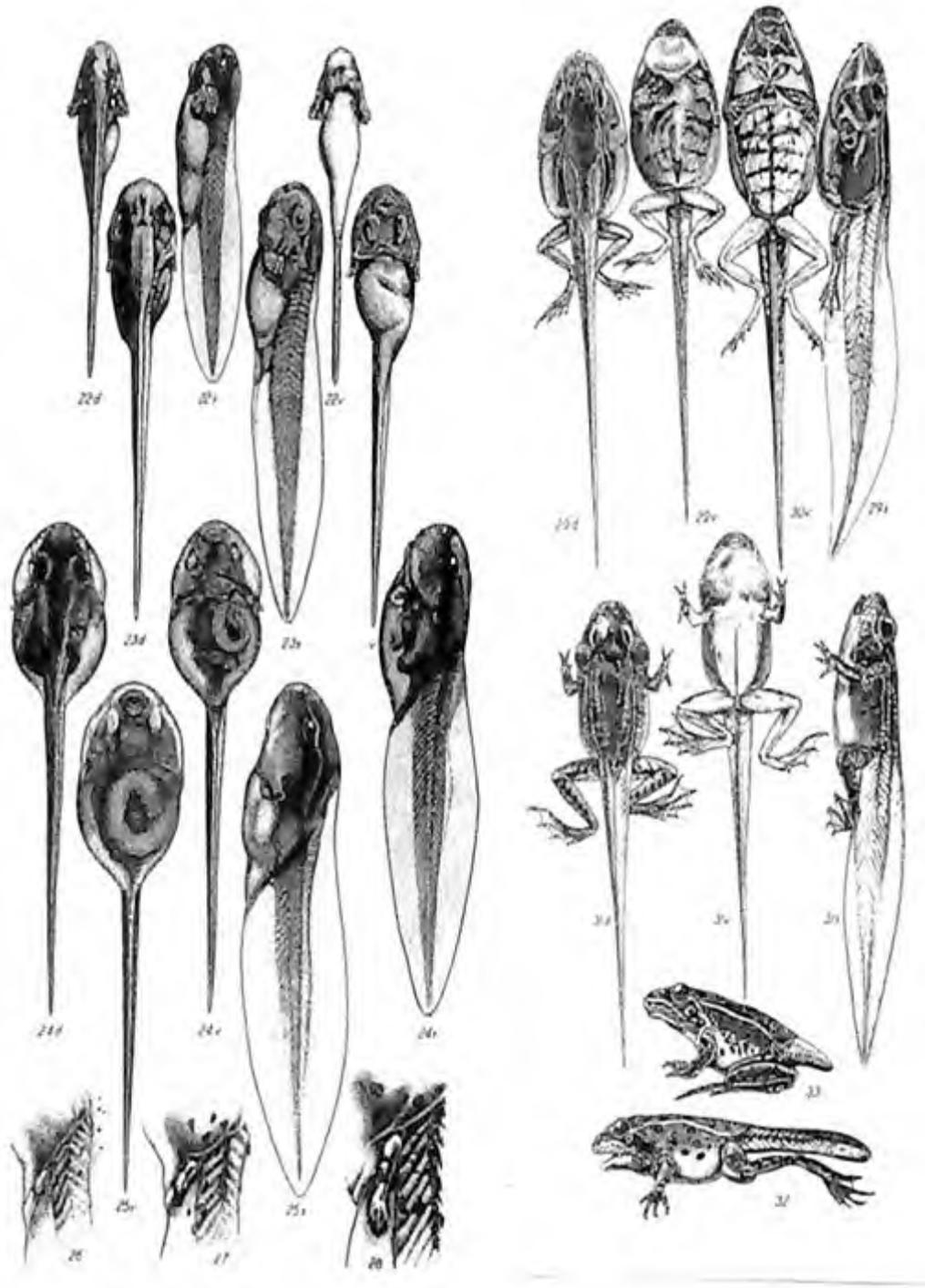


Figura 32: Tavola dello sviluppo di *Rana esculenta* (Witschi 1956).

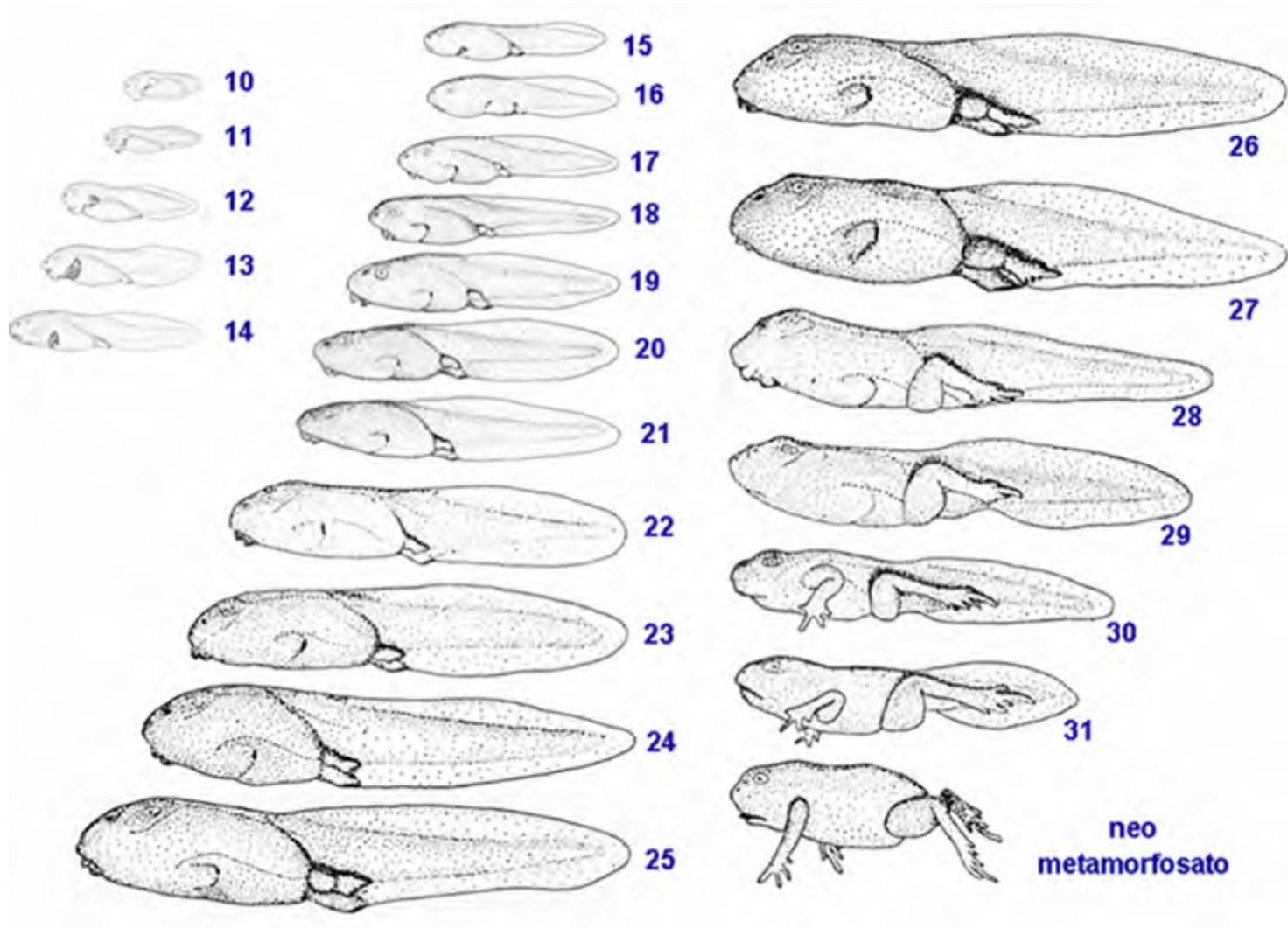


Fig. 33: Tavola dello sviluppo embrionale di *Bufo bufo* (Cambar e Gipoloux 1556)-



Fig. 34:Uova di *Coturnix coturnix* incubate in una stufa a 37° C



Fig. 35: Tavola di sviluppo di *Coturnix coturnix*.

5.4. Fissazione.

La fissazione può essere considerata l'operazione più importante della tecnica istologica, da essa dipendono la buona riuscita di un preparato microscopico.

Essa ha essenzialmente un triplice scopo:

1. immobilizzare i costituenti cellulari e tissutali del campione in uno stato più vicino possibile a quello di vita;
2. consente al preparato di sopportare gli stress fisici e chimici insiti nelle successive fasi di disidratazione, inclusione e sezionamento.
3. preservare i campioni dall'attacco di muffe e batteri, che potrebbero proliferare, nutrendosi delle strutture non più in grado di proteggersi.

Tra l'altro, alcuni fissativi devono anche mantenere inalterate le reattività enzimatiche della cellula. Tutti i fissativi, utilizzati in singolo o in combinazione, devono necessariamente essere preparati come soluzioni isotoniche e a pH 7.4, per impedire fenomeni di collasso e di rigonfiamento dei campioni, legati agli stress osmotici.

I campioni prelevati sono stati posti immediatamente nella miscela di fissativo di Bouin, costituita da acido picrico, aldeide formica e acido acetico glaciale, nel rapporto 15:5: 1.

Il Bouin è un ottimo fissativo universale. Esso ha un elevato potere penetrante per cui i pezzi possono essere fissati bene anche per sola immersione, se di piccole dimensioni, garantendo preparati istologici più che soddisfacenti.

La fissazione ha una durata di 24 h, trascorse le quali, i campioni sono stati posti in una soluzione di alcool etilico a 75%.

Successivamente sono stati eseguiti lavaggi giornalieri in alcool al 75% per circa una settimana, perpetuati fino ad allontanamento del fissativo in eccesso.

I campioni sono stati inclusi in paraffina.

5.5. Inclusione in paraffina e taglio al microtomo.

Dopo una settimana i campioni sono stati sottoposti ad inclusione in paraffina seguendo passaggi graduali in alcool a concentrazione progressivamente maggiori (serie ascendente degli alcool), seguiti da un passaggio in xilene, un solvente del mezzo d'inclusione.

I passaggi in alcool hanno lo scopo di disidratare i campioni per sostituire l'acqua con un mezzo che sia miscibile con le sostanze di inclusione. In questo modo i campioni sono preparati al successivo passaggio in paraffina, mezzo idrofobo (miscela di idrocarburi insaturi ad alto peso molecolare con formula generale C_nH_{2n+1} con $21 < n < 34$). Dal momento che l'etanolo contenuto nel preparato dopo la disidratazione non è miscibile con la sostanza (paraffina) usata per l'inclusione, occorre sostituire l'etanolo con un solvente intermedio, che sia miscibile sia con l'etanolo che con la paraffina; per questo sono importanti i passaggi in xilene.

Lo xilene è un chiarificatore sicché i pezzi quando ne sono completamente imbevuti assumono un aspetto diafano. Questo carattere permette di riconoscere se è avvenuta la sostituzione dell'etanolo assoluto e se il pezzo è stato disidratato completamente.

Dunque, si è proceduto come segue:

- passaggio in alcool etilico a 75% (1 x 15 minuti);
- passaggio in alcool etilico a 85% (1 x 15 minuti);
- passaggio in alcool etilico a 95% (2 x 15 minuti);
- passaggio in alcool etilico a 100% (2 x 15 minuti);
- passaggio in xilene (2 X 15 minuti);

Successivamente, i campioni sono stati immersi in paraffina liquida tenuta in stufa a 58°C e sottoposti a vuoto per 1 ora. Questo passaggio è stato ripetuto per tre volte.

L'inclusione sotto vuoto permette di evitare la formazione di bolle durante l'inclusione.

Dopo i tre passaggi in paraffina sottovuoto i campioni sono stati posti in blocchetti riempiti di paraffina fusa, orientati accuratamente e lasciati a solidificare per una notte.

I blocchetti così preparati sono stati attaccati a pezzetti di legno o al cilindro metallico che viene fissato al portaoggetti del microtomo.

Una volta posizionato il blocchetto al portaoggetti i campioni sono stati sottoposti a taglio frontale e le fettine condotte allo spessore di 7 μ m. Queste ultime sono state poi disposte su vetrini portaoggetti e fatte aderire con l'impiego di albumina glicerinata (albume d'uovo e glicerina nel rapporto di 1:1. La soluzione di albumina glicerinata è stata preparata diluendo 3-4 gocce della miscela di albumina glicerinata in 100 ml di acqua distillata. Il vetrino con le sezioni è stato poi lasciato ad asciugare alcuni minuti su una piastra riscaldata a 37°C. Questo passaggio permette la distensione e l'adesione delle fettine sul vetrino portaoggetti.

Dopo che i vetrini sono stati asciugati possono essere sottoposti a colorazione.

5.6. *Tecnica immunoistochimica.*

Gli antigeni sono tutte le molecole capaci di legarsi specificamente ad un anticorpo. Si tratta per lo più di proteine e polisaccaridi, la cui principale caratteristica è quella di essere “immunogenici”, cioè hanno la capacità di indurre l'attivazione del sistema immunitario in un organismo ospite che venga a contatto con esse. Ovvero, se opportunamente presentati a un sistema immunocompetente, essi ne inducono l'attivazione cioè la formazione, da parte dell'ospite, di anticorpi (immunoglobuline) specifici diretti verso una o più parti dell'antigene (determinanti antigenici), ciascuno dei quali sarà riconosciuto da un singolo anticorpo. Il loro nome deriva, infatti, dall'espressione “*antibody generator*”.

Gli anticorpi sono glicoproteine prodotte in grandi quantità da un sistema immune in seguito all'esposizione ad un antigene. Un anticorpo è formato da quattro catene polipeptidiche, due catene pesanti (catene H) identiche e due leggere (catene L) anch'esse identiche ma più piccole; esse sono assemblate in una struttura simile alla lettera Y dell'alfabeto grazie a ponti disolfuro. Ciascun braccio della Y è composto da una catena leggera completa appaiata con la porzione ammino-terminale di una catena pesante. Il gambo della Y è formato dall'appaiamento delle regioni carbossi-terminali delle due catene pesanti.

Le catene polipeptidiche delle differenti molecole anticorpali variano notevolmente per la sequenza amminoacidica soprattutto nell'ambito della regione ammino-terminale, sia nelle catene pesanti che in quelle leggere. Questa porzione, chiamata regione variabile (regione V), è responsabile del legame altamente specifico con l'antigene. Le restanti parti dei due tipi di catena presentano una minore variabilità e vengono chiamate regioni costanti (regioni C), (Fig. 36).

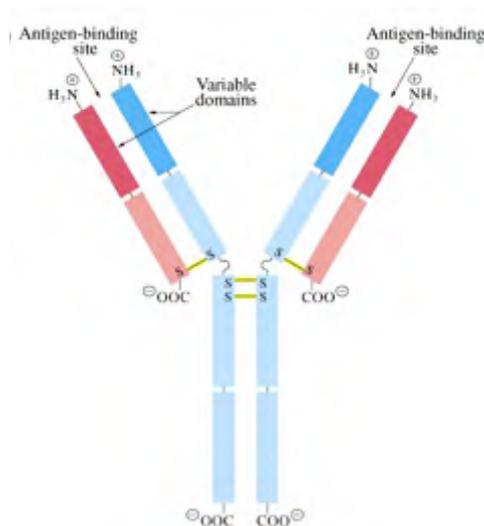


Fig. 36: Struttura schematica di un anticorpo

Esistono cinque differenti classi (o isotipi) di anticorpi: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Le loro catene pesanti vengono indicate con le corrispondenti lettere dell'alfabeto greco, mentre esistono soltanto due isotipi di catena leggera che vengono nominate kappa (κ) e lambda (λ).

Gli anticorpi che vengono più frequentemente utilizzati nelle tecniche immunoistochimiche appartengono alla classe delle IgG.

Nonostante l'immunoistochimica (IHC) è considerata una disciplina giovane, nasce "virtualmente" nel 1941. A tale data si fa risalire una intuizione di Coons che pensò di coniugare un anticorpo con un tracciante fluorescente per evidenziare la reazione immune dando inizio alla immunofluorescenza. Successivamente è di Hsu (1981) l'idea di coniugare all'anticorpo la biotina dando vita alla moderna tecnica immunoistochimica. L'IHC nasce dall'unione di tecniche immunologiche e istochimiche e permette di rilevare ed interpretare la presenza di specifici antigeni all'interno di un contesto morfologico.

Le tecniche IHC sfruttano la capacità degli anticorpi di legarsi all'antigene specifico. Le metodiche più comunemente impiegate oggi in IHC sono quelle immunoenzimatiche (perossidasi, fosfatasi alcalina, avidina-biotina o streptavidina). Esse si avvalgono dell'utilizzo di enzimi che agiscono su un substrato e originano un prodotto di reazione che a sua volta modifica una sostanza colorata (cromogeno) consentendo così di visualizzare la reazione tra antigene e anticorpo.

Vi sono due metodi IHC:

- diretto: il marker è coniugato direttamente all'anticorpo responsabile del riconoscimento dell'antigene;
- indiretto: prevede l'utilizzo di anticorpi primari e secondari marcati, diretti contro il primario legato all'antigene.

La scelta del primario deve essere fatta in base al tipo di molecola che si vuole rilevare, specificandone anche l'animale di provenienza. Quelli d'uso più comune sono prodotti in capra e coniglio.

L'anticorpo primario è spesso policlonale e più facilmente può riconoscere oltre alla molecola di nostro interesse, anche delle altre ed è adoperato ad una diluizione ottimale. Infatti nel presente lavoro sono state effettuate delle prove a diverse diluizioni su sezioni seriali in modo da poter valutare la migliore diluizione possibile. È stato osservato che un'alta diluizione dell'anticorpo primario rende la reazione più specifica. Ciò è dovuto al fatto che anche l'anticorpo primario è di natura policlonale: operando in tal senso, si sfavoriscono le interazioni aspecifiche.

Quello secondario è invece monoclonale e specificamente diretto contro il primario. Esso a livello della regione costante è coniugato con biotina (vitamina H) a cui viene fatta seguire un complesso contenente avidina o streptavidina coniugata con per ossidasi (Fig. 37).

Il sistema biotina-avidina o streptavidina si basa sulla straordinaria affinità che l'avidina, una glicoproteina presente nell'albume d'uovo, presenta verso la biotina e la streptavidina. Il complesso determina

un'amplificazione del segnale costituendo, quindi, un notevole vantaggio dell'applicazione perché permette l'uso di basse concentrazioni di primario. Le basse concentrazioni vanno a vantaggio della specificità del segnale.

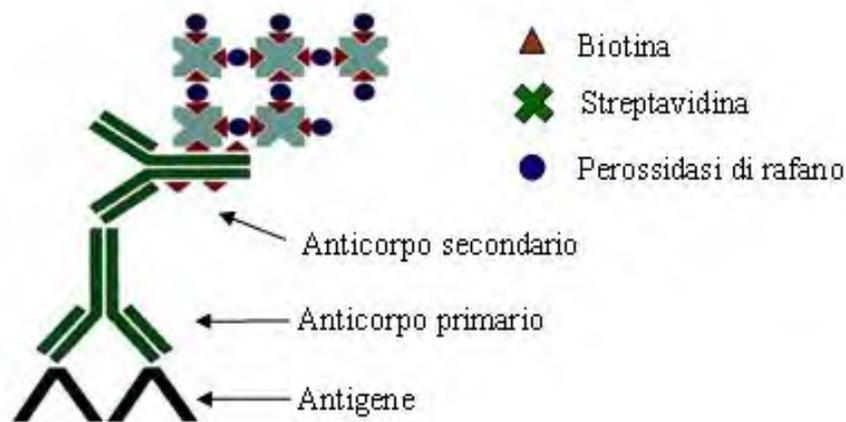


Fig. 37: Sistema avidina-biotina.

Il metodo utilizzato in questo lavoro è quello indiretto. Il marker è la perossidasi di rafano (horseradish peroxidase, HRP). L'anticorpo per l'immunolocalizzazione della PCNA è di natura monoclonale, prodotto in topo.

La procedura immunohistochimica ha previsto:

- due passaggi preliminari di sparaffinatura dei vetrini in xilene per 40 minuti ciascuno.
- reidratazione dei campioni mediante passaggi in una serie discendente di alcool:
 - alcool etilico a 100% (2 x 5 minuti);
 - alcool etilico a 95% (2 x 5 minuti);
 - alcool etilico a 85% (1 x 5 minuti);
 - alcool etilico a 75% (1 x 5 minuti);
- passaggio in H₂O distillata (1 x 5 minuti); (a questo punto le sezioni si circoscrivono utilizzando una speciale penna, "pap-pen", in modo da evitare la dispersione della goccia di anticorpo sul vetrino).
- passaggio in tampone sodio fosfato salino (PBS, 0.1 M, ph 7.4 + TRITON), (2 x 10 minuti). Il lavaggio in PBS è necessario perché gli anticorpi saranno disciolti in PBS;
- incubazione dei vetrini con siero normale di cavallo (NHS, 1:50; Pierce) per 20 minuti in una camera oscura a temperatura ambiente per ridurre le colorazioni aspecifiche di fondo;
- aspirazione del siero in eccesso dalle sezioni e applicazione dell'anticorpo primario mouse anti-PCNA (1:30.000, Dako) e

-
- incubazione in camera oscura e umida a 4°C per una notte, per evitare disidratazioni. La PCNA è usata come marcatore delle cellule in attiva proliferazione (Tete et al., 2000);
- passaggio in PBS, (2 x 10 minuti);
 - incubazione con anticorpo secondario biotinilato horse anti-mouse (1:200, Pierce) per 1 h a temperatura ambiente;
 - passaggio in PBS, (2 x 10 minuti);
 - incubazione con streptavidina coniugata a perossidasi (1:200, Pierce) per 1 h a temperatura ambiente;
 - passaggio in tampone TRIS (0,1 M, ph 7.4), (2 x 5 minuti);
 - passaggio in diamminobenzidina (DAB, Sigma Chemicals) (0,03 g di DAB in 230 ml di TRIS + 200 µl di H₂O₂ al 3%), (1 x 3 minuti);
 - passaggio in acqua distillata, 1 x 10 min;
 - (per i vetrino di *Bufo bufo*)passaggio in una soluzione sbiancante (bleaching solution):
 - soluzione di lavoro:
 - Alcool benzilico 60 ml
 - Acetone 30 ml
 - Perossido di idrogeno (H₂O₂) 15 ml
 - Ammoniaca (25% NH₃) 60 µl
 - incubazione dei vetrini nella suddetta soluzione a 37°C in un contenitore di vetro chiuso (EllendaI), (1 x 1h);
 - lavaggi in acetone (1:1 in H₂O₂ dist.), (2 x 5 minuti);
 - Trattamento con 20% sodio tiosolfato, (1 x 5 minuti). (questo step può essere omesso);
 - lavaggi ripetuti in acqua corrente;
 - lavaggio in H₂O₂ distillata, (1 x 10 minuti);
 - controcolorazione se desiderata;
 - passaggio in una serie di alcool ascendenti:
 - alcool etilico a 75% (1 x 5 minuti);
 - alcool etilico a 85% (1 x 5 minuti);
 - alcool etilico a 95% (2 x 5 minuti);
 - alcool etilico a 100% (2 x 5 minuti);
 - passaggio in xilene (2 x 10 minuti);
 - montaggio delle sezioni con vetrini coprioggetto, utilizzando Balsamo del Canada (NOVA, Pertex).

La specificità della reazione immunoistochimica è stata garantita dai seguenti controlli:

1. omissione dell'anticorpo primario e sostituzione con PBS;
2. omissione dell'anticorpo primario e di quello secondario;
3. omissione di una delle tappe successive della colorazione e sostituzione con PBS.

L'omissione dell'anticorpo primario prevede che non ci sia riconoscimento

dell'antigene e quindi la sua rilevazione. La sezione che subisce l'omissione del primario è comunque incubata con il secondario secondo il normale processo. Un'altra sezione subisce anche l'omissione del secondario per controllarne la sua specificità (ottimizzata con il trattamento delle sezioni con il siero normale come visto in precedenza).

L'antisiero utilizzato in questo lavoro è l'antigene nucleare di proliferazione cellulare (PCNA) che rappresenta un marcatore delle cellule in attiva proliferazione.

5.7. Colorazione con ematossilina.

E' una delle tecniche di colorazione più utilizzate in campo istologico e istopatologico, spesso in associazione all'eosina. Essa consente di esaminare il tessuto per farsi una idea della sua morfologia, ed è compatibile con tutti i fissativi, eccetto quelli che prevedono l'osmio. L'ematossilina è un colorante basico che colora i nuclei in violetto e le componenti cellulari cariche negativamente come acidi nucleici, [proteine](#) di membrana, membrane cellulari ed elastina che sono quindi detti basofili. Per contro, l'eosina, è un colorante acido, che colora il citoplasma in rosa e i componenti carichi positivamente, come molte proteine [cellulari](#), le proteine mitocondriali e le fibre collagene che sono quindi detti eosinofili o acidofili.

La colorazione con ematossilina fornisce ottimi risultati nell'identificazione di frammenti di cellule morenti consentendo la visualizzazione di cellule apoptotiche persino prima che la frammentazione del DNA possa essere rilevata da metodiche quali la colorazione TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling).

Il procedimento di colorazione adoperato che ha previsto il solo utilizzo dell'ematossilina, è stato eseguito secondo il seguente procedimento:

- sparaffinatura in xilolo, (2 x 40 minuti);
 - reidratazione del campione mediante i seguenti passaggi:
 - alcool etilico a 100% (2 x 5 minuti);
 - alcool etilico a 95% (2 x 5 minuti);
 - alcool etilico a 85% (1 x 5 minuti);
 - alcool etilico a 75% (1 x 5 minuti);
 - passaggio in H₂O distillata (1 x 5 minuti);
 - colorazione in emallume acido di Mayer, (1 x 5 minuti);
 - passaggio in H₂O distillata, (1 x 5 minuti);
 - passaggio in acqua di fonte, (1 x 10 minuti);
 - disidratazione del campione mediante i seguenti passaggi:
 - alcool etilico a 75% (1 x 5 minuti);
 - alcool etilico a 85% (1 x 5 minuti);
 - alcool etilico a 95% (2 x 5 minuti);
 - alcool etilico a 100% (2 x 5 minuti);
 - passaggio in xilolo, (2 x 10 minuti);
- montaggio dei vetrini in Permout (NOVA, Pertex).

5.8. Western Blot e Immunorilevazione con anticorpi anti-PARP.

Il western blot o immunoblot è una tecnica biochimica che consente l'identificazione di una proteina specifica contenuta in una miscela di proteine, mediante il riconoscimento da parte di specifici anticorpi. La miscela di proteine viene separata mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti (SDS-PAGE) che discrimina le proteine in base al loro peso molecolare e successivamente viene trasferita su un supporto solido, che comunemente è una membrana di nitrocellulosa. Il riconoscimento della proteina di interesse avviene mediante l'utilizzo di anticorpi specifici: anticorpi primari, diretti contro la proteina di interesse, e anticorpi secondari, diretti contro gli anticorpi primari e coniugati con un enzima che catalizza una reazione rilevabile.

5.8.1. Estrazione e quantizzazione proteica.

I campioni sottoposti ad analisi biochimica per determinare l'attività della poli ADPR-(polimerasica) sono stati congelati in toto a -80 °C. Successivamente la mucosa ed entrambi gli occhi di ciascun girino agli stadi di sviluppo scelti sono stati accuratamente isolati dal cranio con l'ausilio di un microbisturi e di un microscopio binoculare per dissezioni e immediatamente congelati a -4°C.

L'omogeneizzazione di ciascun preparato è stata effettuata mediante Dounce in tampone di estrazione contenente PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 100 mM Na₂HPO₄, 2mM KH₂PO₄), MgCl₂ 3 mM, NP-40 0,5% e PMSF 0,5 mM a pH 7.4. Tutte le operazioni sono state effettuate su ghiaccio e al tampone di estrazione è stato aggiunto, prima dell'uso, un mix di inibitori delle proteasi (Roche) alla concentrazione di 10 µg/ml.

Il Dounce è un omogeneizzatore costituito da un tubo di vetro e da un pestello mosso a mano; il tubo è mantenuto fisso mentre il pestello viene fatto ruotare per generare le forze frizionali, le quali sono più elevate alla superficie del pestello e minime lungo la parete del tubo. Lo spazio libero tra il pestello e la parete del tubo è mantenuta entro dimensioni precise in quanto l'attrito sviluppato dipende dal raggio del pestello e del tubo di vetro e dalla velocità di rotazione del pestello stesso. L'omogeneizzazione viene effettuata perché consente di frantumare cellule e tessuti, provocando la rottura delle membrane, e quindi il rilascio delle proteine cellulari. Le proteine cellulari sono dotate di carica e dopo omogeneizzazione, soprattutto se sono basiche, possono restare associate al materiale particolato; proprio per questo motivo si utilizzano tamponi di estrazione. Inoltre, per evitare la frammentazione della proteina di interesse da parte di proteasi endogene, si aggiunge una miscela di inibitori delle proteasi al tampone di estrazione.

L'omogenato ottenuto è stato centrifugato per 5 minuti a 500 g e filtrato con filtri per proteine in PVDF (polivilidendifluoruro) da 0,45 μm (Millipore – GE Healthcare) per rimuovere i residui insolubili.

La concentrazione proteica è stata determinata mediante dosaggio Bradford (Bradford et al., 1976). Il saggio è basato su un metodo colorimetrico che permette di quantizzare le proteine in base al loro legame con il colorante *Coomassie Blu Brillante*. Per determinare la concentrazione proteica viene costruita una retta di taratura utilizzando concentrazioni note di una proteina standard, l'albumina di siero bovino (BSA). Dopo incubazione dei campioni e della proteina standard con il colorante per 5 minuti a temperatura ambiente, viene determinata l'assorbanza a 595 nm. La curva standard viene costruita mettendo in grafico i valori dell'assorbanza registrati per la proteina standard in funzione della loro concentrazione. Mediante metodi di interpolazione grafica o mediante risoluzione dell'equazione della retta di taratura viene determinata la concentrazione della proteina di interesse.

5.8.2. Elettroforesi in condizioni denaturanti (SDS-PAGE).

I campioni ottenuti mediante omogeneizzazione sono stati analizzati su gel di poliaccrilamide in condizioni denaturanti. Il resolving gel al 12%, dove avviene la separazione delle proteine, è stato preparato utilizzando una soluzione contenente 1,6 ml di H_2O ; 2,9 ml di 30% acrilamide mix; 1,3 ml di 1,5 M TrisHCl (pH 8.8); 0,05 ml di 10% SDS; 0,05 ml di 10% ammonio persolfato; 0,002 ml di TEMED. Lo stacking gel al 5%, sede dei pozzetti per il caricamento delle proteine, è stato preparato utilizzando una soluzione contenente 2,1 ml di H_2O ; 0,5 ml di 30% acrilamide mix; 0,38 ml di 1 M TrisHCl (pH6.8); 0,03 ml di 10% SDS; 0,03 ml di 10% ammonio persolfato; 0,003 ml di TEMED.

Il sodio dodecilsolfato, ovvero SDS, è un detergente anionico recante una coda idrofobica e una testa polare carica negativamente; esso denatura tutti i tipi di interazione che si stabiliscono tra gli amminoacidi, legandosi ogni due residui amminoacidici e svolgendo la catena polipeptidica in forma lineare. Quindi quanto più grande è la molecola, tanto maggiore sarà la quantità di SDS legato. L'SDS legato maschera la carica delle proteine, conferendogli una carica netta negativa che rende insignificante la loro carica intrinseca; ciò comporta che tutte le proteine saranno cariche negativamente e migreranno verso il polo positivo nel corso dell'elettroforesi.

Il legame con SDS altera la struttura nativa delle proteine, che vengono ad assumere una forma simile; quindi la separazione avverrà solo in relazione alla massa molecolare. I polipeptidi più piccoli migreranno più velocemente

in quanto incontreranno minore resistenza nella migrazione attraverso il setaccio rispetto a quelli di maggiori dimensioni.

Inoltre il loading buffer (1,52 g Tris base; 20 ml glicerolo; 2 g SDS 2 ml β -mercaptoetanol; 1 mg blu di bromofenolo; H₂O per raggiungere un volume finale di 100 ml) che permette di facilitare il caricamento delle proteine e seguire la corsa elettroforetica, contiene il 2-mercaptoetanol che ha il compito di ridurre i ponti disolfuro, che non sono attaccabili dall'SDS, e quindi di consentire all'agente denaturante l'accesso all'intera struttura proteica.

La corsa elettroforetica viene effettuata ad un voltaggio costante (100 mV) per circa due ore, in presenza del tampone di corsa Tris-glicina 1x (15,1 g Tris base; 72,0 g Glicina; 5 g SDS e H₂O fino ad un volume di 1 litro). Come riferimento di peso molecolare è stato utilizzato il marker Colour Burst della Sigma (Sigma-Aldrich).

5.8.3. Elettroblotting.

Dopo esser state separate in SDS-PAGE, le proteine sono state trasferite su una membrana di nitrocellulosa della Whatman Westran™ (Whatman) mediante elettroblotting (Biorad Transblot System, Biorad), ossia grazie ad un campo elettrico trasversale che forza le proteine a migrare dal gel di poliacrilammide direttamente sulla membrana.

Al termine della corsa elettroforetica viene assemblato un "sandwich" di trasferimento su un apposito supporto costituito da:

 Spugna

 Carta

 Gel

 Membrana

 Carta

 Spugna

Prima di porre il secondo strato di carta, con l'ausilio di un rullo, sono state eliminate le bolle d'aria tra la membrana e il gel, bagnati di tampone. Successivamente il sandwich viene alloggiato nella camera di trasferimento, facendo attenzione a rispettare la polarità; è importante infatti rivolgere la membrana di nitrocellulosa verso il polo positivo (anodo - per convenzione il cavetto è di colore rosso). La camera riempita del tampone di trasferimento (Tris-glicina 1x all'80%; metanolo al 20%); viene collegata mediante gli elettrodi all'alimentatore ed il trasferimento viene effettuato a 20 mA per 90 min ad una temperatura di 4°C. Come controllo sono stati trasferiti anche gli standard di peso molecolare (Bio-Rad).

Per valutare l'efficienza del trasferimento e la presenza di bolle, dopo l'elettroblotting, il filtro è stato incubato in presenza di 20 ml di una soluzione di Rosso Ponceau (soluzione allo 0,1%, in acido acetico 1%) su un agitatore oscillante per circa 5 minuti; il colorante in eccesso è stato drenato e decolorato con acqua distillata fino a quando non sono risultate visibili le bande proteiche. Infine il filtro è stato completamente decolorato mediante ripetuti lavaggi nella soluzione tampone contenente PBS Tween 0,02%.

5.8.4. Blocking.

Nel processo di trasferimento rimangono dei siti liberi sulla membrana, che vengono bloccati mediante incubazione con una miscela di proteine non specifiche. Questo evita il legame aspecifico dell'anticorpo su tali siti e abbassa quindi notevolmente l'aspecificità del legame dell'anticorpo primario. Nel nostro caso per il Blocking è stato utilizzato *Non fat dry milk* (Biorad) 5% in PBS Tween 0,02% per 30 minuti a 37°C

5.8.5. Incubazione con anticorpo primario e secondario e rilevazione della PARP frammentata.

La membrana è stata successivamente incubata con anticorpi policlonali anti-PARP da coniglio diretti contro il sito catalitico della proteina (diluiti 1:1000; v/v) in PBS Tween 0,02%, - *non fat dry milk* 1% , per tutta la notte in agitazione, a 4°C.

Dopo 3 lavaggi da 10 minuti in PBS-Tween 0,02%, il filtro di nitrocellulosa è stato incubato in agitazione per 1h e 30 minuti a 4°C con anticorpi secondari anti-IgG di coniglio (diluiti 1:10000; v/v), coniugati con perossidasi (PIERCE) in PBS Tween 0,02%, - *non fat dry milk* 1%.

Infine, il filtro di nitrocellulosa è stato sottoposto ad ulteriori 3 lavaggi da 10 minuti in PBS-Tween 0,02%, prima della rivelazione dell'attività perossidasi per chemiluminescenza potenziata, effettuata utilizzando il kit PIERCE Super Signal® WestPico. Il procedimento effettuato con un substrato chemiluminescente (Luminol) è più complesso ma più preciso rispetto ad un sistema basato su un substrato precipitante come Diamminobenzidina (DAB). Per tale procedimento è stata preparata in una camera oscura una soluzione contenente Luminol ed Enhancer (in rapporto 1:1); successivamente questa soluzione è stata incubata da 2 a 5 minuti con la membrana per permettere lo sviluppo della reazione chemiluminescente. La chemiluminescenza del luminolo si manifesta con emissione di luce quando questo viene ossidato ad acido 3-aminoftalico con perossido di idrogeno (H₂O₂) in presenza di un catalizzatore metallico di conversione (Enhancer).

L'acquisizione e l'analisi delle immagini sono state effettuate al Chemidoc (Bio-Rad), utilizzando il programma Quantity One.

5.9. Osservazione e Fotodocumentazione.

Tutti i preparati sono stati esaminati al microscopio ottico Leica DMBL equipaggiato con una fotocamera digitale Canon Power Shot S50. Le immagini digitali sono state acquisite come TIFF files e migliorate in luminosità e contrasto utilizzando il programma ADOBE Photoshop 6.

5.10. Quantificazione di mitosi ed apoptosi nella retina e stime morfologiche dell'occhio.

Per ottenere un dato numerico relativo agli eventi mitotici e apoptotici nello sviluppo della retina di *Bufo* sono stati effettuati dei conteggi di quelle cellule che mostravano evidenti segni del fenomeno. In particolare, per le figure mitotiche sono state contate tutte le cellule in cui erano chiaramente visibili i cromosomi; laddove per i corpi apoptotici sono state rilevate le cellule i cui nuclei mostravano la frammentazione della cromatina o il collasso della stessa. Il tutto è stato rapportato a stime di crescita morfologica dell'occhio.

Le stime morfologiche ed i conteggi, effettuati su sei campioni per stadio, sono stati eseguiti su 5 sezioni equidistanti contenenti il cristallino. In questo modo sono state ricavate:

- il numero di cellule complessive presenti nella retina in ogni sezione;
- il relativo numero di figure mitotiche;
- il numero delle figure apoptotiche.

Il numero totale di cellule nelle sezioni di retina osservate è stato calcolato contando le cellule presenti in un riquadro di area nota, espresso in μm^2 , moltiplicandolo poi per l'area totale. Naturalmente, nel calcolo si è tenuto conto delle aree retiniche non cellularizzate, che sono state opportunamente sottratte dal computo totale. Le misurazioni sono state effettuate su immagini digitali usando il software ImageJ.

Successivamente, accorpando i dati delle 5 sezioni di ogni campione, si è provveduto a rapportare il numero di mitosi in esse osservato, al numero totale di cellule presenti nelle sezioni. In questo modo è stato ricavato un "indice mitotico" relativo ad ogni campione. Con procedura analoga è stato ricavato un "indice apoptotico".

Gli indici così ottenuti, sono stati trattati statisticamente calcolando per ogni stadio dello sviluppo studiato la loro media e la deviazione standard.

Questo tipo di approccio ovviamente non fornisce una stima totale, ma è un indicatore di incremento/diminuzione di attività proliferativa o di morte cellulare.

Capitolo 6:
Risultati

6.1. *Cichlasoma nigrofasciatum*.



Gli stadi di sviluppo sono stati scelti in maniera tale che ci fossero delle apprezzabili differenze morfologiche nella forma del corpo tra uno stadio e quello successivo.

In questo lavoro è stato studiato lo sviluppo della retina di *Cichlasoma nigrofasciatum* a partire da stadi embrionali precoci, mediante la colorazione istologica classica con ematossilina.

Gli animali sono stati classificati a partire dal giorno in cui è avvenuta la fecondazione fino al settimo giorno, quando l'animale ha completamente riassorbito le caratteristiche larvali.

6.1.1. Sviluppo dell'occhio di *Cichlasoma nigrofasciatum* 2 giorni dopo la fecondazione.

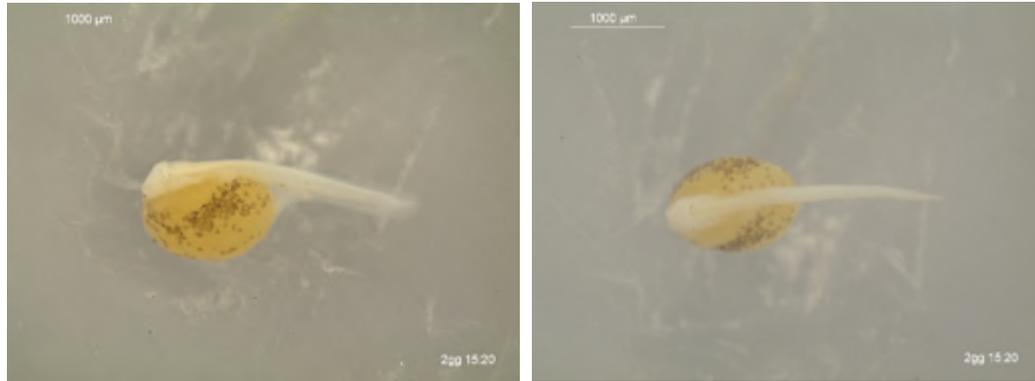


Fig. 38: Immagine laterale e dorsale di *Cichlasoma nigrofasciatum* 2 giorni dopo la fecondazione.

Anatomicamente l'animale appare formato per la maggior parte della sua estensione da un sacco vitellino molto grande mentre si osserva appena accennata la testa (Fig.38). Non ha una alimentazione autonoma e rimane attaccato sul fondo con l'accenno di leggeri movimenti.

Per quanto riguarda la morfologia dell'occhio (Fig. 39a), il cristallino appare appena separato dalla coppa ottica e in piena proliferazione (Fig. 39b) e contemporaneamente inizia la produzione dell'umor vitreo (diametro medio dell'occhio = $72 \pm 5,93 \mu\text{m}$).

La retina (Fig. 39c) non appare stratificata (area retinica media = $5298,4 \pm 723,25 \mu\text{m}^2$) e in essa sono presenti alcune figure mitotiche (n. mitosi medie = $2,84 \pm 0,80$) dislocate lungo tutta la sua estensione (Fig. 39e)

Anche il fenomeno apoptotico (Fig. 39d) è molto abbondante (n apoptosi medie = $3,36 \pm 0,77$) con apoptosi ben visibili.

Dai conteggi effettuati (Fig. 51) sulle figure apoptotiche e mitotiche contate e le relative cellule retiniche (n. cellule retiniche medie = $39,8 \pm 4$) si osserva un indice mitotico (indice mitotico medio = $0,067 \pm 0,01$) ed apoptotico (indice apoptotico medio = $0,009 \pm 0,003$) molto alto.

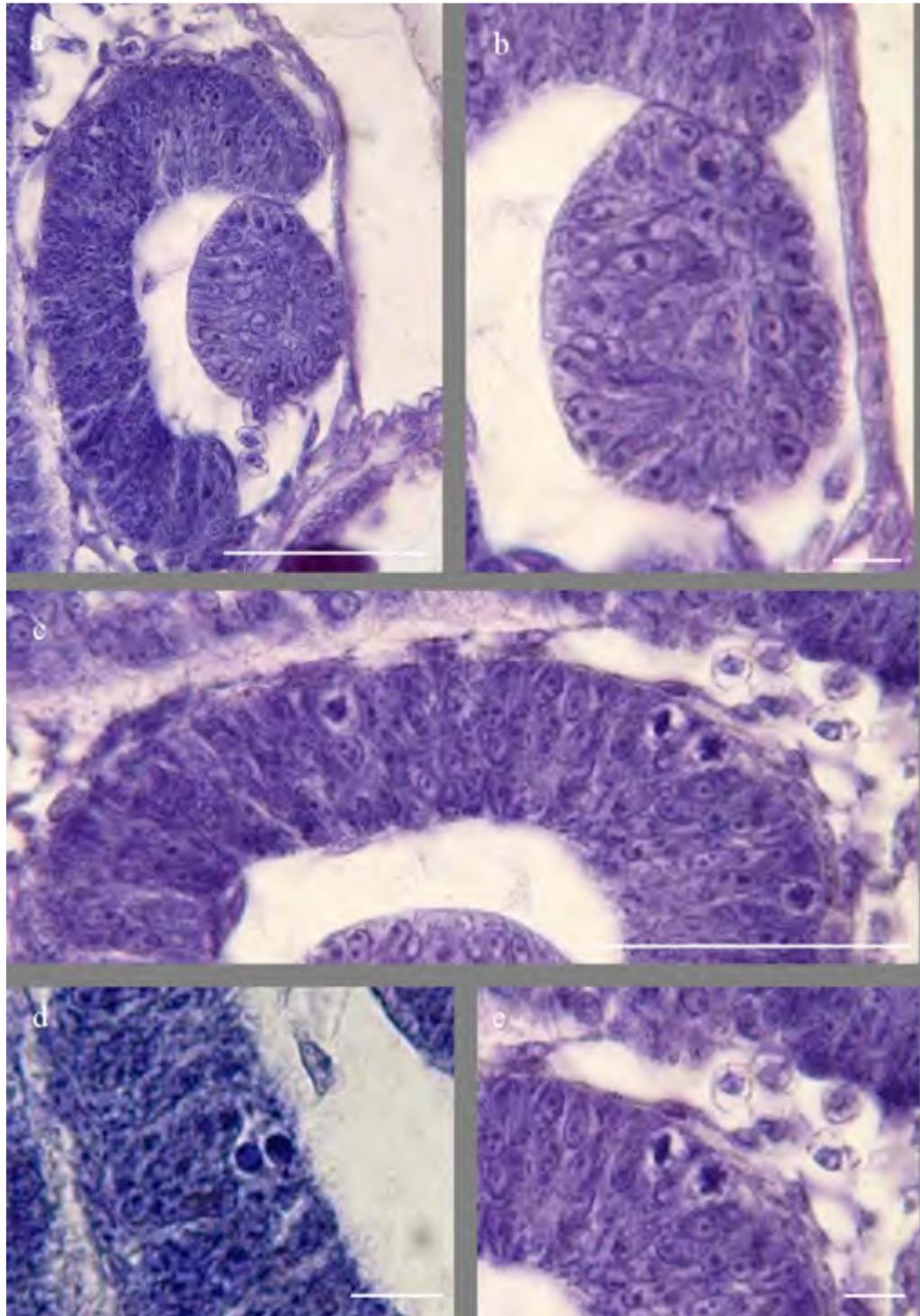


Fig. 39: Sezioni trasversali rappresentative della retina di *Cichlasoma nigrofasciatum* 2 giorni dopo la fecondazione, colorate con ematossilina. a) visione generale dell'occhio; b) cristallino in neoformazione; c) retina non stratificata; d) esempi di apoptosi a livello della retina; e) evidenti mitosi distribuite in tutta la retina. Unità di misura della barra di riferimento: a,c = 50 μm ; b,d,e = 20 μm .

6.1.2. Sviluppo dell'occhio di *Cichlasoma nigrofasciatum* 3 giorni dopo la fecondazione.

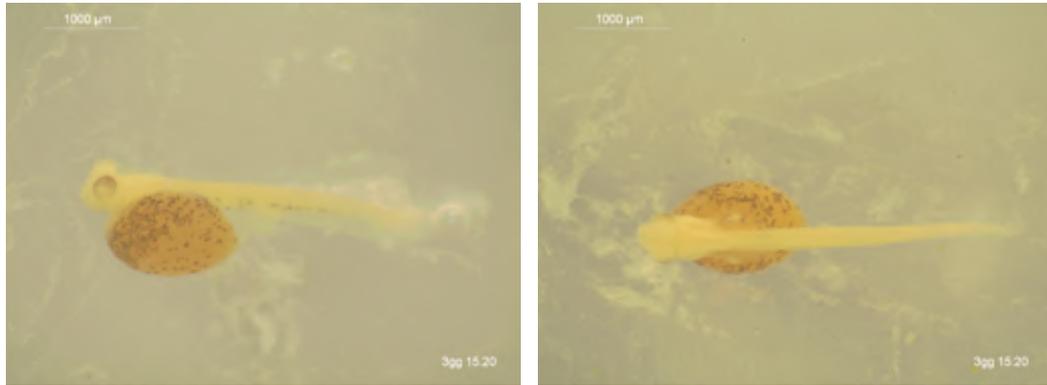


Fig. 40: Immagine laterale e dorsale di *Cichlasoma nigrofasciatum* 3 giorni dopo la fecondazione.

L'animale, 3 giorni dopo la fecondazione, presenta una riduzione del sacco vitellino e un occhio ben accentuato con la crescente formazione dello strato pigmentato (Fig. 40), inoltre inizia ad non essere più statico sul fondo ma effettua rapidi movimenti circolari.

L'occhio (Fig. 41a) cresce in dimensioni e il cristallino risulta maggiormente differenziato, rispetto al giorno precedente, e si osserva una maggiore abbondanza dell'umor vitreo (dimensioni medie dell'occhio = $110,2 \pm 12,67 \mu\text{m}$).

La retina (Fig. 41c) non inizia ancora la sua stratificazione (area retinica media = $16843,88 \pm 314,22 \mu\text{m}^2$; n. cellule retiniche medie = $163,16 \pm 51,8$).

Inoltre le mitosi (Fig. 41b) risultano molto abbondanti (n. mitosi medie = $23,4 \pm 1,63$), dimostrate da un forte picco mitotico (indice mitotico medio = $0,0885 \pm 0,0059$) che si verifica in questo giorno.

Le apoptosi, invece, sono scarse (n. apoptosi medie = $0,01142 \pm 0,0036$) e dislocate in tutta la retina come dimostra la drastica riduzione, rispetto al giorno precedente, dell'indice apoptotico (indice apoptotico medio = $0,01 \pm 0,0036$).

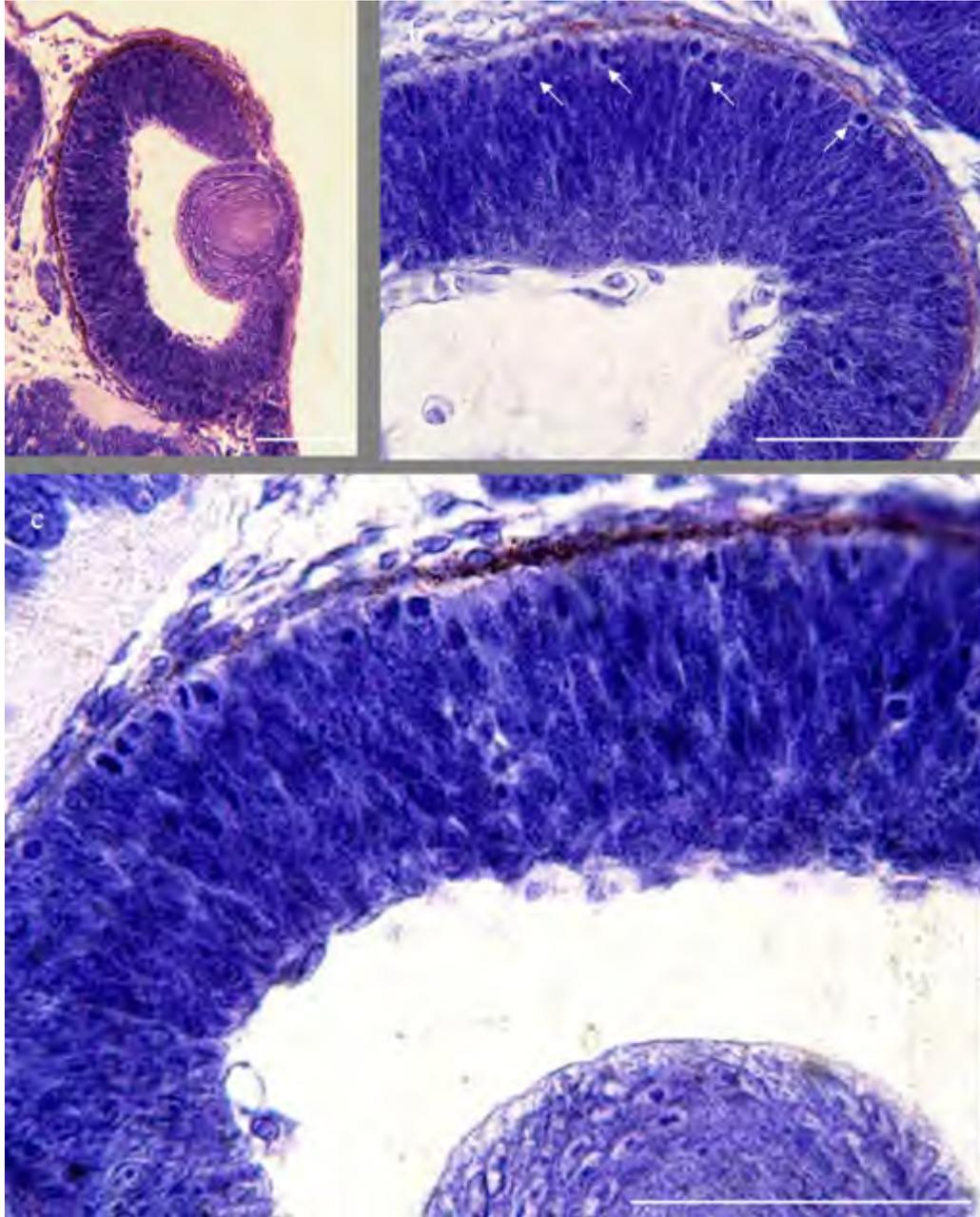


Fig. 41: Sezioni trasversali rappresentative della retina di *Cichlasoma nigrofasciatum*, 3 giorni dopo la fecondazione, colorate con ematossilina. a) visione generale dell'occhio; b) abbondanti mitosi (freccie) in tutta la retina; c) retina in piena proliferazione senza alcun tipo di straticazione. Unità di misura della barra di riferimento: a,b,c = 50 μ m.

6.1.3. Sviluppo dell'occhio di *Cichlasoma nigrofasciatum* 4 giorni dopo la fecondazione.

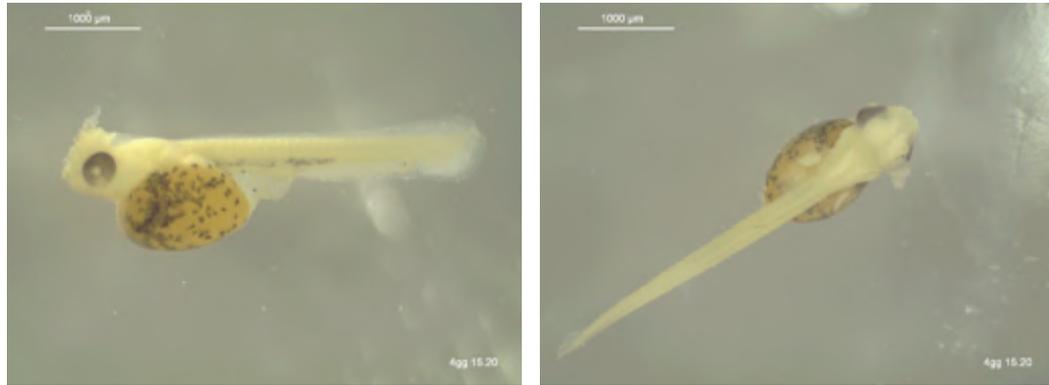


Fig. 42: Immagine laterale e dorsale di *Cichlasoma nigrofasciatum* 4 giorni dopo la fecondazione.

L'animale (Fig. 42) presenta l'abbozzo delle pinne e un capo ben sviluppato con occhi abbastanza grandi e pigmentati; è capace di alimentarsi nonostante la presenza di un sacco del tuorlo ancora molto sviluppato.

L'occhio (Fig. 43a) continua la sua crescita dimensionale (diametro medio dell'occhio = $148,66 \pm 20,53 \mu\text{m}$) e il cristallino ha quasi completato la sua differenziazione.

La retina (Fig. 43c) non appare ancora completamente stratificata ma si osserva un forte sviluppo dello strato pigmentato (area retinica media = $30566,23 \pm 1964 \mu\text{m}^2$; n. cellule retiniche = $585,43 \pm 176,32$).

Le mitosi (Fig. 43b) iniziano a concentrarsi a livello della zona marginale ciliare (MCZ) in numero leggermente superiore rispetto allo stadio precedente (n. mitosi medie = $29,53 \pm 3,15$), mentre le poche apoptosi (n. apoptosi medie = $2,66 \pm 0,27$) osservate compaiono nella retina prossimale (regione opposta al cristallino).

A questo stadio di sviluppo dell'animale sia l'indice mitotico (indice mitotico medio = $0,0040 \pm 0,005$) che l'indice apoptotico (indice apoptotico medio = $0,0037 \pm 0,0006$) hanno valori molto bassi rispetto ai conteggi cellulari effettuati sulla retina di *Cichlasoma nigrofasciatum* a 3 giorni dopo la fecondazione (Fig.51).

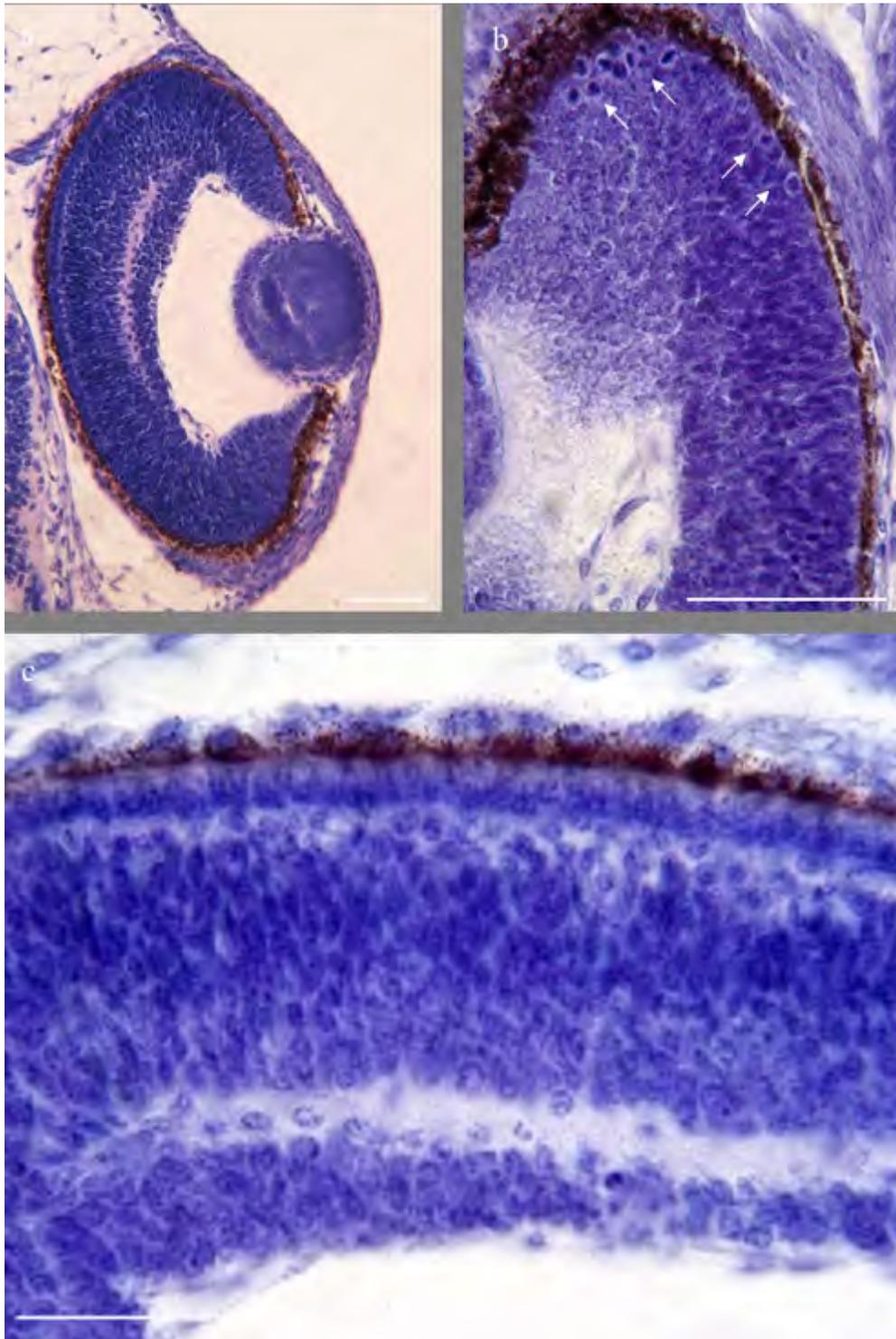


Fig. 43: Sezioni trasversali rappresentative della retina di *Cichlasoma nigrofasciatum*, 4 giorni dopo la fecondazione, colorate con ematossilina. a) visione generale dell'occhio; b) abbondanti mitosi (freccie) in tutta la retina; c) retina con accennato inizio di stratificazione. Unità di misura della barra di riferimento: a,b,c = 50 μ m.

6.1.4. Sviluppo dell'occhio di *Cichlasoma nigrofasciatum* 5 giorni dopo la fecondazione.

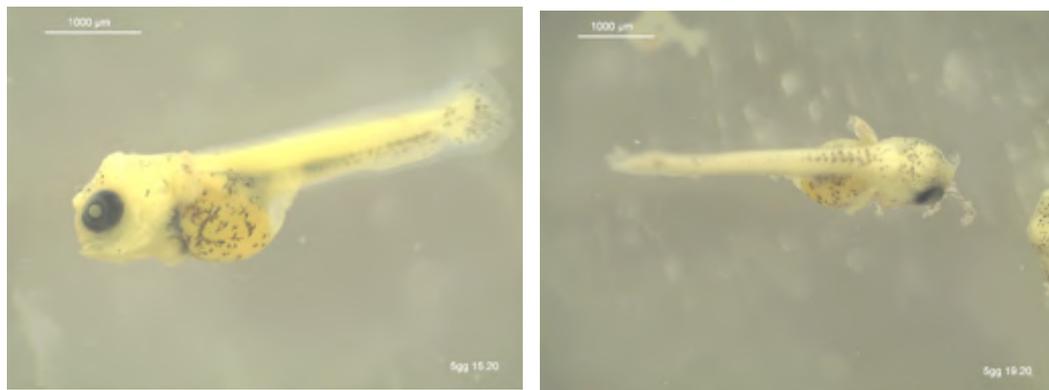


Fig. 44: Immagine laterale e dorsale di *Cichlasoma nigrofasciatum* 5 giorni dopo la fecondazione.

A questo stadio il *Cichlasoma nigrofasciatum* ha quasi completato il suo sviluppo anatomico, è autonomo nell'alimentazione e nel nuoto, ma sono ancora evidenti caratteristiche larvali, come le branchie esterne e il sacco del tuorlo (Fig. 44).

L'occhio (diametro medio dell'occhio = $203,33 \pm 5,65 \mu\text{m}$) appare già all'anatomia grossolana fortemente pigmentato, ciò che poi è meglio evidente all'analisi istologica (Fig. 45a). Il cristallino ha ormai completato la sua differenziazione e la stratificazione della retina (Fig. 45c) si estende fino a quasi la zona marginale ciliare (MCZ) (area retinica media = $46533,66 \pm 1,72 \mu\text{m}^2$); inoltre, gli elementi sensoriali cominciano ad approfondirsi nello strato pigmentato dell'occhio.

L'attività proliferativa è ristretta alla MCZ e da qui si estende fino a circa metà della retina (Fig. 45d), prevalentemente nello strato nucleare interno (INL), ma il numero di mitosi (n. mitosi medie = $14,13 \pm 1,72$) è più basso rispetto allo stadio precedente. Per contro le apoptosi (Fig. 45b) appaiono numericamente più abbondanti (n. apoptosi medie = $6,66 \pm 0,002$) e in proporzione al numero totale di cellule (n. cellule retiniche medie = $604,17 \pm 180,15$) danno il secondo picco apoptotico dello sviluppo della retina dell'animale (indice apoptotico medio = $0,0068 \pm 0,00073$).

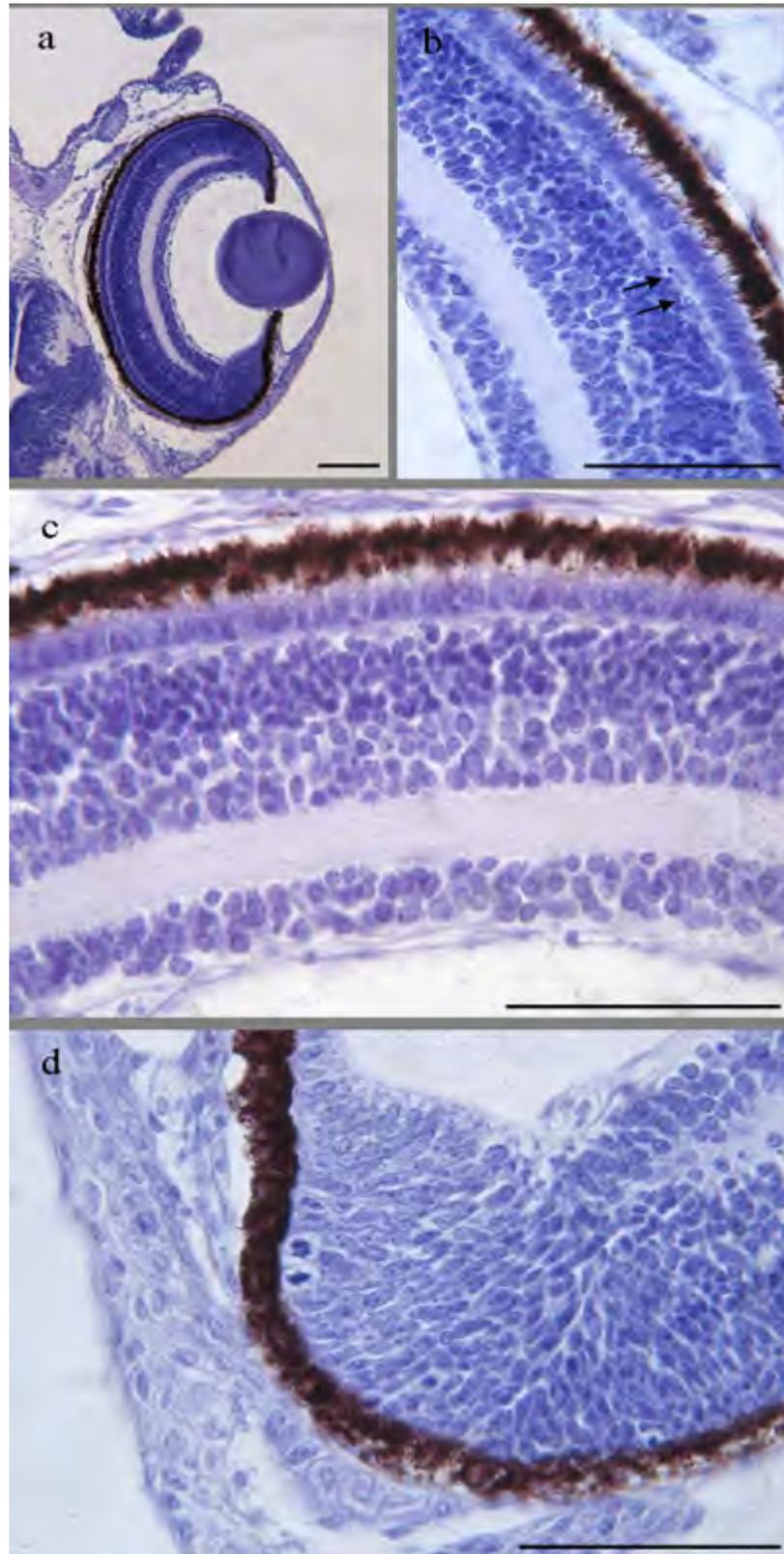


Fig. 45: Sezioni trasversali rappresentative della retina di *Cichlasoma nigrofasciatum*, 5 giorni dopo la fecondazione, colorate con ematossilina. a) visione generale dell'occhio; b) apoptosi presenti all'estremità dello strato nucleare interno (freccette); c) retina n con evidente stratificazione; d) mitosi nella zona marginale ciliare (freccette). Unità di misura della barra di riferimento: a,b,c = 50 μ m.

6.1.5. Sviluppo dell'occhio di *Cichlasoma nigrofasciatum* 6 giorni dopo la fecondazione.

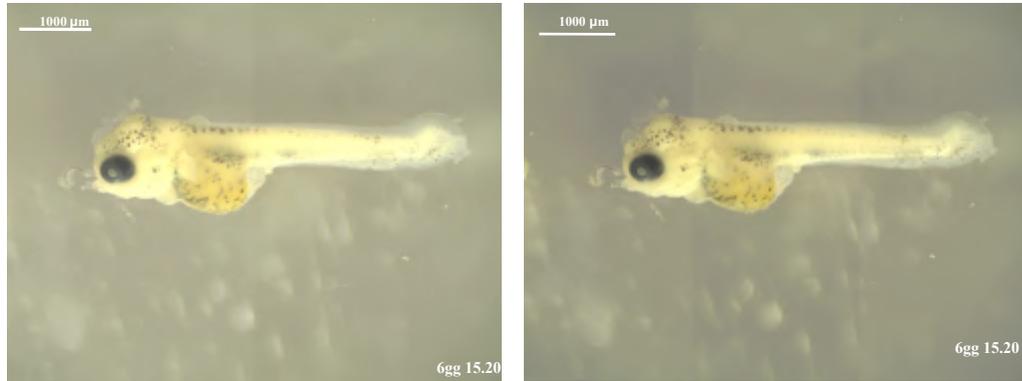


Figura 46: Immagine laterale e dorsale di *Cichlasoma nigrofasciatum* 6 giorni dopo la fecondazione.

L'avanotto, a 6 giorni dopo la fecondazione, nuota liberamente e ha un'alimentazione autonoma e sono bene evidenti le pinne dorsali e quella caudale. Anatomicamente presenta un occhio molto grande, con un evidente cristallino (Fig. 46).

L'occhio (Fig. 47a) presenta un aumento delle sue dimensioni (diametro medio dell'occhio = $218,33 \pm 14,68 \mu\text{m}$) e la retina è completamente stratificata (area retinica media = $52661,03 \pm 4841,24 \mu\text{m}^2$; n. cellule retiniche medie = $871,93 \pm 298,17$); infatti si distinguono tre strati: nucleare interno, nucleare esterno (che presenta già l'inizio della differenziazione degli elementi sensoriali) e lo strato gangliare (Fig. 47c).

L'attività mitotica (Fig. 47b) risulta diminuita (n. mitosi medie = $11,36 \pm 0,55$), rispetto allo stadio di sviluppo del giorno precedente (Fig. 50), (indice mitotico medio = $0,0095 \pm 0,0010$).

Per quanto riguarda il fenomeno apoptotico (indice apoptotico medio = $0,0022 \pm 0,0004$), esso è drasticamente diminuito (Fig. 51) e le figure apoptotiche sono sporadiche.

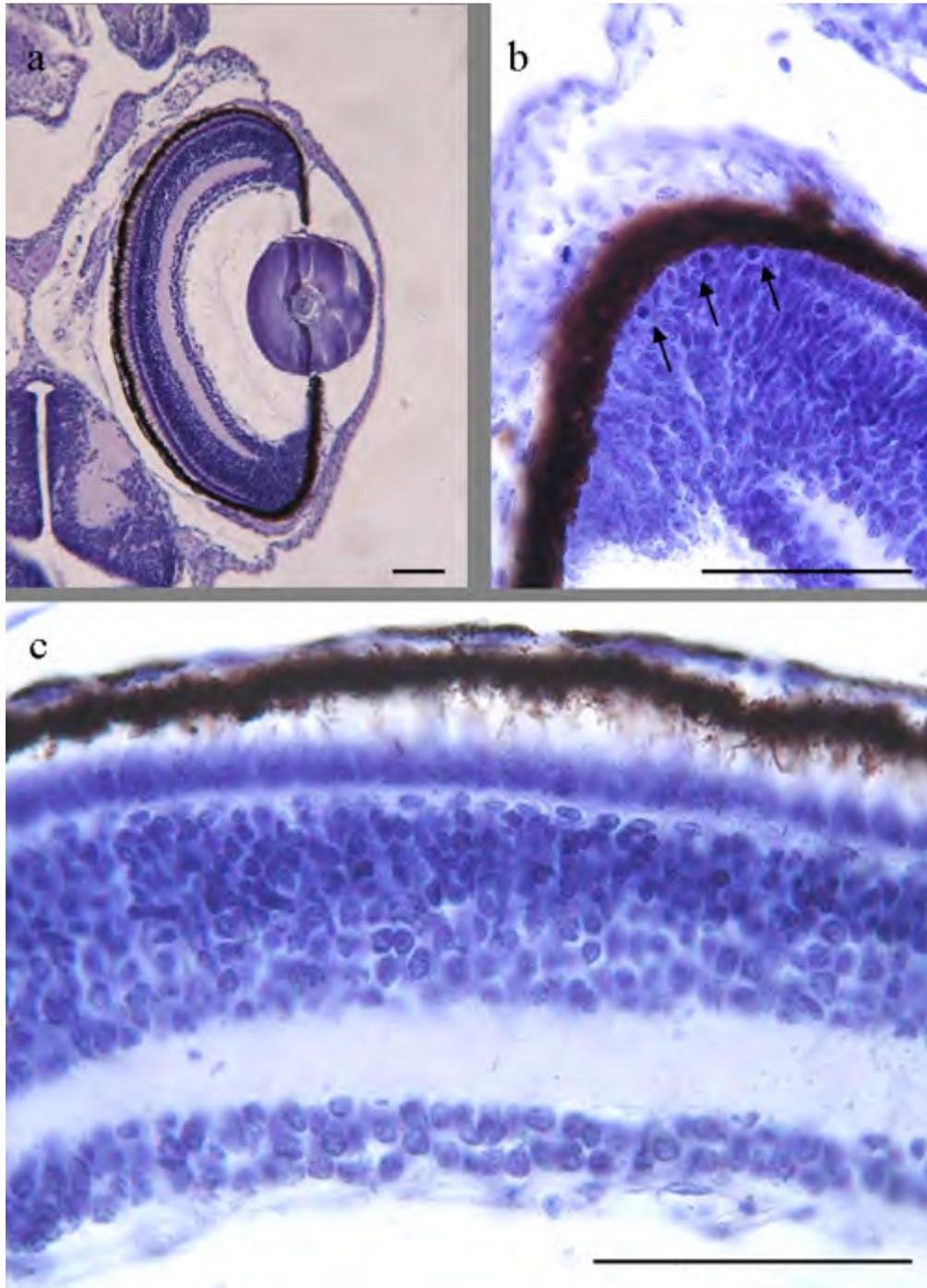


Fig. 47: Sezioni trasversali rappresentative della retina di *Cichlasoma nigrofasciatum*, 6 giorni dopo la fecondazione, colorate con ematossilina. a) visione generale dell'occhio; b) esempio di mitosi riscontrata in questo stadio (freccia); c) retina stratificazione. Unità di misura della barra di riferimento: a,b,c = 50 μ m.

6.1.6. Sviluppo dell'occhio di *Cichlasoma nigrofasciatum* 7 giorni dopo la fecondazione.

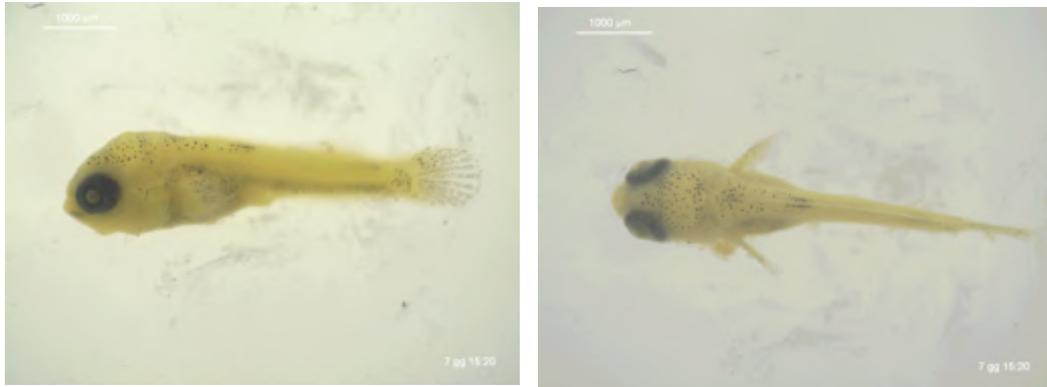


Fig. 48: Immagine laterale e dorsale di *Cichlasoma nigrofasciatum* 7 giorni dopo la fecondazione.

L'animale ormai nuota liberamente e si alimenta autonomamente. Il sacco del tuorlo è completamente riassorbito e le branchie sono coperte dall'opercolo e le pinne sono completamente differenziate (Fig. 48).

L'occhio (Fig. 49a) ha completato il suo sviluppo (diametro medio dell'occhio = $223,16 \pm 15,94 \mu\text{m}$); il cristallino appare molto grande e completamente differenziato.

Anche la retina (Fig. 49c) è completamente stratificata con uno strato pigmentato ben evidente, ma la sua area non cresce rispetto allo stadio precedente (area retinica media = $52483,2 \pm 2677,58 \mu\text{m}^2$; n. cellule retiniche medie = $858,63 \pm 274,33$).

Il numero di mitosi (n. mitosi medie = $7,8 \pm 0,74$) ed apoptosi (n. apoptosi medie = $1,2 \pm 0,26$) è molto basso, ciò indica una decisa diminuzione dell'attività proliferativa (indice mitotico medio = $0,00644 \pm 0,0009$) e di rimodellamento della retina (indice apoptotico medio = $0,00098 \pm 0,00021$), (Fig. 49b,d).

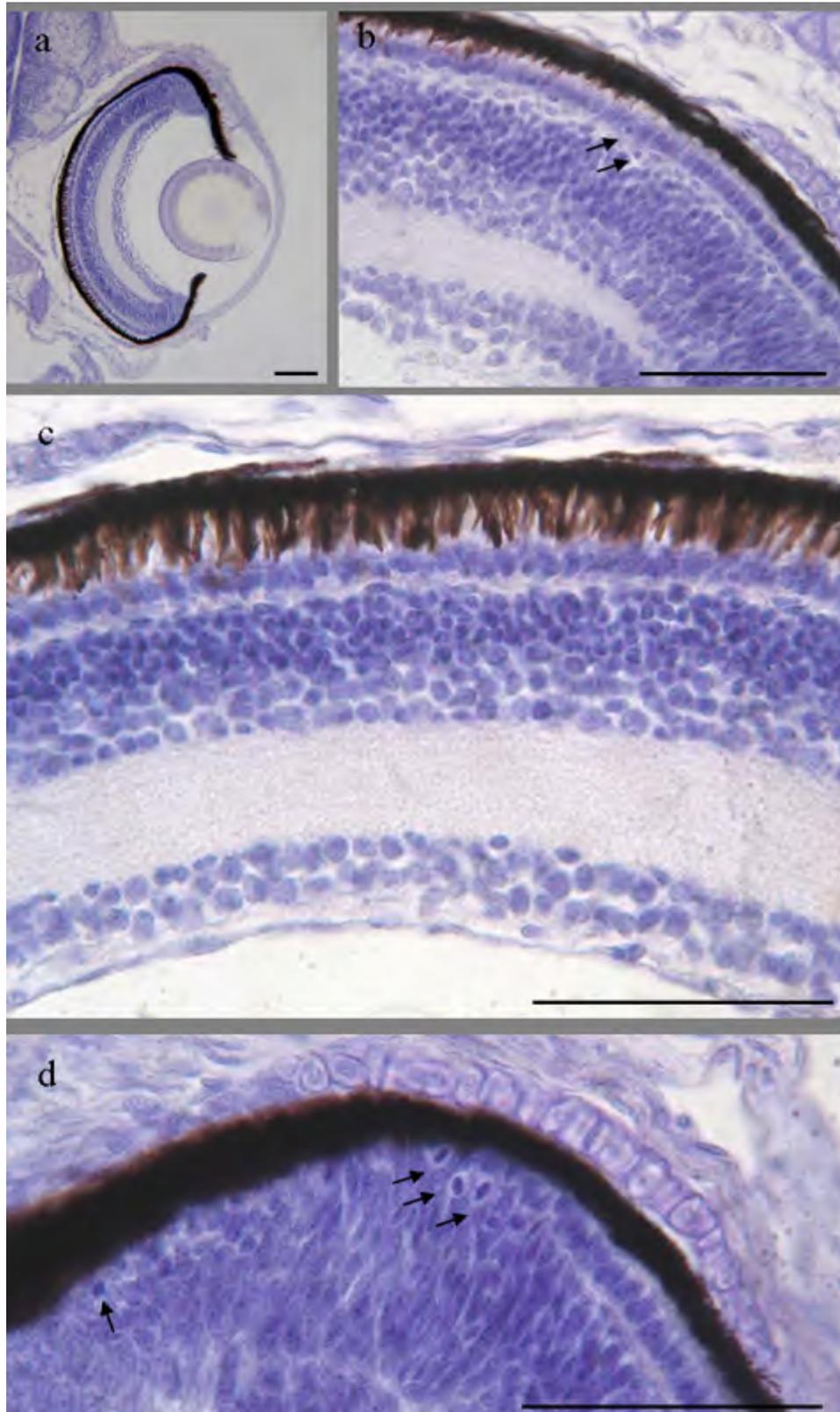


Fig. 49: Sezioni trasversali rappresentative della retina di *Cichlasoma nigrofasciatum*, 7 giorni dopo la fecondazione, colorate con ematossilina. a) visione generale dell'occhio; b) esempio di apoptosi riscontrata in questo stadio (freccette); c) retina stratificazione; d) mitosi nella zona marginale ciliare (freccette). Unità di misura della barra di riferimento: a,b,c = 50 μ m.

6.1.7. Risultati delle quantificazioni di mitosi ed apoptosi nella retina e delle stime morfologiche dell'occhio di *Cichlasoma nigrofasciatum*.

I risultati dei conteggi dell'area retinica media, da densità cellulare, del numero cellule totali, delle figure mitotiche ed apoptotiche in sezioni rappresentative, i relativi indici mitotici ed apoptoticie del diametro dell'occhio sono di seguito riportati nelle figure 50 e 51.

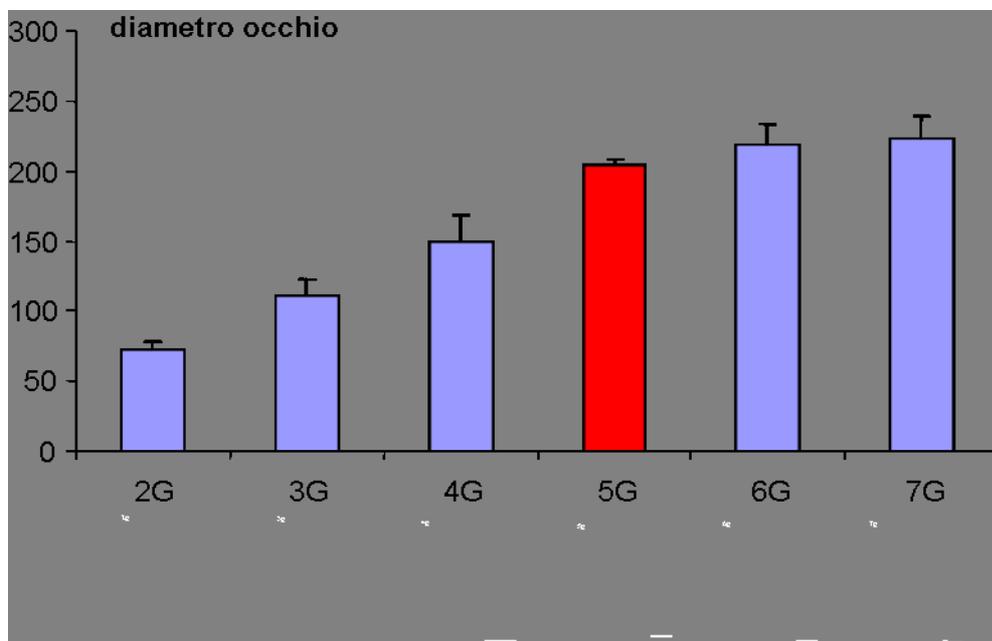


Fig. 50: visione grafica delle dimensioni dell'occhio di *Cichlasoma nigrofasciatum* nei vari giorni dello sviluppo (valori significativi evidenziati in rosso).

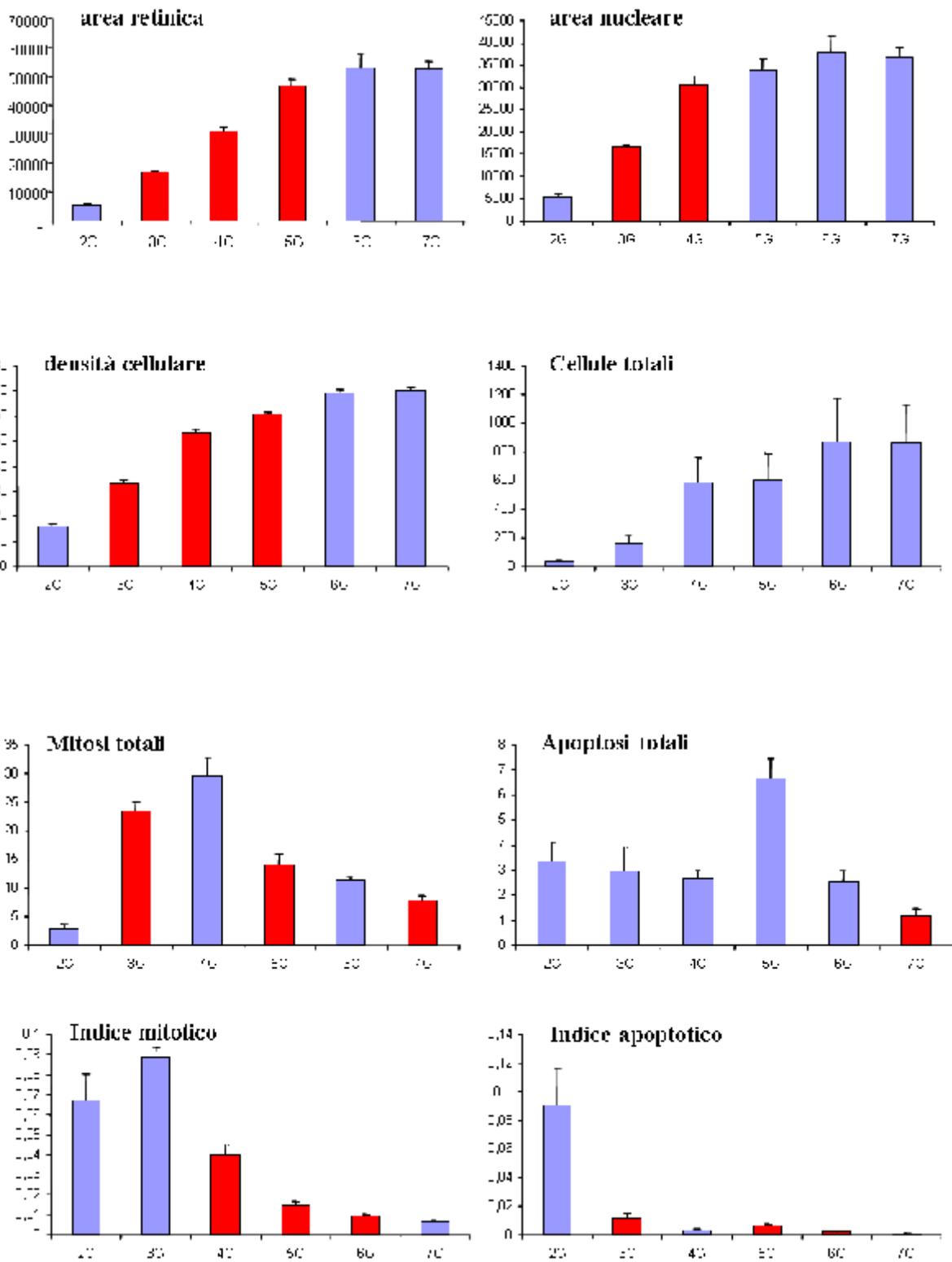
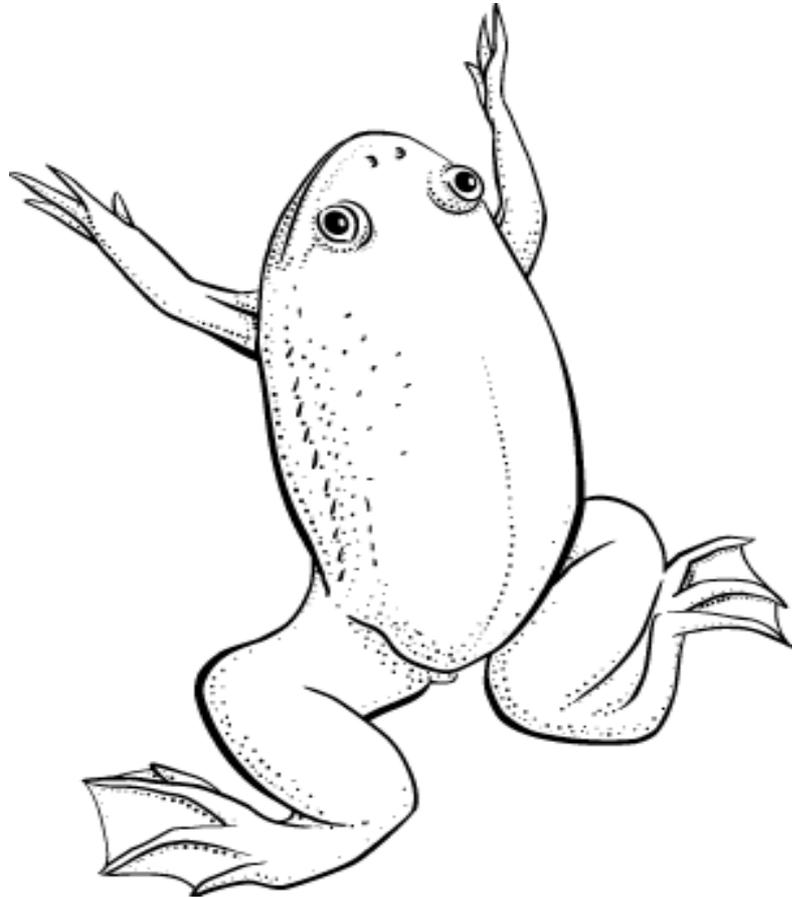


Fig. 51: visione grafica dell'aria retinica, area nucleare, densità cellulare, cellule totali, mitosi totali, apoptosi totali, indice mitotico, indice apoptotico, di *Cichlasoma nigrofasciatum* nei vari giorni di sviluppo (valori significativi evidenziati in rosso).

6.2. *Xenopus laevis*.



In *Xenopus laevis* è stato possibile analizzare sia lo sviluppo del sistema visivo sia quello olfattivo, utilizzando tecniche istologiche ed immunoistochimiche per l'osservazione del fenomeno proliferativo e apoptotico in entrambi i sistemi.

Sono stati analizzati embrioni e girini a diversi stadi di sviluppo in accordo con la tavola di sviluppo di Nieuwkoop e Faber (1956).

In particolare, sono stati considerati i seguenti stadi di sviluppo: 29, 33, 35, 37, 42, 44, 46, 49, 52, 53, 57, 59, 63, 66 (neometamorfosato), per ciascuno dei quali sono stati analizzati 6 campioni. Di questi 10 stadi sono stati esaminati per lo sviluppo dell'occhio e 6 per lo studio della mucosa olfattiva.

6.2.1. Sviluppo dell'occhio di *Xenopus laevis* allo stadio 29.

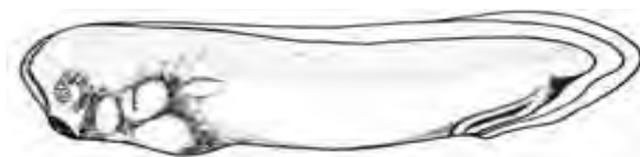


Fig. 52: Visione grafica di un girino allo stadio 29 di *Xenopus laevis*.

Questo stadio corrisponde ad un embrione allo stadi 29 (Fig. 52), prima della schiusa, che avviene allo stadio 38.

L'occhio (Fig. 53a) è in pieno sviluppo, infatti esso è costituito da un ammasso di cellule in attiva proliferazione, dove si osserva già l'abbozzo del cristallino (diametro medio dell'occhio = $40,95 \pm 2,86 \mu\text{m}$).

La retina, non ancora stratificata (area retinica medie = $31438,23 \pm 3127,85 \mu\text{m}^2$; n. cellule retiniche medie = $426 \pm 31,34$), è ricca di figure mitotiche (n mitosi medie = $8,97 \pm 1,01$) (Fig. 53b) e rare apoptosi (n. apoptosi medie = $0,47 \pm 0,25$).

In questo stadio si riscontra un indice mitotico (indice mitotico medio = $1 \pm 0,33$) molto alto (Fig. 90), mentre l'indice apoptotico ha un valore molto basso (indice apoptotico medio = $0,02 \pm 0,01$).

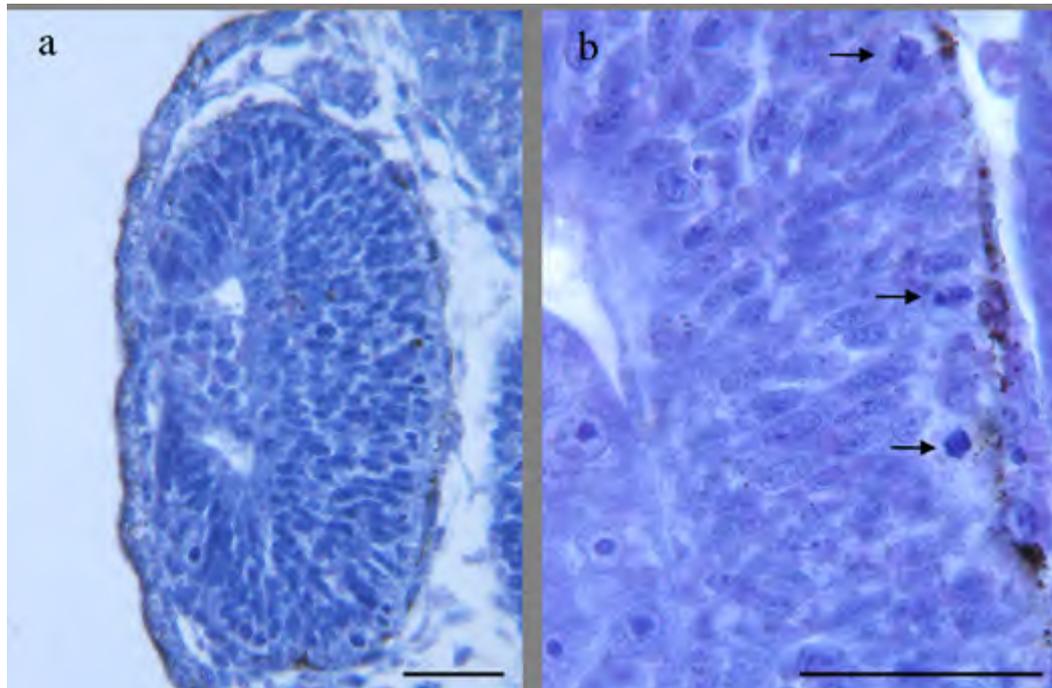


Fig. 53: Sezioni trasversali rappresentative della retina di *Xenopus laevis* allo stadio 29, colorate con ematossilina. a) occhio con cristallino in neoformazione; b) esempi di mitosi (freccia) a livello della retina. Unità di misura della barra di riferimento: a,b = 50 μ m.

6.2.2. Sviluppo dell'occhio di *Xenopus laevis* allo stadio 35.



Fig. 54: Visione grafica di un girino allo stadio 35 di *Xenopus laevis*.

A questo stadio si osserva un encefalo con un buon grado di differenziamento, pur essendo le diverse aree encefaliche largamente indeterminate (Fig. 54).

L'occhio (Fig. 55a) presenta un cristallino ben evidente; tuttavia, esso è ancora addossato alla retina, in quanto non è ancora, o è appena, iniziata la secrezione dell'umor vitreo (diametro medio dell'occhio = $55,2 \pm 19,2 \mu\text{m}$).

L'analisi immunohistochimica per la PCNA rileva una immunoreattività in tutta la retina, ma con maggiore concentrazione in prossimità della MCZ (Fig. 55c).

La retina (Fig. 55b) non appare stratificata (area retinica media = $30523,07 \pm 1461,01 \mu\text{m}^2$; n. cellule retiniche medie = $522,87 \pm 18,68$).

Il numero di figure mitotiche è ancora molto alto (n. mitosi medie = $8,17 \pm 0,28$), mentre le apoptosi sono molto rare (n. apoptosi medie = $0,01 \pm 0,0005$).

I conteggi relativi al numero di figure mitotiche ed apoptotiche rapportate alle cellule totali (Fig. 90) evidenziano una diminuzione sia dell'indice mitotico (indice mitotico medio = $0,19 \pm 0,02$) che dell'indice apoptotico (indice apoptotico medio = $0,01 \pm 0,0005$) rispetto allo stadio analizzato precedentemente.

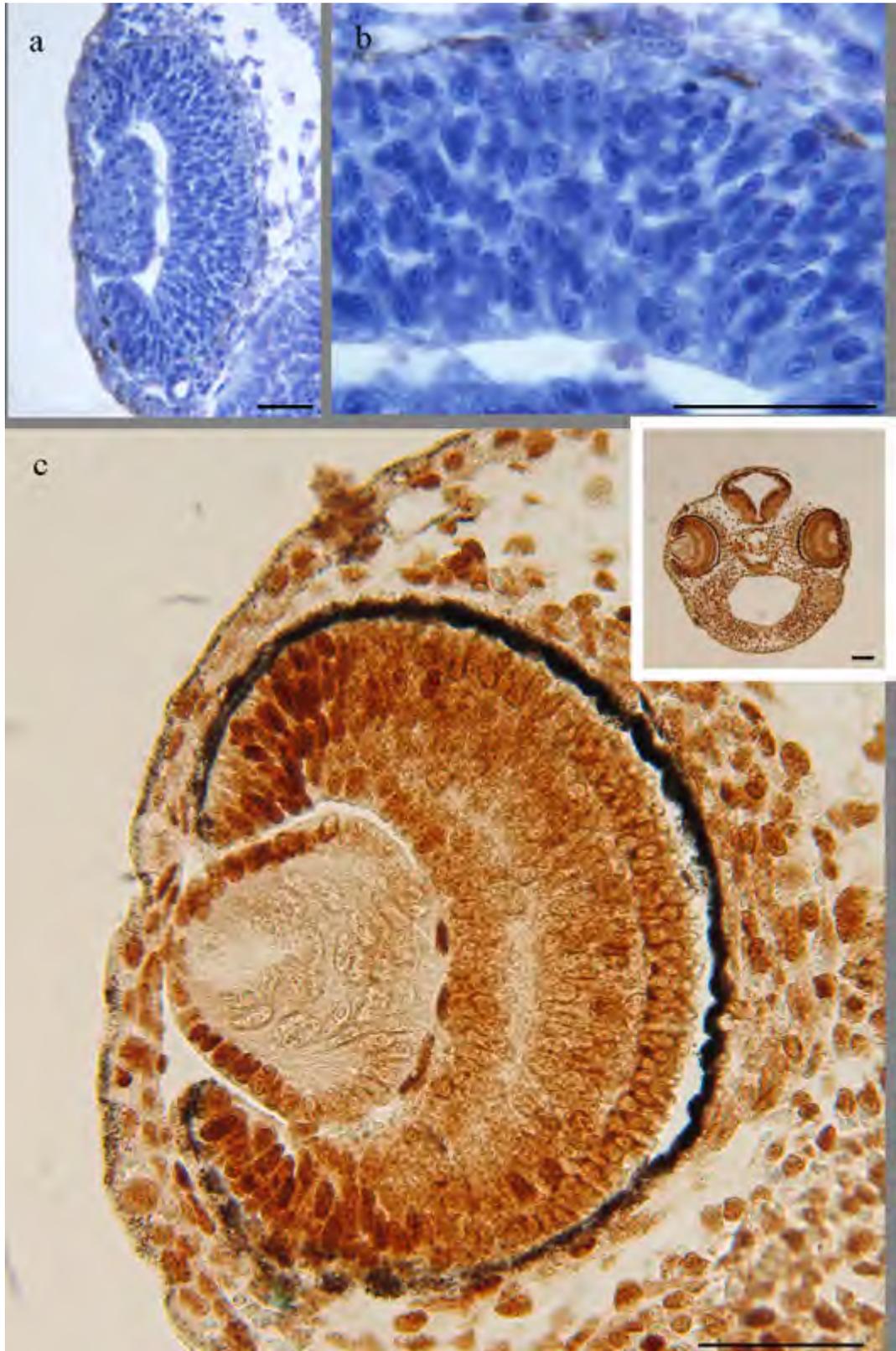


Fig. 55: Sezioni trasversali rappresentative della retina di *Xenopus laevis* allo stadio 35, colorate con ematossilina ed immunoistochimica per la PCNA. a) visione generale dell'occhio; b) retina non ancora stratificata; c) occhio immunoreattivo alla PCNA in tutte le sue regioni. Unità di misura della barra di riferimento: a,b,c = 50 μ m.

6.2.3. Sviluppo dell'occhio di *Xenopus laevis* allo stadio 42.



Fig. 56: Visione grafica di un girino allo stadio 42 di *Xenopus laevis*

A questo stadio il girino presenta una coda che gli permette il movimento in acqua ed un capo trasparente dove si possono osservare i vari organi in formazione (Fig. 56).

Il livello di differenziamento dell'encefalo ha quasi raggiunto la morfologia tipica di un adulto, anche se complessivamente è molto più piccolo.

L'occhio (Fig. 57a,c) continua a crescere secernendo sempre più umor vitreo (diametro medio dell'occhio = $52,8 \pm 1,47 \mu\text{m}$); in più, il cristallino assume un aspetto un po' più translucido e la retina inizia ad organizzarsi in strati (area retinica media = $40774,13 \pm 2402,54 \mu\text{m}^2$; n. cellule retiniche medie = $365,47 \pm 211$).

L'attività mitotica è drasticamente diminuita rispetto agli stadi precedenti (n. mitosi medie = $0,4 \pm 0,4$) mentre per quanto riguarda il fenomeno apoptotico (Fig. 57b), a questo stadio si osserva un'abbondanza di figure apoptotiche (n. apoptosi medie = $13,27 \pm 0,18$); ciò viene dimostrato anche dalla comparsa di un indice apoptotico (indice apoptotico medio = $0,2 \pm 0,01$) molto elevato mentre l'indice mitotico (indice mitotico medio = $0,01 \pm 0,001$) risulta più ridotto rispetto allo stadio precedente (Fig. 90).

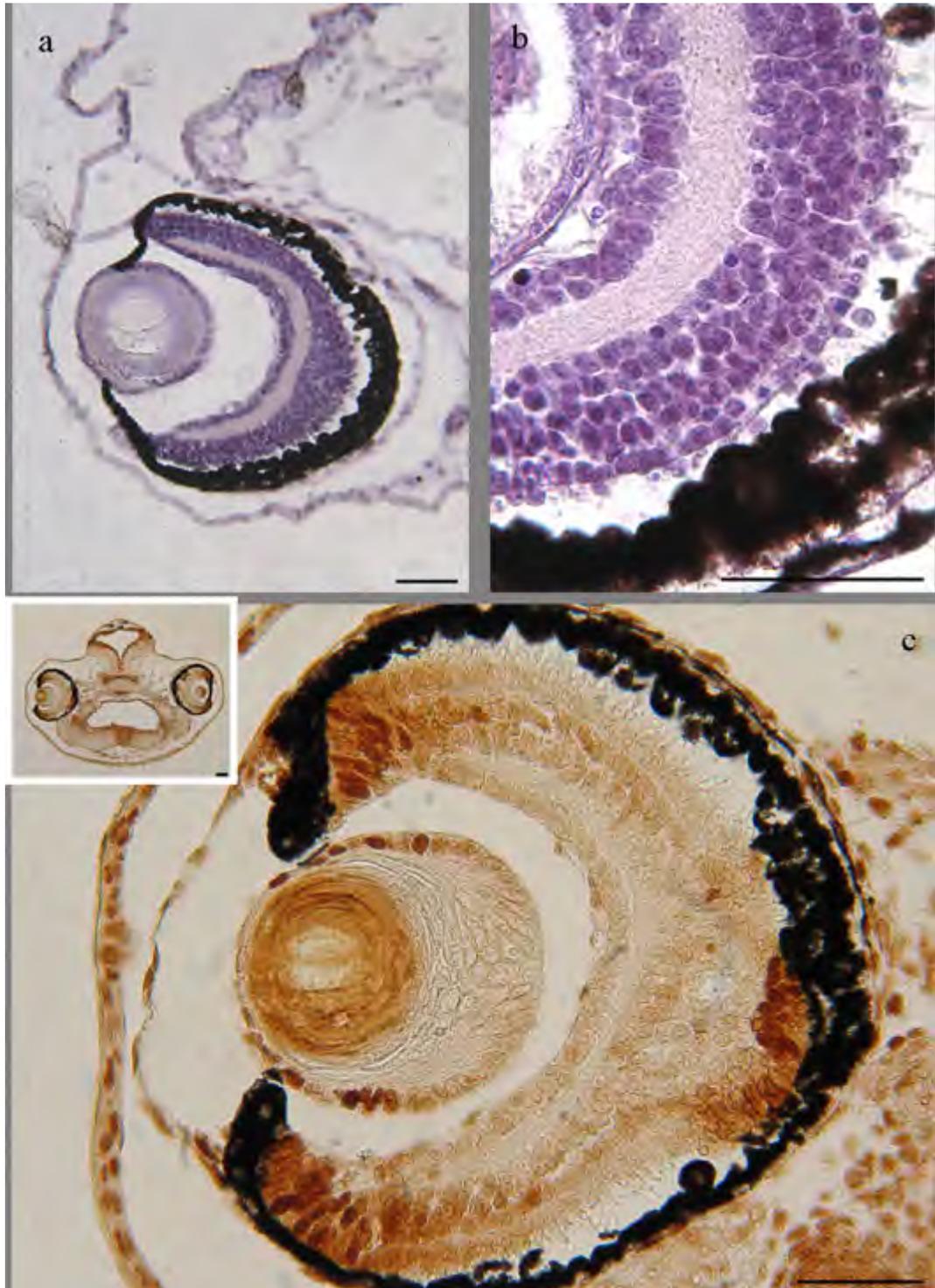


Fig. 57: Sezioni trasversali rappresentative della retina di *Xenopus laevis* allo stadio 42, colorate con ematossilina ed immunoistochimica per la PCNA. a) visione generale dell'occhio; b) apoptosi presenti in tutta la retina c) occhio immunoreattivo alla PCNA. Unità di misura della barra di riferimento: a,b,c = 50 μ m.

6.1.4. Sviluppo dell'occhio di *Xenopus laevis* allo stadio 44.

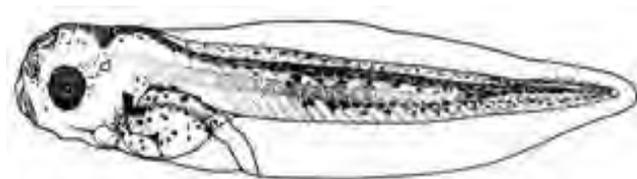


Fig. 58: Visione grafica di un girino allo stadio 44 di *Xenopus laevis*.

Anatomicamente il girino presenta una struttura molto simile allo stadio descritto precedentemente (Fig. 58).

L'occhio (Fig. 59a) continua a crescere in dimensioni e il cristallino ha completato la sua differenziazione (diametro medio dell'occhio = $51,58 \pm 1,11 \mu\text{m}$).

Nella retina (Fig. 59b), ormai stratificata si possono osservare i tre strati nucleari: strato nucleare esterno, strato nucleare interno, strato gangliare (area retinica media = $44432,87 \pm 3136,33 \mu\text{m}^2$; n. cellule retiniche medie = $433 \pm 36,81$).

Le figure mitotiche (n. mitosi medie = $1,1 \pm 0,55$) iniziano a concentrarsi nella zona marginale ciliare (MCZ), mentre si osserva una drastica diminuzione degli elementi apoptotici (n. apoptosi medie = $0,87 \pm 0,31$) in seguito all'evento apoptotico.

L'indice mitotico, calcolato a questo stadio di sviluppo resta pressochè invariato (indice mitotico medio = $0,01 \pm 0,01$) mentre l'indice apoptotico subisce una drastica diminuzione (indice apoptotico medio = $0,01 \pm 0,0005$).



Fig. 59: Sezioni trasversali rappresentative della retina di *Xenopus laevis* allo stadio 44, colorate con ematossilina ed immunoistochimica per la PCNA. a) visione generale dell'occhio; b) retina stratificata. Unità di misura della barra di riferimento: a,b = 50 μ m.

6.2.5. Sviluppo dell'occhio di *Xenopus laevis* allo stadio 46.

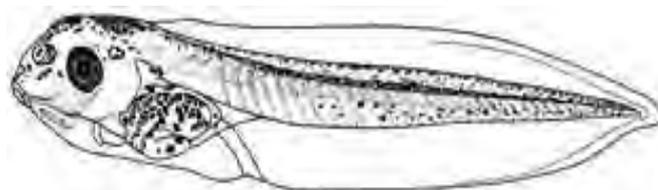


Fig. 60: Visione grafica di un girino allo stadio 46 di *Xenopus laevis*

A questo stadio il girino cresce in dimensioni e ha quasi completato tutto lo sviluppo degli organi interni; inoltre l'animale nuota e si alimenta autonomamente (Fig. 60).

L'occhio (Fig. 61a) continua a crescere in dimensione (diametro medio dell'occhio = $66,32 \pm 3,35 \mu\text{m}$) e la retina (Fig. 61b) è completamente stratificata (area retinica media = $47361,03 \pm \mu\text{m}^2$; n. cellule retiniche medie = $401 \pm 16,85$).

In questo stadio le figure mitotiche sono rarissime (n. mitosi medie = $0,2 \pm 0,07$), ciò è dimostrato anche da una debole attività PCNA-sica che si concentra solo nella zona marginale ciliare, e le apoptosi sono sparse ed in numero inferiore rispetto a quelle riscontrate allo stadio 44 (n. apoptosi medie = $1,07 \pm 0,3$).

Dai conteggi effettuati sulla retina (Fig. 90), l'indice mitotico, a questo stadio di sviluppo, è completamente azzerato mentre l'indice apoptotico resta pressochè invariato (indice apoptotico medio = $0,01 \pm 0,0001$).

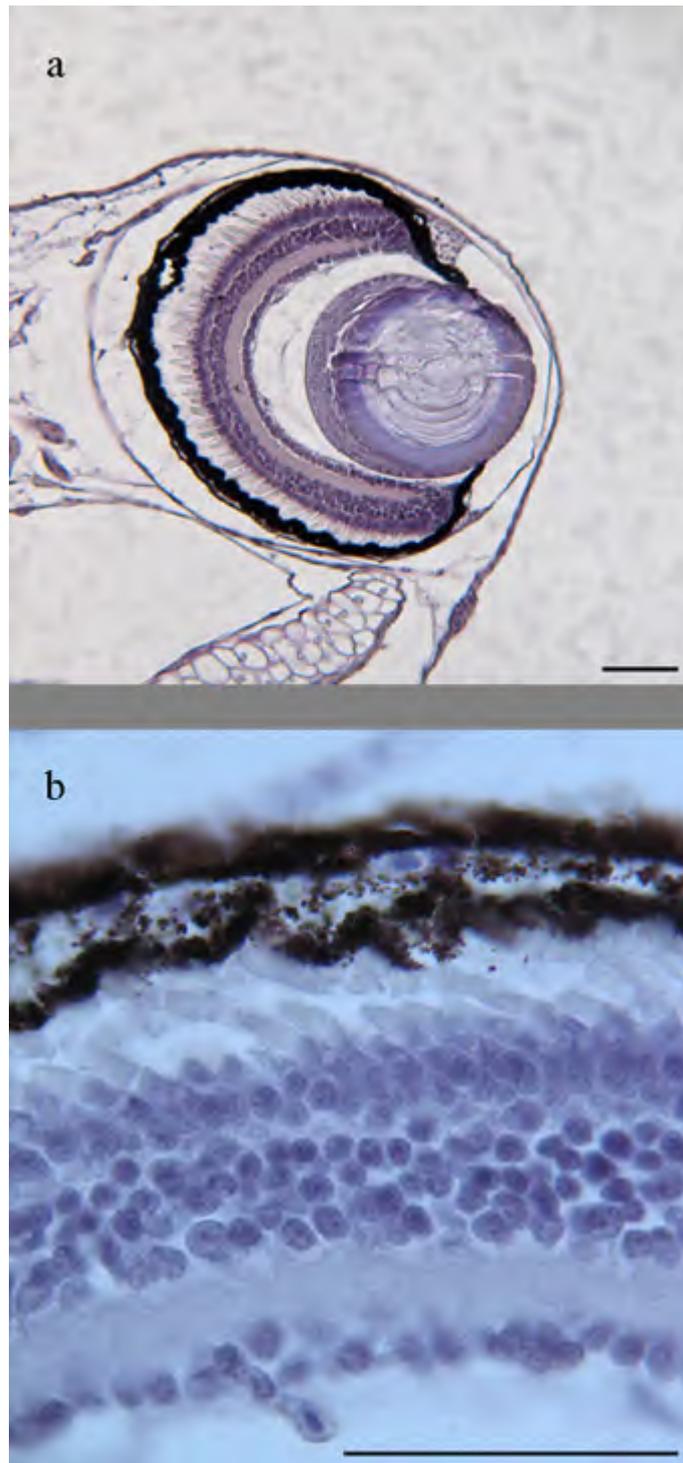


Fig. 61: Sezioni trasversali rappresentative della retina di *Xenopus laevis* allo stadio 46, colorate con ematossilina ed immunoistochimica per la PCNA. a) visione generale dell'occhio; b) retina stratificata. Unità di misura della barra di riferimento: a,b = 50 μm .

6.2.6. Sviluppo dell'occhio di *Xenopus laevis* allo stadio 49.

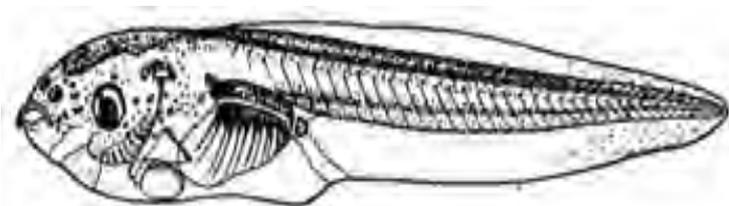


Fig. 62: Visione grafica di un girino allo stadio 49 di *Xenopus laevis*

Il girino inizia a crescere il capo e tutto il corpo inizia ad avere una pigmentazione più scura (Fig. 62).

L'occhio (Fig. 63a) continua ad aumentare (diametro medio dell'occhio = $125,72 \pm 6,34 \mu\text{m}$) ed a livello della retina (Fig. 63b), la stratificazione è ben definita (area retinica media = $86577,03 \pm 2008,27 \mu\text{m}^2$; n. cellule retiniche medie = $729,97 \pm 43,75$).

L'attività mitotica, ormai concentrata a livello della MCZ, come dimostrato in nuclei PCNA positivi esclusivamente presenti in questa regione prossimale al cristallino, inizia di nuovo ad aumentare (n. mitosi medie = $0,8 \pm 0,34$), rispetto allo stadio 46 mentre l'attività apoptotica continua a diminuire (n. apoptosi medie = $0,8 \pm 0,26$).

A questo stadio di sviluppo, inoltre, l'indice mitotico resta invariato (indice mitotico medio = $0,01 \pm 0,00001$) mentre l'indice apoptotico subisce una significativa diminuzione (indice apoptotico medio = $0,0001 \pm 0,0001$)



Fig. 63: Sezioni trasversali rappresentative della retina di *Xenopus laevis* allo stadio 46, colorate con ematossilina ed immunoistochimica per la PCNA. a) visione generale dell'occhio; b) retina stratificata. Unità di misura della barra di riferimento: a,b = 50 μ m.

6.2.7. Sviluppo dell'occhio di *Xenopus laevis* allo stadio 53.



Fig. 64: Visione grafica di un girino allo stadio 53 di *Xenopus laevis*.

L'encefalo ha ormai raggiunto la sua connotazione definitiva dal punto di vista della morfologia generale (Fig. 64).

Le varie aree del cervello sono ormai nettamente distinguibili; tuttavia molti dei nuclei encefalici sono ancora lontani dall'assetto strutturale dell'adulto.

L'occhio (diametro medio dell'occhio = $189,13 \pm 11,4 \mu\text{m}$) presenta una retina meglio organizzata (area retinica media = $125318,13 \pm 22017,84 \mu\text{m}^2$; n. cellule retiniche medie = $1414,4 \pm 59,12$) e il cristallino presenta, come negli strati precedenti, un'intensa attività PCNA in una regione della retina che contorna il cristallino (Fig. 65).

Tale attività si estingue piuttosto bruscamente allontanandosi dal cristallino. Un'altra area in cui sono presenti cellule PCNA immunoreattive nella retina è la zona di emergenza del nervo ottico.

La forte attività mitotica (n. mitosi medie = $1,5 \pm 0,53$) in queste regioni è dimostrata da un aumento dell'indice mitotico (indice mitotico medio = $0,03 \pm 0,003$) rispetto allo stadio precedente, mentre le figure apoptotiche (n. apoptosi medie = $0,5 \pm 0,28$) e il relativo indice apoptotico (indice apoptotico medio = $0,0001 \pm 0,00001$) mostrano un andamento con valori molto bassi rispetto allo stadio precedente.



Fig. 65: Visione della zona marginale ciliare immunoreattiva alla PCNA nella retina di *Xenopus laevis* allo stadio 53. Unità di misura della barra di riferimento: 50 μ m.

6.2.8. Sviluppo dell'occhio di *Xenopus laevis* allo stadio 59.

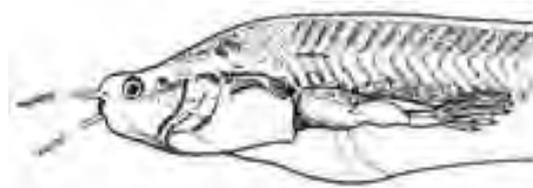


Fig. 66: Visione grafica di un girino allo stadio 53 di *Xenopus laevis*.

L'encefalo presenta un livello di differenziamento piuttosto simile a quello dello stadio precedente. Diversi nuclei encefalici cominciano a prendere la loro forma definitiva (Fig. 66).

L'occhio (diametro medio dell'occhio = $202,3 \pm 18,11\mu\text{m}$) si presenta con una maggior quantità dei umor vitreo e pertanto il cristallino appare molto più lontano dalla retina (area retinica media = $205956,43 \pm 4320,31\mu\text{m}^2$; n. cellule retiniche medie = $1711,57 \pm 74,76$) (Fig. 67b).

Nell'occhio cellule PCNA immunoreattive sono localizzate esclusivamente nella regione che circonda il cristallino (Fig. 67a).

Nel cristallino sono poche le cellule PCNA positive; esse sono sempre disposte alla periferia dell'organo e diminuiscono la loro intensità di colorazione progressivamente dalla regione circolare prossima all'inizio della retina alla sua parte più interna più bassa. In più questi elementi PCNA positivi hanno un'intensità più bassa se comparata a quella degli stadi esaminati in precedenza.

In questo stadio si osserva, inoltre un aumento delle figure mitotiche (n. mitosi medie = $2,73 \pm 0,6$) ed una diminuzione di quelle apoptotiche (n. apoptosi medie = $2,23 \pm 0,3$). Per contro, l'indice mitotico subisce una diminuzione (indice mitotico medio = $0,01 \pm 0,0001$) mentre si riscontra un aumento significativo dell'indice apoptotico (indice apoptotico medio = $0,01 \pm 0,0001$) (Fig. 67c,d).

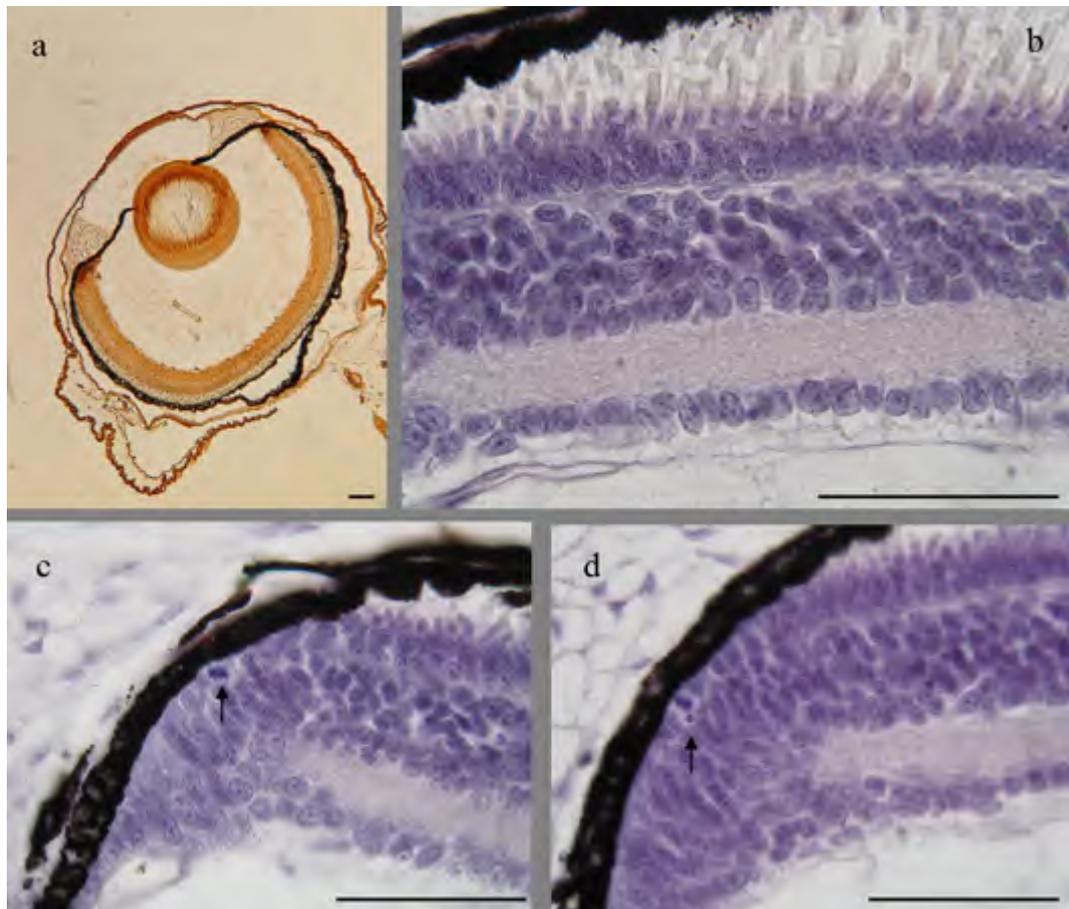


Fig. 67: Sezioni trasversali rappresentative della retina di *Xenopus laevis* allo stadio 59, colorate con ematossilina ed immunoistochimica per la PCNA. a) visione generale dell'occhio immunoreattivo alla PCNA; b) stratificazione della retina; c,b) apoptosi e mitosi presenti in tutta la retina. Unità di misura della barra di riferimento: 50 μm .

6.2.9. Sviluppo dell'occhio di *Xenopus laevis* allo stadio 63 .

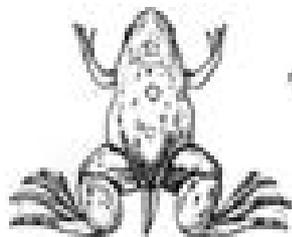


Fig. 68: Visione grafica di un girino allo stadio 63 di *Xenopus laevis*

L'aspetto morfologico dell'encefalo a questo stadio appare sostanzialmente molto simili allo stadio descritto con dettaglio precedentemente. L'animale è prossimo alla metamorfosi e presenta un capo molto ridotto nelle dimensioni, mentre la coda viene man mano riassorbita (Fig. 68).

Le dimensioni dell'occhio sono ormai stabili (diametro medio dell'occhio = $225,81 \pm 7,64 \mu\text{m}$) e la retina stratificata presenta degli elementi fotosensibili ben evidenti e grandi (area retinica media = $186346,47 \pm 14719,59 \mu\text{m}^2$; n. cellule retiniche medie = $2238,1 \pm 172,12$).

L'attività mitotica (n. mitosi medie = $3,36 \pm 0,94$; indice mitotico medio = $0,02 \pm 0,0001$) è circoscritta alla zona marginale ciliare (MCZ) mentre si osserva una forte attività apoptotica (n. apoptosi medie = $10,07 \pm 1,21$) dimostrata da un picco apoptotico (indice apoptotico medio = $0,04 \pm 0,01$) (Fig. 69) che si verifica a questo stadio (Fig. 90).

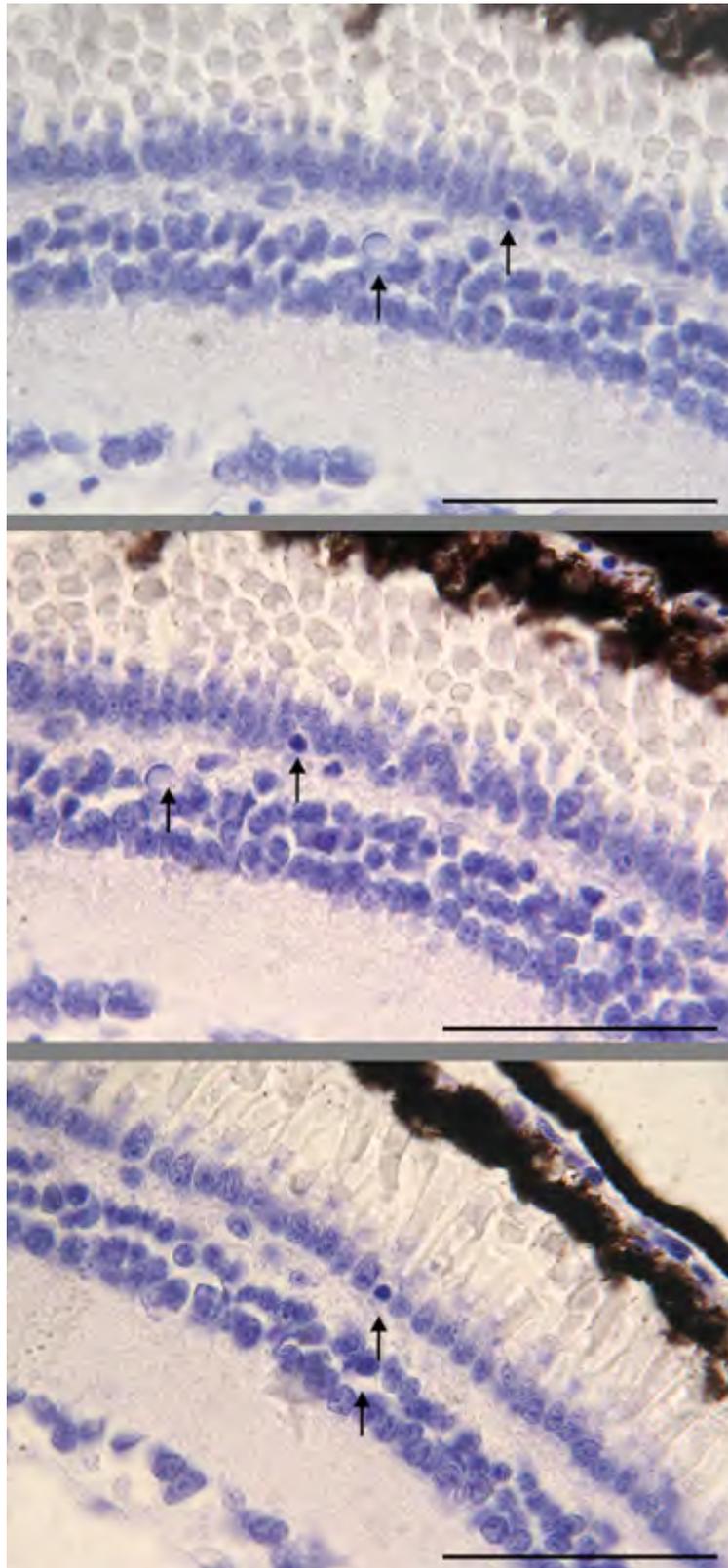


Fig. 69: Sezioni trasversali rappresentative delle apoptosi (freccie) presenti nella retina di *Xenopus laevis* allo stadio 63, colorate con ematossilina. Unità di misura della barra di riferimento: 50 μm .

6.2.10. Sviluppo dell'occhio di *Xenopus laevis* allo stadio 66.

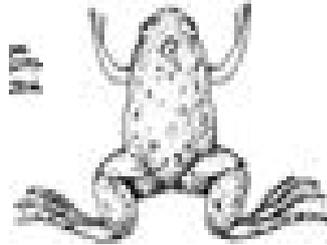


Fig. 70: Visione grafica di un girino allo stadio 66 di *Xenopus laevis*

A questo stadio si verifica la metamorfosi dell'anfibio con il completo riassorbimento della coda (Fig. 70).

L'occhio (Fig. 71) ha pressapoco le stesse dimensioni dello stadio precedente (diametro medio dell'occhio = $250,5 \pm 3,97\mu\text{m}$) e la retina si presenta ben stratificata e differenziata, i coni e i bastoncelli sono ben evidenti e rivolti verso il fondo del globo oculare (area retinica media = $154187,27 \pm 27460,49 \mu\text{m}^2$; n. cellule retiniche medie = $1812 \pm 67,52$).

Nell'occhio l'attività PCNASica è quasi esclusivamente confinata alle regioni della retina più prossime al cristallino, e il numero di cellule immunoreattive è vistosamente più basso rispetto agli stadi precedenti, mentre nel cristallino esse sono rare e periferiche.

Le figure apoptotiche risultano in numero minore rispetto allo stadio precedente (n mitosi medie = $1 \pm 0,31$), lo stesso andamento si osserva per il relativo indice mitotico (indice mitotico medio = $0,02 \pm 0,01$). Invece l'attività apoptotiche tende a diminuire in maniera significativa in seguito al picco apoptotico che si verifica allo stadio 63 (n. apoptosi medie = $1,97 \pm 0,15$; indice apoptotico medio = $0,01 \pm 0,0005$).

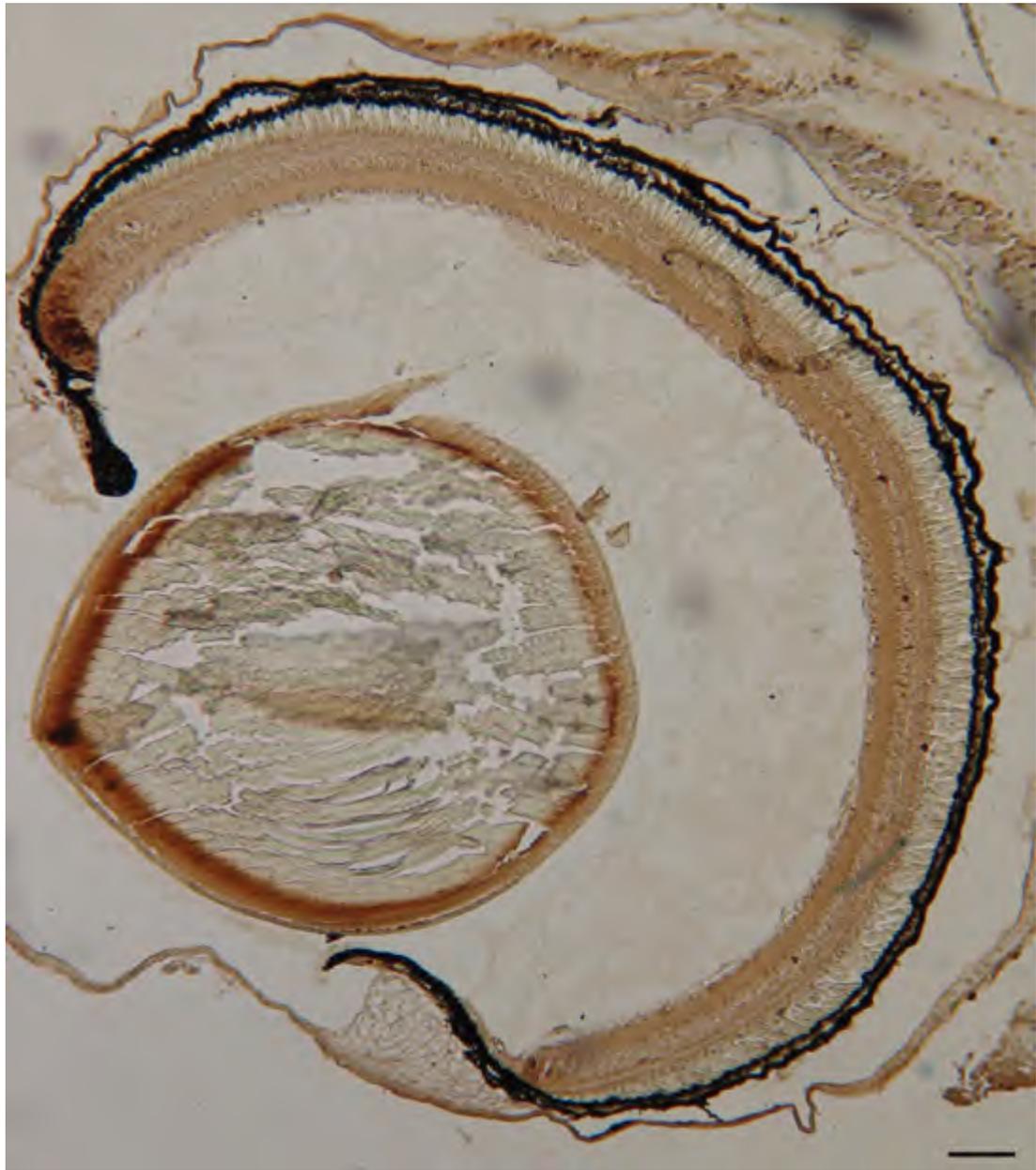


Fig. 71: Visione dell'occhio immunoreattivo alla PCNA nella retina di *Xenopus laevis* allo stadio 66. Unità di misura della barra di riferimento: 50 μ m.

6.2.11. Sviluppo della mucosa olfattiva dello *Xenopus laevis* allo stadio 33.



Fig. 72: Visione grafica di un girino allo stadio 33/34 di *Xenopus laevis*

Questo stadio corrisponde ad un embrione prima della schiusa (Fig. 72). Il placode olfattivo è costituito da ammassi di cellule omogenee senza strutture differenziate.

La maggior parte dei neuroni PCNA risultano generalmente immunoreattivi in tutti i tessuti presenti nella sezione (Fig. 73).

I placodi olfattivi e ottici presentano tutti i nuclei PCNA immunoreattivi (PCNA-ir) senza alcuna zonazione, ma quelli con diversa intensità dell'immunocolorazione sono casualmente mescolati. Durante gli stadi successivi la situazione resta piuttosto statica.

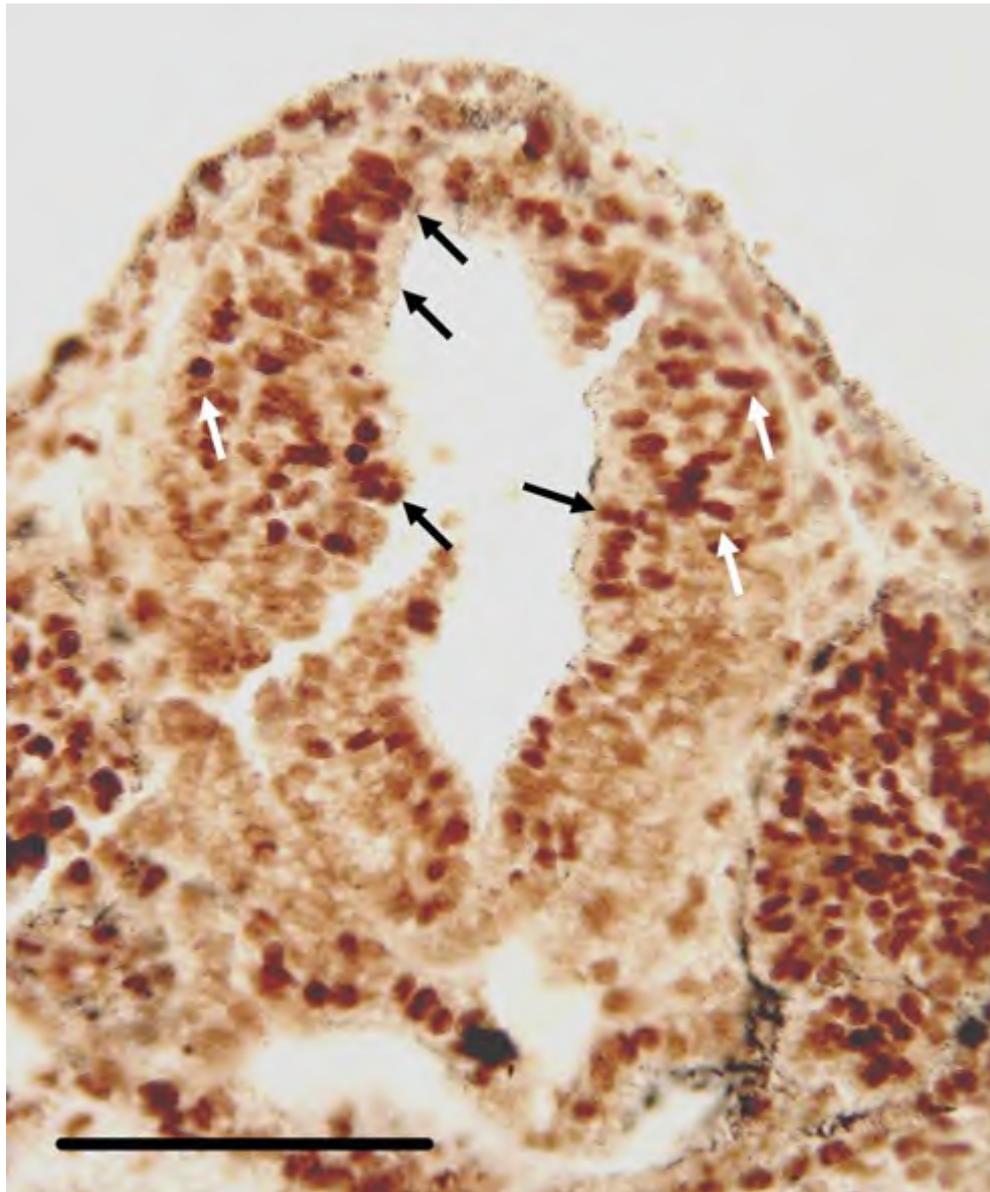


Fig. 73: Neuroni PCNA-ir in un girino allo stadio 33/34. Sezione frontale. Nuclei positivi intorno alle cavità neuroepiteliali (freccie nere). Nuclei positivi in posizione distale rispetto al neuroepitelio (freccie bianche). Unità di misura della barra di riferimento: 100 μ m.

6.2.12. Sviluppo della mucosa olfattiva dello *Xenopus laevis* allo stadio 37/38.

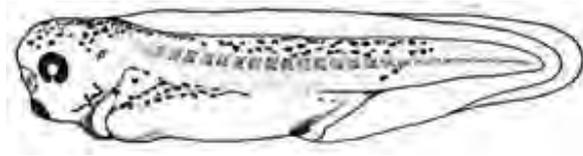


Fig. 74: Visione grafica di un girino allo stadio 37/38 di *Xenopus laevis*.

L'encefalo presenta un maggior grado di differenziamento, pur restando le diverse aree encefaliche largamente indeterminate (Fig.74). Il placode olfattivo non progredisce rispetto agli stadi precedenti. Esso non è ancora invaginato, ma appare come un'unica massa cellulare tondeggiante.

Tutti i nuclei del placode olfattivo risultano colorati, alcuni con maggiore intensità altri meno, lo stesso accade per gli altri tessuti visibili nella sezione.

Gli stadi successivi vedono una lieve progressione nello sviluppo con la tendenza dei nuclei PCNA-ir ad organizzarsi maggiormente in prossimità dei ventricoli encefalici. Il placode olfattivo comincia ad invaginarsi, mentre l'attività PCNASica tende a concentrarsi basalmente (Fig. 75)



Fig. 75: Sezione orizzontale di un girino allo stadio 39. Invaginazione del placode olfattivo. I nuclei PCNA-ir tendono a concentrarsi a livello basale (freccie). Unità di misura della barra di riferimento: 100 μm , inserto 200 μm .

6.2.13. Sviluppo della mucosa olfattiva dello *Xenopus laevis* allo stadio 42.

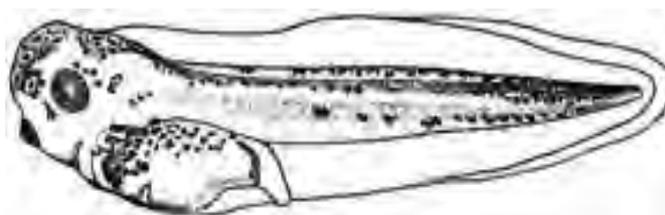


Fig. 76: Visione grafica di un girino allo stadio 42 di *Xenopus laevis*.

Il livello di differenziamento dell'encefalo ha quasi raggiunto la morfologia tipica dell'adulto, anche se complessivamente è molto più piccolo (Fig. 76). La mucosa olfattiva si presenta molto invaginata medialmente; inoltre, è presente una camera aggiuntiva nettamente distinta dalla cavità principale, ma in collegamento con essa che rappresenta il primordio dell'organo vomeronasale.

La mucosa olfattiva presenta attività PCNA-sica generalizzata. Tuttavia, la camera principale presenta una maggiore quantità di nuclei PCNA-ir in prossimità delle regioni basali e meno verso il lume. Il primordio dell'organo vomeronasale, per contro, mostra cellule più intensamente immunocolorate e omogeneamente distribuite per tutto l'organo (Fig. 77).

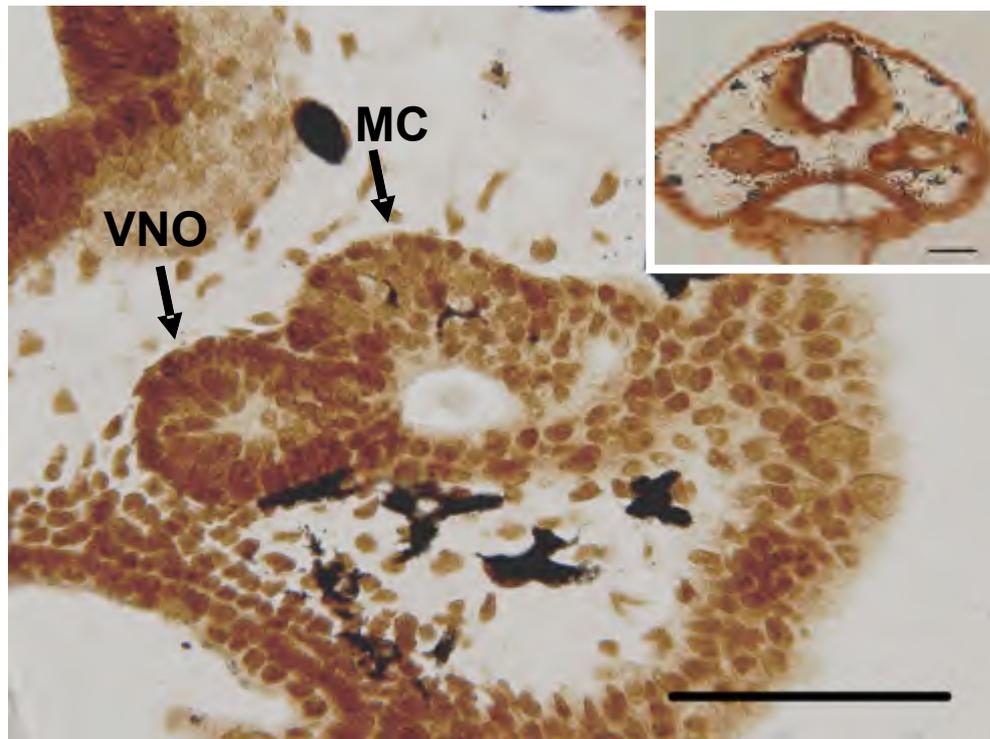


Fig. 77: Sezione frontale di un girino allo stadio 42 a livello della mucosa olfattiva. La camera principale (mediale, MC) presenta una maggiore quantità di nuclei PCNA-ir in prossimità delle regioni basali e meno verso il lume. Il primordio dell'organo vomeronasale (VNO) mostra cellule più intensamente immunocolorate e omogeneamente distribuite per tutto l'organo. Unità di misura della barra di riferimento: 100 μm , inserto 100 μm .

6.2.14. Sviluppo della mucosa olfattiva dello *Xenopus laevis* allo stadio 52.

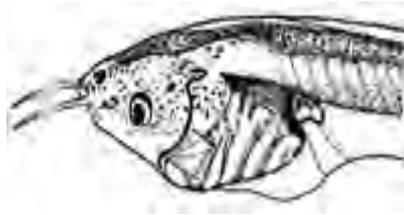


Fig. 78: Visione grafica di un girino allo stadio 52 di *Xenopus laevis*.

L'encefalo ha ormai raggiunto la sua connotazione definitiva dal punto di vista della morfologia generale (Fig. 78).

Il cervello si è molto allungato in senso anteroposteriore, cosicché i nervi olfattivi appaiono molto lunghi.

L'occhio presenta una retina meglio organizzata mentre la mucosa olfattiva si presenta più articolata, presentando un'evidente primordio della camera laterale la quale origina dalla principale.

Gli organi olfattivi presentano tutti un'attività PCNASica molto spinta, ma principalmente localizzata nelle regioni basali delle mucose (Fig. 79).

Gli stadi successivi sono caratterizzati da una generale diminuzione dell'attività PCNASica e da un progressivo differenziamento delle camere della mucosa olfattiva che tendono a ramificarsi mentre l'occhio si accresce in dimensioni.

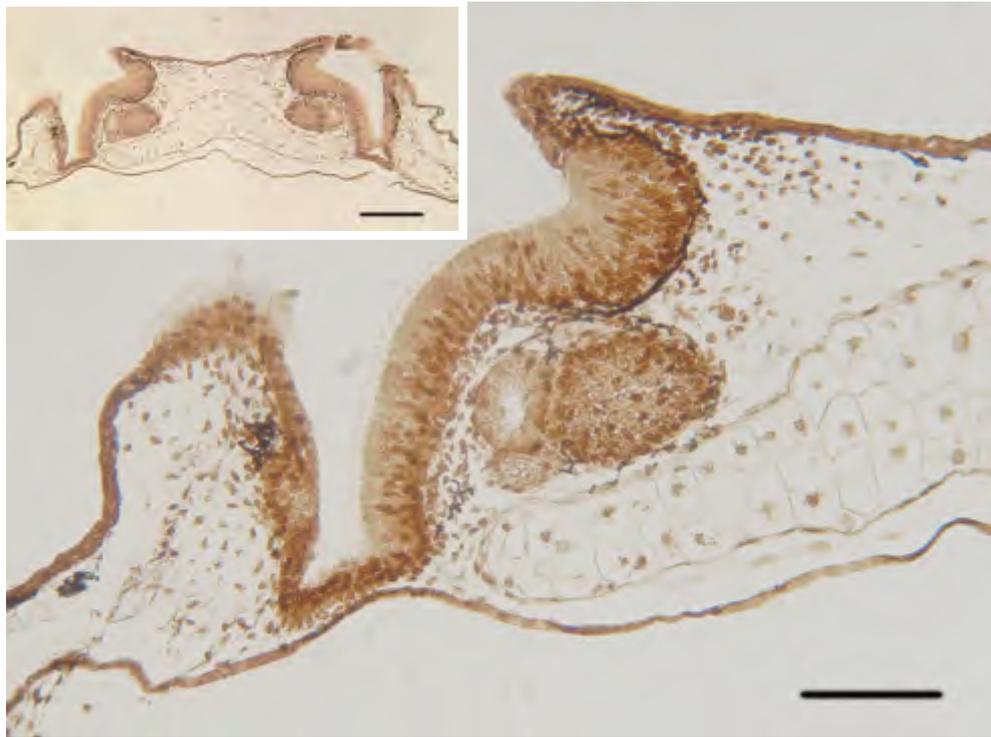


Fig 79: Sezione frontale di un girino allo stadio 52. Intensa attività PCNA a livello delle mucose olfattive principalmente localizzata nelle regioni basali. Unità di misura della barra di riferimento: 100 μm , inserto 200 μm .

6.2.15. Sviluppo della mucosa olfattiva dello *Xenopus laevis* allo stadio 57.

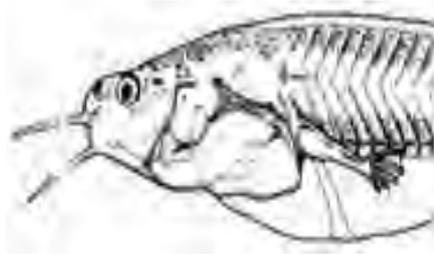


Fig. 80: Visione grafica di un girino allo stadio 57 di *Xenopus laevis*.

Il girino (Fig. 80) presenta un encefalo un livello di differenziamento piuttosto simile a quello dello stadio precedente (Fig. 83-84).

La camera olfattiva presenta tre cavità in collegamento tra di loro. Una camera principale, più mediale, una camera laterale, ormai ben evidente, che ha iniziato a formarsi nello stadio 50. Al di sotto di essa è alloggiato l'organo vomeronasale, anch'esso collegato mediante un dotto con la camera principale. Questo sistema di cavità è collegato con l'esterno solo mediante le narici, in quanto le coane non si sono ancora aperte.

L'attività PCNA-sica nel cervello è drammaticamente ridotta cosicché le cellule sono generalmente sparse nelle regioni ventricolari con qualche eccezione in cui l'attività PCNA-sica rimane ancora molto evidente.

Le cellule PCNA-ir a livello del sistema olfattivo sono più numerose e intensamente colorate nella camera mediale, rispetto alla camera laterale, specialmente nella sua regione più anteriore. Nell'organo vomeronasale, per contro, ci sono solo rari nuclei PCNA-ir (Fig. 81-82).

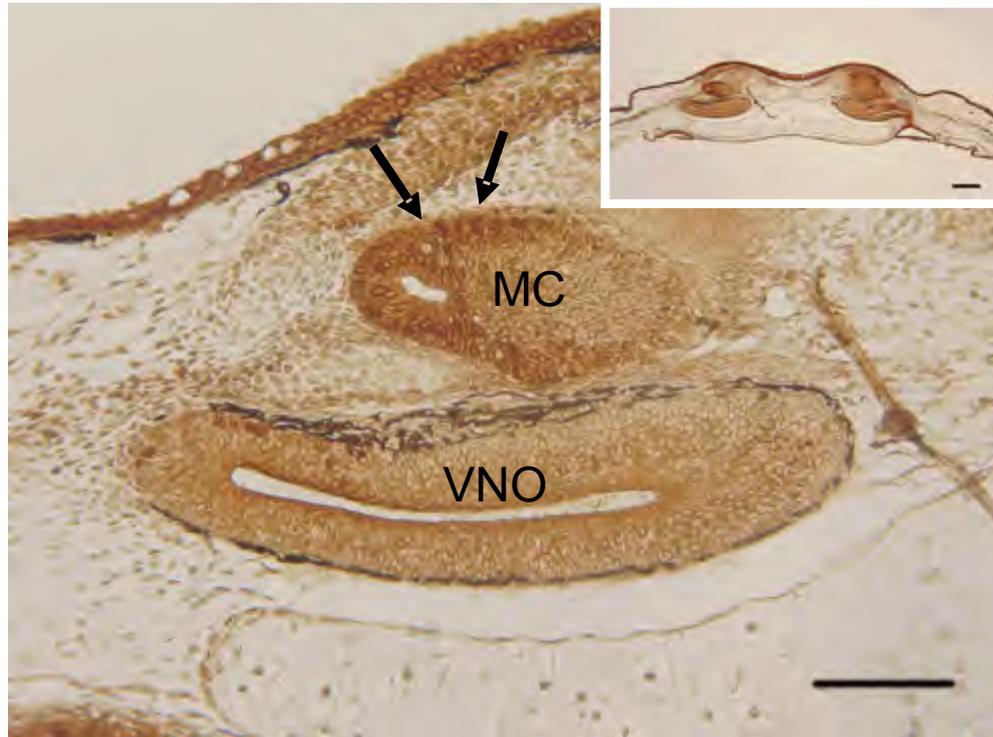


Fig 81: Sezione frontale di un girino allo stadio 57. Cellule PCNA-ir nella regione anteriore della camera mediale (frece nere). MC: camera mediale, VNO: organo vomeronasale. Unità di misura della barra di riferimento: 100 μm , inserto 200 μm .

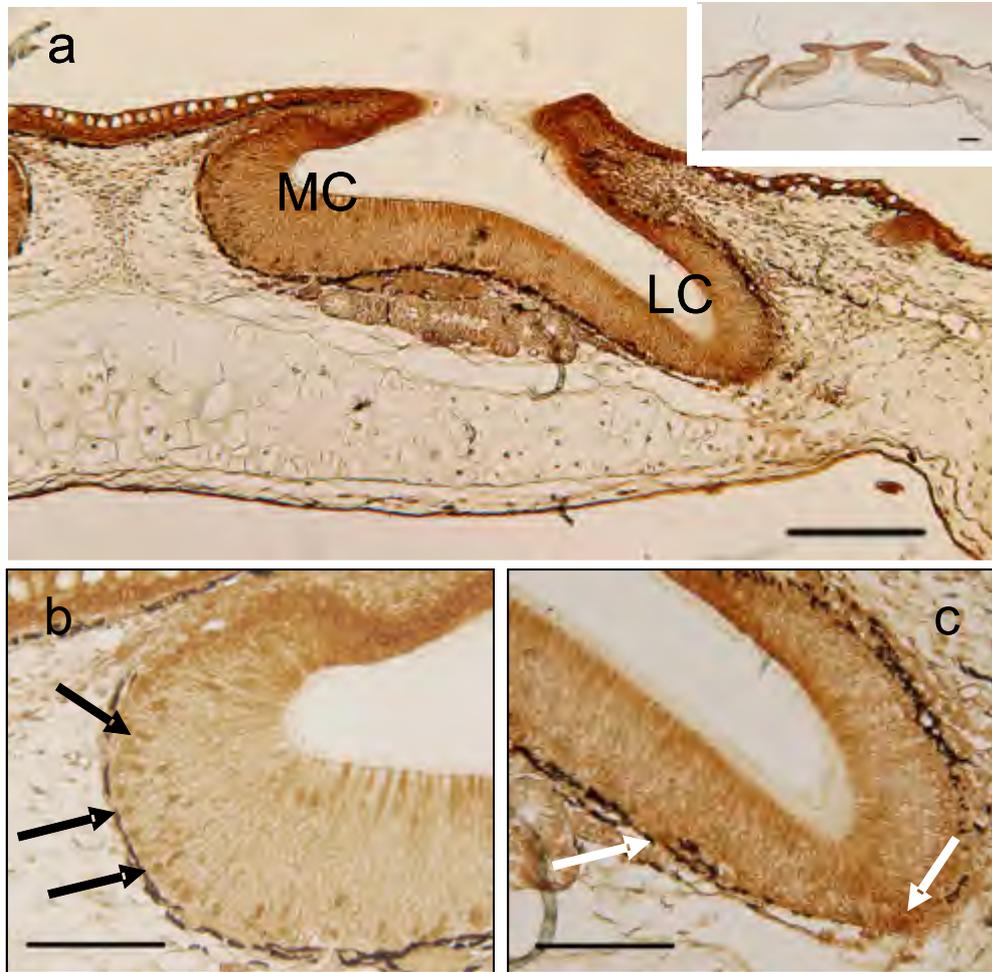


Fig. 82: Sezione frontale di un girino allo stadio 57 a. Nuclei PCNA-ir nella camera mediale (freccie nere) in numero maggiore rispetto alla camera laterale (freccie bianche). MC: camera mediale, LC: camera laterale. Unità di misura della barra di riferimento: a, inserto 200 μm ; b, c: 100 μm .

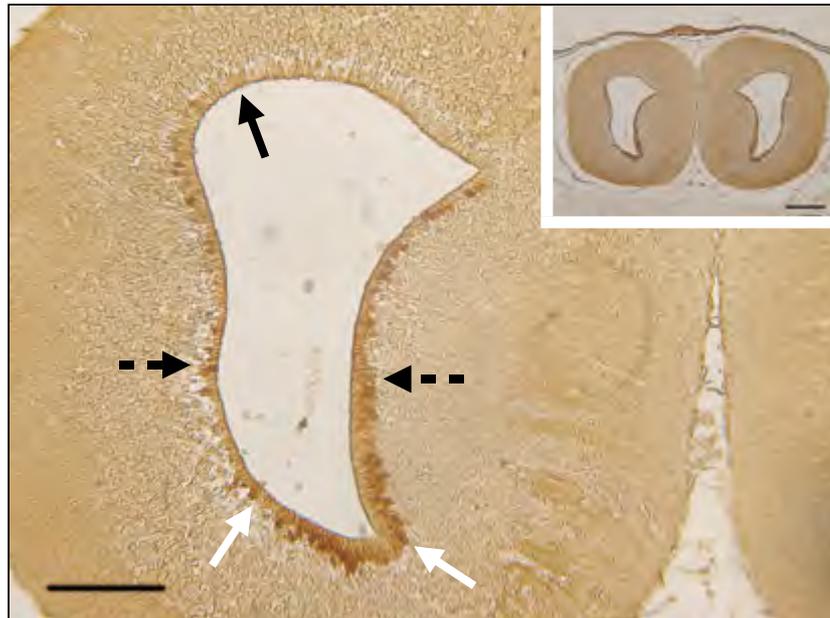


Fig. 83 Sezione frontale di un girino allo stadio 57 a livello del telencefalo anteriore. La regione superiore dei ventricoli ha quasi perso tutte le cellule PCNA-ir (freccie nere), mentre nella zona inferiore (freccie bianche) e mediale (freccie tratteggiate) il loro numero è maggiore, anche se molto più basso rispetto agli stadi precedenti. Unità di misura della barra di riferimento: 100 μm , inserto 200 μm .

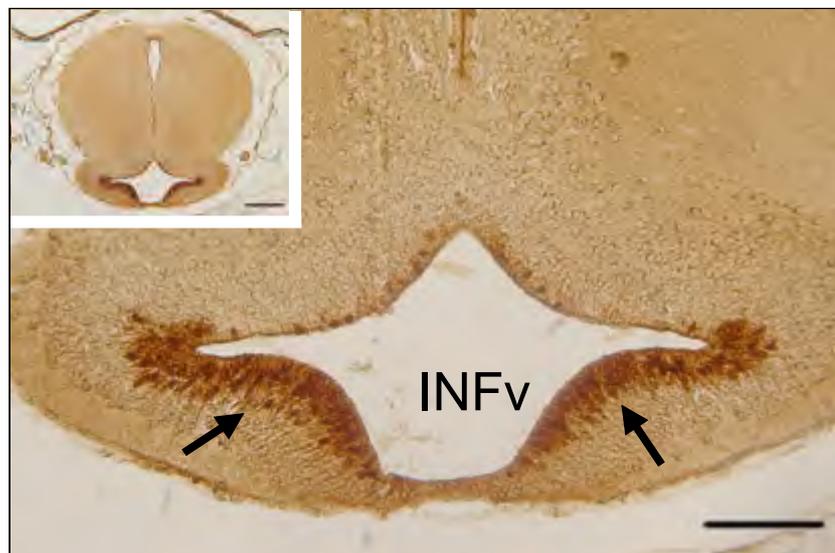


Fig. 84 Sezione frontale di un girino allo stadio 57 a livello del diencefalo. Il neuroepitelio del ventricolo dell'infundibolo basale presenta intensa attività PCNAasica (freccie nere). INFv: ventricolo infundibolare. Unità di misura della barra di riferimento: 100 μm , inserto 200 μm .

6.2.16. Sviluppo della mucosa olfattiva dello *Xenopus laevis* allo stadio 66.

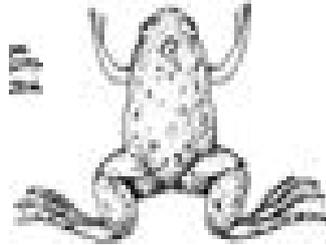


Fig. 85: Visione grafica di un girino allo stadio 66 di *Xenopus laevis*.

L'encefalo (Fig. 88) sostanzialmente appare molto simile allo stadio descritto con dettaglio precedentemente sotto l'aspetto morfologico (Fig. 85).

Le tre cavità risultano in collegamento fra loro (Fig. 86).

Le camere olfattive si presentano ora molto articolate. Vi è la camera olfattiva laterale che si estende in posizione mediale. Essa comunica con l'esterno attraverso le narici e con la cavità della bocca con le coane, che sono ora aperte. Questa camera comunica con quella mediale ed è da essa separata attraverso una valvola. Le aree sensoriali appaiono più spesse, mentre larghi tratti delle mucose hanno un aspetto più sottile e sono epitelii respiratori. L'organo vomeronasale comunica anch'esso con la cavità mediale tramite un canale stretto e non è separato da valvole. A livello istologico nella camera mediale si sono differenziati evidenti elementi ghiandolari globulari (ghiandole di Bowman) e meno evidenti ghiandole tubulari. Quest'ultime sono anche presenti nell'organo vomeronasale. Nessun elemento ghiandolare è presente nella camera laterale.

A livello delle camere olfattive si nota un maggior numero di cellule PCNA-ir nella camera laterale rispetto a quella mediale e l'organo vomeronasale, specialmente nelle zone dorsali. Intensa attività PCNA-sica la si riscontra nella valvola che separa la camera mediale da quella laterale e in alcune zone dell'epitelio non sensoriale. Più posteriormente l'attività PNA-sica è molto forte a livello dell'epitelio non sensoriale dell'apertura delle coane (Fig. 87).

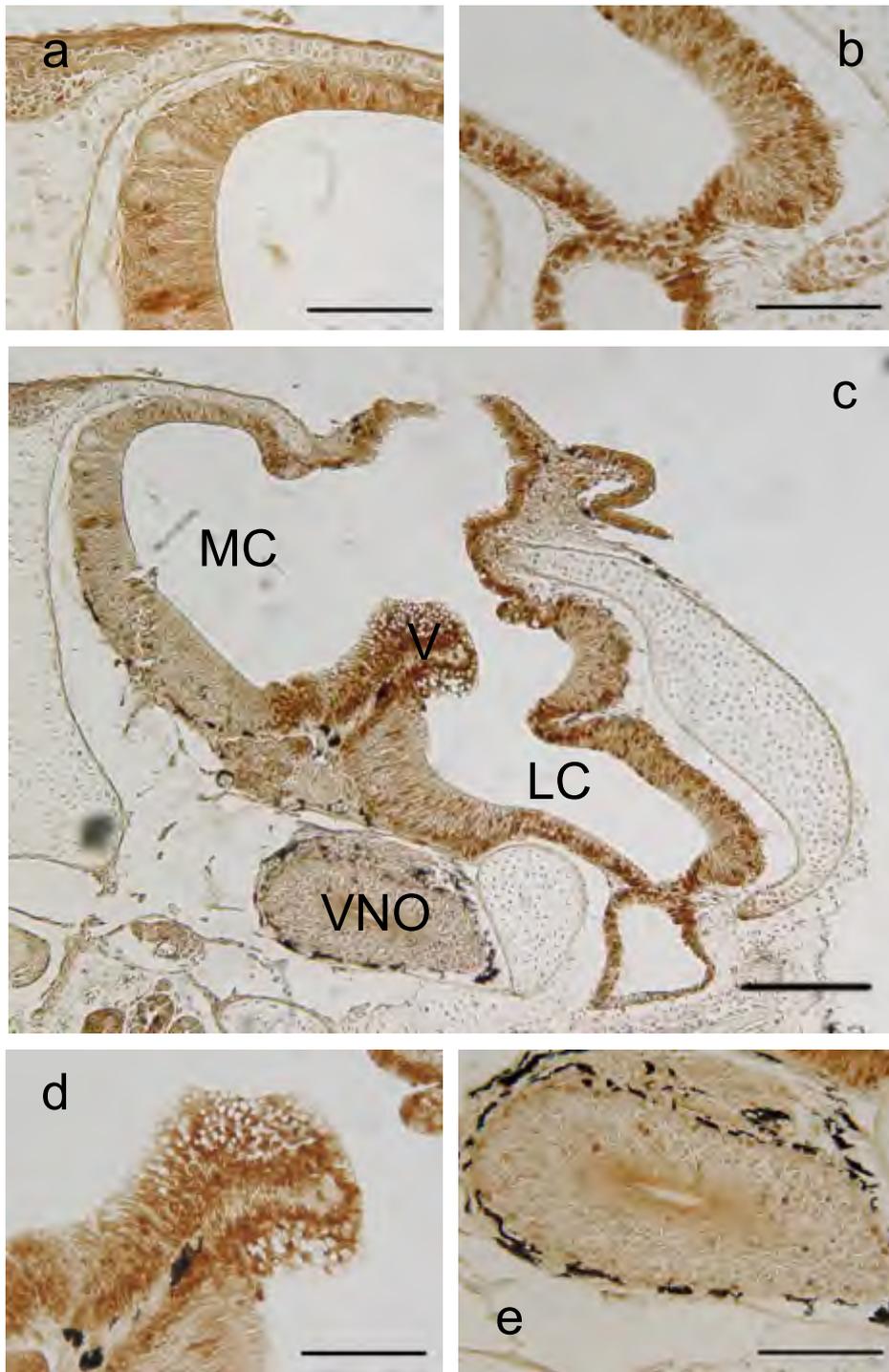


Fig. 86: Sezione frontale della mucosa di un neometamorfosato (stadio 66). a) Cellule PCNA-ir (frecche nere) nella camera mediale. Presenti anche elementi ghiandolari (frecche bianche); b) Cellule PCNA-ir (frecche nere) nella camera laterale in numero maggiore rispetto a quella mediale e l'organo vomeronasale, specialmente nelle zone dorsali; c) Visione d'insieme della mucosa. d) Attività PCNA-ir nella valvola che separa la camera mediale da quella laterale; e) Nuclei PCNA-ir nell'organo vomeronasale (frecche nere). MC: camera mediale, LC: camera laterale, VNO: organo vomeronasale, V: valvola. Unità di misura della barra di riferimento: a, b, d, e: 100 μm ; c: 200 μm .

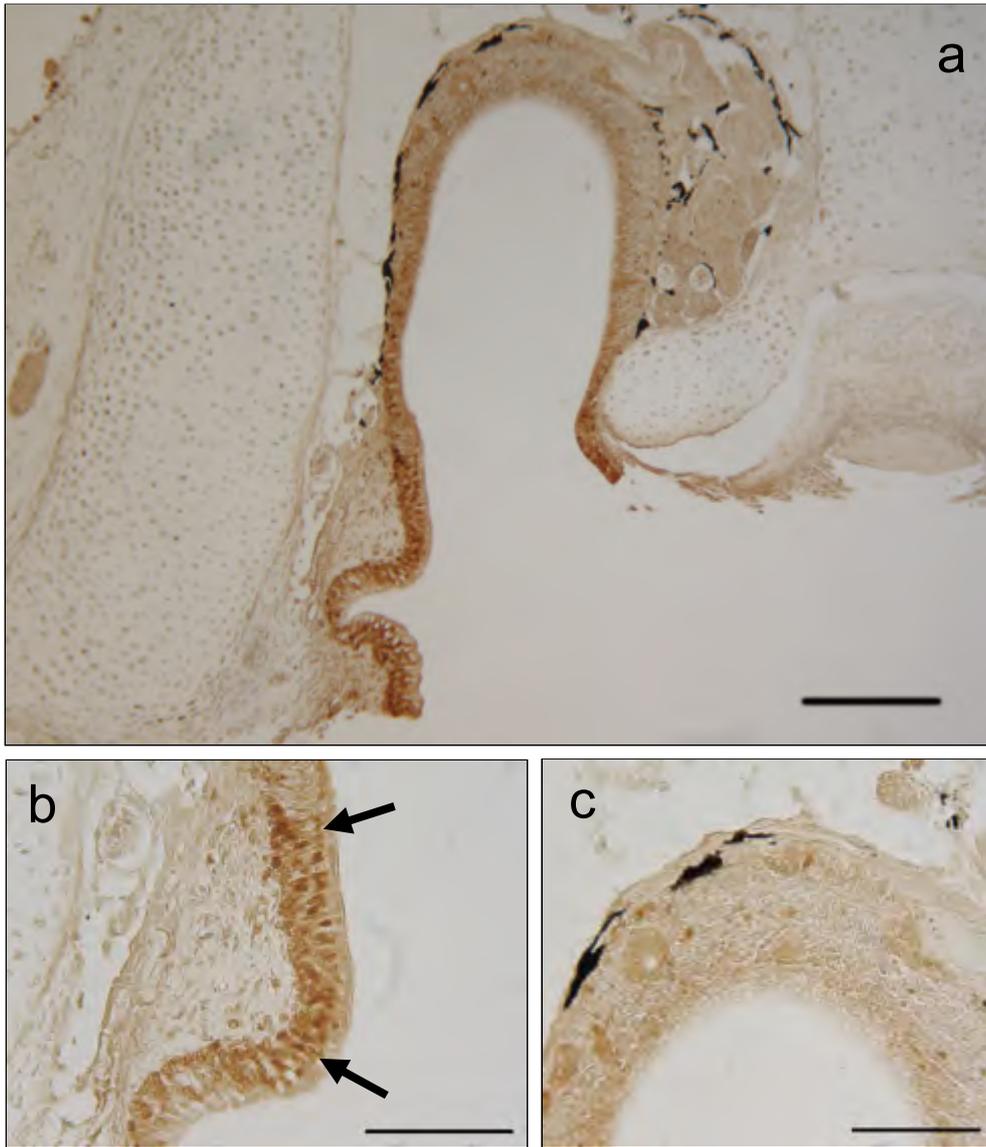


Fig. 87: Sezione frontale di coane di un neometamorfosato (stadio 66). A livello dell'epitelio non sensoriale dell'apertura delle coane l'attività PCNAasica è molto forte (freccie nere). Unità di misura della barra di riferimento: a, inserto: 200 μm ; b, c: 100 μm .

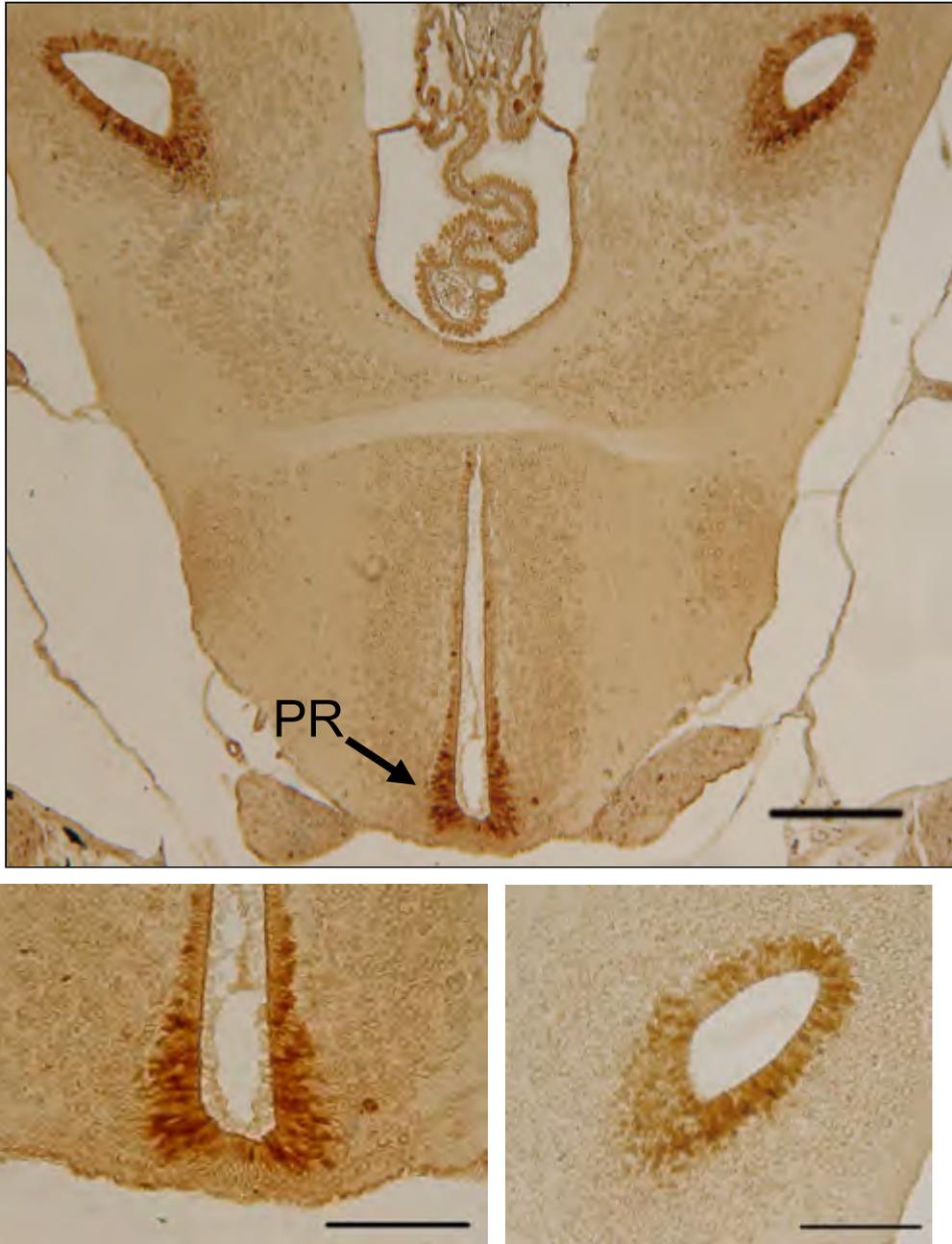


Fig. 88: Sezione frontale di un neometamorfosato (stadio 66) a livello del terzo ventricolo encefalico. La regione basale del recesso preottico rimane ancora abbastanza attiva per quanto concerne l'attività PCNAsica. PR: recesso preottico. Unità di misura della barra di riferimento: 100 μm , inserto 200 μm .

6.2.17. Risultati delle quantificazioni di mitosi ed apoptosi nella retina e delle stime morfologiche dell'occhio di *Xenopus laevis*.

I risultati dei conteggi dell'area retinica media, da densità cellulare, del numero cellule totali, delle figure mitotiche ed apoptotiche in sezioni rappresentative, i relativi indici mitotici ed apoptotici e del diametro dell'occhio sono di seguito riportati nelle figure 89 e 90.

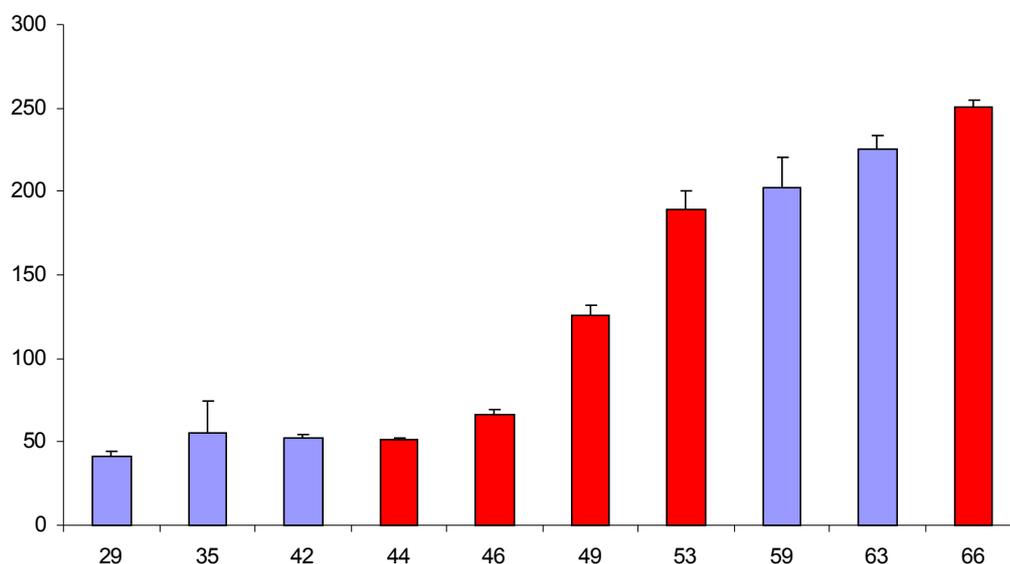


Fig. 89: visione grafica delle dimensioni dell'occhio di *Xenopus laevis* nei vari giorni dello sviluppo (valori significativi evidenziati in rosso)

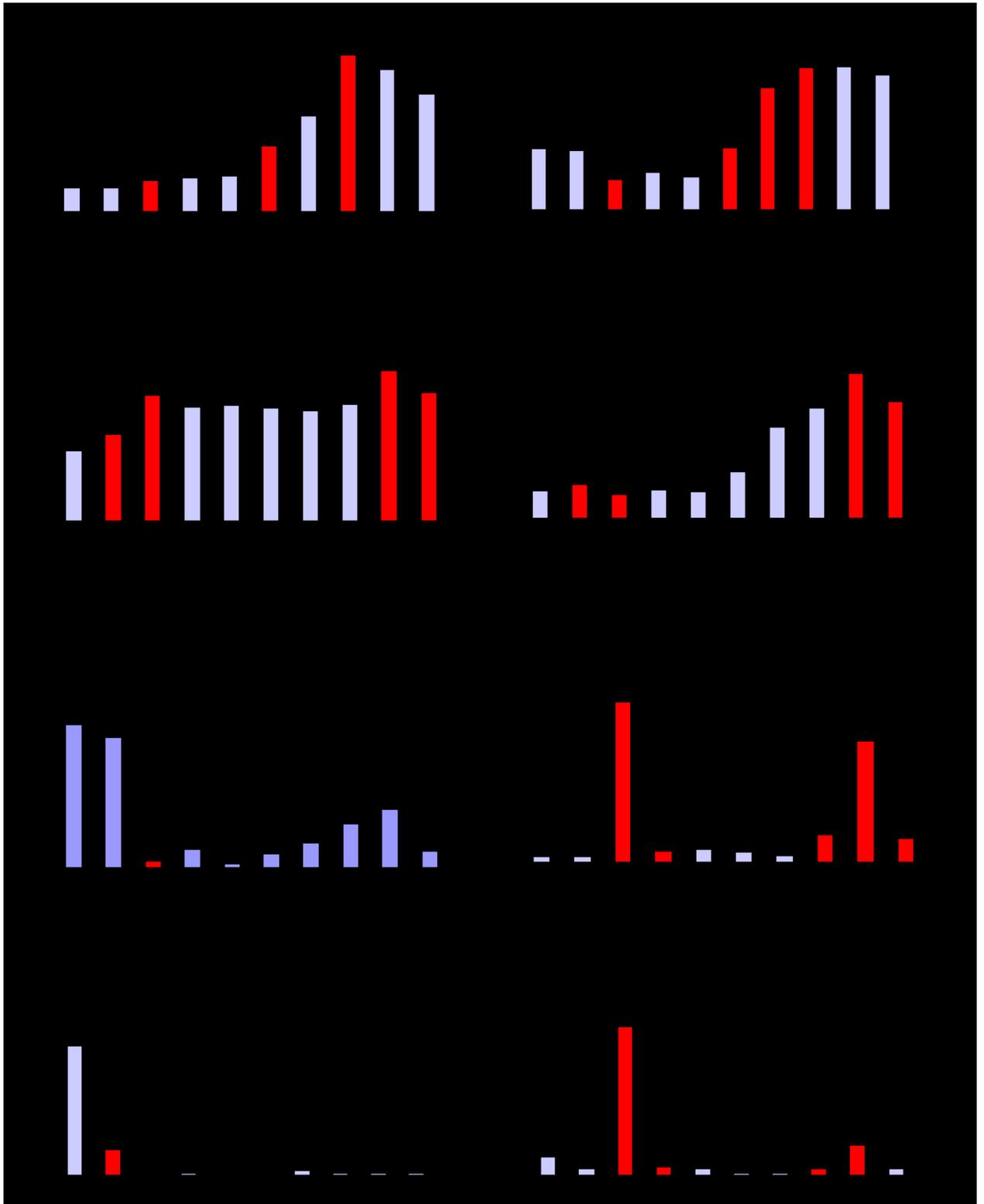


Fig. 90: visione grafica dell'area retinica, area nucleare, densità cellulare, cellule totali, mitosi totali, apoptosi totali, indice mitotico, indice apoptotico, di *Xenopus laevis* nei vari giorni dello sviluppo (valori significativi evidenziati in rosso).

6.3. *Rana esculenta*.



Per studiare la proliferazione del sistema olfattivo di *Rana esculenta* è stata eseguita un'indagine immunocistochimica con la PCNA. Gli stadi presi in considerazione sono: 25/26, 27/28, 29/30, 31/32, 33 e lo stadio neometamorfosato.

Gli stadi precedenti al 25 presentano una colorazione quasi omogeneamente distribuita in tutto l'organo olfattivo e l'encefalo, che peraltro si trovano in uno stadio di differenziamento molto precoce. Di conseguenza, non saranno dettagliati nel presente lavoro di tesi.

Gli stadi con organizzazione simile sono stati raggruppati.

6.3.1. Sviluppo della mucosa olfattiva di *Rana esculenta* allo stadio 25/26.

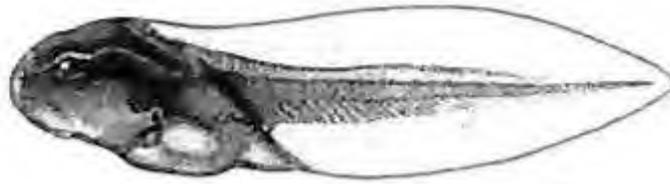


Fig. 91: Visione grafica di un girino allo stadio 25/26 di *Rana esculenta*.

In questo stadio, l'encefalo appare morfologicamente ben sviluppato. Infatti, sono abbastanza riconoscibili le principali aree (Fig. 91). La componente olfattiva, invece, è in attiva morfogenesi: la mucosa olfattiva è costituita solo da epitelio sensoriale con ciglia molto brevi (Fig. 92).

Non sono presenti elementi ghiandolari. L'organo vomeronasale non è ancora abbozzato e le coane risultano già aperte.

I nervi olfattivi appaiono scarsamente immunoreattivi (ir). Nell'ambito dell'epitelio olfattivo, l'attività PCNAasica non è limitata unicamente alle regioni basali, in quanto nuclei ir sono presenti anche a livello apicale con alcuni di essi che sporgono nel lume della mucosa (Fig. 93).

Comunque, le cellule ir sono soprattutto localizzate nella porzione basale dell'epitelio olfattivo.

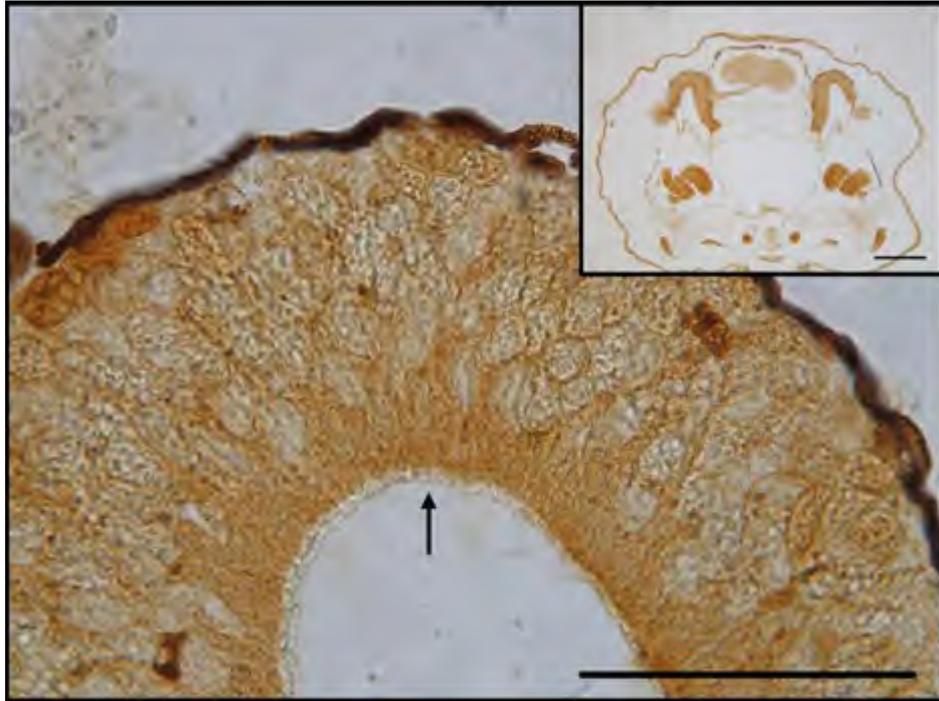


Fig. 92: Sezione trasversale a livello della mucosa olfattiva. La freccia indica le ciglia in sviluppo. Unità di misura della barra di riferimento = 50 μm , inserto 100 μm .



Fig. 93: Sezione trasversale a livello della mucosa olfattiva. Attività presente a livello basale (freccie nere) ed apicale (freccie bianche). Unità di misura della barra di riferimento = 50 μm , inserto 100 μm .

6.3.2. Sviluppo della mucosa olfattiva di *Rana esculenta* allo stadio 27/28.



Fig. 94: Visione grafica di in girino allo stadio 27/28 di *Rana esculenta*.

Il grado di differenziamento dell'encefalo ha assunto quasi le caratteristiche dell'adulto. Infatti, rispetto allo stadio precedente, i diversi distretti encefalici sono meglio distinguibili (Fig. 94).

La morfogenesi della componente olfattiva procede con l'inizio della formazione dell'organo vomeronasale. Difatti, è ben distinguibile un diverticolo che si spinge internamente a formare la struttura (Fig. 95).

Come nello stadio precedente, la mucosa presenta solo aree sensoriali, a parte l'epitelio che circonda i tubuli della narice e delle coane. Non si evidenziano ghiandole all'interno. Le ciglia dell'epitelio olfattivo sono più sviluppate e aumentate di dimensioni (Fig. 96). Le coane sono aperte.

La distribuzione dei nuclei ir segue un pattern paragonabile allo stadio 25. Infatti, le cellule ir sono prevalentemente concentrate nella parte basale rispetto a quella apicale (Fig. 96). Tuttavia, i nuclei ir apicali in questi campioni risultano molto più rari se paragonati a quelli dello stadio precedente.

In prossimità del diverticolo (abbozzo del vomeronasale), la presenza di nuclei ir è più cospicua, rispetto le altre regioni della mucosa olfattiva. La forte attività proliferativa indica la formazione di una nuova struttura, il vomeronasale (Fig. 95).

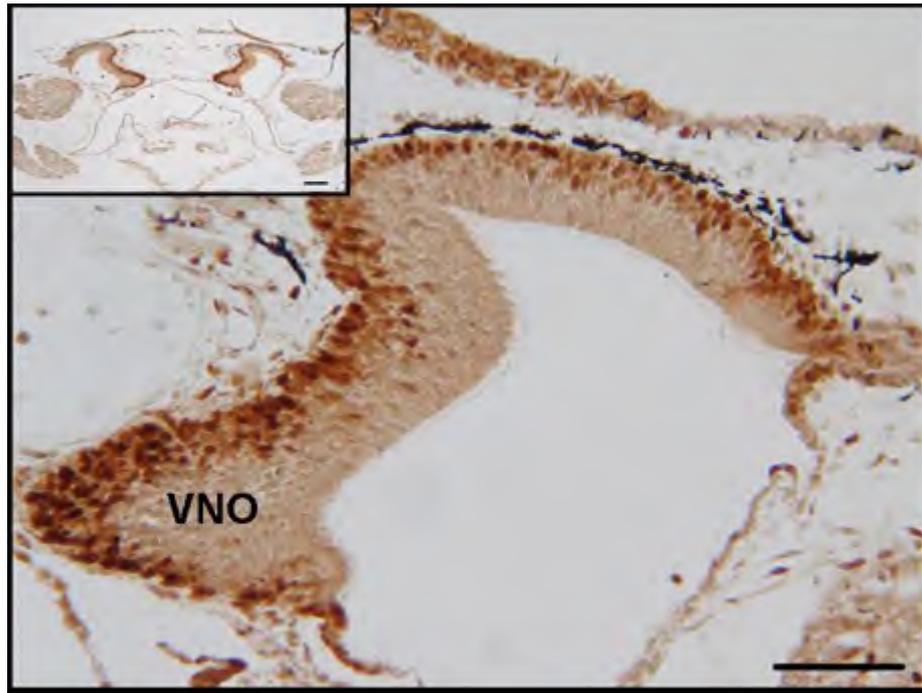


Fig. 95: Sezione trasversale a livello della mucosa olfattiva. Primordio dell'organo vomeronasale (VNO) con forte attività ir. Unità di misura della barra di riferimento = 100 μm , inserto 200 μm .

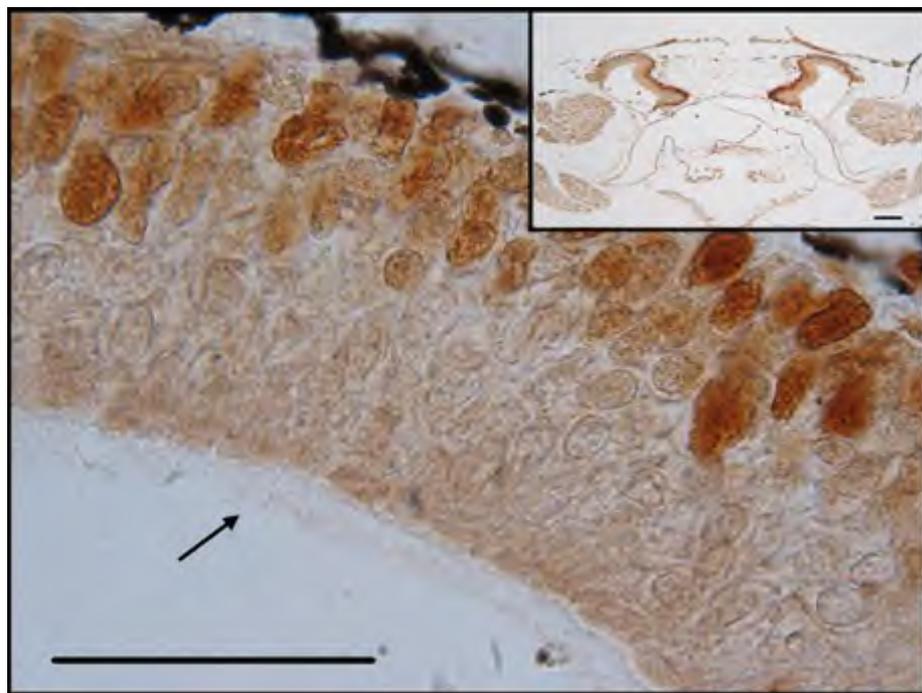


Fig. 96: Sezione trasversale a livello della mucosa olfattiva. Ciglia in fase di sviluppo (freccia). Attività PCNAasica a livello basale. Unità di misura della barra di riferimento = 50 μm , inserto 200 μm

6.3.3. Sviluppo della mucosa olfattiva di *Rana esculenta* allo stadio 29/30.



Fig. 97: Visione grafica di in girino allo stadio 29/30 di *Rana esculenta*.

La morfologia dell'encefalo presenta delle caratteristiche paragonabili a quelle dello stadio precedente (Fig. 102-103). Tuttavia, le dimensioni sono maggiori (Fig. 97).

La morfogenesi della componente olfattiva prosegue con la formazione del vomeronasale. In questo stadio, l'organo di Jacobson ha quasi raggiunto le sue dimensioni finali. Al microscopio ottico non appare evidente se i prolungamenti cellulari che sporgono nel lume dell'organo siano microvilli o ciglia; tuttavia, attenendoci ai numerosi lavori presenti in letteratura saranno in questo contesto interpretati come microvilli (Fig. 98).

Chiaro ed evidente il collegamento tra l'organo stesso e la camera olfattiva.

Nell'ambito dell'organo olfattivo, è possibile distinguere una regione non sensoriale, probabilmente respiratoria, costituita da un epitelio olfattivo più sottile rispetto a quello sensoriale (Fig. 99).

La componente respiratoria presenta una regione confinante con la porzione sensoriale ed, inoltre, una porzione che forma una cavità posizionata dorsalmente al vomeronasale (Fig. 99). I microvilli dell'epitelio sensoriale della mucosa sono maggiormente differenziati e presentano dimensioni maggiori rispetto a quelli presenti nello stadio precedente (Fig. 100).

Da rilevare la presenza di elementi probabilmente ciliari anche sull'epitelio respiratorio, di dimensioni ridotte rispetto ai microvilli dell'epitelio sensoriale. Non sono ancora presenti elementi ghiandolari.

Anche in questo stadio dello sviluppo, l'attività PCNAasica è localizzata principalmente a livello basale dell'epitelio olfattivo, sia sensoriale sia respiratorio. Da constatare, comunque, che il numero di cellule ir nella porzione sensoriale, localizzate in posizione mediale e apicale, è maggiore rispetto allo stadio 28 (Fig. 101).

Nell'ambito della mucosa, l'attività è molto più accentuata a livello dorso-laterale.

Anche nell'organo vomeronasale, l'immunoreattività è principalmente localizzata nella zona basale. Tuttavia, il numero di elementi ir è maggiormente presente nella sua regione mediale, che è la zona di crescita

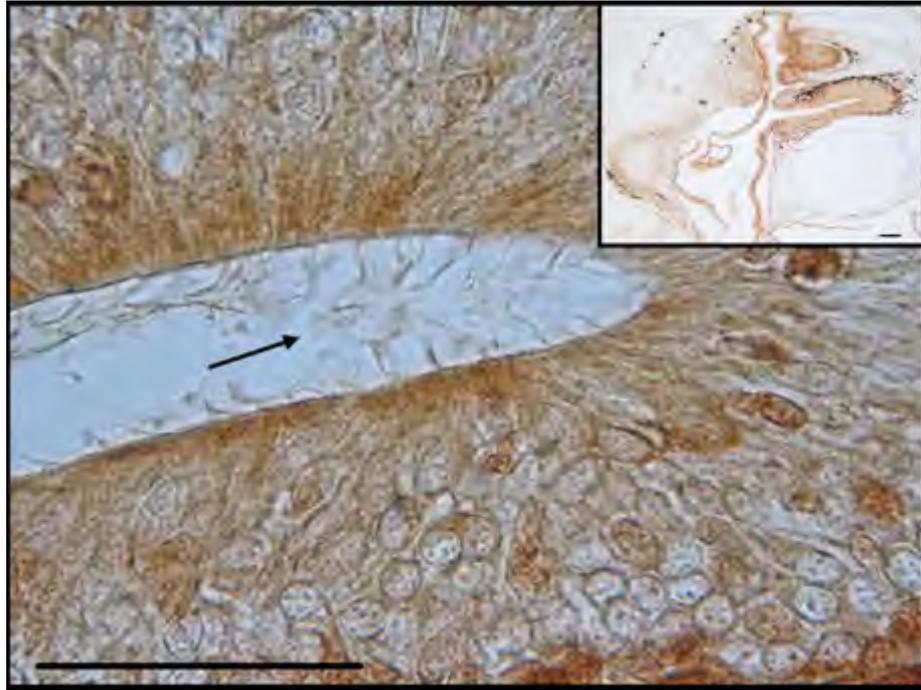


Fig. 98: Sezione trasversale a livello della mucosa olfattiva. Microvilli (freccia) rivestono l'epitelio del VNO. Unità di misura della barra di riferimento = 50 μm , inserto 100 μm

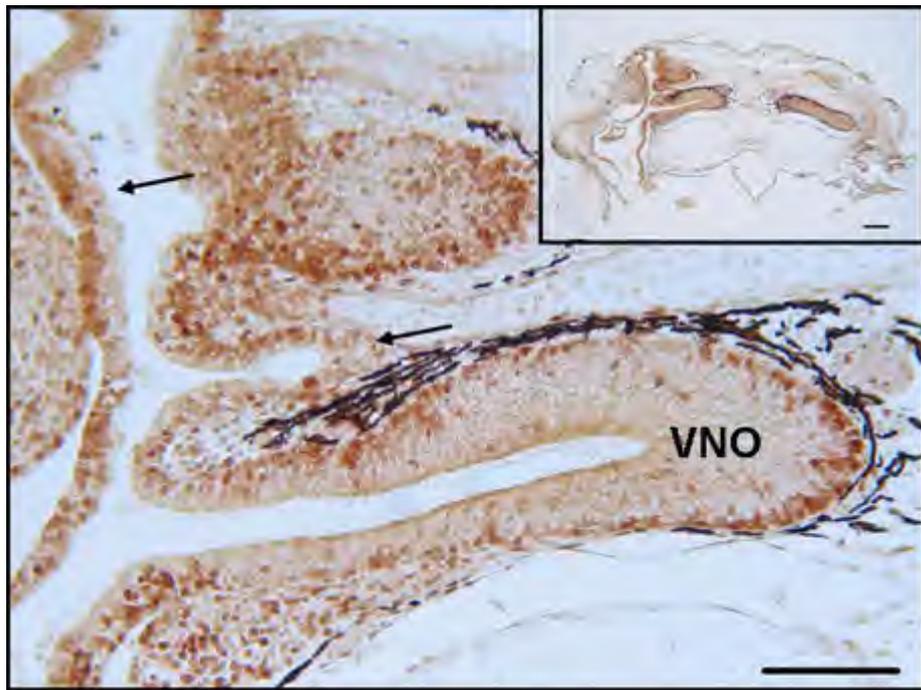


Fig. 99: Sezione trasversale a livello della mucosa olfattiva. Epitelio respiratorio (freccie). Vomeronasale (VNO). Unità di misura della baara di riferimento = 100 μm , inserto 200 μm



Fig. 100: Sezione trasversale a livello della mucosa olfattiva. Epitelio sensoriale con ciglia (freccia). Unità di misura della barra di riferimento = 50 μm , inserto 200 μm .

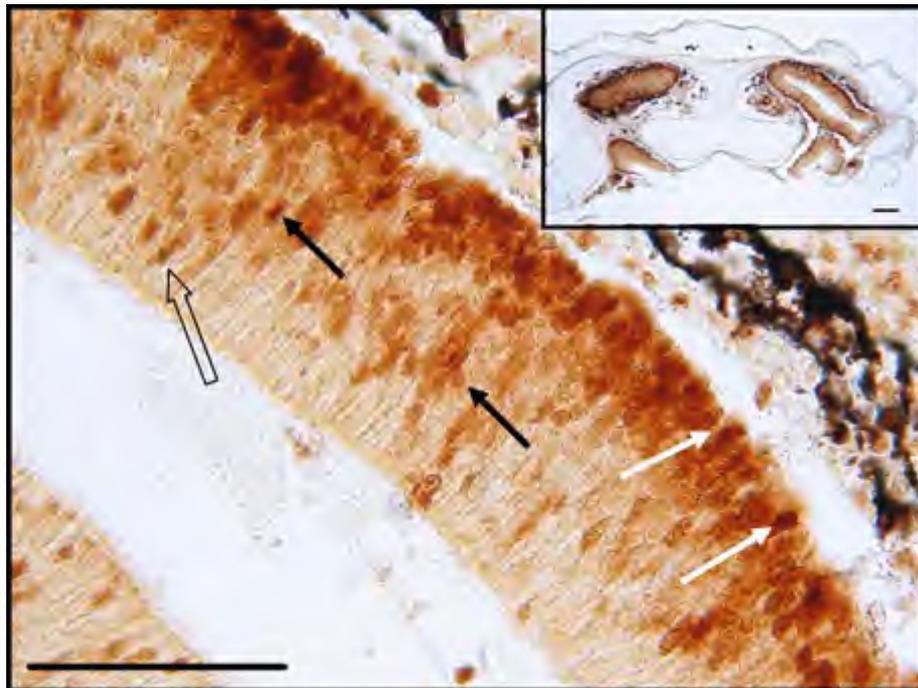


Fig. 101: Sezione trasversale a livello della mucosa olfattiva. Nuclei in a livello basale (freccie bianche), mediale (freccie nere) e apicale (freccia vuota). Unità di misura della barra di riferimento = 50 μm , inserto 200 μm .

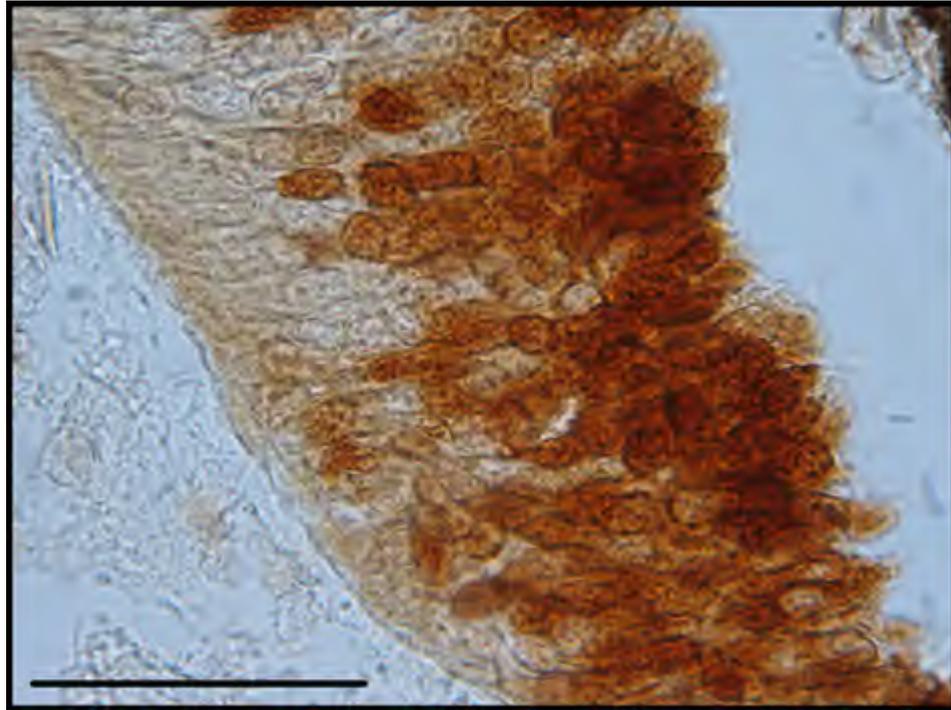


Fig. 102: Sezione trasversale a livello della mucosa olfattiva con forte attività PCNA sica. Unita' di misura della barra di riferimento = 50 μ m

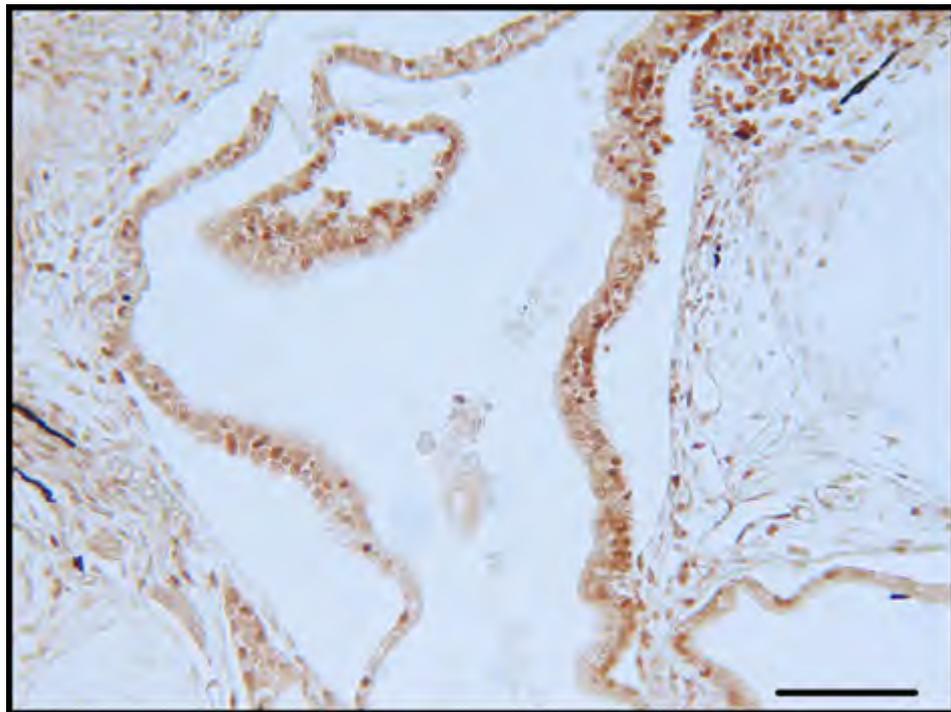


Fig. 103: Sezione trasversale a livello dell'epitelio respiratorio di un girino di *Rana esculenta* allo stadio 29/30. Unita' di misura della barra di riferimento = 50 μ m.

6.3.4. Sviluppo della mucosa olfattiva di *Rana esculenta* allo stadio 31/32.



Fig. 104: Visione grafica di un girino allo stadio 31/32 di *Rana esculenta*.

La morfologia dell'encefalo in questo stadio di sviluppo è molto simile a quella dello stadio 29. Anche le dimensioni non sembrano aver subito variazioni (Fig. 104).

Evento particolare nell'ambito della componente olfattiva, è la comparsa di elementi ghiandolari, le ghiandole di Bowman (Fig. 105).

Esse sono localizzate maggiormente nella porzione dorsale della mucosa olfattiva. Nella porzione anteriore della mucosa gli elementi ghiandolari presentano dimensioni e numero ridotto rispetto a quelle localizzate nella porzione posteriore.

La morfologia dell'organo olfattivo ha quasi assunto la sua struttura definitiva. Il vomeronasale è ben sviluppato, localizzato in posizione ventrale rispetto alla mucosa olfattiva. Esso è chiaramente costituito da una porzione sensoriale, ad epitelio più spesso, e da una porzione probabilmente non sensoriale, ad epitelio più sottile. Anche la mucosa olfattiva è costituita da un epitelio sensoriale, più spesso, ed un epitelio respiratorio, il quale si ripiega ventralmente formando una cavità posizionata tra il vomeronasale e la regione sensoriale della mucosa olfattiva. Le ciglia della porzione sensoriale della mucosa sono ripiegate su se stesse, e sembrano di dimensioni simili a quelle dello stadio precedente. Nell'epitelio respiratorio, le ciglia sono ben sviluppate e non ripiegate, di dimensioni inferiori rispetto a quelle della porzione sensoriale.

Nel vomeronasale, invece, le ciglia sono maggiormente localizzati nella regione sensoriale e rari in quella non sensoriale.

Tutti gli elementi dell'organo olfattivo sono in collegamento tra di loro, compreso il vomeronasale.

L'epitelio olfattivo presenta ancora elementi ir. L'attività PCNA_{sica} e la sua distribuzione, cambia poco rispetto allo stadio precedente.

I nuclei ir, infatti, sono principalmente localizzati a livello basale dell'epitelio olfattivo, sia sensoriale sia respiratorio. Cellule ir sono anche presenti nelle zone mediali e apicali dell'epitelio olfattivo, ma il loro numero è inferiore rispetto allo stadio 30.

Da notare che, nell'ambito della mucosa olfattiva, anche in questo stadio gli elementi PCNA ir sono principalmente localizzati nella regione ventrale. Le ghiandole di Bowman presentano attività PCNAasica, circoscritta alle zone basali e laterali dell'elemento ghiandolare. Nel vomeronasale sono presenti cellule ir nelle zone basali dell'epitelio sensoriale. Nelle regioni non sensoriali dell'epitelio del vomeronasale gli elementi ir sono più rari.

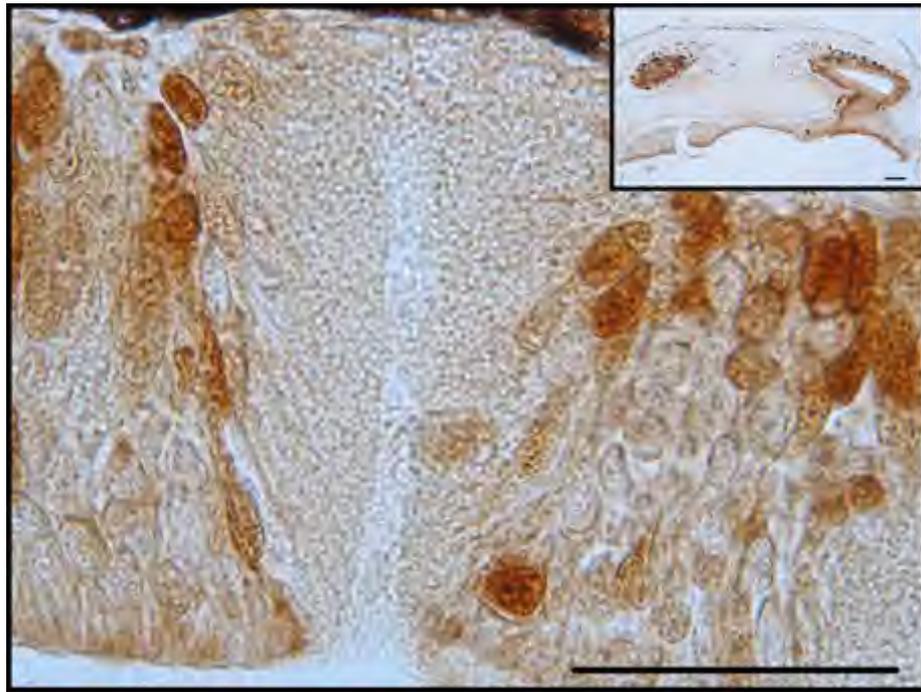


Fig. 105: Sezione trasversale a livello della mucosa olfattiva. Ghiandole di Bowman. Unità di misura della barra di riferimento = 50 μm , inserto 200 μm .

6.3.5. Sviluppo della mucosa olfattiva di *Rana esculenta* allo stadio 33.



Fig. 106: Visione grafica di un girino allo stadio 33 di *Rana esculenta*.

Lo stadio di sviluppo analizzato corrisponde ad un girino prossimo alla metamorfosi (Fig. 106).

Il cervello ha ormai raggiunto la sua morfologia finale e i diversi nuclei encefalici hanno ormai quasi preso la loro forma definitiva. Esso appare leggermente aumentato di dimensioni rispetto allo stadio precedente.

Anche l'organo olfattivo ha quasi raggiunto la sua struttura definitiva.

La sua morfologia non si discosta molto da quella riscontrata nello stadio precedente. Esso presenta una camera olfattiva dorsale con epitelio sensoriale e ghiandole di Bowman, un epitelio respiratorio, più sottile rispetto al sensoriale. L'organo di Jacobson si estende ventralmente alla mucosa olfattiva. Anche in questo stadio, gli elementi ghiandolari della regione anteriore della mucosa olfattiva risultano di dimensioni inferiori rispetto a quelle della regione posteriore.

Il vomeronasale presenta una morfologia leggermente diversa da quella osservata precedentemente. Infatti, la componente sensoriale appare di dimensioni inferiori rispetto alla componente non sensoriale. Quest'ultima tuttavia, a rigore dovrebbe non essere considerata una componente dell'organo vomeronasale, in quanto tappezza il tubulo che collega l'organo stesso con il resto delle componenti olfattive. Le sue ciglia sono ora più numerosi e sviluppati in lunghezza.

Le ciglia della porzione sensoriale della mucosa olfattiva, sono ben sviluppate, ripiegate e agglutinate tra di loro. Questo particolare era scarsamente presente nello stadio precedente e del tutto assente negli stadi più precoci dello sviluppo.

Invece, le ciglia della porzione respiratoria, sono ben evidenti e sviluppate, non ripiegate e/o agglutinate tra loro e presentano una morfologia paragonabile a quanto visto prima.

Nonostante si tratti di un girino prossimo alla metamorfosi, l'immunoreattività verso la PCNA è ancora ben evidente nell'organo olfattivo (Fig. 107).

Il pattern di distribuzione dell'attività PCNAasica nell'ambito dell'epitelio olfattivo non subisce variazioni sostanziali rispetto allo stadio precedente. Quindi, nell'epitelio sensoriale è presente un forte addensamento delle cellule in nella sua porzione basale, ma, come per gli altri stadi studiati, sono presenti

pochi nuclei ir anche nella parte apicale e intermedia. Nell'epitelio respiratorio i nuclei ir sono, invece, principalmente localizzati a livello basale.

Procedendo in senso anteriore, la situazione s'inverte, in quanto è la regione dorsale della mucosa a presentare un'immunopositività maggiore. Più avanti, ancora, la situazione diviene equivalente per entrambe le regioni, dorsale e ventrale. Le ghiandole di Bowman sono ben sviluppate e mostrano attività PCNASica a livello basale e laterale.

Nell'organo vomeronasale, l'attività PCNASica è più evidente nella sua parte basale, ma è anche evidente a livello intermedio e apicale, con nuclei che si affacciano spesso nel lume dell'organo.

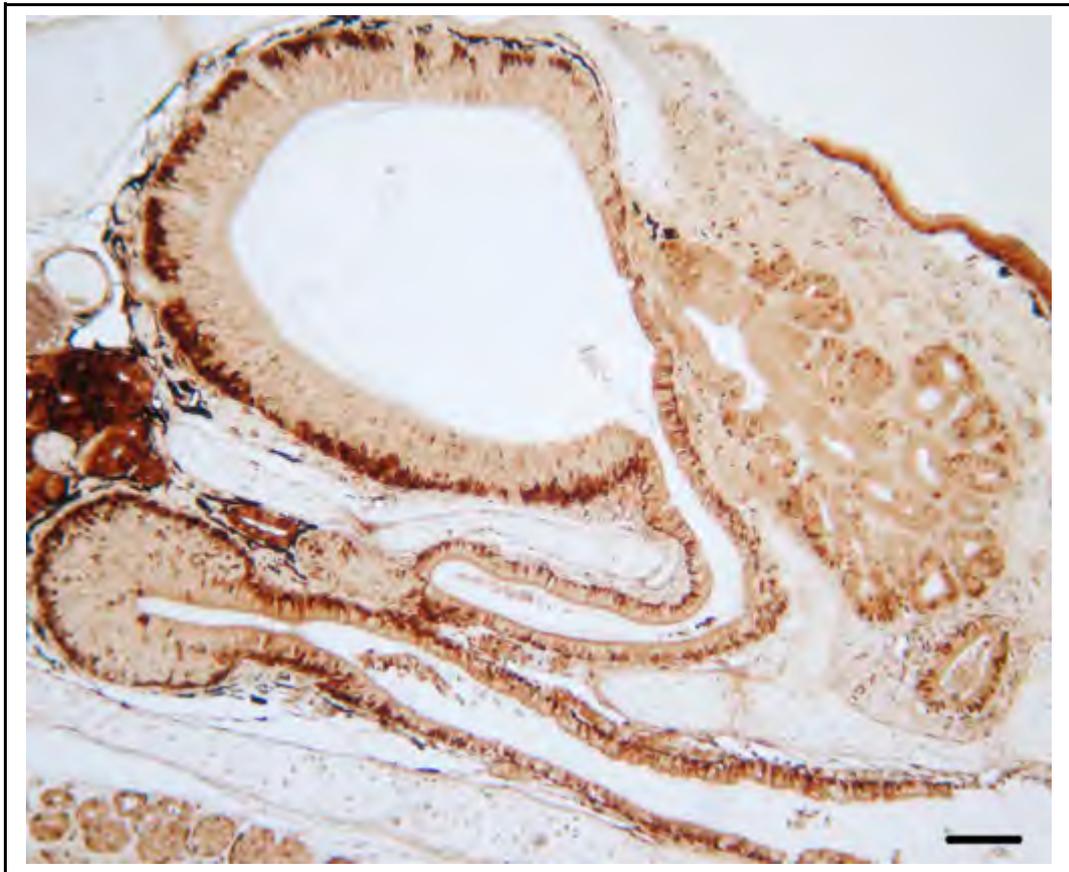


Fig. 107: Girino allo stadio 33. L'organo olfattivo ha quasi raggiunto la sua struttura definitiva. Nonostante si tratti di un girino prossimo alla metamorfosi, l'attività immunoreattiva è ancora presente. Unità di misura della barra di riferimento = 100 μ m

6.3.6. Sviluppo della mucosa olfattiva di *Rana esculenta* allo stadio neometamorfosato.



Fig. 108: Visione grafica di in girino neometamorfosato di *Rana esculenta*.

In questo stadio, il cervello è ormai simile nella forma a quello dello stadio adulto, ma ovviamente di dimensioni più ridotte (Fig. 108).

Morfologicamente la componente olfattiva non subisce sostanziali variazioni rispetto allo stadio precedente. Le coane sono aperte e persiste il collegamento tra le camere olfattive. Le ghiandole di Bowman sono ben differenziate. Le ciglia nelle regioni delle coane sono di dimensioni inferiori rispetto a tutte le altre e si presentano disposte uniformemente lungo tutto l'epitelio. Procedendo in senso anteriore, nella regione sensoriale, le ciglia assumono delle caratteristiche particolari, in quanto sono più lunghe, ripiegate ed agglutinate tra loro (Fig. 103). Le ciglia della regione respiratoria e dell'organo vomeronasale, invece, non subiscono modificazioni.

L'attività proliferativa nelle regioni olfattive riflette fedelmente il pattern descritto nello stadi 33 (Fig. 109).



Fig. 109: Stadio neometamorfosato. L'organizzazione dell'organo olfattivo ha quasi raggiunto la sua struttura definitiva. E' presente una regione sensoriale (freccia nera), un epitelio respiratorio (freccia bianca) e l'organo vomeronasale (VNO). E' presente ancora attività immunoreattiva alla PCNA (freccia blu) in quanto l'organo olfattivo deve accrescersi ulteriormente per far fronte all'accrescimento corporeo dell'animale. Unità di misura della barra di riferimento = 100 μ m.

6.3.7. Localizzazione della PCNA nell'occhio di Rana esculenta durante lo sviluppo.

L'analisi immunostochimica per la rilevazione della PCNA evidenzia una forte attività immunoreattiva di tutto il placode ottico all'inizio dello sviluppo del girino. A partire dallo stadio 25 (Fig. 110a), l'attività PCNA si concentra soprattutto a livello della zona marginale ciliare (MCZ) e il cristallino, che evidenzia numerose cellule immunoreattive, è in piena proliferazione (Fig. 110b-c).

La retina, a questo stadio di sviluppo, inizia la sua stratificazione con la presenza dei tre strati nucleari; strato nucleare esterno, strato nucleare interno, strato gangliare; inoltre lo strato plessiforme interno è ben evidente mentre, quello esterno non appare ancora del tutto formato (Fig. 110d).

Procedendo con lo sviluppo del girino di *Rana esculenta*, si osserva, a partire dallo stadio 27 una riduzione dell'attività PCNA soprattutto all'interno del cristallino (Fig. 110e). La retina inoltre è completamente stratificata (Fig. 110f) in tutte le sue componenti e si osserva solo la presenza di rare cellule immunoreattive a livello del nervo ottico (Fig. 110g).

Procedendo con lo sviluppo dell'animale, all'interno dell'occhio le cellule marcate tendono a diminuire drasticamente in numero, fino ad arrivare allo stadio neometamorfosato dove, l'occhio ormai completamente formato non presenta alcun tipo di cellule marcate.

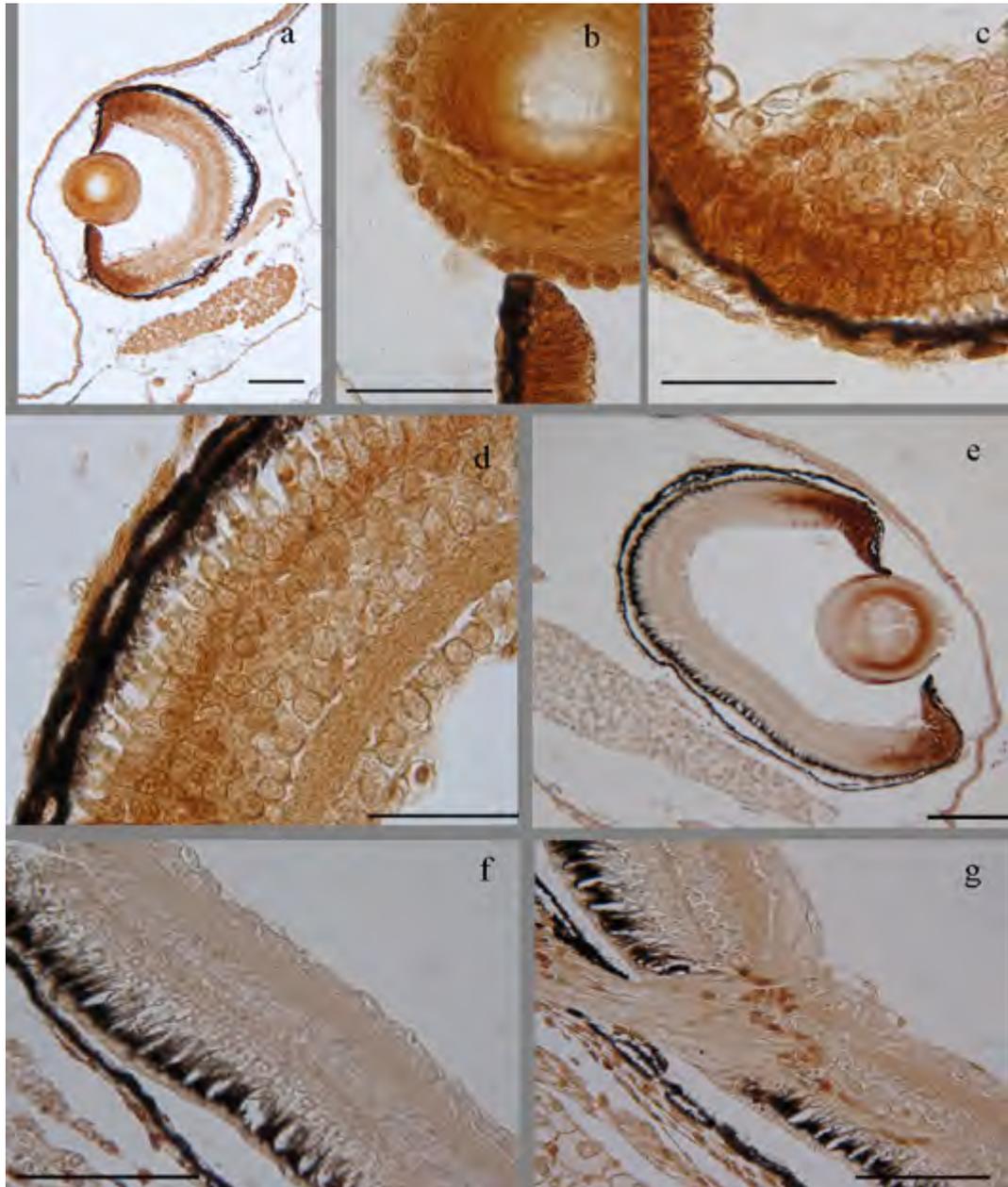
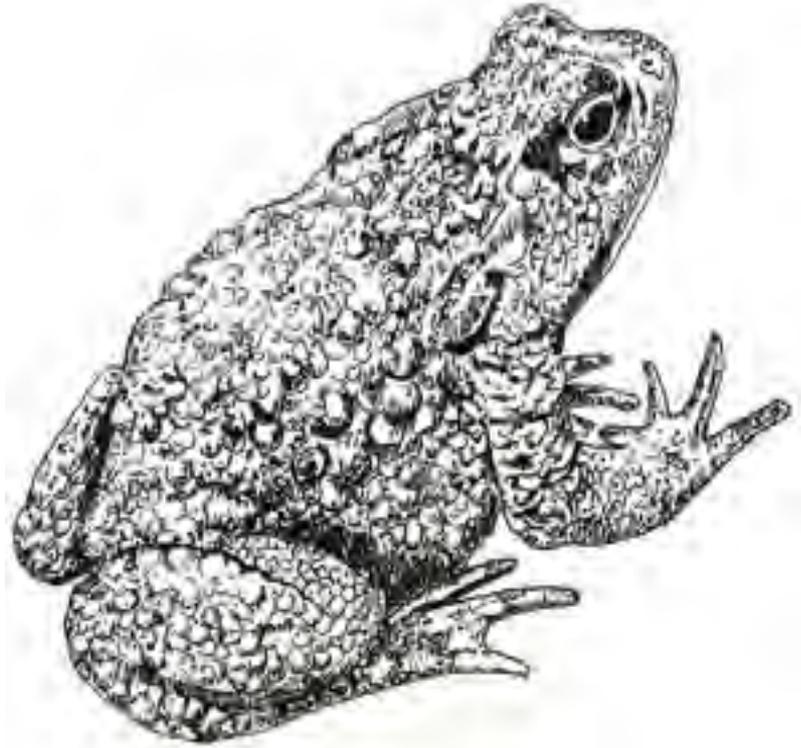


Fig. 110: Sviluppo dell'occhio di *Rana esculenta*. a) visione dell'occhio allo stadio 25; b) cristallino con forte attività PCNA_{sica} allo stadio 25; c) zona marginale ciliare di un girino di *Rana esculenta* allo stadio 26; d) stratificazione della retina allo stadio 26; e) visione dell'occhio allo stadio 27; f) stratificazione della retina allo stadio 27; g) cellule PCNA-ir a livello del nervo ottico allo stadio 27). Unita' di misura della barra di riferimento = 50 μ m

6.4. *Bufo bufo*.



Gli stadi dello sviluppo sono stati scelti in maniera tale che ci fossero delle apprezzabili differenze morfologiche nella forma del corpo tra uno stadio e quello successivo. Tuttavia, con le prime osservazioni si è notato immediatamente che l'occhio aveva degli eventi di differenziamento svincolati dall'anatomia generale del corpo. Pertanto, sono stati aggiunti stadi intermedi al fine di rilevare i cambiamenti che avvenivano nell'occhio, anche quando la struttura generale dell'animale rimaneva pressoché inalterata, per un certo tempo durante lo sviluppo.

Gli stadi utilizzati in questo lavoro, secondo la tavola di Cambar R. e Gipouloux D. (1956) sono: 10, 13, 15, 21, 25, 28, 31, 32 (neometamorfosato).

6.4.1. Sviluppo dell'occhio di *Bufo bufo* allo stadio 10.

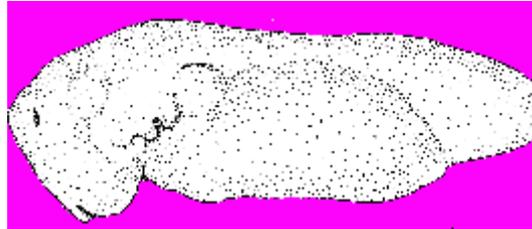


Fig. 111: visione grafica di un girino allo stadio 10 di *Bufo bufo*.

Allo stadio 10, l'embrione, appena schiuso, è in pieno sviluppo anatomico (Fig. 111), si osserva l'inizio dell'invaginazione del placode ottico (Fig. 112a) che però risulta ancora indifferenziato, anche se il cristallino si è già separato, (diametro medio dell'occhio = $32,09 \pm 1,08 \mu\text{m}$) (Fig. 127).

La colorazione immunohistochimica per la PCNA si presenta estesa quasi al 60% delle cellule, che risultano distribuite in maniera casuale nella retina. Il cristallino invece presenta un minor numero di cellule PCNA-immunoreattive (ir) rispetto alla retina (Fig. 112b).

La stessa retina appare indifferenziata senza alcun tipo di stratificazione (area retinica media = $26258,57 \pm 3018,84 \mu\text{m}^2$; n. cellule retiniche medie = $199,13 \pm 24,54$). Nelle sezioni osservate è stata riscontrata la presenza abbondante di cellule in mitosi (n. mitosi medie = $2,5 \pm 0,65$), dislocate nella regione più prossimale ed opposta alla posizione del cristallino (Fig 112c). Le apoptosi osservate sono molto rare (n apoptosi medie = $0,07 \pm 0,007$) Sono anche visibili cellule in mitosi nel cristallino, anche se in numero molto più esiguo rispetto alla retina.

A questo stadio di sviluppo di *Bufo bufo* si riscontra un indice mitotico molto alto (indice mitotico medio = $0,01 \pm 0,0046$) mentre l'indice apoptotico è basso (indice apoptotico medio = $0,000001 \pm 0,0000001$) (Fig. 128).

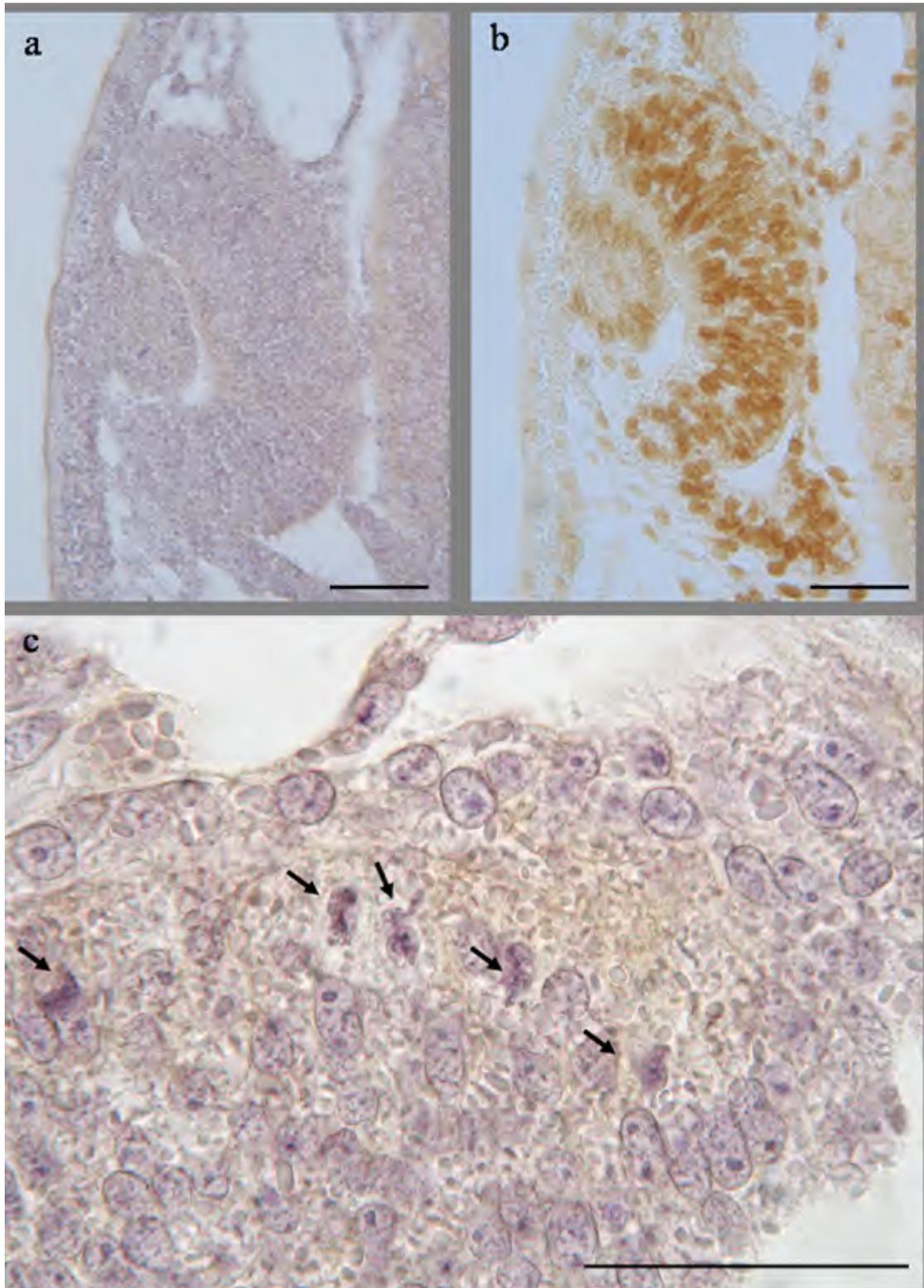


Fig. 112: Sezioni trasversali rappresentative della retina di *Bufo Bufo* allo stadio 10, colorazione con ematossilina ed immunistochemica per la PCNA: a-b) visione generale dell'occhio; c) mitosi rappresentative allo stadio 10. Unità di misura della barra di riferimento = 50 μm .

6.4.2. Sviluppo dell'occhio di *Bufo bufo* allo stadio 13.



Fig. 113: visione grafica di un girino allo stadio 13 di *Bufo bufo*.

L'embrione è in pieno sviluppo con un corpo più allungato rispetto allo stadio precedente e delle branchie ben visibili (Fig. 113). Il cristallino risulta ben differenziato anche se resta ancora a stretto contatto con la retina in quanto l'abbozzo dell'occhio (Fig. 114a). non ha iniziato ancora la secrezione dell'umor vitreo

In queste sezioni l'occhio presenta una quasi totale presenza di cellule PCNA-ir anche se colorate con diversa intensità (Fig. 114b). Le poche e ristrette regioni immunonegative alla PCNA sono presenti nelle zone più interne e centrali della retina, mentre in quelle contigue al cristallino tutte le cellule sono PCNA-ir (diametro medio dell'occhio = $44,52 \pm 3,87\mu\text{m}$) (Fig.127).

La retina non presenta ancora la sua caratteristica stratificazione (area retinica media = $31264,7 \pm 3029,87 \mu\text{m}^2$; n. cellule retiniche medie = $465,2 \pm 55,83$). Come nello stadio precedente, le figure mitotiche (Fig 114c) risultano rare nel cristallino e più abbondanti nella retina (n. mitosi medie = $5,8 \pm 0,64$). Esse si distribuiscono lungo tutta l'estensione della retina, ma rispetto allo stadio precedente ora si localizzano prevalentemente nella sua regione corticale. Anche in questo stadio non si osservano cellule che mostrano chiari segni di apoptosi.

L'indice mitotico rilevato (Fig. 128) in questo stadio è ancora molto alto (indice mitotico medio = $0,01 \pm 0,002$).

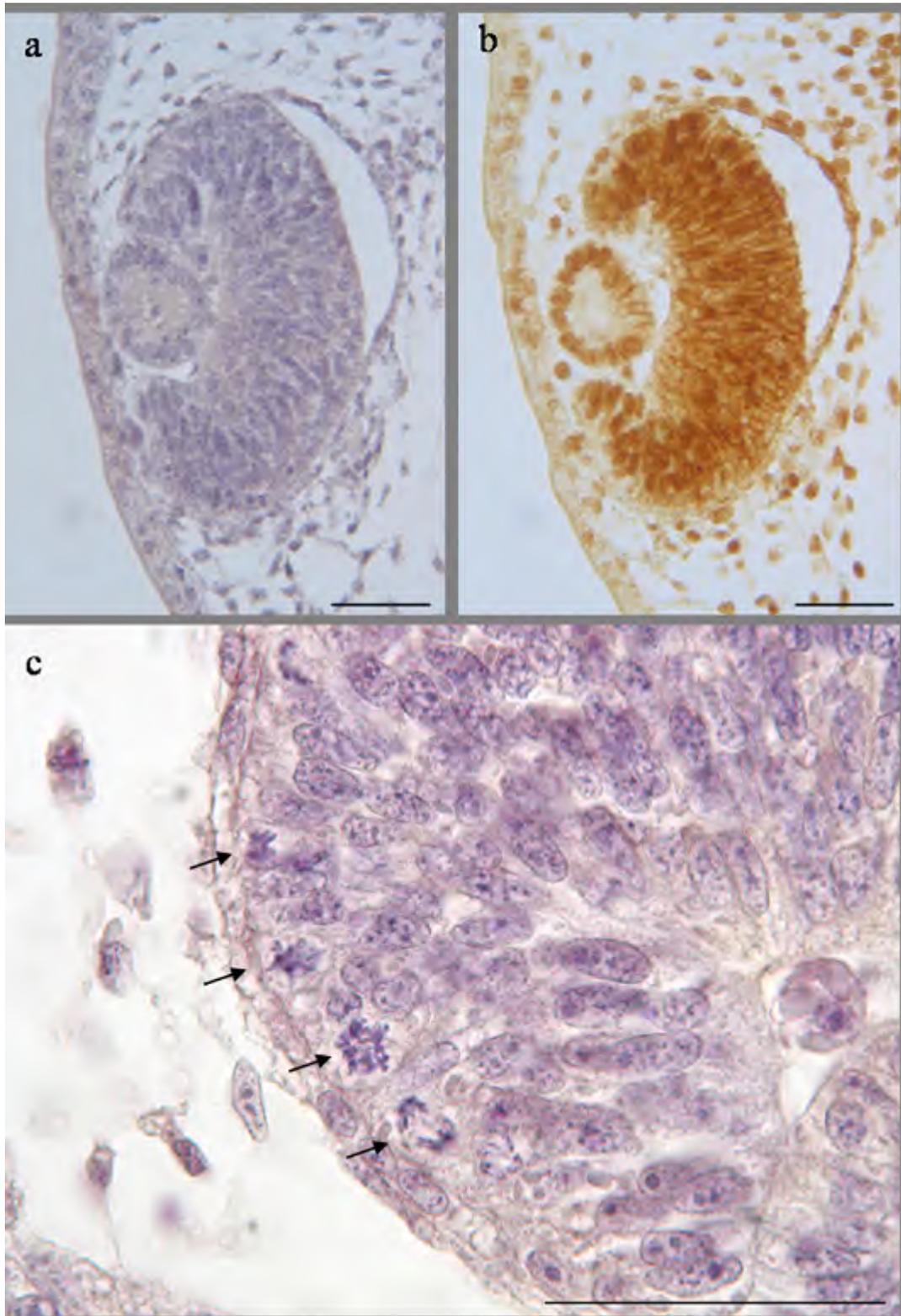


Fig. 114: Sezioni trasversali rappresentative della retina di *Bufo Bufo* allo stadio 13, colorazione con ematossilina ed immunistochemica per la PCNA: a-b) visione generale dell'occhio; c) mitosi rappresentative allo stadio 13. Unità di misura della barra di riferimento = 50 μm .

6.4.3. Sviluppo dell'occhio di *Bufo Bufo* allo stadio 15.



Fig. 115: visione grafica di un girino allo stadio 15 di *Bufo bufo*.

A questo stadio il girino morfologicamente appare con branchie parzialmente ricoperte e non presenta ancora l'abbozzo delle zampe posteriori (Fig. 115).

L'occhio (Fig. 116a) presenta umor vitreo, ma non è ancora molto abbondante. Il cristallino appare ancora in differenziamento, anche se solo nella sua regione corticale (diametro medio dell'occhio = $59,72 \pm 6,67 \mu\text{m}$) (Fig. 127).

Le cellule PCNA-ir sono ora più localizzate, distribuendosi in prevalenza in prossimità della zona marginale ciliare (Marginal ciliar zone, MCZ) ed estinguendosi progressivamente verso la regione della retina più differenziata; mentre le cellule del cristallino risultano PCNA-ir in circa il 30% dei casi (Fig. 116b).

Nella retina (Fig. 116c) si distinguono tre strati: nucleare interno, nucleare esterno (che presenta già l'inizio della differenziazione degli elementi sensoriali) e lo strato gangliare. La suddivisione in strati non è estesa a tutta la retina in quanto la regione laterale in prossimità del cristallino della MCZ risulta ancora indifferenziata (area retinica media = $52635,7 \pm 1,04 \mu\text{m}^2$; n. cellule retiniche medie = $731,17 \pm 84,9$).

L'attività mitotica (Fig. 116d) è ora quasi esclusivamente corticale e localizzata nelle aree in cui non è ancora presente l'organizzazione citoarchitettone stratificata della retina, quindi più abbondante nelle regioni più prossime al cristallino (n. mitosi medie = $5,7 \pm 1,04$). Intanto, cominciano ad evidenziarsi evidenti fenomeni apoptotici (Fig. 116e) nelle regioni della retina opposte al cristallino e nelle aree intermedie (n. apoptosi medie = $0,73 \pm 0,29$).

In figura 128 si osserva una diminuzione dell'indice mitotico rispetto allo stadio precedente (indice mitotico medio = $0,01 \pm 0,0013$) ed un aumento significativo dell'indice apoptotico (indice apoptotico medio = $0,0009 \pm 0,0003$).

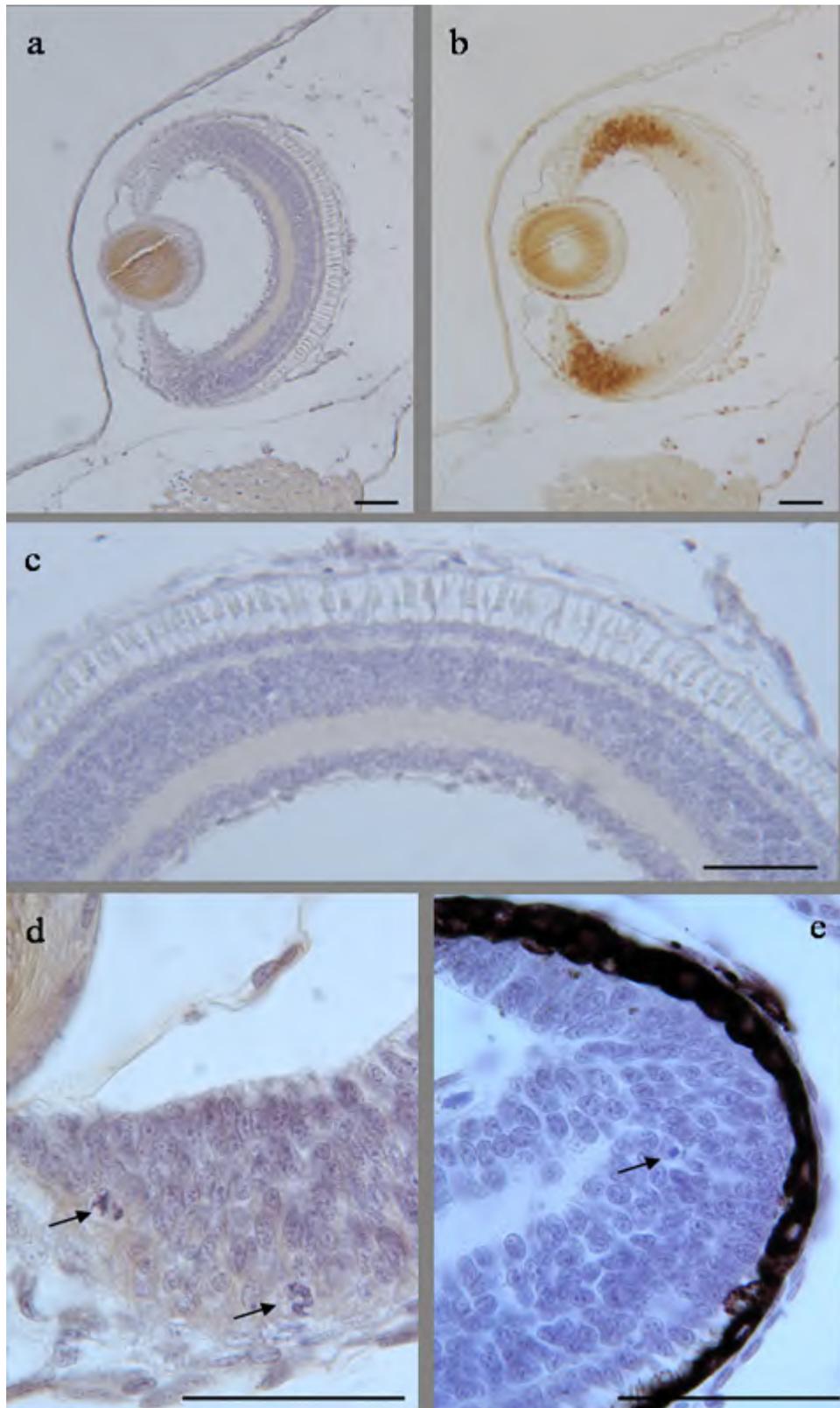


Fig. 116: Sezioni trasversali rappresentative della retina di *Bufo Bufo* allo stadio 15, colorazione con ematossilina ed immunohistochimica per la PCNA: a-b) visione generale dell'occhio; c) stratificazione della retina; d) mitosi rappresentative allo stadio 15; e) apoptosi rappresentative dello stadio 15. Unità di misura della barra di riferimento = 50 μm .

6.4.4. Sviluppo dell'occhio di *Bufo bufo* allo stadio 21.



Fig. 117: visione grafica di un girino allo stadio 21 di *Bufo bufo*.

A questo stadio di sviluppo di *Bufo bufo*, il girino presenta l'abbozzo delle zampe posteriori ed un occhio ben evidente (Fig. 117).

La struttura dell'occhio (Fig. 118a) si presenta pressappoco come lo stadio precedente ma la quantità di umor vitreo risulta più abbondante; l'attività PCNA si concentra solo a livello della MCZ (Fig. 118b) (diametro medio dell'occhio = $92,65 \pm 4,74 \mu\text{m}$) (Fig. 127).

La stratificazione citoarchitettica (Fig. 118c) della retina è, però, più estesa, anche se non completa (area retinica media = $73381,8 \pm 3327,91 \mu\text{m}^2$; n. cellule retiniche medie = $1465,2 \pm 89,81$).

I conteggi (Fig. 128) mostrano una caduta del numero delle figure mitotiche (n. mitosi medie = $2,1 \pm 0,95$) sempre più localizzate nella MCZ e un picco riguardo le apoptosi (Fig. 118d), le quali ora sono localizzate maggiormente nelle regioni intermedie della retina (n. apoptosi medie = $2,93 \pm 0,48$), comprese tra il cristallino e la retina prossimale (regione opposta al cristallino).

A questo stadio di sviluppo si osserva (Fig. 128) una significativa diminuzione dell'indice mitotico (indice mitotico medio = $0,0014 \pm 0,00065$) ed l'indice apoptotico più alto dello sviluppo di *Bufo bufo* (indice apoptotico medio = $0,002 \pm 0,0004$).

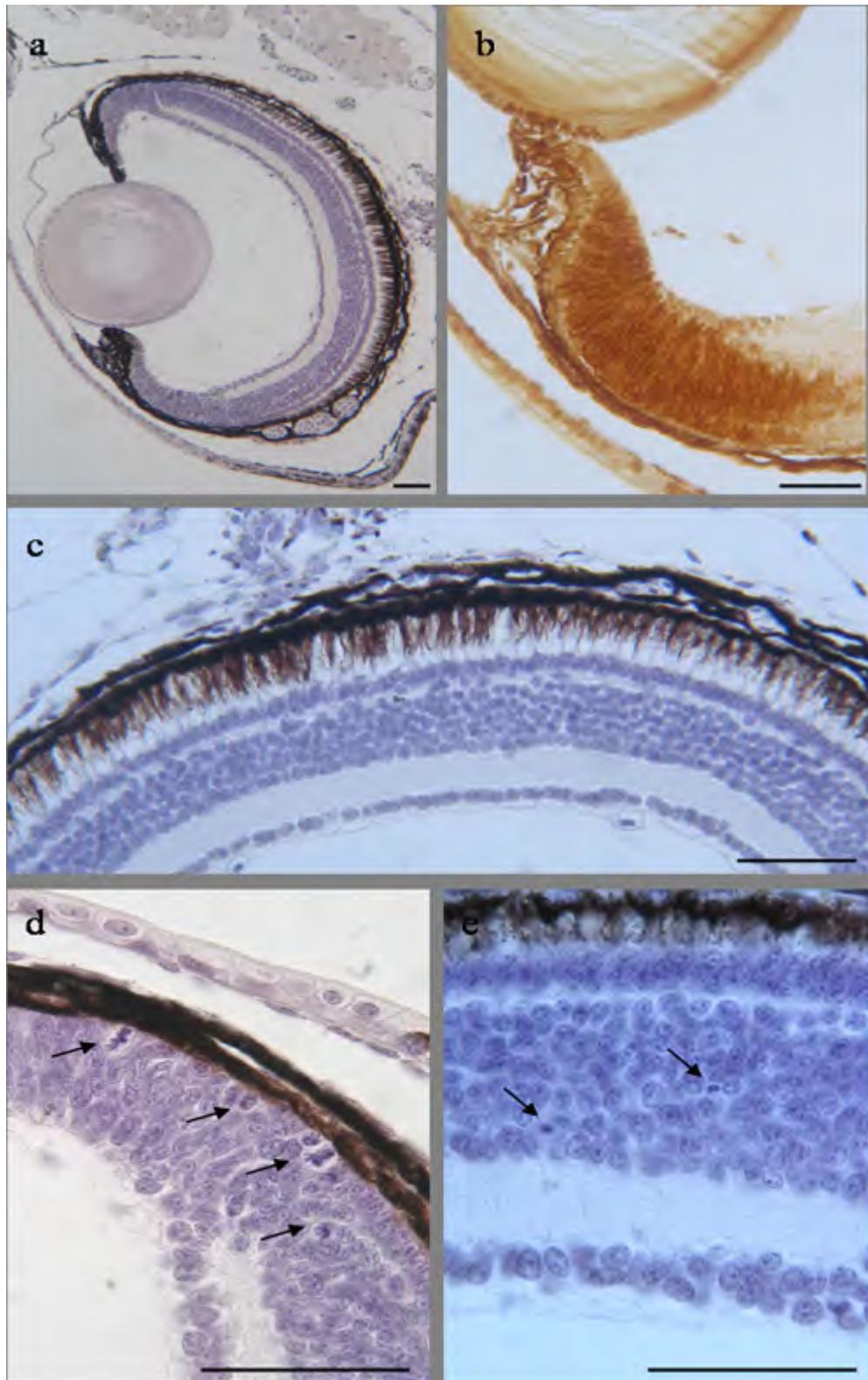


Fig. 118: Sezioni trasversali rappresentative della retina di *Bufo Bufo* allo stadio 21, colorazione con ematossilina ed immunostochimica per la PCNA: a) visione generale dell'occhio; b) cellule PCNA-ir nella zona marginale ciliare (MCZ); c) stratificazione della retina; d) mitosi rappresentative allo stadio 21; e) apoptosi rappresentative dello stadio 21. Unità di misura della barra di riferimento = 50 μm .

6.4.5. Sviluppo dell'occhio di *Bufo bufo* allo stadio 25.



Fig. 119: visione grafica di un girino allo stadio 25 di *Bufo bufo*.

A questo stadio di sviluppo il girino di *Bufo bufo* presenta l'abbozzo delle zampe posteriori, mentre quelle anteriori non sono ancora visibili (Fig. 119).

L'occhio (Fig. 120a) appare ben differenziato (diametro medio dell'occhio = $133,98 \pm 3,66 \mu\text{m}$) e l'attività proliferativa segnalata dalla presenza della PCNA (Fig. 120b) è ristretta alla MCZ e da qui si estende fino circa metà della retina prevalentemente nello strato nucleare interno (INL).

La retina (Fig. 120c) risulta stratificata fin quasi alla MCZ (area retinica media = $95267,47 \pm 8143,6 \mu\text{m}^2$; n. cellule retiniche medie = $1947,97 \pm 216,62$). Gli elementi sensoriali si presentano ulteriormente differenziati affondandosi nello strato pigmentato che circonda l'occhio. Il cristallino si presenta più differenziato e anche la quantità di umor vitreo è maggiore.

Come negli stadi precedenti l'attività mitotica (Fig. 120d) è esclusivamente corticale e strettamente localizzata nella MCZ (n. mitosi medie = $9,77 \pm 1,6$) e l'attività apoptotica (Fig. 120e) è, invece, più abbondante nella retina intermedia (n. apoptosi medie = $0,9 \pm 0,1$). Si registra (Fig. 128) un nuovo incremento di attività mitotica (indice mitotico medio = $0,0049 \pm 0,004$) e una diminuzione del fenomeno apoptotico (indice apoptotico medio = $0,0005 \pm 0,00008$).

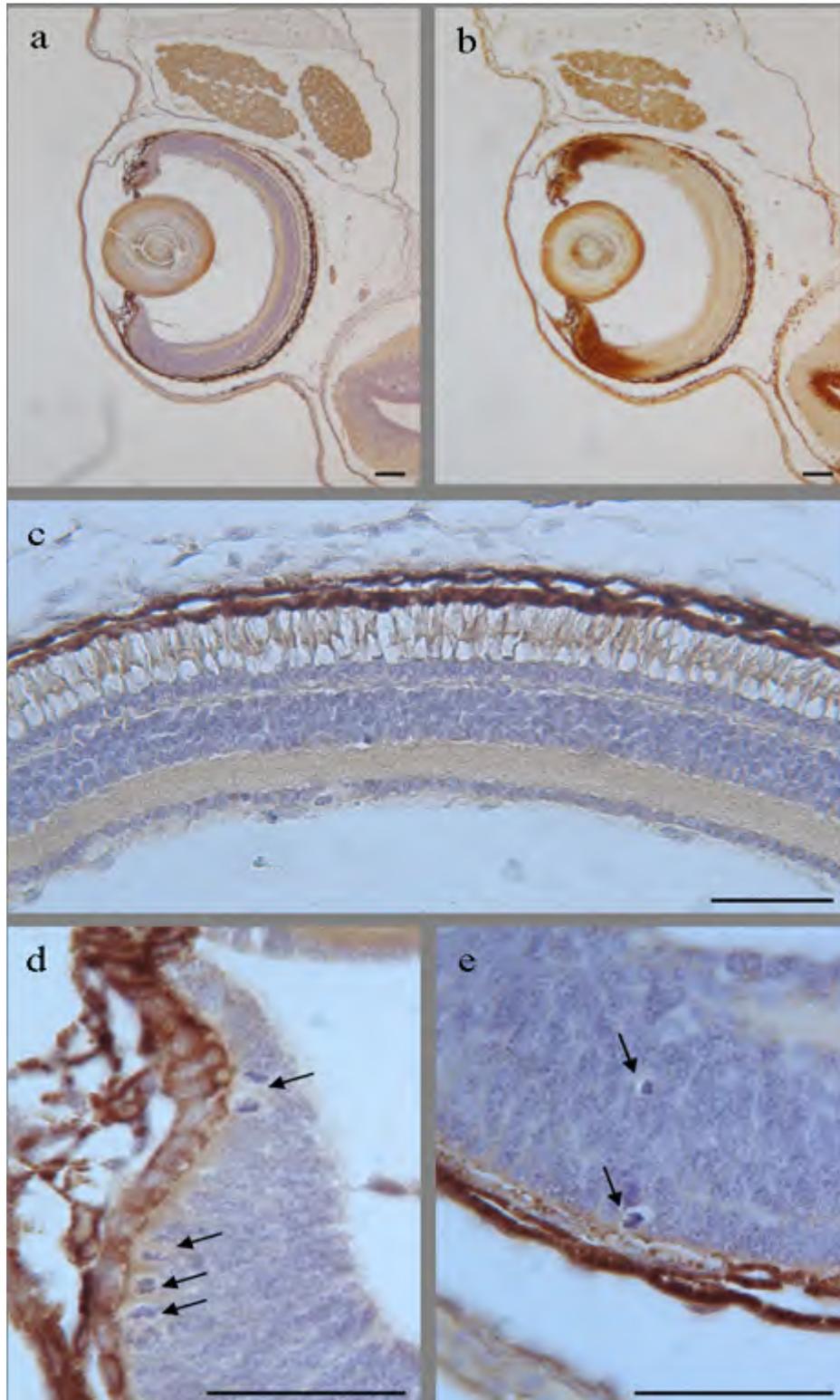


Fig. 120: Sezioni trasversali rappresentative della retina di *Bufo Bufo* allo stadio 25, colorazione con ematossilina ed immunistoichimica per la PCNA: a-b) visione generale dell'occhio; c) stratificazione della retina; d) mitosi rappresentative allo stadio 25; e) apoptosi rappresentative dello stadio 25, insieme ad una mitosi. Unità di misura della barra di riferimento = 50 μm .

6.4.6. Sviluppo dell'occhio di *Bufo bufo* allo stadio 28.



Fig. 121: visione grafica di un girino allo stadio 28 di *Bufo bufo*.

Allo stadio 28 il girino presenta zampe posteriori ben formate (Fig. 121).

L'occhio (Fig. 122a) appare più grande rispetto allo stadio precedente (diametro medio dell'occhio = $149,36 \pm 5,24 \mu\text{m}$), l'attività proliferativa segnalata dalla PCNA (Fig. 122b) è presente sempre nella zona marginale ciliare.

La stratificazione della retina (Fig. 122c) è simile allo stadio precedente (area retina media = $140840,93 \pm 5533,93 \mu\text{m}^2$; n. cellule retiniche medie = $3317,4 \pm 300,47$). Le cellule dei fotorecettori (coni e bastoncelli) dello strato nucleare esterno (ONL) aumentano di dimensioni.

L'attività mitotica (Fig. 122d) è molto forte (n. mitosi medie = $14,27 \pm 3,2$); allo stesso modo anche il numero di cellule apoptotiche (n. apoptosi medie = $2,93 \pm 0,33$) mostrano un lieve incremento e sono localizzate nelle stesse aree degli stadi precedenti (Fig. 122e-f).

Dai conteggi effettuati sulle cellule si riscontra indice mitotico pressochè uguale allo stadio precedente (indice mitotico medio = $0,0043 \pm 0,0007$) ed un secondo picco apoptotico (indice apoptotico medio = $0,0009 \pm 0,0001$) dopo quello osservato allo stadio 21 dello sviluppo di *Bufo bufo* (Fig. 128).

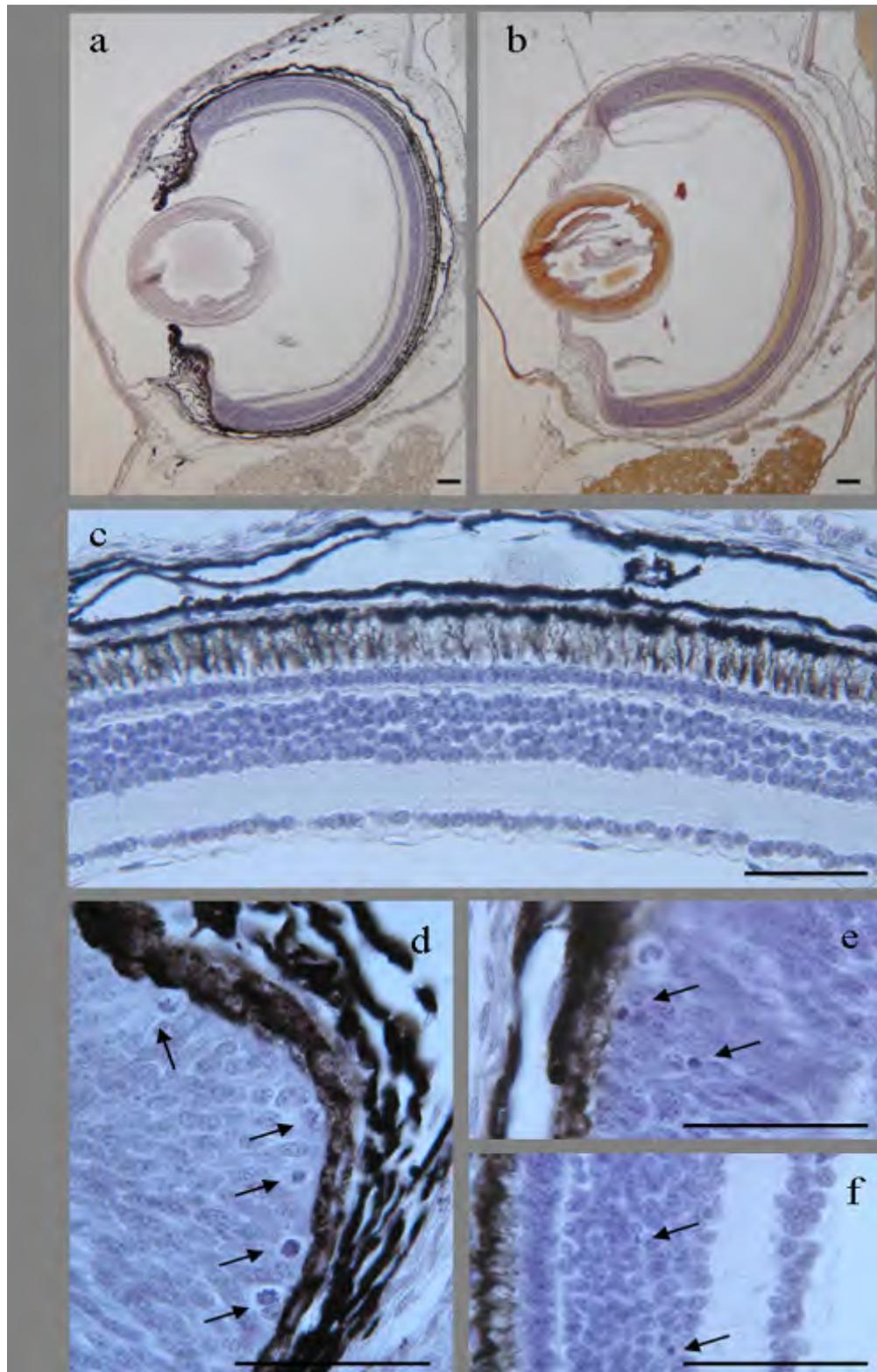


Fig. 122: Sezioni trasversali rappresentative della retina di *Bufo Bufo* allo stadio 28, colorazione con ematossilina ed immunostochimica per la PCNA: a-b) visione generale dell'occhio; c) stratificazione della retina; d) mitosi rappresentative allo stadio 28; e-f) apoptosi rappresentative dello stadio 25. Unità di misura della barra di riferimento = 50 μ m.

6.4.7. Sviluppo dell'occhio di *Bufo bufo* allo stadio 31.

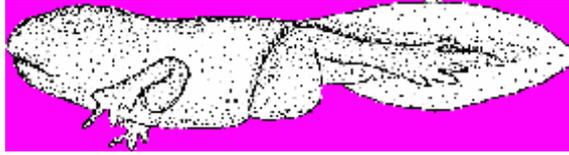


Fig. 123: visione grafica di un girino allo stadio 31 di *Bufo bufo*.

Allo stadio 31, il girino di *Bufo bufo* (Fig. 123) è prossimo alla metamorfosi e presenta sia le zampe posteriori che quelle anteriori ben sviluppate.

L'occhio (Fig. 124a) ha ormai completato il suo sviluppo e l'attività proliferativa della PCNA (Fig. 124b) è molto più debole e si osserva solo nella MCZ (Fig. 117d) (diametro medio dell'occhio = $210,9 \pm 3,38 \mu\text{m}$).

Il cristallino mostra anch'esso rari nuclei PCNA-ir, ma soltanto nelle regioni laterali

Il differenziamento della retina ha ormai quasi raggiunto la sua connotazione definitiva (Fig. 124c). Sono ben evidenti i tre strati: nucleare interno, nucleare esterno e strato gangliare, estesi fino alla MCZ (area retinica = $191066,73 \pm 15442,45 \mu\text{m}^2$; n. cellule retiniche medie = $3080,07 \pm 255,65$); anche lo strato dei fotorecettori è quasi differenziato fino alla MCZ.

L'attività mitotica (n. mitosi = $4,2 \pm 0,39$) come quella apoptotica (n. apoptosi = $2,3 \pm 0,09$) sono più deboli rispetto allo stadio precedente.

Dai conteggi effettuati riportando il numero di figure mitotiche ed apoptotiche con il totale delle cellule (Fig. 128) si osserva una diminuzione sia dell'indice mitotico (indice mitotico medio = $0,0014 \pm 0,00019$) che dell'indice apoptotico (indice apoptotico medio = $0,00079 \pm 0,000145$) rispetto allo stadio precedente.

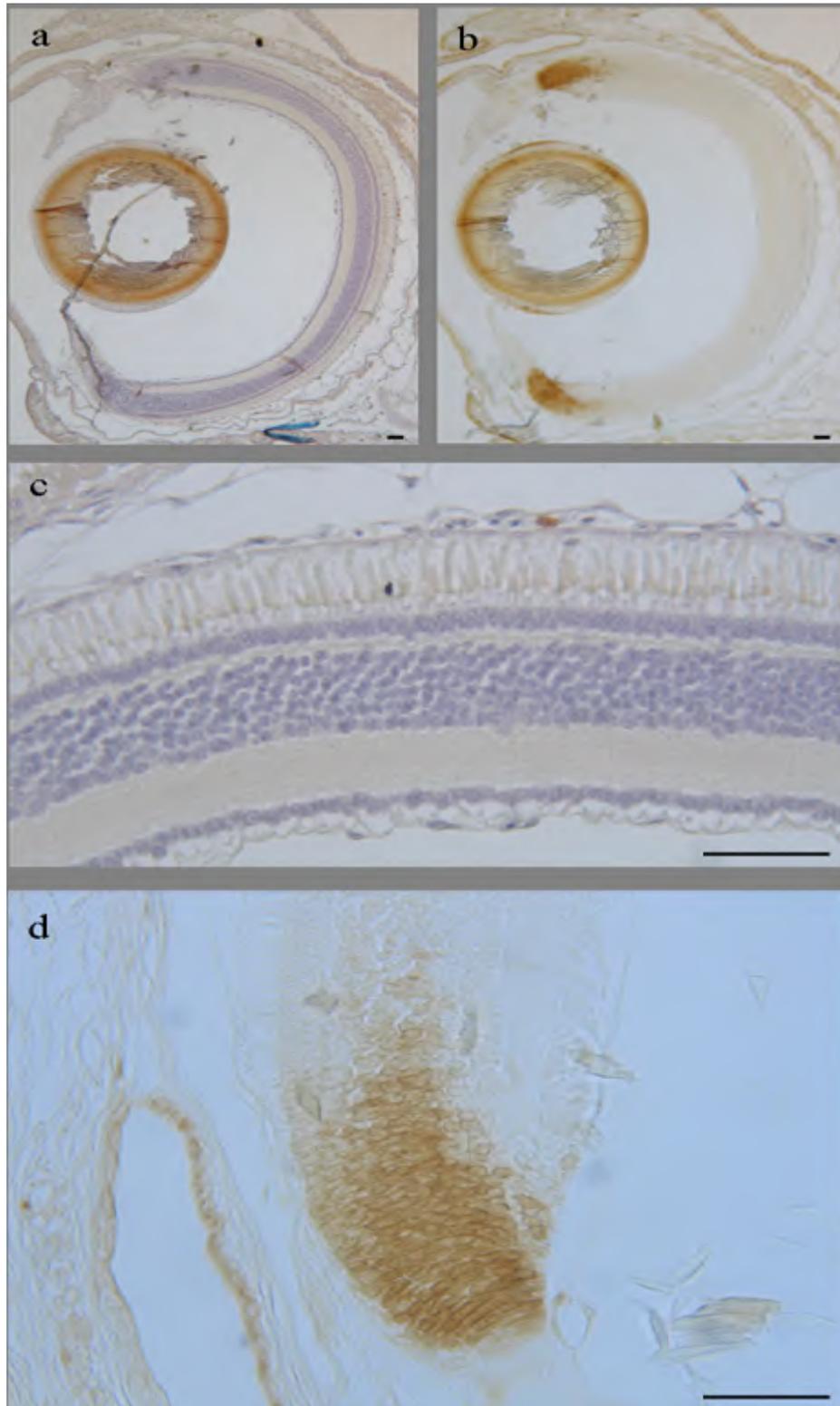


Fig. 124: Sezioni trasversali rappresentative della retina di *Bufo Bufo* allo stadio 31, colorazione con ematossilina ed immunistochemica per la PCNA: a-b) visione generale dell'occhio; c) stratificazione della retina; d) b) cellule PCNA-ir nella zona marginale ciliare; (MCZ). Unità di misura della barra di riferimento = 50 μ m.

6.4.8. Sviluppo dell'occhio di *Bufo bufo* allo stadio neometamorfosato.

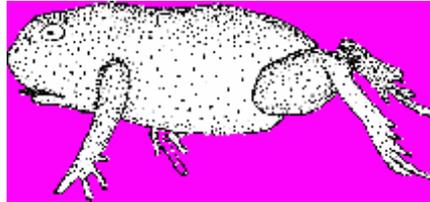


Fig. 125: visione grafica di un girino neometamorfosato di *Bufo bufo*.

A questo stadio di sviluppo di *Bufo bufo* la metamorfosi è completa in seguito al riassorbimento della coda (Fig. 125) Morfologicamente l'occhio (Fig. 126a-b) appare identico allo stadio precedente (diametro medio dell'occhio = $196,481 \pm 14,91 \mu\text{m}$) (fig. 127).

La retina (Fig. 126c) è progredita solo lievemente rispetto allo stadio precedente (area retinica media = $184221,1 \pm 8535,29 \mu\text{m}^2$; n. cellule retiniche medie = $2991,53 \pm 146,23$). Lo strato dei coni e bastoncelli è esteso fino alla regione del margine ciliare e presenta un differenziamento completo. Le protrusioni sensoriali sono fortemente compenstrate nello strato pigmentato.

L'attività proliferativa dell'occhio crolla drasticamente durante la metamorfosi come testimoniato dalla diminuzione delle cellule in mitosi (n. mitosi = $0,2 \pm 0,126$) e dall'attività PCNA-ir, la quale è del tutto assente nel cristallino, ma si evidenzia ancora, anche se di debole intensità e in poche cellule nella MCZ (Fig. 126d).

Allo stesso modo anche i corpi apoptotici (n. $0,1 \pm 0,044$) sono sporadici.

I conteggi effettuati in questo stadio di sviluppo (Fig.128) mostrano una significativa diminuzione sia dell'indice mitotico (indice mitotico medio = $0,0000662 \pm 0,000040$) che dell'indice apoptotico ($0,000031$; e.s. = $0,0000139$) rispetto allo stadio 31.

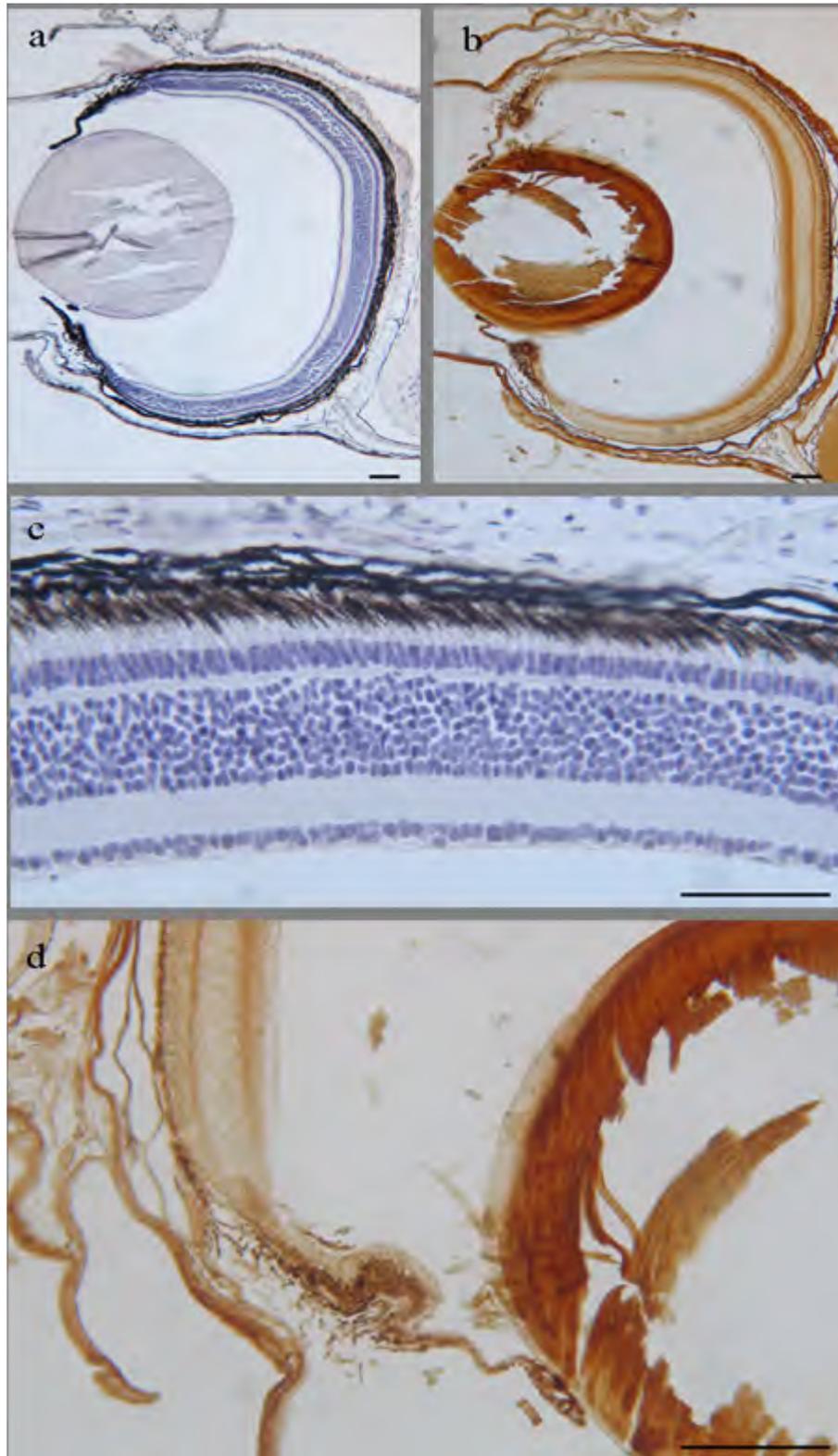


Fig. 126: Sezioni trasversali rappresentative della retina di *Bufo Bufo* allo stadio neometamorfosato, colorazione con ematossilina ed immunisto chimica per la PCNA: a-b) visione generale dell'occhio; c) stratificazione della retina; d) b) cellule PCNA-ir nella zona marginale ciliare; (MCZ). Unità di misura della barra di riferimento = 50 μm .

6.4.9. Risultati delle quantificazioni di mitosi ed apoptosi nella retina e delle stime morfologiche nell'occhio di *Bufo bufo*.

I risultati dei conteggi dell'area retinica media, della densità cellulare, del numero di cellule totali, delle figure mitotiche e apoptotiche in sezioni rappresentative, i relativi indici e le dimensioni dell'occhio sono di seguito riportate nelle figure 120 e 121.

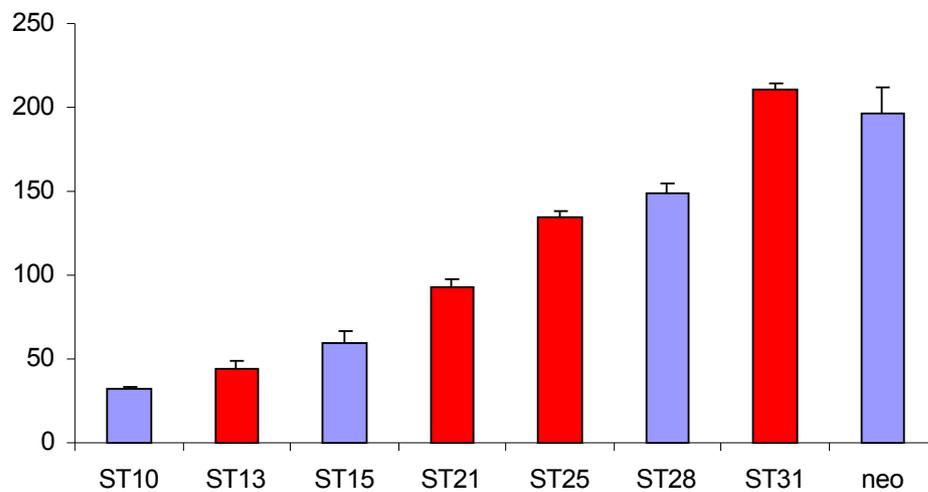


Fig. 127: visione grafica delle dimensioni dell'occhio di *Bufo bufo* nei vari giorni dello sviluppo (valori significativi evidenziati in rosso).

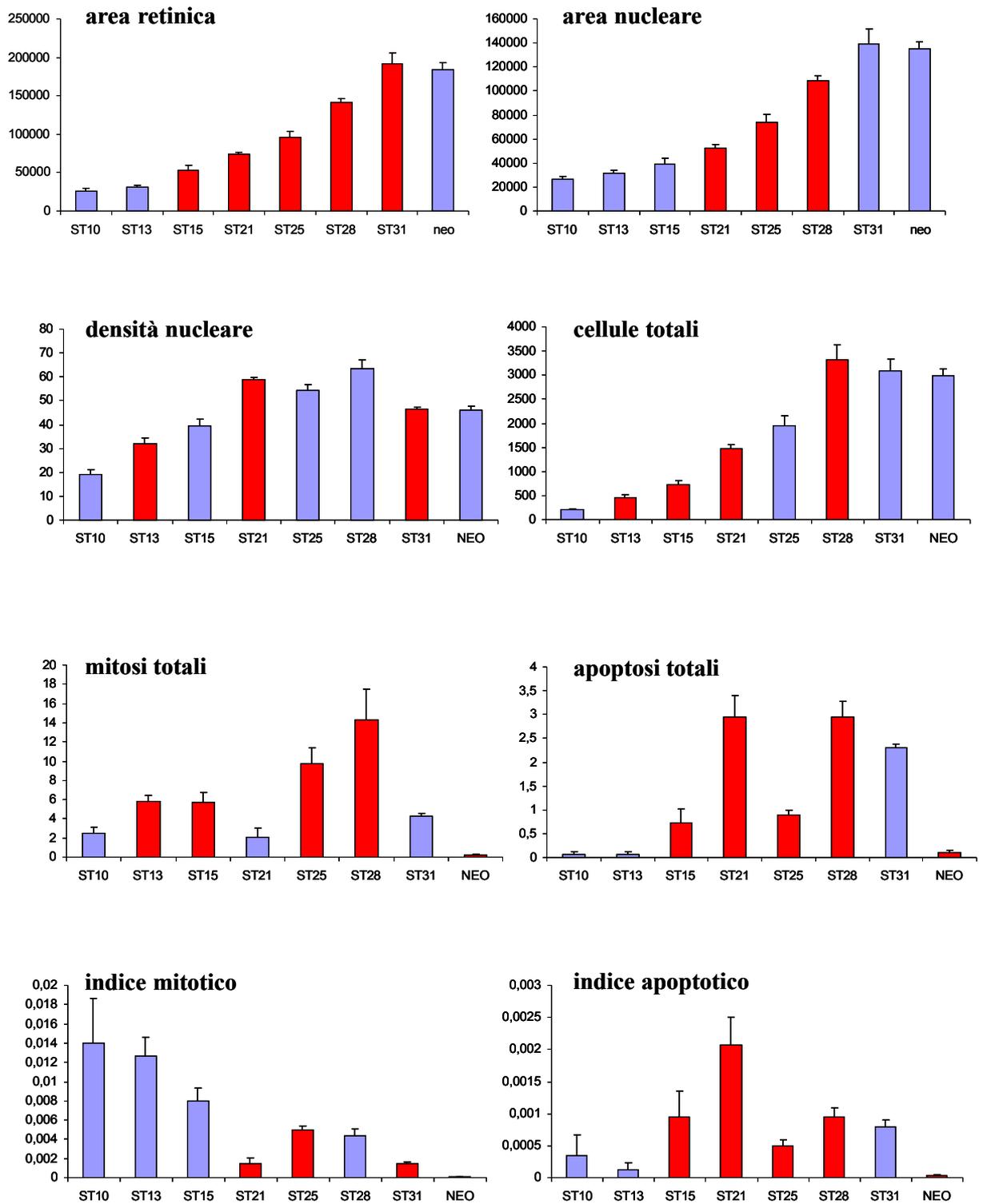


Fig. 128: visione grafica dell'area retinica, area nucleare, densità cellulare, cellule totali, mitosi totali, apoptosi totali, indice mitotico, indice apoptotico di *Bufo bufo* nei vari giorni dello sviluppo (valori significativi evidenziati in rosso).

6.4.10. Quantificazione di PARP-1 frammentata nell'occhio di *Bufo bufo*.

Alcuni campioni di *Bufo bufo* sono stati sottoposti a l'analisi biochimica mediante Western blotting per la rilevazione della PARP-1 frammentata. I risultati sono evidenziati in figura 129:

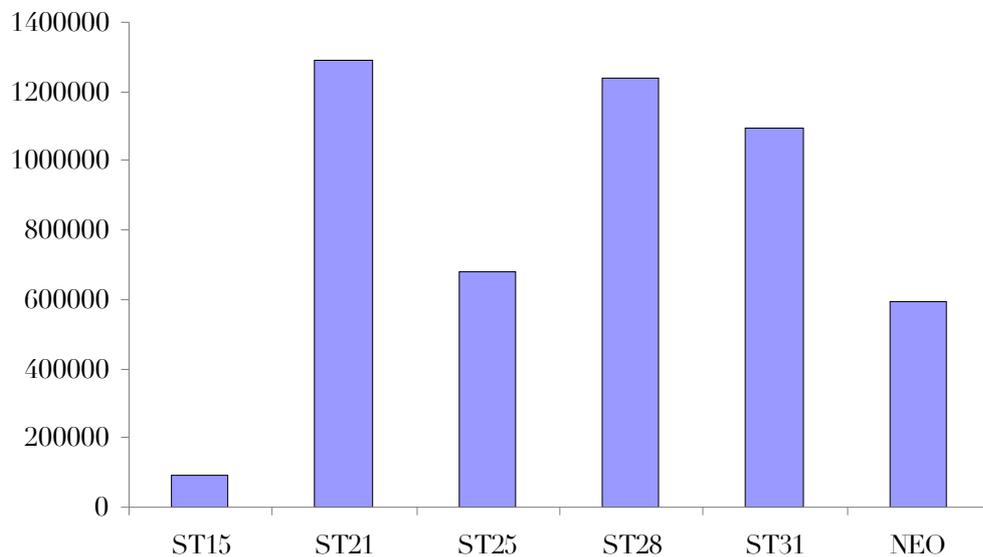


Fig. 129: visione grafica della quantizzazione della PARP-1 frammentata in alcuni stadi dello sviluppo di *Bufo bufo*.

6.4.11. Quantificazione di PARP-1 frammentata nella mucosa olfattiva di *Bufo bufo*.

La mucosa olfattiva di *Bufo bufo* è stata analizzata mediante l'analisi biochimica per la rivelazione della PARP-1 frammentata. I campioni utilizzati sono: stadi 15, 21, 25, 28, 31 e neometamorfosato. I risultati sono evidenziati in Figura 130.

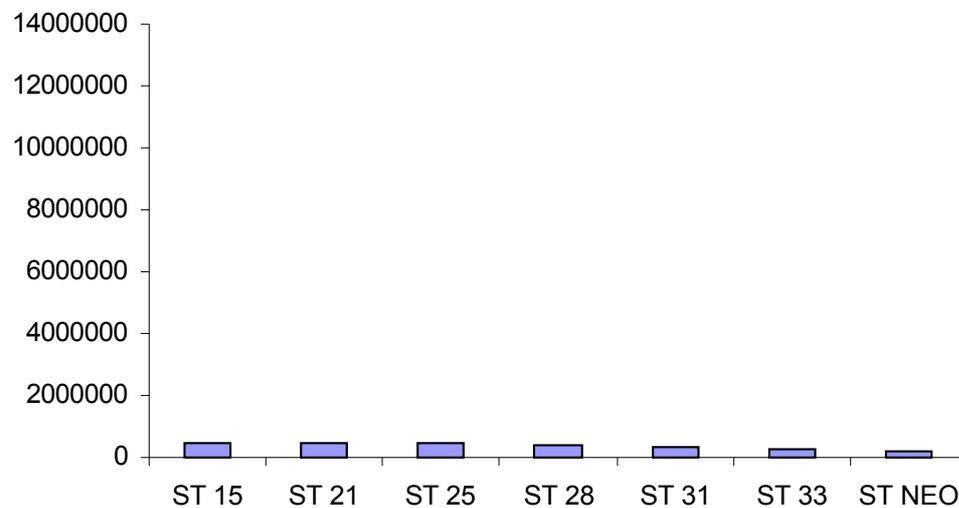
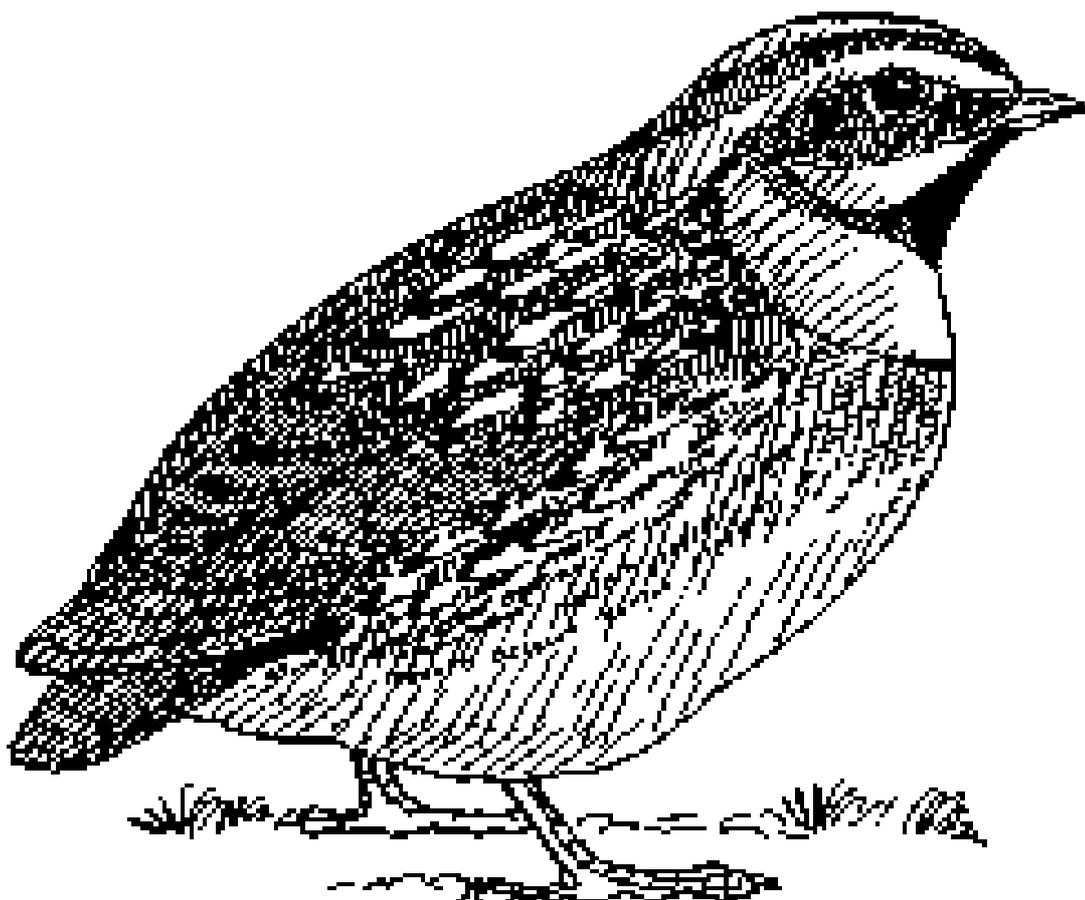


Fig. 130: visione grafica della quantizzazione della PARP-1 frammentata in alcuni stadi dello sviluppo di *Bufo bufo*.

6.5. *Coturnix coturnix*.



E' stato studiato lo sviluppo dell'occhio di *Coturnix coturnix* a partire dal quarto giorno di incubazione, quando l'occhio è ben evidente, fino al diciassettesimo giorno di incubazione, cui segue la schiusa.

L'analisi è stata eseguita mediante la colorazione istologica con ematossilina, l'immunoistochimica per la PCNA e l'analisi dell'espressione delle PARP frammentata mediante western blotting. Per le altre 2 tecniche sono stati usati stadi di sviluppo rappresentativi.

6.5.1. Sviluppo dell'occhio di *Coturnix coturnix* allo stadio E4.



Fig. 131: visione grafica di *Coturnix coturnix* a 4 giorni d'incubazione.

L'embrione a 4 giorni di incubazione presenta un capo abbozzato dove l'occhio non è ancora facilmente rilevabile. Presenta inoltre i vasi che lo collegano al sacco vitellino per l'alimentazione (Fig.131). Dalle sezioni osservate al microscopio, l'occhio (Fig. 132a) mostra regioni in attiva proliferazione e presenta un cristallino di forma allungata (diametro medio dell'occhio = $359,4 \pm 22,09 \mu\text{m}$). L'attività PCNA si riscontra in tutto l'occhio (Fig 132c)

La retina (Fig. 132d) è costituita da cellule che non appaiono organizzate in strati e le mitosi si localizzano lungo tutta la retina senza una particolare zonazione (area retinica media = $63019,9 \pm 7290,1 \mu\text{m}^2$).

Oltre agli elementi mitotici (Fig. 132b), (n. mitosi medie = $33,08 \pm 4,18$), si riscontrano anche alcune apoptosi (n. apoptosi medie = $4,48 \pm 1,55$). Dai conteggi effettuati sul numero di elementi mitotici e apoptotici in relazione alle cellule retiniche totali (cellule retiniche medie = $573,12 \pm 73,49$) si evidenzia sia un indice mitotico (indice mitotico medio = $0,0587 \pm 0,0042$) che apoptotico particolarmente alto (indice apoptotico medio = $0,0017 \pm 0,00051$).

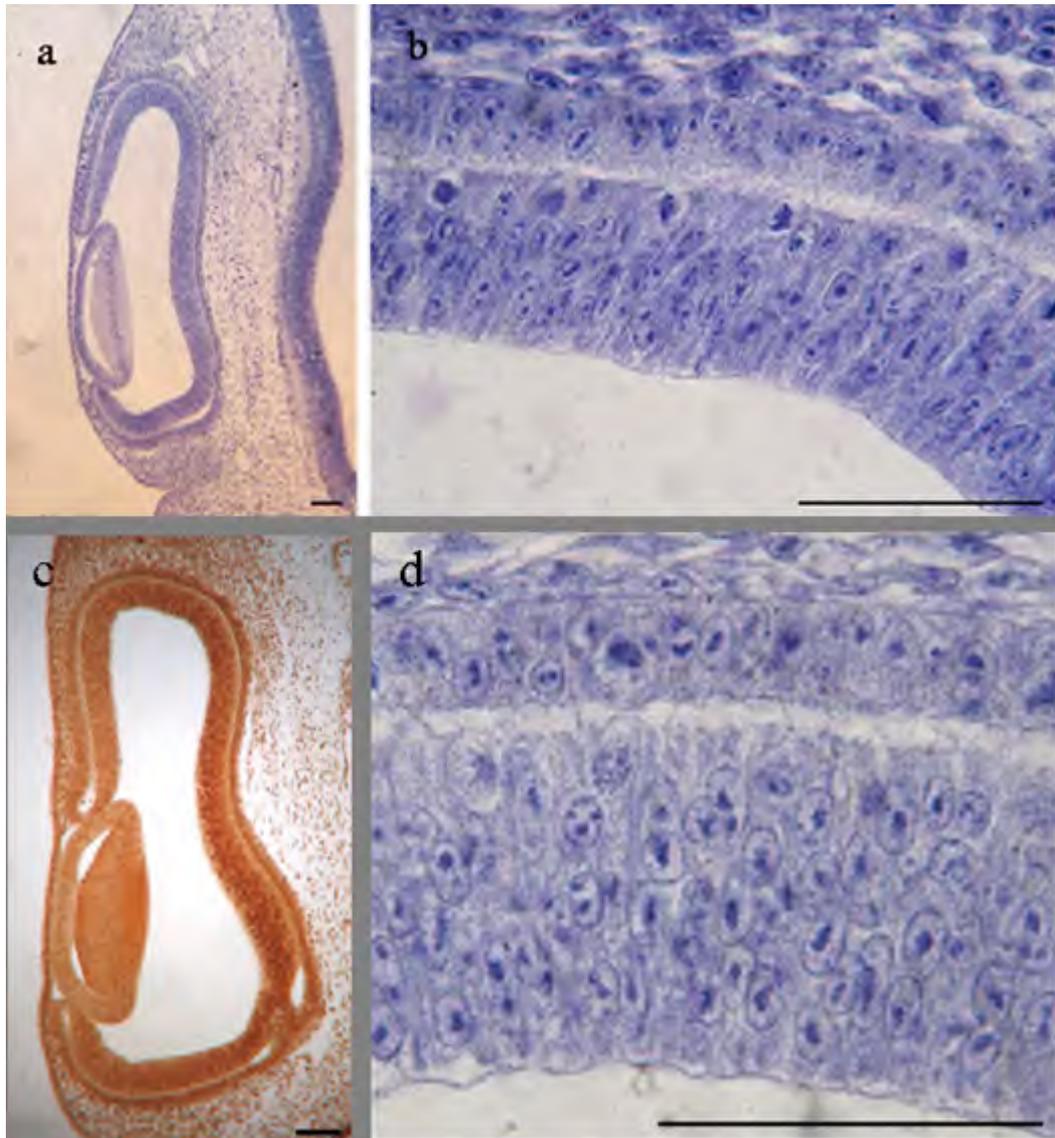


Fig. 132: Sezioni trasversali rappresentative della retina di *Coturnix coturnix* dopo 4 giorni d'incubazione, colorate con ematossilina. a) occhio con cristallino in neoformazione; b) esempi di mitosi a livello della retina; c) cellule immunoreattive alla PCNA in tutt'occhio; d) la retina appare in piena proliferazione con la presenza di evidenti mitosi e senza alcun tipo di stratificazione. Unità di misura della barra di riferimento = 50 μ m.

6.5.2. Sviluppo dell'occhio di *Coturnix coturnix* allo stadio E5.

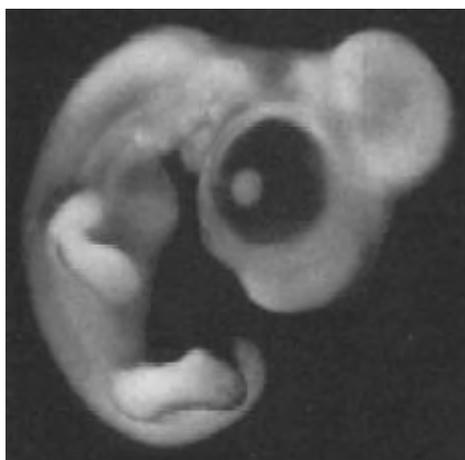


Fig. 133: visione grafica di *Coturnix coturnix* a 5 giorni d'incubazione.

L'embrione, a 5 giorni d'incubazione, presenta un encefalo non ancora ben sviluppato e si osserva l'abbozzo degli arti (Fig. 133).

L'occhio (Fig. 134a) cresce in dimensioni rispetto al giorno precedente (dimensione media dell'occhio = $1236,2 \pm 32,82 \mu\text{m}$) con un cristallino ben evidente. L'attività PCNASica è sempre molto forte in tutta la retina (Fig. 134d).

La retina (Fig. 134c), in continua crescita (area retinica media = $210006,92 \pm 11070,48 \mu\text{m}^2$; cellule retiniche medie = $2233,88 \pm 176,81$) non è stratificata ed il numero di mitosi continua ad aumentare (n. mitosi medie = $125,52 \pm 11,93$), distribuendosi in tutta estensione retinica. A questo giorno d'incubazione l'indice mitotico (indice mitotico medio = $0,056 \pm 0,001$) mostra una leggera diminuzione pur rimanendo tra i valori più alti analizzati durante tutto lo sviluppo di *Coturnix coturnix*.

Le apoptosi (Fig. 133b), contate nelle sezioni esaminate, subiscono un leggero calo in numero (n. apoptosi medie = $3,88 \pm 0,97$) che si ripercuote nel calcolo dell'indice apoptotico ($0,0013 \pm 0,0002$).

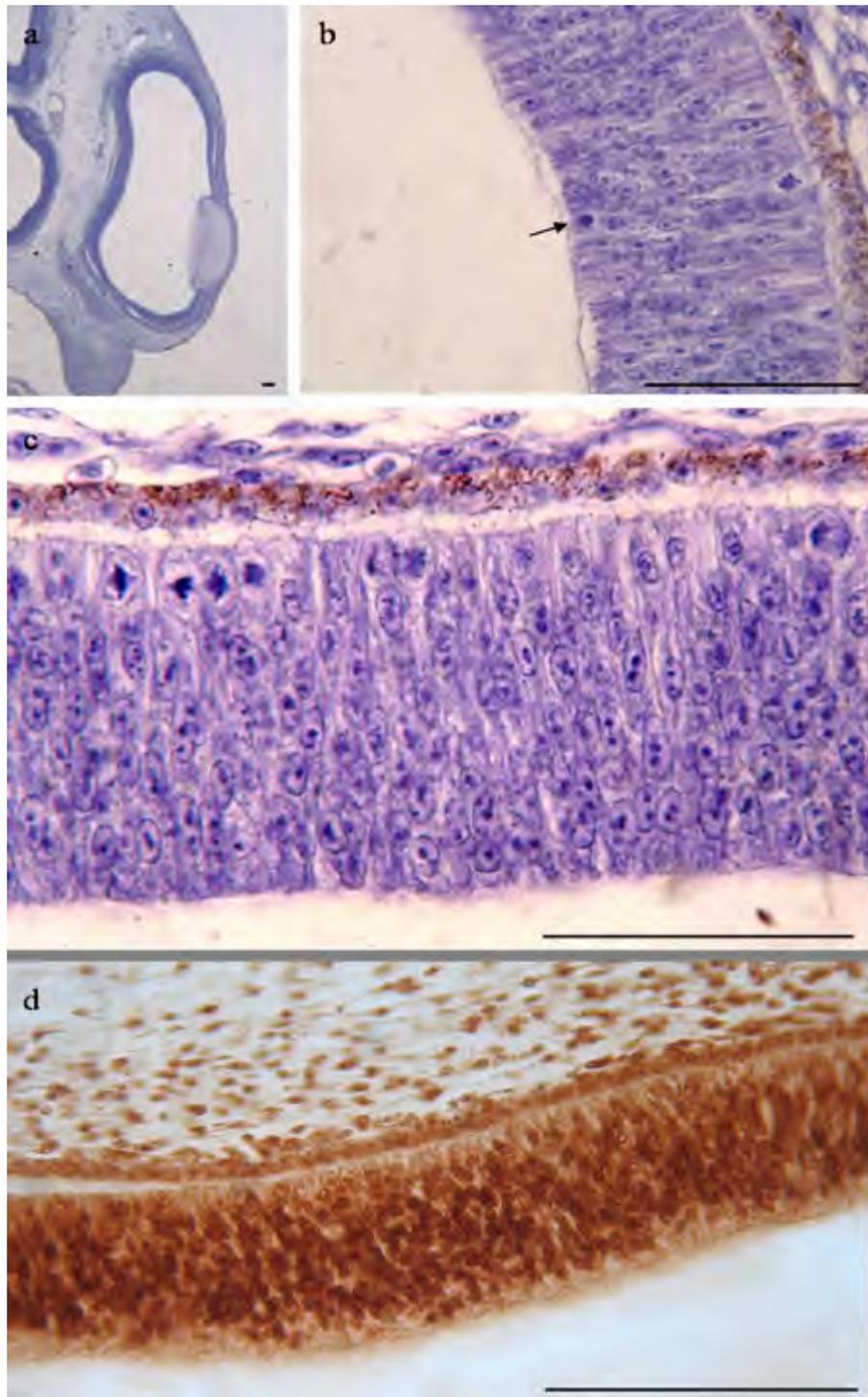


Fig. 134: Sezioni trasversali rappresentative della retina di *Coturnix coturnix* dopo 5 giorni d'incubazione, colorate con ematossilina. a) visione generale dell'occhio; b) esempio di apoptosi (freccia) a livello della retina; c) la retina appare in piena proliferazione con la presenza di evidenti mitosi e senza alcun tipo di stratificazione; d) forte attività PCNA in tutta la retina. Unità di misura della barra di riferimento = 50 μm .

6.5.3. Sviluppo dell'occhio di *Coturnix coturnix* allo stadio E6.



Fig. 135: visione grafica di *Coturnix coturnix* a 6 giorni d'incubazione.

Gli annessi embrionali appaiono riccamente vascolarizzati e i vasi sanguigni confluiscono verso l'embrione attraverso il sacco vitellino; gli arti appaiono più sviluppati rispetto al giorno precedente (Fig. 135).

L'occhio (Fig. 136a) continua a crescere di dimensione (diametro medio dell'occhio = $1291,4 \pm 43,49 \mu\text{m}$) ed il cristallino appare in pieno sviluppo (Fig. 140b).

La retina (Fig. 136c) continua la sua crescita (area retinica media = $420893,8 \pm 4426,86 \mu\text{m}^2$; cellule retiniche medie = $6144,48 \pm 274,51$), con l'aumento contemporaneo della sua densità cellulare (Fig. 160) e non appare ancora stratificata.

Il numero di mitosi (Fig. 136d) continua ad aumentare (n. mitosi medie = $293,24 \pm 9,53$) mentre gli elementi apoptotici (Fig. 136e) restano ancora in numero molto basso (n. apoptosi medie = $8,08 \pm 1,66$).

Dai conteggi effettuati (Fig. 164) si evidenzia un indice mitotico (indice mitotico medio = $0,048 \pm 1,66$) ancora molto alto mentre l'evento apoptotico (indice apoptotico medio = $0,001 \pm 0,0002$) continua ad essere molto basso.

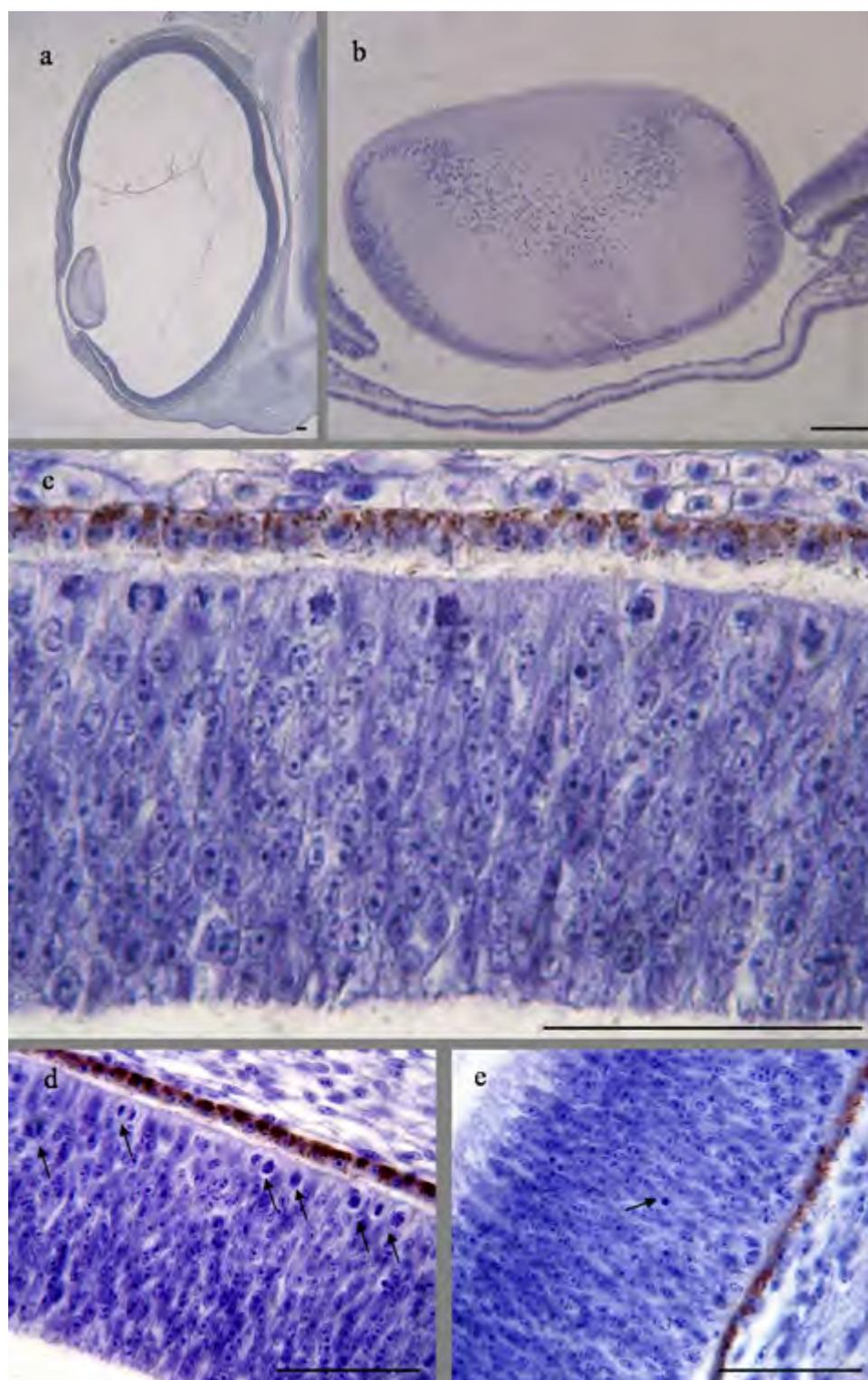


Fig. 136: Sezioni trasversali rappresentative della retina di *Coturnix coturnix* dopo 6 giorni d'incubazione, colorate con ematossilina. a) visione generale dell'occhio; b) cristallino in proliferazione; c) la retina appare in piena proliferazione con la presenza di evidenti mitosi e senza alcun tipo di stratificazione; d) esempi di mitosi (freccie) a livello della retina; e) apoptosi tipica. Unità di misura della barra di riferimento = 50 μm .

6.5.4. Sviluppo dell'occhio di *Coturnix coturnix* allo stadio E7.



Fig. 137: visione grafica di *Coturnix coturnix* a 7 giorni d'incubazione.

L'embrione all'interno dell'uovo continua a crescere in dimensioni: il capo risulta più sviluppato e gli arti sono più definiti (Fig.137). L'occhio presenta una maggiore quantità di umor vitreo rispetto al giorno precedente ed un cristallino che appare quasi completamente strutturato (diametro medio dell'occhio = $2096,4 \pm 68,96 \mu\text{m}$).

A questo stadio di sviluppo, si osservano la maggiore percentuale di nuclei PCNA-ir localizzata nella regione più distante dal cristallino, mentre il segnale risulta assente nella MCZ. Inoltre, le cellule positive appaiono più concentrate nella zona centrale della retina, meno nella regione esterna e del tutto assenti nel margine interno.

La retina (Fig. 138c) incrementa la sua superficie, ma resta ancora non stratificata (area retinica media = $905208 \pm 159571 \mu\text{m}^2$; cellule retiniche medie = $905208 \pm 15971,48$). Il numero delle mitosi (Fig. 138a,b) in questo stadio di sviluppo aumenta in maniera significativa (numero mitosi medie = $346,08 \pm 18,72$), mentre le figure apoptotiche (Fig. 138d) subiscono un lieve incremento (numero apoptosi medie = $17 \pm 3,21$).

I grafici relativi ai fenomeni di rimodellamento della retina mostrano una riduzione dell'indice mitotico (indice mitotico medio = $0,025 \pm 0,007$), mentre l'indice apoptotico resta su valori simili rispetto ai precedenti giorni di incubazione (indice apoptotico medio = $0,001 \pm 0,0003$).

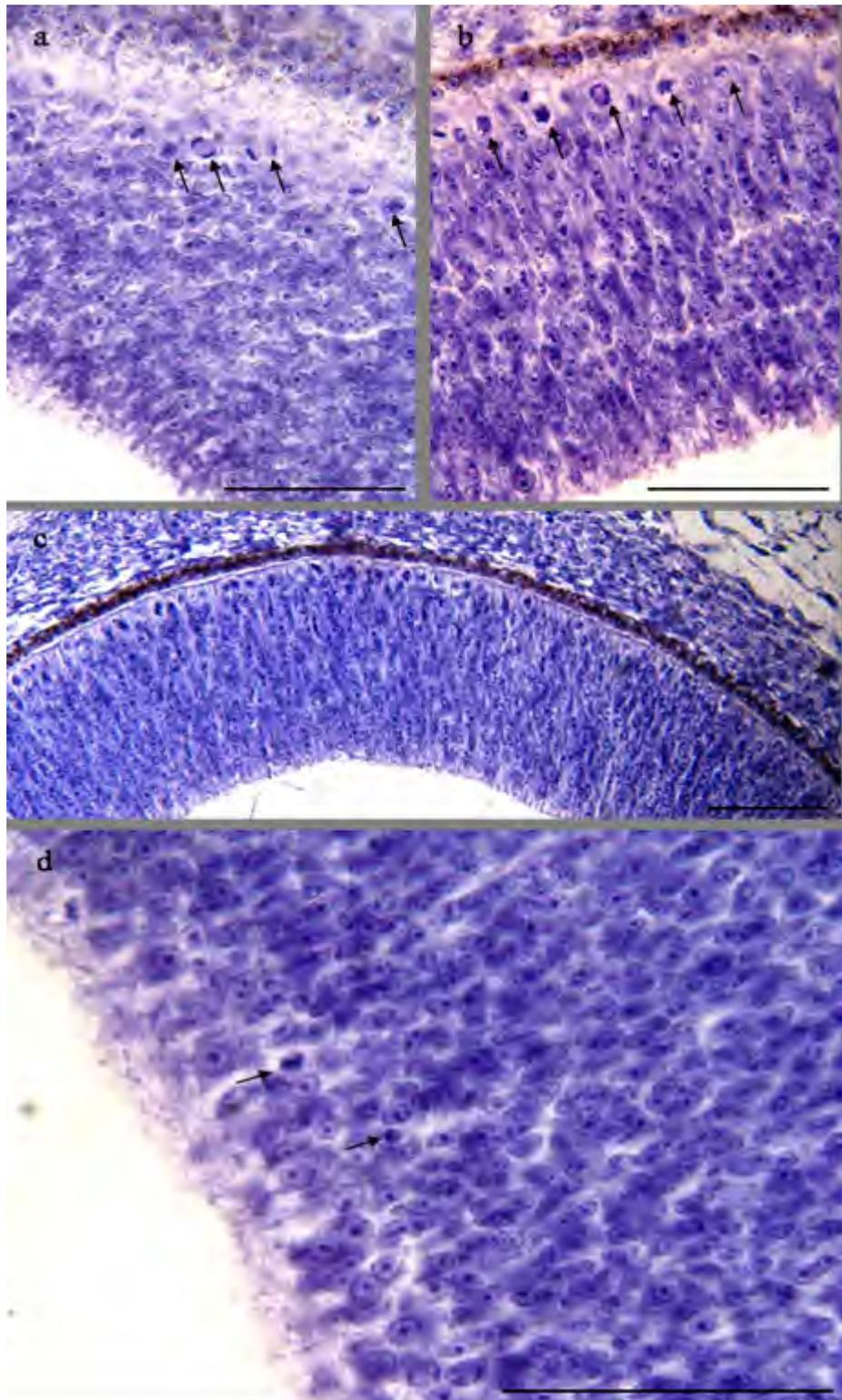


Fig. 138: Sezioni trasversali rappresentative della retina di *Coturnix coturnix* dopo 7 giorni d'incubazione, colorate con ematossilina. a-b) esempi di mitosi (freccie); c) la retina appare in piena proliferazione con la presenza di evidenti mitosi e senza alcun tipo di stratificazione; d) esempi di apoptosi (freccie) a livello della retina. Unità di misura della barra di riferimento = 50 μm .

6.5.5. Sviluppo dell'occhio di *Coturnix coturnix* allo stadio E8.



Fig. 139: visione grafica di *Coturnix coturnix* a 8 giorni d'incubazione.

L'embrione risulta maggiormente irrorato dai vasi sanguigni che circondano il vitello. Anatomicamente si osserva un maggiore sviluppo dell'embrione in tutte le sue parti (Fig.139). L'occhio prosegue la sua crescita (diametro medio occhio = $2712,25 \pm 108,07 \mu\text{m}$) e la retina presenta un accenno di stratificazione (area retinica media = $1099605 \pm 4529,2 \mu\text{m}^2$; cellule retiniche medie = $1099605 \pm 4529,23$).

Anche la colorazione immunostochimica rileva l'inizio della stratificazione retinica, con le cellule PCNA-ir presenti ora anche nella MCZ e che qui si localizzano soprattutto negli strati nucleare interno (INL) e nucleare esterno (ONL) in via di formazione; non si osserva, invece, alcun segnale proveniente dallo strato di cellule gangliari. Lontano dal cristallino si ha la massima intensità del segnale nella regione esterna del INL (Fig.140).

Il numero di mitosi subisce un abbassamento significativo (numero mitosi medie = $194,1 \pm 1,27$), mentre le apoptosi rimangono pressappoco costanti (numero apoptosi medie = $15,05 \pm 0,89$). Dai conteggi cellulari effettuati si rileva un decremento significativo dell'indice mitotico (indice mitotico = $0,0096 \pm 0,00037$); mentre l'indice apoptotico non subisce grosse variazioni (indice apoptotico = $0,00074 \pm 0,00004$).

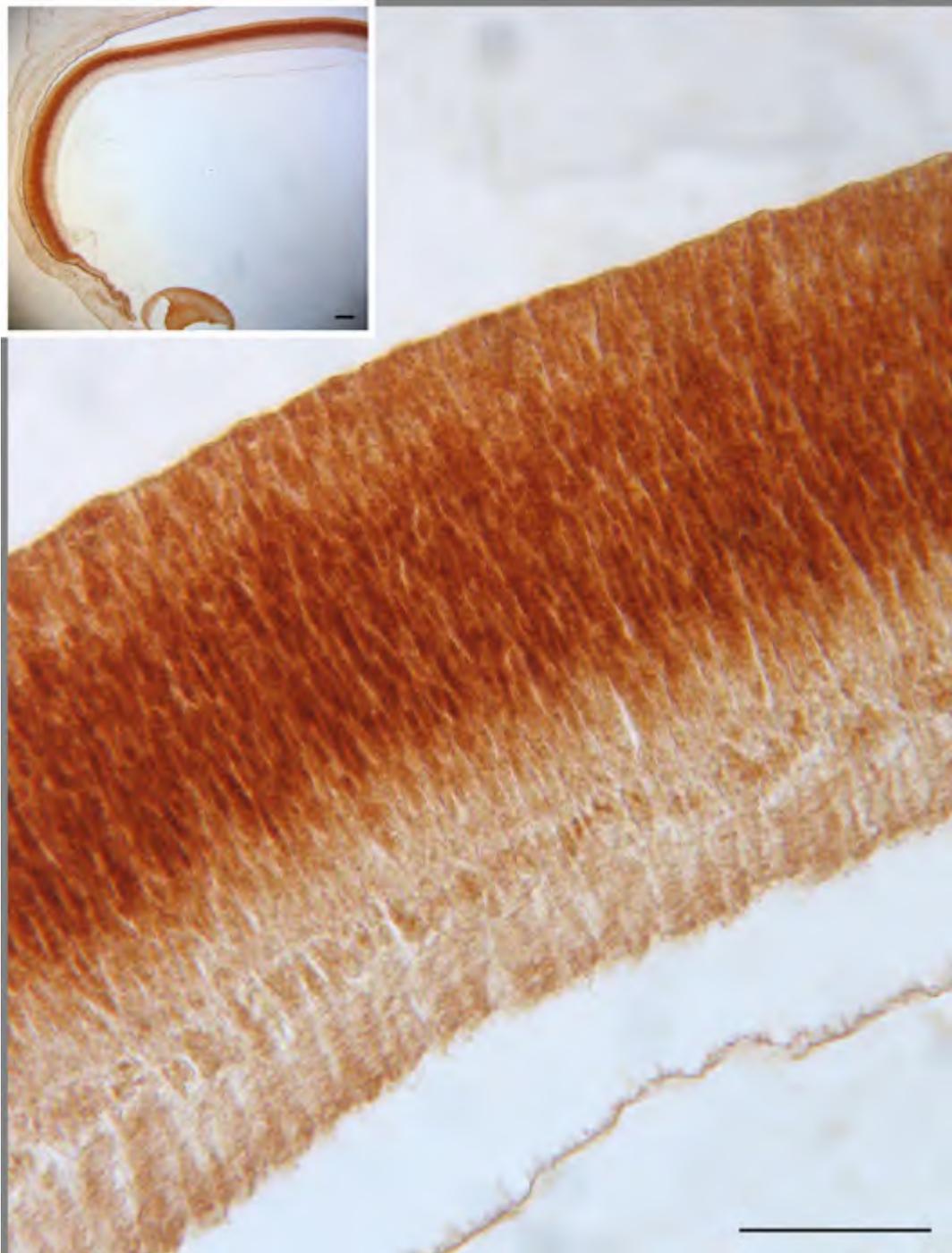


Fig. 140: Sezioni trasversali rappresentative della retina di *Coturnix coturnix* dopo 8 giorni d'incubazione, colorate immunostochimica per la PCNA. Unità di misura della barra di riferimento = 50 μm , inserto, 100 μm .

6.5.6. Sviluppo dell'occhio di *Coturnix coturnix* allo stadio E9.



Fig. 141: visione grafica di *Coturnix coturnix* a 9 giorni d'incubazione.

L'embrione presenta un capo maggiormente accresciuto, con un becco ben visibile (Fig.141). L'occhio (Fig. 142a) continua la sua crescita con un evidente aumento della sua componente pigmentata (diametro medio occhio = $3138,7 \pm 100,1 \mu\text{m}$). L'attività PCNASica si sposta dalla zona più distale alla zona più prossima al cristallino (Fig 143-144).

Nella retina (Fig. 142c) si osserva una quasi completa stratificazione al livello dello strato plessiforme interno (area retinica media = $1278646,7 \pm 22195,2 \mu\text{m}^2$; cellule retiniche medie = $1278646,67 \pm 22195,21$). Gli eventi mitotici (numero mitosi medie = $122,6 \pm 0,46$) ed apoptotici (numero apoptosi medie = $19 \pm 1,2$) rimangono pressoché invariati (Fig. 142b). Lo stesso andamento si riscontra anche per i relativi indici (indice mitotico medio = $0,0058 \pm 0,00026$; indice apoptotico medio = $0,000896 \pm 0,000065$).

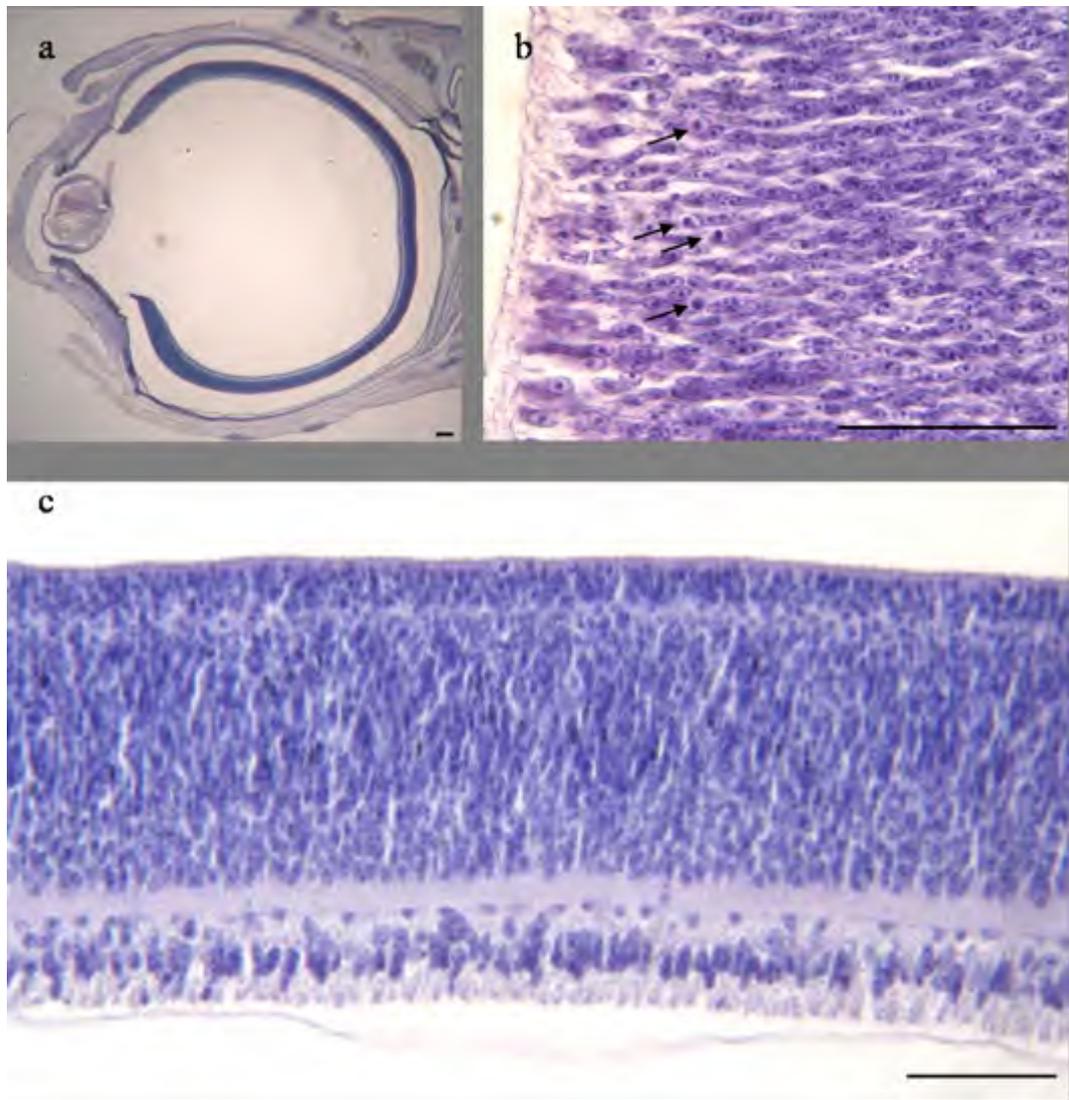


Fig. 142: Sezioni trasversali rappresentative della retina di *Coturnix coturnix* dopo 9 giorni d'incubazione, colorate con ematossilina. a) visione generale dell'occhio; b) esempio di apoptosi (freccie) a livello della retina; c) la retina con una stratificazione non completa. Unità di misura della barra di riferimento = 50 μ m.

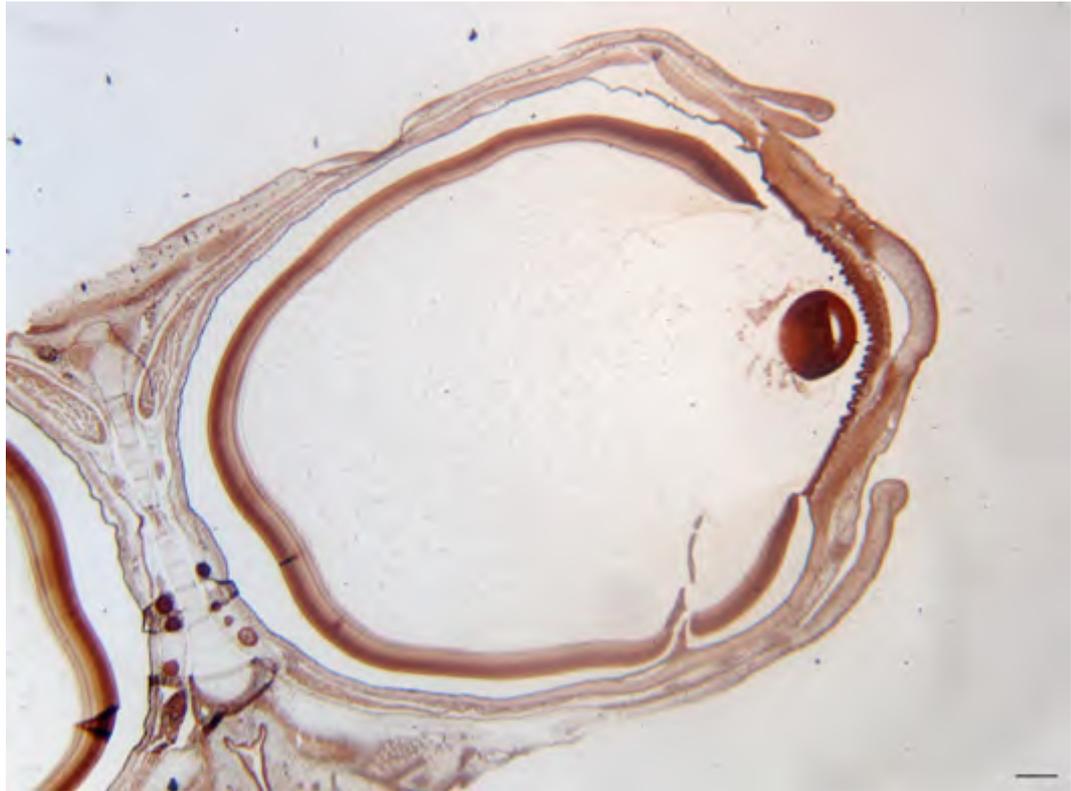


Fig. 143: Sezioni trasversali rappresentative della retina di *Coturnix coturnix* dopo 9 giorni d'incubazione, colorate con immunistoichimia per la PCNA. Unità di msura della barra di riferimento = 50 μm .

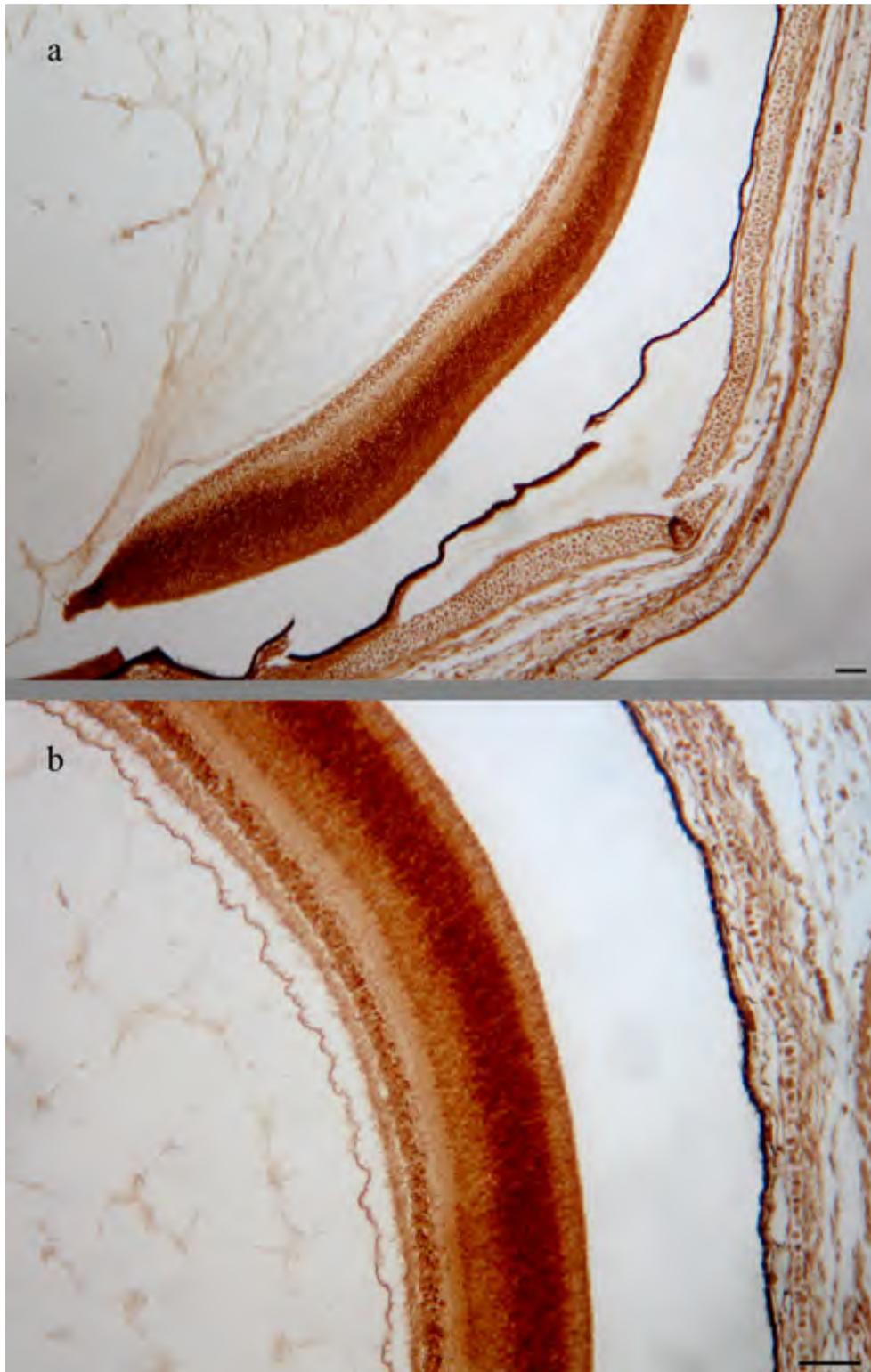


Fig. 144: Sezioni trasversali rappresentative della retina di *Coturnix coturnix* dopo 9 giorni d'incubazione, colorate con immunohistochimica per la PCNA. a) zona marginale ciliare fortemente immunoreattiva; b) particolare della retina distale. Unità di misura della barra di riferimento = 50 µm.

6.5.7. Sviluppo dell'occhio di *Coturnix coturnix* allo stadio E10.



Fig. 145: visione grafica di *Coturnix coturnix* a 10 giorni d'incubazione.

A questo giorno di incubazione l'embrione presenta un becco strutturalmente ben definito e gli arti inferiori ben sviluppati (Fig.145).

L'occhio ha una crescita costante (diametro medio dell'occhio = $3312,25 \pm 181,187 \mu\text{m}$) e la retina (Fig 146c) presenta una quasi completa stratificazione con gli strati nucleari, esterno e interno, ben differenziati mentre lo strato plessiforme esterno è ancora in piena formazione (area retinica media = $1312265 \pm 21536,39 \mu\text{m}^2$; cellule retiniche medie = $1312265 \pm 21536,39$).

L'attività PCNA, in questo stadio di sviluppo presenta lo stesso andamento dello stadio precedente (Fig 147-148).

Le mitosi (Fig. 146a) osservate evidenziano un crollo significativo in numero (n. mitosi medie = $25,7 \pm 0,81$), mentre le figure apoptotiche (Fig. 146b) sono sempre più numerose (n. apoptosi medie = $237,55 \pm 22,51$). Questo andamento è osservabile anche dall'analisi degli indici mitotici ed apoptotici (indice mitotico medio = $0,001 \pm 5,43$; indice apoptotico medio = $0,009 \pm 0,0007$).

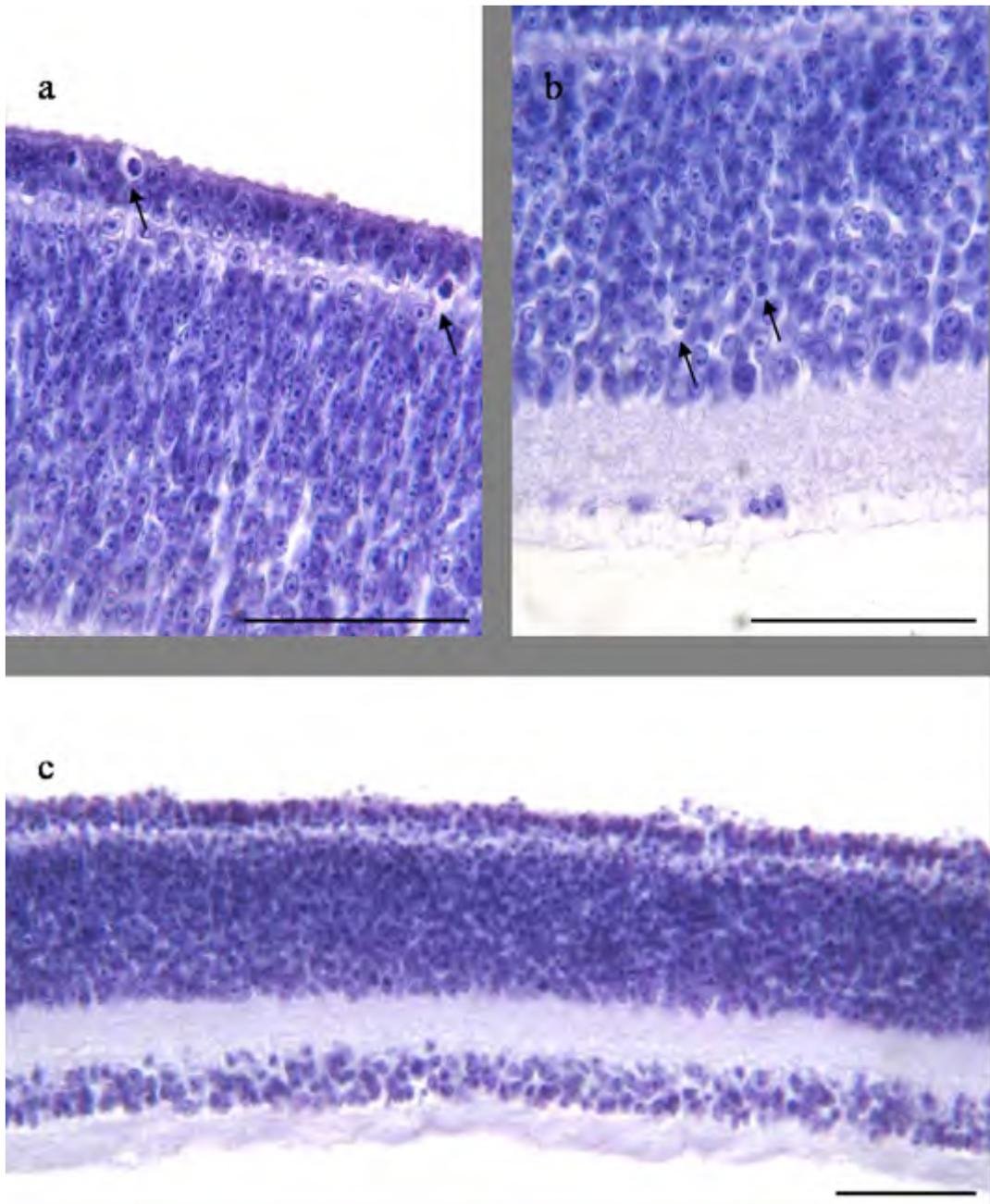


Fig. 146: Sezioni trasversali rappresentative della retina di *Coturnix coturnix* dopo 10 giorni d'incubazione, colorate con ematossilina. a) esempi di mitosi (freccie); b) esempi di apoptosi (freccia) a livello della retina; c) la retina stratificata. Unità di misura della barra di riferimento = 50 μm .



Fig. 147: Sezioni trasversali rappresentative della retina di *Coturnix coturnix* dopo 10 giorni d'incubazione, colorate con immunistoichimia per la PCNA. Unità di msura della barra di riferimento = 50 μm .

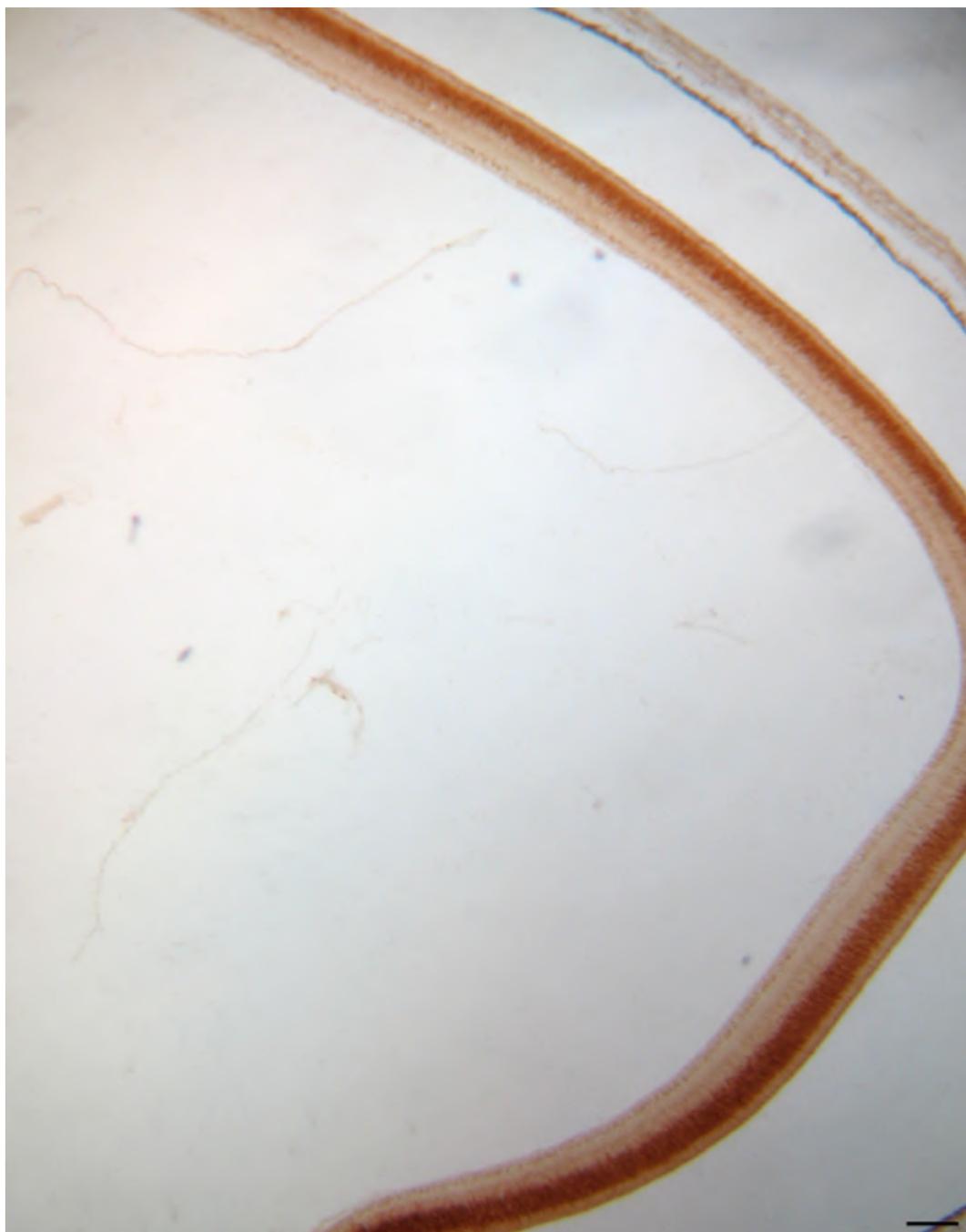


Fig. 148: Sezione trasversale rappresentativa della retina di *Coturnix coturnix* dopo 10 giorni d'incubazione, colorate con immunistoichimia per la PCNA, dove si osservano strati della retina immunoreattivi. Unità di msura della barra di riferimento = 50 μ m.

6.5.8. Sviluppo dell'occhio di *Coturnix coturnix* allo stadio E11.



Fig. 149: visione grafica di *Coturnix coturnix* a 11 giorni d'incubazione.

L'embrione, dopo 11 giorni d'incubazione, presenta un becco ben sviluppato e degli arti definiti; compaiono le penne e l'animale effettua piccoli movimenti del capo (Fig. 149).

L'occhio (Fig. 150d) continua la sua crescita con un forte aumento dell'umor vitreo (dimensioni medie dell'occhio = $3444,6 \pm 223,11 \mu\text{m}$).

A questo stadio di sviluppo, la retina appare completamente stratificata (Fig. 150a), con la presenza dei tre strati: strato nucleare esterno, strato nucleare interno e strato gangliare (area retinica media = $1369800 \pm 11145,03 \mu\text{m}^2$).

Il numero di mitosi della retina continua a diminuire (n. mitosi medie = $25,48 \pm 3,73$) mentre si osserva un forte incremento apoptotico (n. apoptosi medie = $442,76 \pm 6,79$), (Fig. 150b,c). Per quanto riguarda i conteggi relativi al numero di figure apoptotiche e mitotiche rapportate alle cellule totali (cellule retiniche medie = $1369800 \pm 11145,03$), si riscontra un indice mitotico molto basso (indice mitotico medio = $0,00080 \pm 0,00013$) mentre l'indice apoptotico mostra un picco significativo (indice apoptotico medio = $0,0138 \pm 0,00047$).

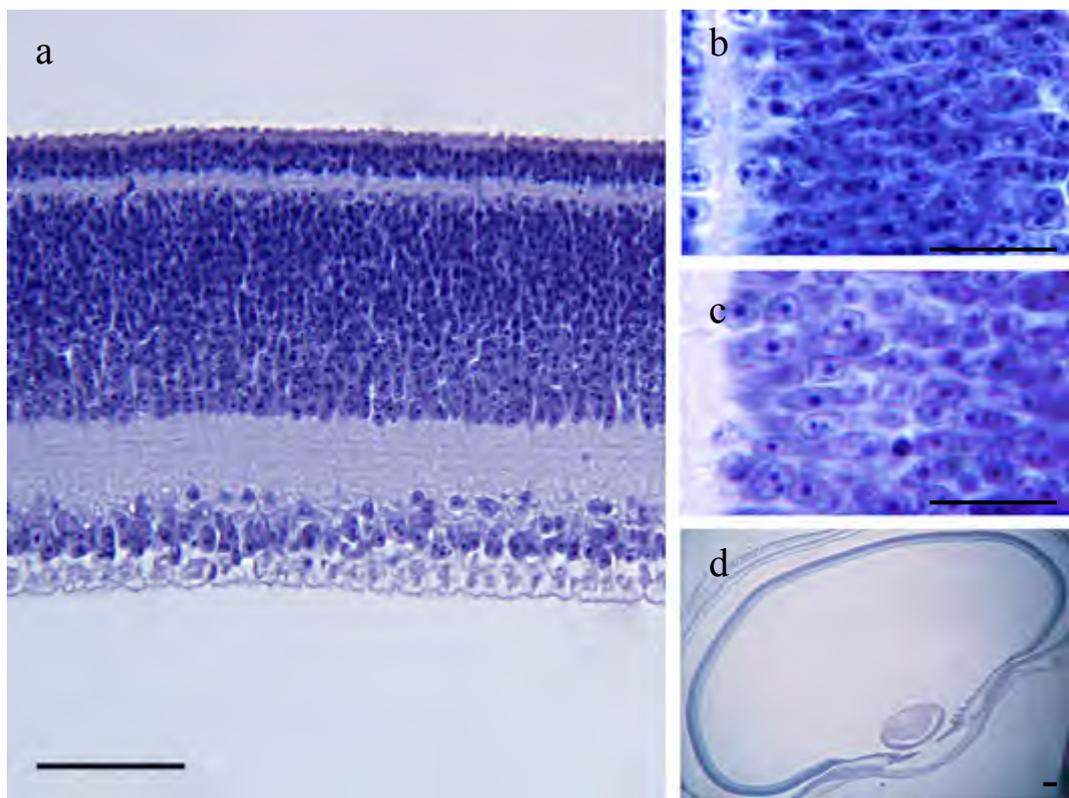


Fig. 150: Sezioni trasversali rappresentative della retina di *Coturnix coturnix* dopo 11 giorni d'incubazione, colorate con ematossilina. a) retina completamente stratificata; b, c) esempi di apoptosi a livello della retina; d) visione generale dell'occhio. Unità di misura della barra di riferimento = 50 μm .

6.5.9. Sviluppo dell'occhio di *Coturnix coturnix* allo stadio E12.



Fig. 151: visione grafica di *Coturnix coturnix* a 12 giorni d'incubazione.

L'embrione presenta delle penne su tutto il corpo. Gli arti e il becco sono ormai quasi del tutto formati (Fig.151). L'occhio (Fig. 152b) prosegue il suo accrescimento in maniera progressiva (diametro medio dell'occhio = $3714,2 \pm 58,8 \mu\text{m}$), come anche il tessuto retinico (Fig. 152a) che risulta ormai completamente stratificato (area retinica media = $1480425 \pm 10350,9 \mu\text{m}^2$; cellule retiniche medie = $1428425 \pm 10350,99$). Non si osservano variazioni significative nel numero di mitosi rispetto allo stadio precedente (n. mitosi medie = $25,9 \pm 3,76$). Le apoptosi, invece, subiscono una riduzione numerica dopo il picco rilevato nel precedente giorno di incubazione (n. apoptosi medie = $251,1 \pm 6,8$). Questo andamento è confermato anche dai relativi indici (indice mitotico medio = $0,00068 \pm 0,000073$; indice apoptotico medio = $0,007 \pm 0,0003$).

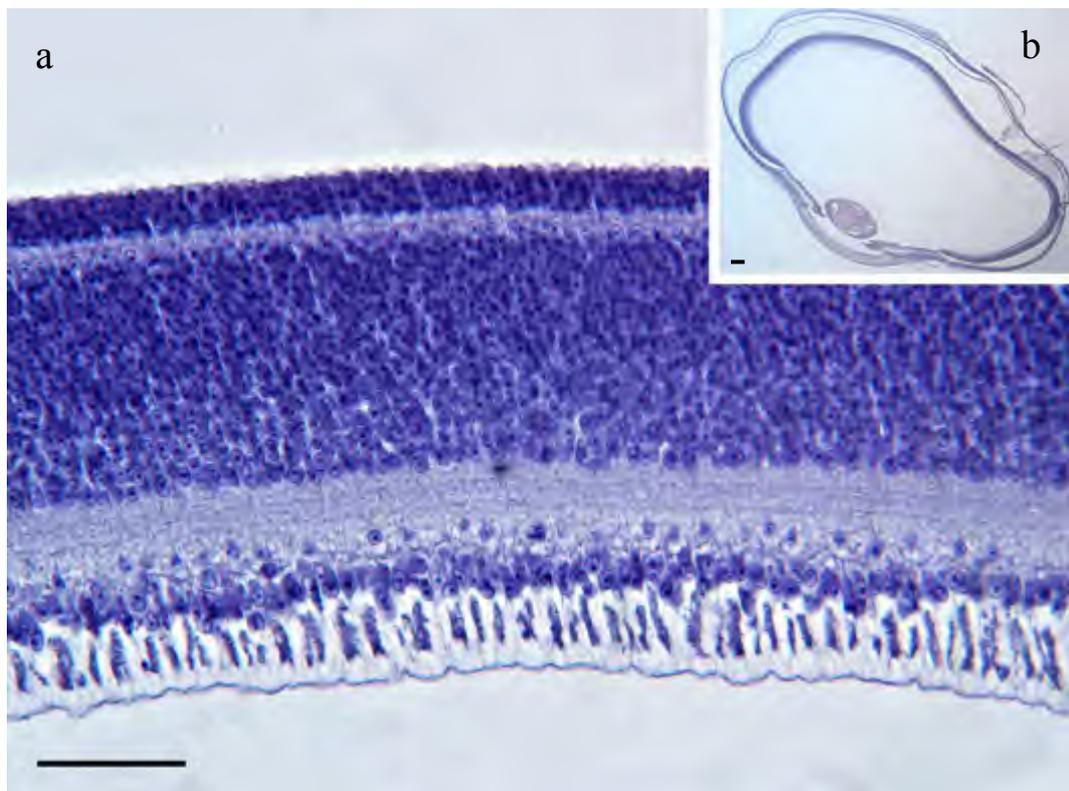


Fig. 152: Sezioni trasversali rappresentative della retina di *Coturnix coturnix* dopo 12 giorni d'incubazione, colorate con ematossilina. a) retina completamente stratificata; b) visione generale dell'occhio. Unità di misura della barra di riferimento = 50 μm .

6.5.10. Sviluppo dell'occhio di *Coturnix coturnix* allo stadio E13.



Fig. 153: visione grafica di *Coturnix coturnix* a 13 giorni d'incubazione.

L'embrione ormai riempie quasi l'intero volume dell'uovo e anatomicamente e mostra un'anatomia piuttosto definita, ma le ali sono ancora poco sviluppate (Fig. 153). L'occhio continua la sua crescita (diametro medio dell'occhio = $3966 \pm 8,27 \mu\text{m}$), come anche la retina (area retinica media = $1796144 \pm 15828,4 \mu\text{m}^2$; cellule retiniche medie = $1796144 \pm 17828,2$), (Fig. 143b). Inoltre si osserva una riduzione dell'attività PCNASica, che si localizza esclusivamente nella MCZ, anch'essa ormai in fase avanzata di stratificazione (Fig. 154).

Il numero di mitosi anche in questo stadio continua a decrescere gradualmente (n. mitosi medie = $10,64 \pm 0,77$), mentre le apoptosi restano quasi invariate in numero rispetto allo stadio precedente (n. apoptosi medie = $232,48 \pm 4,61$). L'indice mitotico conferma lo spegnimento graduale dell'evento proliferativo (indice mitotico medio = $0,00021 \pm 0,000029$). L'indice apoptotico subisce un lieve, ma significativo, decremento (indice apoptotico medio = $0,0045 \pm 0,00037$).



Fig. 154: Sezione trasversale rappresentativa della retina di *Coturnix coturnix* dopo 13 giorni d'incubazione, colorate con immunistoichimia per la PCNA. Unità di msura della barra di riferimento = 50 μ m.

6.5.11. Sviluppo dell'occhio di Coturnix coturnix allo stadio E14.



Fig. 155: visione grafica di *Coturnix coturnix* a 14 giorni d'incubazione.

A questo stadio di sviluppo, l'embrione occupa gran parte del volume dell'uovo e comincia ad assumere la posizione atta a rompere il guscio. Intanto comincia anche ad assumere la pigmentazione del corpo (Fig.155). Sia per l'occhio in toto che per la retina (Fig. 156a,b) si verificano lievi incrementi dimensionali, con la stratificazione retinica che si completa anche nella MCZ (diametro medio dell'occhio: $4086,25 \pm 45,02 \mu\text{m}$; area retinica media: $1873220 \pm 23290,03 \mu\text{m}^2$; cellule retiniche medie = $46889,50 \pm 397,66$).

A questo stadio l'attività mitotica è quasi del tutto esaurita, ed anche le figure apoptotiche subiscono un decremento significativo rispetto al giorno embrionale precedente (n. mitosi medie = $3,6 \pm 0,52$; n. apoptosi medie = $118,25 \pm 4,74$). Questo andamento viene confermato anche dall'osservazione dei relativi indici mitotici (indice mitotico medio = $0,000077 \pm 0,000011$; indice apoptotico medio = $0,0025 \pm 0,0001$).

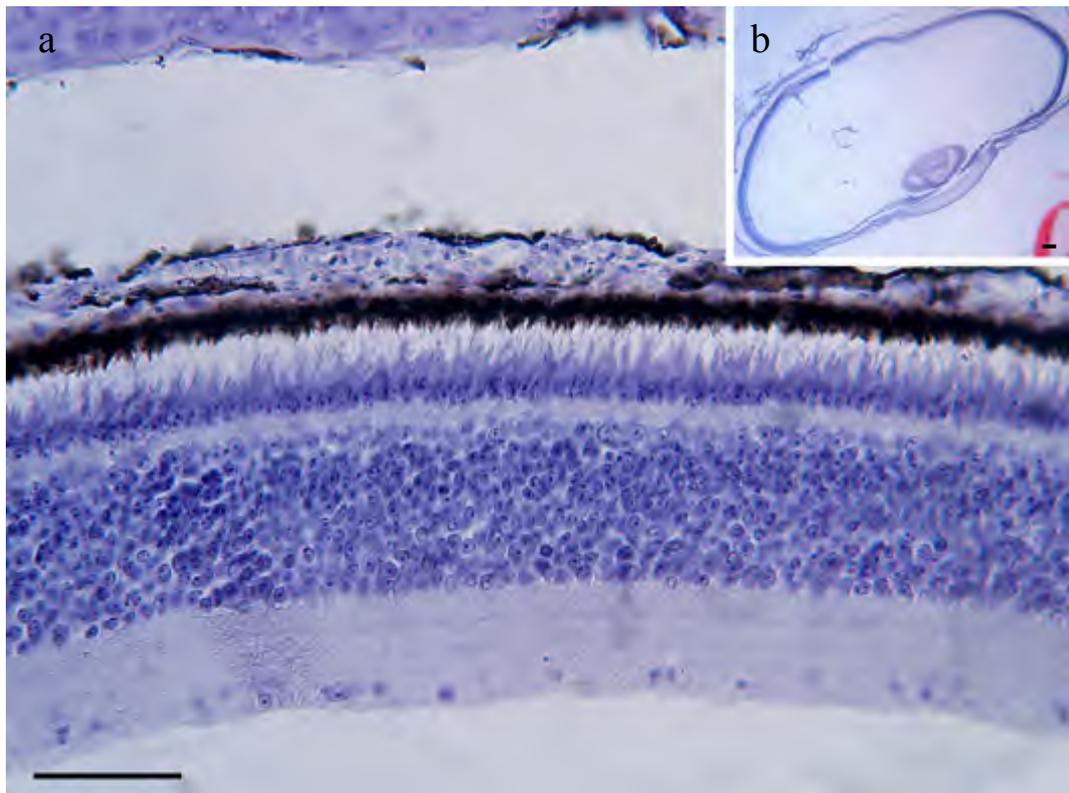


Fig. 156: Sezioni trasversali rappresentative della retina di *Coturnix coturnix* dopo 14 giorni d'incubazione, colorate con ematossilina. a) retina completamente stratificata; b) visione generale dell'occhio. Unità di misura della barra di riferimento = 50 μm .

6.5.12. Sviluppo dell'occhio di *Coturnix coturnix* allo stadio E15.



Fig. 157: visione grafica di *Coturnix coturnix* a 15 giorni d'incubazione.

Dopo 15 giorni d'incubazione, gli embrioni prelevati mostrano squame, artigli e becco completamente sviluppati (Fig. 157). L'albume all'interno dell'uovo è quasi del tutto esaurito e l'occhio (Fig. 158b) prosegue la sua crescita, ma incrementando le sue dimensioni in maniera minore rispetto allo stadio precedente (diametro medio occhio: $4193,5 \pm 42,82 \mu\text{m}$).

La superficie retinica (Fig. 158a) aumenta ulteriormente e l'epitelio pigmentato appare del tutto differenziato (area retinica media: $2020615,0 \pm 77973,56 \mu\text{m}^2$; cellule retiniche medie = $47471,90 \pm 2747,59$).

Le figure mitotiche appaiono di rado e sono esclusivamente localizzate nella regione prossima al cristallino, mentre l'evento apoptotico decresce gradualmente (n. mitosi medie: $1,10 \pm 0,29$; n. apoptosi medie = $92,35 \pm 4,99$). I relativi indici, subiscono una lieve diminuzione (indice mitotico medio = $0,000024 \pm 0,0000076$; indice apoptotico medio = $0,0019 \pm 0,0001$).

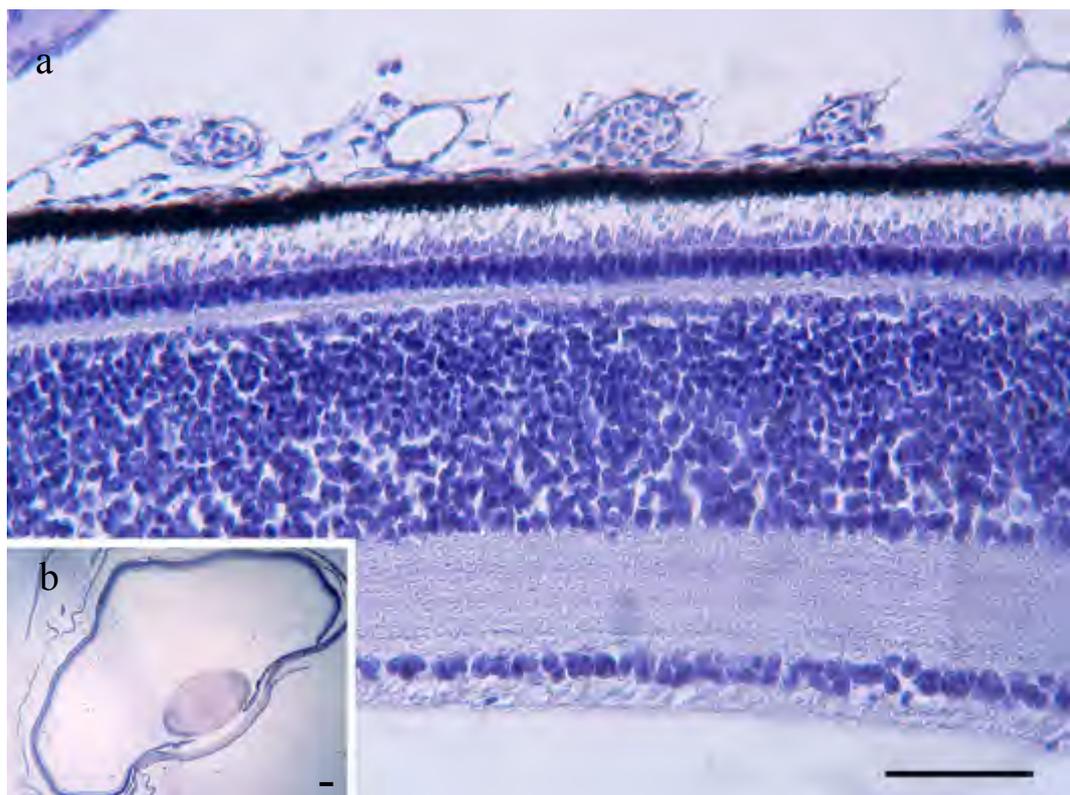


Fig. 158: Sezioni trasversali rappresentative della retina di *Coturnix coturnix* dopo 15 giorni d'incubazione, colorate con ematossilina. a) retina completamente stratificata; b) visione generale dell'occhio. Unità di misura della barra di riferimento = 50 μm .

6.5.13. Sviluppo dell'occhio di *Coturnix coturnix* allo stadio E16.



Fig. 159: visione grafica di *Coturnix coturnix* a 16 giorni d'incubazione.

A questo stadio l'embrione è rivestito da un folto piumaggio ed è prossimo alla schiusa (Fig. 159). L'occhio e la retina hanno incrementato ancora (diametro medio dell'occhio: $4328,75 \pm 19,35 \mu\text{m}$; area retinica media: $2050750,0 \pm 24073,56 \mu\text{m}^2$; cellule retiniche medie = $41561,40 \pm 1111,39$); lo strato dei fotorecettori sotto l'aspetto istologico appare anch'esso completamente differenziato.

L'attività PCNA sica è quasi del tutto spenta (Fig 160).

Le mitosi sono ormai un evento sporadico (n. mitosi medie = $0,35 \pm 0,096$), mentre le apoptosi restano numericamente quasi invariate rispetto al giorno precedente (n. apoptosi medie = $84,25 \pm 2,379$). Dal conteggio del numero di figure mitotiche ed apoptotiche rapportate alle cellule retiniche si osserva un'ulteriore diminuzione dell'indice mitotico rispetto allo stadio precedente (indice mitotico = $0,0000086 \pm 0,0000026$) ed un leggero aumento dell'indice apoptotico (indice apoptotico medio = $0,0024 \pm 0,00016$).

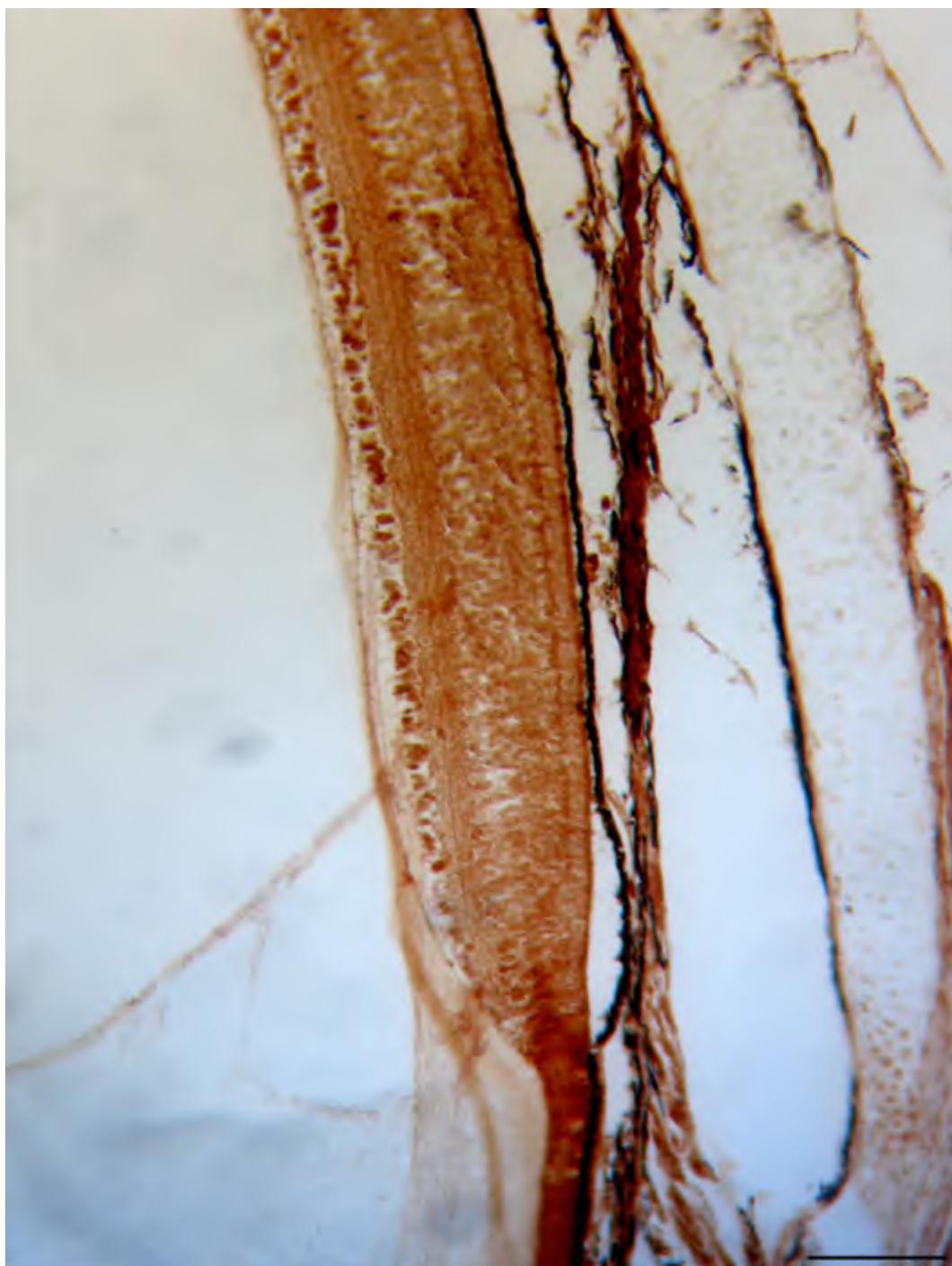


Fig. 160: Sezione trasversale rappresentativa della retina di *Coturnix coturnix* dopo 16 giorni d'incubazione, colorate con immunohistochimica per la PCNA. Unità di misura della barra di riferimento = 50 μm .

6.5.14. Sviluppo dell'occhio di *Coturnix coturnix* allo stadio E17.



Fig. 161: visione grafica di *Coturnix coturnix* a 17 giorni d'incubazione.

A 17 giorni d'incubazione l'embrione, eccetto lo spazio riservato alla camera d'aria, occupa totalmente lo spazio interno all'uovo e si prepara alla schiusa (FIG. 161).

L'occhio (Fig. 162) è al termine del suo sviluppo embrionale (diametro medio dell'occhio = $4308,0 \pm 100,57 \mu\text{m}$) e la stratificazione citoarchitettonica della retina è ormai completa (area retinica media = $2092695,0 \pm 53052,28 \mu\text{m}^2$; cellule retiniche medie = $48330,15 \pm 795,20$).

Il fenomeno proliferativo risulta definitivamente spento, con una sola cellula in mitosi rilevata e le figure apoptotiche fanno registrare un ulteriore calo numerico significativo rispetto allo stadio precedente (n apoptosi = $18,6 \pm 0,283$). Anche i relativi indici subiscono una drastica diminuzione (indice mitotico medio = $0,00000099 \pm 0,00000099$; indice apoptotico medio = $0,00038 \pm 0,000042$).

Fig. 162: Sezioni trasversali rappresentative della retina di *Coturnix coturnix* dopo 17 giorni d'incubazione, colorate con ematosilina. Unità di misura della barra di riferimento = 50 μm .

6.5.15. Risultati delle quantificazione di mitosi ed apoptosi nella retina e delle stime morfologiche dell'occhio di *Coturnix coturnix*.

I risultati dei conteggi dell'area retinica media, dell'area nucleare, della densità cellulare, del numero di cellule totali, delle figure mitotiche ed apoptotiche in sezioni rappresentative, i relativi indici e le dimensioni dell'occhio sono di seguito riportati nelle figure 163 e 164.

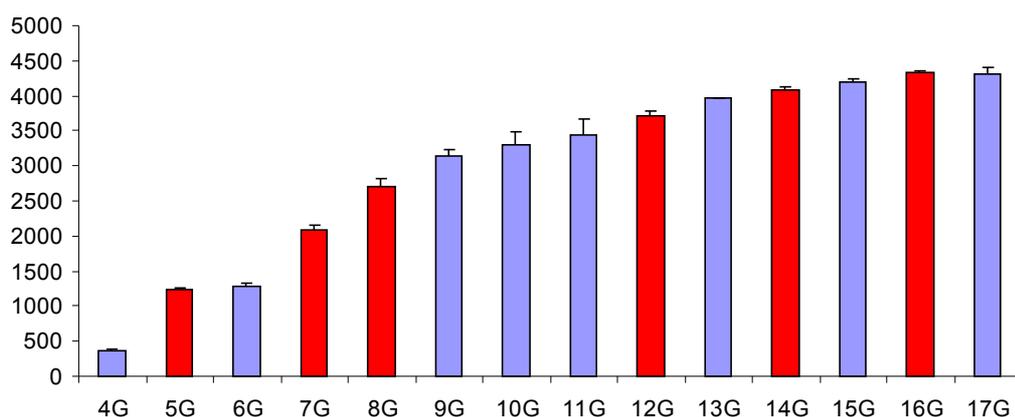


Fig. 163: visione grafica delle dimensioni dell'occhio di *Coturnix coturnix* nei vari giorni dello sviluppo (valori significativi evidenziati in rosso).

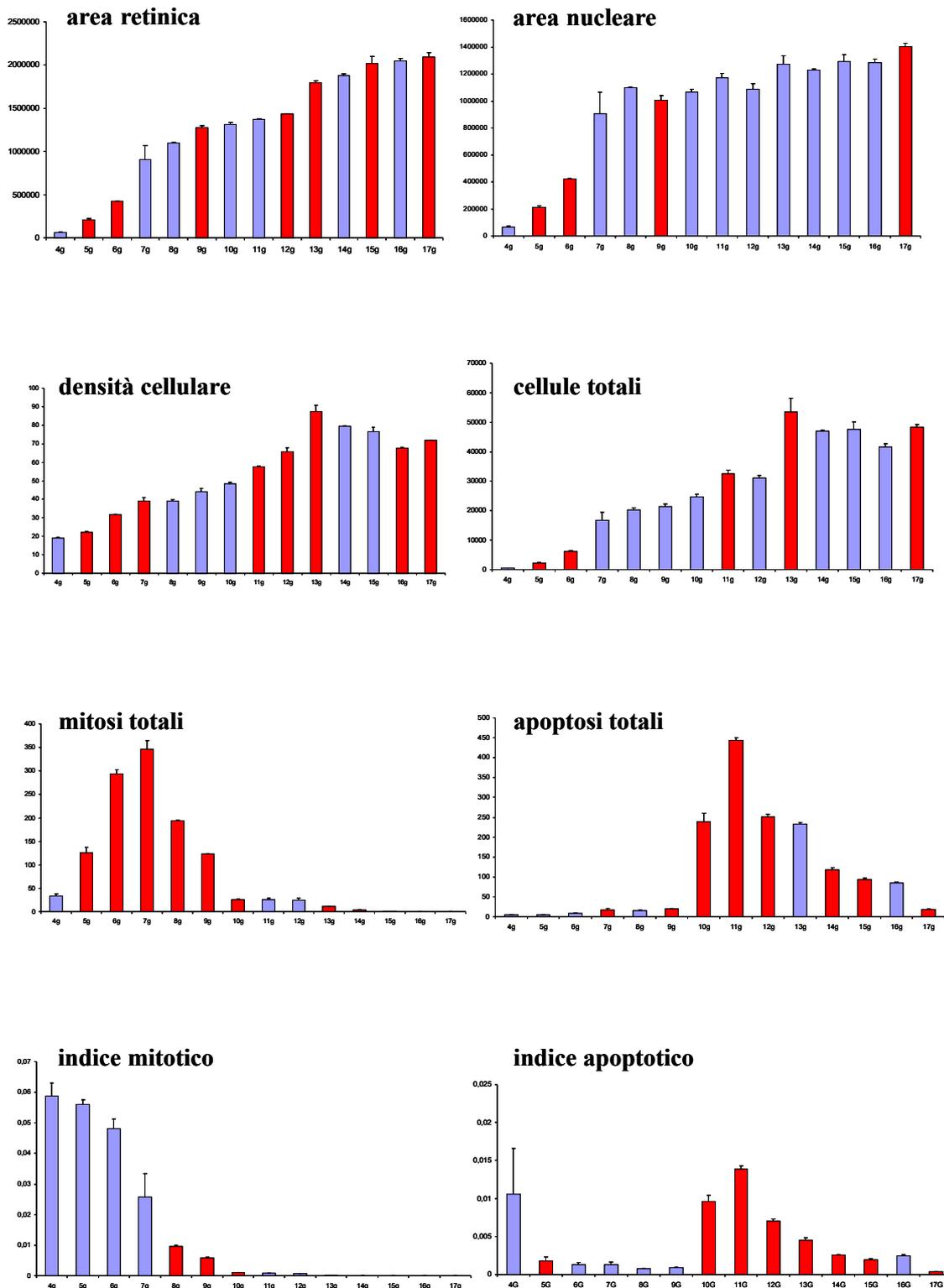


Fig. 164: visione grafica dell'area retinica, area nucleare, densità cellulare, cellule totali, mitosi totali, apoptosi totali, indice mitotico, indice apoptotico di *Coturnix coturnix* nei vari giorni dello sviluppo (valori significativi evidenziati in rosso).

6.5.16. *Quantificazione di PARP-1 frammentata nell'occhio di Coturnix coturnix.*

L'analisi di western blotting è stata effettuata su lisati cellulari retinici di quaglia a diversi stadi embrionali. Questo tipo di analisi è stato condotto a partire dallo stadio 10, in quanto i picchi apoptotici potenziali iniziavano allo stadio 11. Il prodotto del taglio proteolitico di PARP-1, corrispondente al frammento dal peso molecolare di 89 kDa, è stato identificato in tutti gli stadi presi in esame. In particolare, l'analisi densitometrica ha rivelato un incremento dell'espressione della PARP-1 clivata in corrispondenza dei giorni 11 e 16 (Grafico Fig. 165).

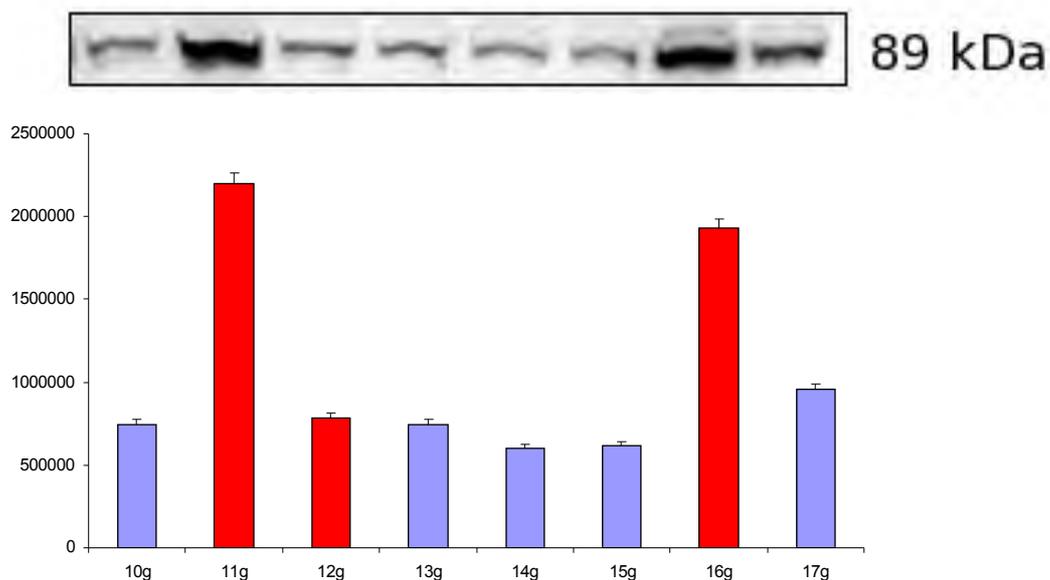


Fig. 165: Visione grafica della quantizzazione della PARP-1 frammentata in alcuni stadi dello sviluppo di *Coturnix coturnix*.

Capitolo 7:
Discussione

4.1.Considerazioni Metodologiche.

PCNA

Nella presente ricerca è stato studiato lo sviluppo del sistema visivo ed olfattivo nei seguenti vertebrati : *Cichlasoma nigrofasciatum*, *Xenopus laevis*, *Rana esculenta*, *Bufo bufo* e *Coturnix coturnix*.

Precisamente, sono stati analizzati i processi morfogenetici che conducono alla formazione delle regioni visive ed olfattive per valutare la presenza di differenti pattern temporali di proliferazione, in modo da correlarli, eventualmente tra di loro.

Il lavoro si avvale dell'utilizzo dell'immunoistochimica per la PCNA, noto marker di proliferazione cellulare (Tetè et al., 2000). Tuttavia, tale strumento non deve intendersi come marker di neurogenesi, in quanto non è possibile predire il destino degli elementi in formazione nel neuroepitelio. Indubbiamente, le aree in cui hanno luogo i processi neurogenetici si sovrappongono alle regioni proliferative, ma ciò non toglie che in quelle stesse aree abbiano origine elementi non neuronali.

D'altronde, scopo del presente lavoro è quello di correlare i processi proliferativi di morfogenesi ai sistemi neuronali studiati.

Colorazione con ematosilina.

La colorazione con ematosilina, in questo lavoro è stata impiegata per effettuare un conteggio numerico relativo agli eventi di mitotici ed apoptotici presenti nel sistema visivo di tutti gli animali studiati.

In particolare, per le figure mitotiche sono state contate tutte le cellule in cui erano chiaramente visibili i cromosomi; laddove per i corpi apoptotici sono state rilevate le cellule i cui nuclei mostravano la frammentazione della cromatina o il collasso della stessa. Il tutto è stato rapportato a stime di crescita morfologica dell'occhio.

La colorazione con ematosilina fornisce ottimi risultati nell'identificazione di frammenti di cellule morenti consentendo la visualizzazione di cellule apoptotiche persino prima che la frammentazione del DNA possa essere rilevata da metodiche quali la colorazione TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling).

Analisi biochimica per la frammentazione della PARP-1.

Il western blotting per la rilevazione della PARP-1 frammentata ha permesso di confermare, in alcuni animali studiati, l'evento apoptotico osservato mediante il conteggio delle figure apoptotiche contate con la colorazione istologica classica con ematossilina.

La frammentazione della PARP-1 avviene mediante un taglio proteolitico ad opera delle caspasi 7 e caspasi 3 che riconoscono e si legano alla sequenza specifica di PARP DEVD, situata nel dominio di legame del DNA, e tagliano l'enzima in due frammenti: p89 e p24. Il taglio inattiva PARP, impedendone la dimerizzazione e il legame al DNA.

Il controllo dell'attività di PARP operato dalle caspasi è importante per il corretto funzionamento del meccanismo apoptotico. Infatti il taglio ha lo scopo di prevenire l'attivazione di PARP dovuto alla frammentazione del DNA e di preservare l'energia cellulare, fondamentale per alcuni passaggi dell'apoptosi.

Tutto ciò permette di definire la frammentazione della PARP-1 come un ottimo marker dell'evento apoptotico nei sistemi studiati nel presente lavoro.

7.2. Analisi comparativa dello sviluppo dell'occhio dei vertebrati.

La comparazione dei risultati ottenuti nel presente lavoro con quelli prodotti da altri autori è complicata dal fatto che l'ontogenesi dei diversi vertebrati, per quanto simile, segue dei pattern che sono abbastanza caratteristici del gruppo. Un altro fattore particolarmente importante, che può determinare delle variazioni sostanziali, è la rapidità di sviluppo, la quale nelle specie studiate può essere molto variabile.

7.2.1. Analisi dello sviluppo dell'occhio di *Cichlasoma nigrofasciatum*.

Lo sviluppo dell'occhio di *Cichlasoma nigrofasciatum* inizia molto precocemente, a partire da 2 giorni dopo la fecondazione, quando l'animale appare ancora formato per la maggior parte della sua estensione da un sacco vitellino molto grande e ha un capo appena accentuato (Fig. 38).

L'occhio in questo stadio di sviluppo è costituito da un ammasso di cellule in proliferazione, dove il cristallino è separato dalla retina dall'inizio della formazione dell'umor vitreo.

La crescita dell'occhio di *Cichlasoma nigrofasciatum* è esponenziale durante tutto il suo sviluppo. Anche la retina presenta questo andamento con una stasi verso il settimo giorno dopo la fecondazione, quando ormai l'animale ha quasi completato il suo sviluppo anatomico.

In numero di mitosi riscontrate nella retina dell'animale è sempre alto con il verificarsi di una forte attività proliferativa soprattutto durante le prime fasi di sviluppo del pesce, a 3 giorni e a 4g dopo la fecondazione.

Il tipo di proliferazione cellulare dell'occhio è del tutto caratteristico, in quanto dopo una fase iniziale in cui l'attività mitotica è diffusa in tutta la retina, gli elementi neuronali sono prodotti in un'area concentrica direttamente prossima al cristallino, la zona marginale ciliare (MCZ). Questo tipo di sviluppo è stato già precedentemente riportato nei mammiferi (Rapaport e Stone, 1983; Walsh e Polly, 1985; Young, 1985; Zimmerman et al., 1988; Reese et al., 1996) nel pollo (Kahn, 1973, 1974; Prada et al., 1991; Rager et al., 1993; Snow e Robson, 1995) nelle tartarughe (Francisco-Morcillo et al., 2005-2006), negli anfibi (Jacobson, 1968; Straznicky e Gaze, 1971; Holt et al., 1988) e nei pesci (Johns e Easter, 1977; Sharma e Ungar, 1980; Vecino et al., 1998).

Inoltre, durante lo sviluppo retinico di *Cichlasoma nigrofasciatum* si verificano due esplosioni apoptotiche a 2 giorni e 5 giorni dopo la

fecondazione (come dimostrano i conteggi delle apoptosi totali effettuate e confermate dalla presenza di due indici apoptotici in questi stessi giorni di sviluppo)

La presenza di questa prima esplosione apoptotica può essere spiegata dalla necessità di eliminare cellule in eccesso che si sono formate durante le primissime fasi di sviluppo dell'occhio del pesce (infatti in questi giorni si verificano anche forti fenomeni proliferativi)

Circa 5 giorni dopo la fecondazione, avviene nell'occhio di *Cichlasoma nigrofasciatum* la stratificazione della retina; questo evento probabilmente induce una seconda ondata apoptotica in quanto con la neoformazione degli strati plessiformi le cellule in eccesso vengono indotte alla morte cellulare programmata.

Il fenomeno di apoptosi nella retina in sviluppo dei pesci sembra essere molto variabile tra le specie. Negli embrioni del pesce zebra (zebrafish, *Danio rerio*) la morte cellulare avviene molto precocemente (Jacobson et al., 1997; Hensey e Gautier, 1999). A 12 ore dalla fecondazione un quinto delle cellule apoptotiche è stato già osservato nel primordio del placode ottico, poi nello strato gangliare e nello strato nucleare interno a circa 3-4 giorni dopo la fecondazione, seguiti poi da una terza ma più piccola ondata a circa 6-7 giorni (Biehlmaier et al., 2001). Analogamente, nella trota, *Salmo trutta fario*, sono state riportate tre imponenti ondate apoptotiche (Candal et al., 2005). Risultati simili sono stati osservati anche in altre specie di pesci, anche se con picchi apoptotici meno imponenti (Hoke e Fernald, 1998). In *Haplochromis burtoni*, l'apoptosi è risultata poco significativa (Hoke e Fernald, 1998; Biehlmaier, et al., 2001; Cole e Ross, 2001).

Ciò risulta molto interessante, perchè potrebbe essere un fenomeno correlato alla velocità dello sviluppo embrionale. In effetti, *Danio rerio* e *Haplochromis burtoni* si sviluppano molto velocemente, il che potrebbe rendere difficile la lettura dei preparati in quanto il fenomeno apoptotico sarebbe così rapido da sfuggire all'osservazione.

7.2.2. Analisi dello sviluppo dell'occhio di *Xenopus laevis*.

Lo sviluppo dell'occhio di *Xenopus laevis* inizia a partire dallo stadio 29, che corrisponde ad un embrione prima della schiusa, che avviene allo stadio 38. In questo stadio l'occhio è in pieno sviluppo, con la presenza di una forte attività proliferativa e con un cristallino appena abbozzato.

Durante tutto lo sviluppo l'occhio cresce in maniera esponenziale.

Analizzando i grafici della crescita retinica e del numero di cellule osservate, si osserva una crescita della retina a partire dallo stadio 29 fino allo stadio 59 e poi successivamente si ha una leggera diminuzione.

Questo andamento è in accordo con altri studi sullo sviluppo retinico dei vertebrati (Candal et al, 2005; Francisco-Morcillo et al, 2005).

Parallelamente si osserva un aumento del numero di cellule totali durante lo sviluppo ad eccezione di due diminuzioni che si verificano allo stadio 42 e dopo lo stadio 63, uno stadio prossimo alla metamorfosi.

Questa diminuzione può essere imputata al picco apoptotico proprio allo stadio 42. Questa ipotesi è rafforzata dall'osservazione della densità cellulare, la quale diminuisce nella retina in seguito agli eventi di morte cellulare.

Bisogna ricordare che, malgrado i modelli di sviluppo dell'occhio degli altri vertebrati sono piuttosto variabili, la maggior parte dei casi studiati hanno fatto registrare eventi apoptotici che si presentano ad ondate.

Il differenziamento della retina del rospo non procede in maniera sincrona, ma segue un gradiente che va dall'area opposta al cristallino (regione prossimale della retina) alla regione circolare più prossima al cristallino, la zona marginale ciliare (MCZ). In questo modo mentre le aree relative alla MCZ sono neoformate e largamente indifferenziate, le aree della retina opposte al cristallino sono quelle maggiormente differenziate; infatti, è in queste zone che inizia ad osservarsi l'organizzazione corticale tipica della retina dell'adulto. Questo pattern è osservabile in tutte le specie studiate

7.2.3. Analisi dello sviluppo dell'occhio di Bufo bufo.

L'occhio del rospo segue il pattern di differenziamento tipico degli altri vertebrati, naturalmente con un *timetable* che è caratteristico della specie. In particolare, il suo sviluppo inizia generalmente molto precocemente.

I primi stadi dello sviluppo studiati riguardano embrioni appena schiusi, quando essi hanno un buon livello di differenziamento morfologico, ma le zampe sono assenti e le branchie ancora esterne. A questo stadio l'occhio si presenta già suddiviso in una coppa ottica e un cristallino.

Nelle specie di vertebrati studiate si osserva in generale una crescita iniziale dell'organo molto rapida seguita da un rallentamento.

Nella lucertola si rileva un rapido incremento dimensionale negli stadi più precoci dello sviluppo, seguito da una lunga fase di limitatissima crescita della coppa ottica (Grossi, 2007). Questa osservazione trova giustificazione nel fatto che l'attività mitotica e l'espressione della PCNA sono inizialmente molto abbondanti.

Analoghi risultati sono stati anche ottenuti nella testuggine. Infatti, osservando le tavole di sviluppo della coppa ottica di *Mauremys leprosa*, anche in questo caso vi è un pattern di limitatissima crescita continua e progressiva (Francisco-Morcillo et al., 2004), dopo una prima fase in cui l'occhio, in un breve lasso di tempo, aumenta molto le sue dimensioni.

Riguardo gli altri vertebrati i dati relativi alla percentuale di crescita dell'occhio non sono discussi nei lavori, ma in alcuni casi essi possono essere evinti dalle tavole mostrate. Quindi, è possibile dedurre che lo sviluppo dell'occhio della trota (*Salmo trutta fario*) segue lo stesso pattern (Candal et al., 2005); così come anche il pollo (*Gallus domesticus*), in cui si verifica una rapida crescita volumetrica nei primi stadi embrionali (Francisco-Morcillo et al., 2005).

Nel rospo (*Bufo bufo*), la specie qui presa in esame, osservando i grafici della crescita e comparandoli anche all'incremento del numero delle cellule nelle sezioni contate, si osserva che la retina non subisce un aumento considerevole delle sue dimensioni tra lo stadio 10 e 13. A partire dallo stadio 15, invece, l'occhio cresce in maniera graduale considerando anche che a questo stadio inizia la secrezione dell'umor vitreo. Parallelamente, si osserva anche l'aumento del numero delle cellule della retina, confermato anche dall'intensa attività mitotica registrata tra lo stadio 13 e 15. Quindi, questo dato contrasta con la letteratura in cui si riporta l'incremento dimensionale più importante nei primi stadi dello sviluppo. Ciò potrebbe forse essere spiegato considerando che in questa specie le cellule primordiali della retina all'inizio hanno dimensioni decisamente maggiori. Di conseguenza la normale crescita dimensionale è attenuata dalla riduzione delle cellule.

Tuttavia, procedendo nello sviluppo, la retina riprende la sua crescita normale fino alla stasi che si osserva allo stadio di climax metamorfico.

Per quanto riguarda l'attività proliferativa della retina, gli elementi neuronali dell'occhio, dopo una fase iniziale in cui sono prodotti in tutta la retina, si localizzano in un'area concentrica direttamente prospiciente al cristallino, la MCZ. Questo tipo di sviluppo è stato già precedentemente riportato nei mammiferi (Rapaport e Stone, 1983; Walsh e Polley, 1985; Young, 1985;

Zimmerman et al., 1988; Reese et al., 1996), nel pollo (Kahn, 1973, 1974; Prada et al., 1991; Rager et al., 1993; Snow e Robson, 1995), nella tartaruga (Francisco-Morcillo et al., 2006), nella lucertola (Grossi, 2007), negli anfibi (Jacobson, 1968; Straznicky e Gaze, 1971; Holt et al., 1988) e nei pesci (Johns e Easter, 1977; Sharma e Ungar, 1980; Vecino et al., 1998).

Questo fenomeno nel rospo è anche confermato dall'espressione della PCNA, che segue lo stesso pattern delle mitosi, anche se si esprime in un maggior numero di nuclei. In particolare, l'espressione della PCNA all'inizio coinvolge quasi tutte le cellule retiniche; gradualmente poi, tende a concentrarsi in prossimità del cristallino nella MCZ, per poi scomparire quasi del tutto quando il girino raggiunge lo stadio di neometamorfosato.

Inoltre, durante lo sviluppo processi di morte cellulare programmata e differenziazione cellulare coesistono nella retina. La durata di entrambi i processi è stata analizzata in diverse specie di vertebrati ed è stata osservata in tempi diversi e in regioni diverse della retina (Valenciano et al., 2009).

Nel rospo comune si nota un aumento del numero delle apoptosi allo stadio 21 che tende poi a diminuire, seguito da un secondo picco allo stadio 28; tale dato è confermato sia da analisi istologiche che biochimiche.

Studi pionieristici sulla morte cellulare nello sviluppo della retina di rana hanno mostrato che la degenerazione fisiologica delle cellule retiniche in questi vertebrati avviene in tre successive ondate. Nella prima ondata, le cellule mitotiche confinate al centro della retina diventano picnotiche e degenerano prima che inizi la differenziazione cellulare. In seguito, dopo la formazione dello strato gangliare e dello strato plessiforme interno, alcune cellule nella regione dell'iniziale strato nucleare interno vanno incontro ad una degenerazione. Infine, una terza ondata di morte cellulare viene osservata nello strato nucleare interno ed esterno alla periferia della retina. Questa terza ondata avviene dopo la formazione dello strato plessiforme esterno e dopo la maturazione della retina centrale (Glucksmann, 1940). La seconda e la terza ondata apoptotica coincidono con i dati qui riportati per il rospo. La prima ondata è stata registrata molto precocemente e forse nel rospo avviene addirittura in campioni antecedenti allo stadio 10, che non sono stati analizzati nel presente lavoro. Tuttavia, in un'altra specie di anfibio, lo *Xenopus laevis*, l'apoptosi delle cellule della retina è stata descritta svolgersi in sole due fasi (Gaze e Grant 1992), che anche in questo caso corrispondono ai dati del rospo. Quindi il pattern di sviluppo dell'occhio degli anfibi sembrerebbe seguire un unico modello generale.

Inoltre, l'area della retina del rospo cresce in maniera progressiva fino allo stadio 31 che rappresenta il climax metamorfico. Incrementi fortemente significativi si registrano proprio allo stadio 28 e 31.

Un andamento simile si registra anche per il numero di cellule totali che costituiscono la retina; tuttavia esse, dopo aver raggiunto un incremento significativo allo stadio 28, arrestano la crescita. Ciò non deve stupire, in

quanto la crescita della retina è relativa anche alla controparte di fibre che, evidentemente, continuano ad aumentare fino allo stadio 31.

In sostanza il numero di cellule che compongono la retina si raggiunge molto presto, prima che il girino abbia strutturato in maniera completa il suo corpo, laddove è necessario intensificare le relazioni tra le cellule fino allo stadio di climax metamorfico.

Come atteso, l'attività mitotica molto forte nei primi stadi dello sviluppo e subisce un decremento fino allo stadio 21 per poi incrementare fino al 28, dopo di che subisce un declino definitivo dopo la metamorfosi in cui le figure mitotiche diventano più sporadiche.

Il minimo mitotico dello stadio 21 non corrisponde ad un rallentamento della crescita del numero delle cellule, ma il significativo incremento del numero delle cellule, osservato allo stadio 28, è concorde con il secondo incremento dell'indice mitotico.

L'andamento delle apoptosi a due ondate non lascia segni evidenti sulla crescita della retina, anche se questa prima ondata apoptotica coincide con un minimo mitotico; come testimoniato anche dall'andamento grafico della PARP-1 frammentata.

La seconda ondata apoptotica, invece, determina, in concomitanza con la caduta dell'attività mitotica, una drastica diminuzione delle cellule dell'area retinica.

7.2.4. Analisi dello sviluppo dell'occhio di *Coturnix coturnix*.

I primi stadi di sviluppo dell'occhio di *Coturnix coturnix* studiati riguardano un embrione dopo 4 giorni d'incubazione dove si osserva l'abbozzo dell'occhio e tutto il corpo è in piena formazione.

A questo stadio l'occhio si presenta già suddiviso in una coppa ottica e in cristallino in proliferazione.

L'occhio di *Coturnix coturnix* presenta una crescita rapida seguita da un rallentamento verso le ultime fasi di sviluppo dell'animale, prossime alla schiusa. Questo dato è riscontrato anche in altri vertebrati come la trota (*Salmo trutta fario*) che segue lo stesso pattern (Candal et al., 2005); così come anche il pollo (*Gallus domesticus*), in cui si verifica una rapida crescita volumetrica nei primi stadi embrionali (Francisco-Morcillo et al., 2005). Anche la retina di *Coturnix coturnix* cresce in dimensione durante lo sviluppo, con una stasi al diciassettesimo giorno d'incubazione.

Il numero di cellule totali osservate nella retina in sviluppo presenta una crescita di numero fino all'undicesimo giorno d'incubazione e poi una diminuzione nei giorni 12, 14 e 16 giorni dopo l'incubazione, che tuttavia non sono significative. Queste diminuzioni non sono però del tutto correlabili agli eventi apoptotici, in quanto solo la riduzione di cellule allo stadio 12 risulta conseguente ad un picco apoptotico.

Il primo evento di morte cellulare programmata in *Coturnix coturnix* si verifica all'inizio del suo sviluppo retinico, in un embrione dopo 4 giorni d'incubazione e un'altro evento apoptotico si verifica dopo 11 giorni d'incubazione. I miei dati sono parzialmente in accordo con quanto osservato nel pollo in cui la prima ondata inizia tra E4 e E7 e si sovrappone parzialmente con il periodo di neurogenesi, differenziamento e migrazione delle cellule gangliari (García-Porrero e Ojeda, 1979; Cuadros and Ríos, 1988). Le cellule picnotiche appaiono nuovamente durante l'ottavo giorno embrionale e il più alto livello di apoptosi è stato registrato allo stadio E11 (Cook et al., 1998). Quindi rispetto al pollo i miei dati non dimostrano il picco apoptotico dello stadio 8.

Nei mammiferi un primo evento di morte cellulare programmata si registra nella retina molto precocemente durante lo sviluppo, nel momento in cui l'invaginazione della vescicola ottica da origine alla coppa ottica (Martin-Partido et al., 1988; Silver and Hughes, 1973). Successivamente si presentano altri 2 incrementi di morte cellulare (Cuadros e Rios, 1988; Martin-partido et al., 1988; Frade et al., 1996; 1997; Diaz et al., 1999, 2000; Mayordomo et al., 2003). Il periodo normale di morte cellulare nei ratti si estende dalla nascita a circa sei giorni dopo ed è abbastanza alto tra il primo e il quarto giorno post-nascita (Galli-Resta e Ensini, 1996). La morte delle cellule bipolari continua per 48 giorni. Per le cellule fotorecetttrici si registra una seconda fase di apoptosi tra il giorno 12 e 72 con un picco a P23 (Vogel e Moller, 1980).

7.3. Analisi dello sviluppo nel sistema olfattivo dei vertebrati.

In questo studio è stato analizzato il sistema olfattivo di due anfi: *Xenopus laevis* e *Rana esculenta*.

7.3.1. Analisi dello sviluppo nel sistema olfattivo di *Xenopus laevis*.

Lo sviluppo della mucosa olfattiva osservato in *Xenopus laevis* procede in perfetto accordo con i dati morfologici presenti in letteratura (Hansen et al., 1998). Riassumendo brevemente gli eventi più importanti si riscontra la presenza di un placode olfattivo indifferenziato fino allo stadio 38. Lo stadio successivo vede l'inizio dell'invaginazione del placode. Durante lo stadio 42 appare medialmente il primordio dell'organo vomeronasale. Infine allo stadio 50 comincia a formarsi la camera laterale. Gli stadi successivi vedono solo il progressivo differenziamento morfologico di queste tre camere e l'apertura delle coane che coincide con la metamorfosi.

All'inizio del differenziamento del sistema olfattivo periferico tutti i nuclei sono in intensa attività proliferativa. Poi successivamente quest'attività tende a localizzarsi progressivamente a livello basale nelle camere olfattive e a ridursi. Il momento in cui la mucosa olfattiva diventa funzionale durante lo sviluppo non è ancora stato determinato con sicurezza. Sinapsi nel bulbo olfattivo sono state osservate già a partire dallo stadio 37 (Byrd and Burd, 1991). Recettori olfattivi differenziati nella camera principale sono presenti a partire dallo stadio 40, anche se le ciglia recettoriali sono ancora corte, e marker indicatori di maturità neuronale sono solo presenti nelle cellule recettoriali olfattive a partire dallo stadio 45 dello sviluppo (Hansen et al., 1998). Questo stadio coincide con l'inizio dell'attività alimentare. Le analisi effettuate in questo studio mostrano che a partire dallo stadio 39 l'attività PCNA-sica inizia a concentrarsi decisamente a livello basale della camera principale in via di sviluppo. Ciò confermerebbe il dato di Hansen et al. (1998) che rilevano recettori differenziati a partire dallo stadio 40 i quali, in quanto neuroni, perdono le loro capacità mitotiche. Diversamente il primordio dell'organo vomeronasale presenta tutte le sue cellule PCNA-ir, come chiaro indicatore che esso è all'inizio del suo differenziamento, quando tutte le sue cellule sono in divisione per strutturare l'organo. Interessante notare che l'origine dell'organo vomeronasale dalla camera principale, così precoce durante lo sviluppo, non supporta l'ipotesi che esso sia un adattamento alla vita terrestre (Broman, 1920). Ciò è in sintonia con quanto già ipotizzato da Eisthen (2000). Più avanti nello sviluppo l'espressione della PCNA rimane più o meno della stessa entità nella parte sensoriale delle tre camere. Ciò che si osserva è che gli organi olfattivi si presentano più articolati e tutte aree sensoriali presentano un'attività PCNA-sica molto spinta, ma principalmente localizzata nelle regioni basali delle mucose. Ciò significa evidentemente che il loro sviluppo procede parallelamente. Anche le aree non sensoriali che costituiscono l'epitelio respiratorio delle camere olfattive presentano molte cellule PCNA-ir.

Durante la metamorfosi, mentre l'epitelio dell'organo vomeronasale e quello della camera laterale rimangono sostanzialmente simili a se stessi, l'epitelio della camera principale è sottoposto ad una profonda modificazione (Hansen et al., 1998). Ciò trova riscontro nel fatto che questa cavità diventerà un "air nose" nel neometamorfosato; laddove, il ruolo di "water nose" sarà assunto dalla camera di più tarda formazione, posta in posizione laterale (Altner, 1952; Weiss, 1986). Sembra strano che una cavità già strutturata per la percezione delle sostanze disciolte sia poi riadattata per le sostanze aeree, mentre per le sostanze in soluzione sia generata una cavità nuova. Questo dato assume un aspetto meno paradossale se si considera che i pipidi sono secondariamente acquatici e, quindi, hanno forse dovuto reinventare un water nose (Meyer et al., 1997).

Non è chiaro se durante la metamorfosi nella ristrutturazione della camera principale siano in atto meccanismi di transdifferenziamento cellulare o morte cellulare programmata e formazione di nuove cellule sensoriali (Farbman, 1985; Burd, 1991). I miei dati dimostrano che l'attività PCNA-sica nelle aree sensoriali della camera principale diminuisce drasticamente durante la metamorfosi. Questo fatto dovrebbe supportare maggiormente l'ipotesi di un transdifferenziamento, piuttosto che la generazione di nuovi elementi neuronali. Tuttavia, c'è bisogno di utilizzare kit per la determinazione di cellule apoptotiche per risolvere la questione.

Ciò che invece mostra una fitta presenza di cellule PCNA-ir è l'epitelio respiratorio che separa quello sensoriale nelle mucose e l'intero compartimento cellulare che costituisce la valvola che separa il "water nose" dall' "air nose" quando l'animale s'immerge. Questa correlazione tra l'intensificazione dell'attività proliferativi nelle aree respiratorie è forse legata alla perdita delle branchie durante la metamorfosi e alla necessità di una struttura che provveda efficientemente agli scambi gassosi quando l'animale è sott'acqua. L'importanza dell'epitelio nasale per la respirazione è testimoniato dal fatto che la chiusura bilaterale delle narici provoca la morte per annegamento nel tritone volgare, mentre l'occlusione unilaterale non ha effetto (D'Aniello, comunicazione personale). D'altronde un attivo pompaggio d'acqua attraverso le narici quando l'animale è immerso è un fenomeno molto comune nello *Xenopus laevis* (osservazione personale).

7.3.2. Analisi dello sviluppo del sistema olfattivo di Rana esculenta.

La metamorfosi degli anfibi è un processo contraddistinto da cambiamenti morfologici e funzionali che modificano il precedente stile di vita dell'animale. Durante i primi stadi di sviluppo di *Rana esculenta*, in seguito alla schiusa, il girino fa fronte al fabbisogno di ossigeno grazie alla presenza di

branchie esterne, già visibili dallo stadio 20. A questo livello dello sviluppo, il placode olfattivo risulta ancora indifferenziato. L'attività proliferativa è distribuita in maniera uniforme nel placode stesso e negli altri tessuti. Il placode olfattivo inizia un processo di differenziamento mediante un processo di invaginazione che inizia nello stadio 23. Allo stadio 25, le branchie sono ricoperte dalla cute e comunicano con l'esterno tramite l'apertura orale e uno specifico sifone. Esse saranno attive almeno fino al climax metamorfico. In questo stadio, s'individua un primo abbozzo della mucosa olfattiva che sembrerebbe indirizzato verso il differenziamento degli elementi sensoriali, in quanto sono già presenti le ciglia, anche se molto brevi. L'attività PCNAasica intensa in tutte le suddivisioni della mucosa olfattiva depone ovviamente a favore di un'intensa attività proliferativa.

Il primordio del vomeronasale compare intorno allo stadio 27. A questo livello dello sviluppo, il girino presenta gli abbozzi degli arti posteriori. Invece, nello *Xenopus*, il primordio del vomeronasale compare allo stadio 42 (Scottoni, 2006), ma il girino della rana africana sembrerebbe ad uno stadio dello sviluppo più precoce rispetto a *R. esculenta*. Infatti, gli arti di *X. laevis* compariranno intorno allo stadio 52.

Nella rana verde, l'organo vomeronasale è ben evidente come un diverticolo che ha origine dalle regioni laterali interne della mucosa. La sua formazione è caratterizzata da una forte attività proliferativa proprio a livello dell'invaginazione. Nelle restanti parti dell'organo olfattivo, l'attività ir mantiene un pattern simile a quello precedentemente analizzato. Il vomeronasale continua ad accrescersi spingendosi medialmente, come testimoniato dalla maggiore attività proliferativa mediale. Intanto appaiono anche le strutture che si differenzieranno in microvilli. Anche l'epitelio respiratorio si accresce progressivamente aumentando la superficie epiteliale interessata allo scambio di ossigeno. Ben evidente, infatti, la formazione di un diverticolo situato in posizione dorsale rispetto al vomeronasale, con la presenza di attività ir.

L'organo olfattivo assume caratteristiche molto simili a quelle riscontrabili nell'adulto nello stadio 30, quando appaiono le ghiandole del Bowman. Ciò è supportato dall'analisi della attività proliferativa ad essi associata. Nello *Xenopus*, invece, la formazione delle ghiandole di Bowman è un evento più tardivo, che si presenta intorno allo stadio 66, momento dello sviluppo interessato dalla metamorfosi. La presenza delle ghiandole del Bowman è un indicatore molto importante che annuncia l'inizio della funzionalità aerea della mucosa olfattiva. Il fatto che nella rana sia molto precoce può essere legato ad una semplice differenza temporale tra le due specie; oppure al fatto che il girino della rana inizia ad utilizzare il sistema olfattivo in ambiente aereo prima della metamorfosi. In effetti, negli stadi avanzati dello sviluppo le risalite in superficie dei girini si fanno più frequenti (D'Aniello, comunicazione personale). Strutturalmente, nel restante corso dello sviluppo,

l'organo olfattivo non subisce modificazioni di rilievo. L'attività ir è comunque molto spinta, anche dopo la metamorfosi: il sistema olfattivo, benché funzionante, si accresce ancora parallelamente all'accrescimento corporeo dell'animale.

La mucosa olfattiva della rana verde non presenta una suddivisione in camere come per i Pipidi. In questa famiglia di anfibi, la componente olfattiva è suddivisa in un air nose ed un water nose responsabili della percezione delle sostanze odorose rispettivamente in ambiente terrestre e in acqua (Altner, 1962; Weiss, 1986; Meyer et al., 1997). Tuttavia, una componente respiratoria è presente solo nel water nose. Quindi, tale struttura sembrerebbe responsabile della respirazione dell'animale nel momento in cui è immerso. La mucosa olfattiva di *R. esculenta* non presenta una suddivisione fisica; si potrebbe pensare ad una sola suddivisione funzionale della mucosa, ovvero il water nose potrebbe presentarsi in una forma non segregata; rimarrebbe, comunque, irrisolto il problema di preservare l'eventuale "air nose" dalla presenza dell'acqua. Inoltre, non bisogna dimenticare che le coane si aprono direttamente nella cavità orale, in quanto gli anfibi mancano di un palato secondario: le narici aperte per una eventuale respirazione subacquea, permetterebbero l'ingresso di acqua nella bocca. Ciò indicherebbe una difficoltà nell'uso della camera olfattiva in acqua. Di conseguenza l'epitelio respiratorio in questa specie, diversamente dallo *Xenopus*, sarebbe utilizzato in ambiente aereo.

In definitiva, con la sola analisi morfologica, una problematica del genere non può essere affrontata: essa necessita dell'apporto di un'analisi comportamentale dell'animale, affiancata da metodiche sperimentali idonee alla risoluzione della questione.

Pertanto, studi futuri sono necessari alla comprensione delle eventuali funzioni "subacquee" del sistema olfattivo di *Rana esculenta*.

Inoltre i dati ottenuti in questo lavoro consentono di discutere brevemente l'evoluzione delle componenti olfattive ed in particolare dell'organo vomeronasale.

Alcuni autori hanno ipotizzato che il vomeronasale si fosse evoluto come adattamento all'habitat terrestre. Ma nel 1920, Broman notò che l'organo era ripieno di liquido e, quindi, suppose che fosse predisposto alla percezione delle sostanze in soluzione. Di conseguenza, era la mucosa olfattiva la nuova acquisizione dei tetrapodi, mentre l'organo del Jacobson era omologo alla mucosa olfattiva dei pesci. Ancora, analizzando la mucosa olfattiva dei pesci, Farbman e Gesteland nel 1974, notarono la presenza di cellule con microvilli, elementi caratteristici dell'epitelio del vomeronasale. Essi ne dedussero che l'organo era presente nei pesci in una forma non segregata. Analoghi risultati sono stati ottenuti in *Protopterus*, in cui è stato segnalato anche un bulbo olfattivo accessorio (Rudebeck, 1944; Schnitzlein and Crosby, 1967). Schnitzlein and Crosby (1967) hanno anche segnalato la presenza di un nervo

e di un organo vomeronasali separati. Tuttavia, queste osservazioni non sono state confermate da un altro autore (Derivot, 1984). Nei pesci ratto (*Chimaera*, condritto non elasmobranco) sono stati descritti due bulbi olfattivi accessori per lato: uno situato dorsalmente come quello descritto in *Protopterus* e uno in posizione ventrolaterale, caso unico finora nei pesci (Faucette, 1969). Inoltre, una porzione del bulbo olfattivo di *Amia* è stata riconosciuta come bulbo olfattivo accessorio (Schnitzlein, 1964). Altre segnalazioni nei pesci di componenti olfattive accessorie sono state ricavate da studi sugli attinopterigi non teleostei: lo storione (Adair, 1964) e il pesce spatola (Story, 1964). In entrambi i casi il bulbo olfattivo accessorio è stato identificato come una porzione della parte dorsomediale del bulbo olfattivo principale. In uno studio sui teleostei è stato anche evidenziato che il tratto olfattivo mediale ha delle connessioni molto simili a quelle del bulbo olfattivo accessorio (Dulka, 1993). Tuttavia, non si può dire con certezza che le due strutture siano omologhe, oppure si siano evolute indipendentemente.

Benché in disaccordo con le osservazioni di Farbman (...), anche Eisthen (.....) sostiene l'ipotesi che il vomeronasale non sia un adattamento alla vita terrestre. Le sue osservazioni trovano fondamento in uno studio effettuato su famiglie di urodeli: i proteidi presentano, come per i teleostei osservati da Farbman e Gesteland (...), cellule con microvilli, ma non sono da considerare come elementi funzionali dell'organo del Jacobson. Infatti, elementi cellulari con simili caratteristiche sono presenti anche negli amfiumidi e nei sirenidi (Eisthen, 2000) e nell'axolotl (Eisthen et al., 1994), i quali posseggono un sistema olfattivo accessorio. Anche se presente in gruppi correlati (amfiumidi e sirenidi) il sistema è assente nei proteidi perché andato perso (Eisthen, 2000).

Altra ipotesi a sostegno della tesi di Eisthen, è l'osservazione che il vomeronasale è presente nei moderni anfibi e negli amnioti: ciò indica che il sistema era presente in un progenitore comune a questi due gruppi, totalmente acquatico (Panchen 1991; Lebedev & Coates, 1995).

Ritornando a Farbman e Gesteland, dalle loro osservazioni si può prendere spunto per altre considerazioni. Se si accetta l'idea che il vomeronasale fosse già presente nei pesci in una forma non segregata, si può considerare la struttura presente nei tetrapodi come un'estensione della struttura preesistente. Osservazioni, queste, che possono essere interpretate analogamente a quelle ottenute da Herrick: egli ipotizzò che il telencefalo dei pesci fosse, principalmente, sotto il controllo della componente olfattiva, e poi, nel corso dell'evoluzione si fosse sviluppato il complesso telencefalo dei mammiferi (Herrick, 1910). Ma, in realtà, collegamenti omologhi a quelli della corteccia dei mammiferi erano presenti già nei pesci. Ciò che aumenta nel corso dell'evoluzione è il grado di complessità della rete neuronale. E ciò spiegherebbe la separazione del sistema olfattivo accessorio dalla mucosa olfattiva.

I dati in mio possesso non depongono a favore di un vomeronasale presente in organismi precedenti ai tetrapodi, in quanto si osserva la formazione durante lo sviluppo di un organo ex novo, che non passa attraverso forme di organizzazione non segregata. E' comunque possibile che questa fase sia stata abolita durante l'ontogenesi nel corso dell'evoluzione. E' anche da considerare che il girino sotto molti punti di vista è formalmente un pesce e, pertanto, la mucosa olfattiva dovrebbe essere molto simile a quella dei pesci. Invece si assiste alla formazione di un organo nuovo che si sviluppa durante la vita attiva del girino e che almeno nelle prime fasi della vita larvale non è di certo funzionale.

7.4. Conclusioni.

Durante lo sviluppo dei vertebrati, tutti gli organi sono sottoposti a fenomeni di morte cellulare programmata e differenziazione cellulare che coesistono. La durata di entrambi i processi è stata analizzata in diverse specie di vertebrati ed è stata osservata in tempi diversi e in regioni diverse di strutture come la retina (Valenciano et al., 2009).

Il perché del fenomeno di apoptosi resta un enigma. Si sa che esso è indotto da intermedi reattivi dell'ossigeno che si formano nei mitocondri, i quali possono danneggiare le membrane e indurre la morte cellulare (Simonian e Coyle, 1996; Yakes e Van Houten, 1997; Chandel et al., 1998; Berneburg e Krutmann, 2000). E' ben noto, infatti, che i mitocondri siano la maggiore fonte di segnali della morte cellulare (Abe et al., 1995; Wei et al., 1996; Kluck et al., 1997; Fulda et al., 1998; Carmody et al., 1999; Esteve et al., 1999).

E' stato postulato che la morte cellulare avviene a causa della mancanza di sufficienti bersagli nelle aree encefaliche che ricevono le fibre ottiche. In pratica, se il numero delle fibre retinali afferenti che arrivano è più alto del numero dei siti disponibili nel tetto ottico di terminazione, le fibre "sopranumerarie" degenerano (Rager e Rager, 1978).

Si potrebbe ipotizzare che il passaggio dalla vita acquatica a quella aerea avrebbe richiesto un rimaneggiamento estensivo delle strutture visive, ma l'ipotesi è subito smentita dagli studi prodotti sui pesci, che subiscono fenomeni apoptotici ugualmente. Ciò che è piuttosto certo è che durante lo sviluppo l'occhio produce un forte surplus di cellule, che dovranno essere eliminate. Quindi, un'ipotesi alternativa sarebbe da ricercare nella necessità di avere uno stock di cellule esclusivamente impegnate in meccanismi di differenziamento cellulare in una struttura di notevole complessità. Esse dopo aver compiuto il loro lavoro nel differenziamento cellulare sarebbero eliminate.

Nel rospo (e negli altri anfibi studiati) la seconda ondata apoptotica si presenta quando l'individuo è ancora allo stadio di girino, stadio in cui l'occhio è già funzionante. E' possibile quindi, che nel girino la visione non sia ancora stata perfezionata e che esso si riferisca principalmente all'olfatto come sistema sensoriale principale di riferimento. Questa ipotesi è supportata dal fatto che il sistema olfattivo non subisce imponenti fenomeni apoptotici durante lo sviluppo, anzi alcune strutture olfattive sono anche più efficienti nel girino rispetto all'adulto (D'Aniello et al., 1996; Pinelli et al., 2004; D'Aniello et al., 2008).

Riassumendo i dati comparativi si osserva che tutti i vertebrati hanno una ristrutturazione apoptotica precoce dell'occhio e che in rettili e uccelli si conclude durante l'embriogenesi. Ciò potrebbe essere indotto dalla necessità avere un organo visivo già differenziato e perfettamente funzionale alla nascita. Nei pesci e negli anfibi, invece il fenomeno apoptotico si arresta poco prima della metamorfosi, che comunque corrisponde all'evento di nascita o di schiusa degli amnioti, come dimostrato dallo studio dei livelli dell'ormone tiroxina (Stubbe et al., 1978; Tata, 1993; Wassenaer e Kok, 2004).

E' ben noto infatti che questi vertebrati e in special modo gli uccelli e i pesci utilizzano la vista come organo principale ed è quindi naturale che tale organo sia perfettamente funzionale già dopo la nascita. Gli anfibi e i pesci larvali utilizzano già l'occhio molto prima della metamorfosi, ma per i fenomeni di

rimaneggiamento che subisce in questo periodo è evidente che la sua funzionalità non è piena, ma come precedentemente accennato possono rivolgersi ad altri sistemi sensoriali (es. sistema olfattivo). Per contro i mammiferi alla nascita vedono poco o nulla e utilizzano in larga misura l'olfatto nel monitoraggio dei segnali ambientali che li circondano (odori dei genitori, cibo...), ciò che potrebbe essere vero anche per i pesci e gli anfibi larvali. Ciò spiegherebbe perché nel ratto si registrano ondate apoptotiche tardivamente dopo la nascita. Nell'uomo non ci sono dati sullo sviluppo dell'occhio, ma esso come tutti i primati usa la vista come organo principale, e come tutti i primati il cucciolo neonato richiede un certo tempo per perfezionare la visione.

Questa ipotesi trova ulteriore riscontro negli studi effettuati sul sistema olfattivo di *Xenopus laevis* e *Rana esculenta*, dove si osserva una mucosa olfattiva che durante lo sviluppo del girino non è sottoposta ad evidenti fenomeni apoptotici e di rimaneggiamento cellulare, quindi dimostra essere un elemento molto statico rispetto agli eventi apoptotici e proliferativi che si osservano nell'occhio dei vertebrati studiati che dimostrano la presenza di un sistema embriologicamente molto più dinamico come l'occhio.

Capitolo 8:
Bibliografia

Abe K., Aoki M., Kawagoe J., Yoshida T., Hattori A., Kogure K., Itoyama Y. (1995). Ischemic delayed neuronal death. A mitochondrial hypothesis. *Stroke*. **26**:1478-89.

Adair J.S. (1964). The olfactory bulb and related nuclei of the sturgeon (*Scaphirhynchus platorhynchus*). *Ala. J. Med. Sci.* **35**: 386-398.

Adler R. (2005). Challenges in the study of neuronal differentiation: a view from the embryonic eye. *Dev. Dyn.* **234**: 454–463.

Altner H. (1962). Untersuchungen u"ber Leistungen und Bau der Nase des su"dafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* (Daudin, 1803). *Z. Vergl. Physiol.* **45**: 272–306.

Alunni A., Menuet, A., Candal, E., Penigault, J.B., Retaux, W.R.J. (2007). Development mechanism for retinal degeneration in the blind cavefish *Astianax mexicanus*. *The Journal of Comparative Neurology.* **505**: 221-233.

Alvarez-Buylla A. (1990). Mechanism of neurogenesis in adult avian brain. *Experientia.* **46**: 948 – 955.

Alvarez-Buylla A., Seri B., Doetsch F. (2002). Identification of neural stem cells in the adult vertebrate brain. *Brain Res. Bulletin* **57**: 751 – 758.

Amé J.C., Spenlehauer C., de Murcia G. (2004) "The PARP superfamily." *Bioessays* **26**: 882–893.

Austin C.P., Feldman D.E., Ida J., Cepko C.L. (1995). Vertebrate retinal ganglion cells are selected from competent progenitors by the action of Notch. *Development* **121**: 3637-3650.

Ayagari R., Gomes X.V., Cordenin D.A., Burgers P.M. (2003). Okazaki fragment maturation in Yeast. I. distribution of functions between FEN1 and DNA2. *J. Biol. Chem.* **278**: 1618–1625.

Backstrom K. (1924). Contribution to the forebrain morphology in selachians. *Acta Zool.* **5**: 123-240.

Bae S.H., Bae K.H., Kim J.A., Seo Y.S. (2001). RPA governs endonuclease switching during processing of Okazaki fragment in eukaryotes. *Nature.* **412**: 456–461.

Bae S.H., Seo Y.S. (2000). Characterization of enzymatic properties of the yeast DNA2 helicase/endonuclease suggests a new model for Okazaki fragment processing. *J. Biol. Chem.* **275**: 38022–38031.

-
- Belecky-Adams T., Cook B., Adler R. (1996). Correlation between terminal mitosis and differentiated fate of retinal precursor cells in vivo and in vitro: analysis with the window-labeling technique. *Dev. Biol.* **178**: 304-315.
- Belliveau M.J., Cepko C.L. (1999). Extrinsic and intrinsic factors control the genesis of amacrine and cone cells in the rat retina. *Development* **126**: 555-566.
- Benraiss A., Arsanto J.P., Coulon J., Thouveny Y. (1999). Neurogenesis during spinal cord regeneration in adult newts. *Dev. Genes Evol.* **209**: 363 – 369.
- Berneburg M., Krutmann J. (2000). Photoaging-associated large-scale deletions of mitochondrial DNA. *Methods Enzymol.* **319**:366-76
- Bernocchi G., Scherini E., Giacometti S., Mares V. (1990). Premitotic DNA synthesis in the brain of the adult frog (*Rana esculenta* L.): an autoradiographic ³H-thymidine study. *Anat. Rec.* **228**: 461 – 470.
- Bertamar G. (1981). Evolution of vomeronasal organ in vertebrates. *Evolution.* **35**: 359-366.
- Biehlmaier O., Neuhauss S.C., Kohler K. (2001). Onset and time course of apoptosis in the developing zebrafish retina. *Cell. Tissue Res.* **306**: 199–207.
- Bork P., Hoffman K., Bucher P., Neuwald A.F., Altschul S.F., Koonin E.V. (1997). *Faber J.* **11**: 68-76.
- Born G. (1876). Ueber die Nasenhöhlen und den Thränennasegang der Amphibien. *Morphol. Jahrb.* **2**: 577-646.
- Boya P., De La Rosa E.J. (2005). Cell death in early neural life. *Birth Defects Res. C. Embryo. Today* **75**: 281–293.
- Broman I. (1920). Die Organon Vomero-nasale Jacobsoni – ein Wassergeruchorgan! *Anat. Hefte.* **58**: 143 – 191.
- Bowen I.D. (1993). Apoptosis or programmed cell death. *Cell Biol. Int.* **17**: 365-380.
- Boya P., De La Rosa E.J. (2005). Cell death in early neural life. *Birth Defects Res. C. Embryo. Today* **75**: 281-293.
- Broman I. (1920). Die Organon Vomero-nasale Jacobsoni – ein Wassergeruchorgan! *Anat. Hefte.* **58**: 143 – 191.

Burd G.D., Sein V. (1998). Influence of olfactory innervation on neurogenesis in the developing olfactory bulb of the frog, *Xenopus laevis*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **855**: 270 – 273.

Buss R.R., Sun W., Oppenheim R.W. (2006). Adaptive roles of programmed cell death during nervous system development. *Annu. Rev. Neurosci.* **29**: 1-35.

Candal E., Anadón R., De Grip W. Rodríguez–Moldes I. (2005). Patterns of cell proliferation and cell death in the developing retina and optic tectum of the brown trout. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **154(1)**: 101–119.

Carmody B.J., Arora S., Avena R., Cosby K., Sidawy A.N. (1999). Folic acid inhibits homocysteine-induced proliferation of human arterial smooth muscle cells. *J Vasc Surg.* **30(6)**:1121-1128.

Carter-Dawson L., La Vail M.M. (1979). Rod and cones in the mouse retina. Autoradiographic analysis of cells generation using tritiated thymidine. *J. Comp. Neurol.* **188(2)**: 263-272.

Cepeda V., Fuertes M.A., Castilla J., Alonso C., Quevedo C., Soto M., Peréz J.M. (2006) “Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 (PARP-1) Inhibitors in Cancer Chemotherapy.” *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*; **1**: 39-53.

Cepko C., Austin C.P. (1996). Cells fate determination in the vertebrate retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93(2)**: 589-595.

Cepko C. (1999). The roles of intrinsic and extrinsic cues and bHLH genes in the determination of retinal cell fates. *Curr. Opin. Neurobiol.* **9(1)**: 37-46.

Chandel N.S., Maltepe E., Goldwasser E., Mathieu C.E., Simon M.C., Schumacker P.T. (1998). Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95(20)**:11715-11720.

Chetvernkhin V.K., Polenov A.L. (1993). Ultrastructural radioautographic analysis of neurogenesis in the hypothalamus of the adult frog, *Rana temporaria*, with special reference to physiological regeneration of the preoptic nucleus. I. Ventricular zone cell proliferation. *Cell Tissue Res.* **271**: 341 – 350.

Chiasson B.J., Tropepe V., Morshead C.M., van der Kooy D. (1999). Adult mammalian forebrain ependymal and subependymal cells demonstrate proliferative potential, but only subependymal cells have neural stem cell characteristics. *J. Neurosci.* **19**: 4462 – 4471.

Chow L.R., Lang R.A. (2001). Early eye development in vertebrates. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **17**: 255–296.

-
- Cohen D.H., Duff T.A., Ebbesson S.O.E. (1973). Electro-physiological identification of a visual area in shark telencephalon. *Science*. **182**: 492 – 494.
- Cole L. K., Ross L. S. (2001). Apoptosis in the developing zebrafish embryo. *Dev. Biol.* **240(1)**: 123–142.
- Cook B., Portera-Cailliau C., Adler R. (1998). Developmental neuronal death is not a universal phenomenon among cell types in the chick embryo retina. *J. Comp. Neurol.* **396(1)**: 12–19.
- Cuadros M.A., Rios A. (1988). Spatial and temporal correlation between early nerve fiber growth and neuroepithelial cell death in chick embryo retina. *Anat. Embryol.* **178**: 543-551.
- Cunningham T.J., Mohler I.M., Giordano D.L. (1982). Naturally occurring neuron death in the ganglion cell layer of the neonatal rat: morphology and evidence for regional correspondence with neuron death in superior colliculus. *Dev. Brain Res.* **2**: 203–215.
- D'Aniello B., Masucci M., di Meglio M., Iela L., Rastogi R.K. (1994). Immunohistochemical localization of GnRH in the crested newt (*Triturus cristatus*) brain and terminal nerve: a developmental study. *J. Neuroendocrinol.* **6**: 167-172.
- D'Aniello B., Pinelli C., Di Fiore M., Iela L., King J.A., Rastogi R.K. (1995). Development and distribution gonadotropin-releasing hormone neuronal system in the frog (*Rana esculenta*) brain: immunohistochemical analysis. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **89**: 281-288.
- D'Aniello B., Fiorentino M., Pinelli C., di Meglio M., Vallarino M., Rastogi R.K. (1996). Distribution of FMRamide-like immunoreactivity in the brain and pituitary of *Rana esculenta* during development. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **95(2)**: 194-204.
- D'Aniello B., Fiorentino M., Pinelli C., Guarino F.M., Angelini F., Rastogi R.K. (2001) Localization of FMRamide-like immunoreactivity in the brain of the viviparous skink (*Chalcides chalcides*). *Brain. Behav. Evol.* **57(1)**: 18-32.
- D'Aniello B., Pinelli C., Polese G., Luongo L., Rastogi R.K. (2007). Developmental analysis of the extrabulbar olfactory projection in the ranid frog with some phylogenetic considerations. *Ital. J. Zool.* In Press.
- Dann J.F., Beazley L.D. (1989). Neurogenesis and cell death in the isthmus nuclei of the frog *Limnodynastes dorsalis*. *J. comp. Neurol.* **283**: 28 – 37.

Davidovic L., Vodenicharov M., Affar E.B., Poirier G.G. (2001) “ Importance of poly(ADP-ribose) glycohydrolase in the control of poly(ADP-ribose) metabolism.” *Experimental Cell Research*; **268**: 7-13.

Davies A.M. (2003). Regulation of neural survival and death by extracellular signals during development. *Embo J.* **22**: 2537-2545.

Dawley E.M., Fingerlin A., Hwang D., John S.S., Stankiewicz C.A. (2000). Seasonal cell proliferation in the chemosensory epithelium and brain of red-backed salamanders, *Plethodon cinereus*. *Brain Behav. Evol.* **56**: 1-13.

De La Rosa E.J., De Pablo F. (2000). Cell death in early neural development beyond the neurotrophic theory. *Trends Neurosci.* **23**: 454-458.

de Murcia JM., Niedergang C., Trucco C., Ricoul M., Dutrillaux B., Mark M., Oliver FJ., Masson M., Dierich A., LeMeur M., Walztinger C., Chambon P., de Murcia G. (1997). Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells. *The Proceedings of the National Academy of Sciences online USA.* **94**:7303-7307.

Del Grande P., Franceschini V., Minelli G., Ciani F. (1990). Mitotic activity of the telencephalic matrix areas following optic tectum or pallial cortex lesion in newt. *Z. Mikrosk. Anat. Forsch.* **104**: 617 – 624.

Derivot J.H (1984a). Functional anatomy of the peripheral olfactory system of the African lungfish *Protopterus annectens owen*: development of the primary olfactory pathway during postembryonic growth. *Am. J. Anat.* **171(1)**: 15-23.

Derivot J.H (1984b). Functional anatomy of the peripheral olfactory system of the African lungfish *Protopterus annectens owen*: macroscopic, microscopic, and morphometric aspects. *Am. J. Anat.* **169(2)**: 177-192.

Diaz B., Pimentel B., de Pablo F., de Rosa E.J. (1999). Apoptosis cell death of proliferating neuroepithelial cells in the embryonic retina is prevented by insulin. *Eur. J. Neurosci.* **11**: 1624-1632.

Diaz B., Serna J., de Pablo F., de la Rosa E. J. (2000). In vivo regulation of cell death by embryonic (pro)insulin and the insulin receptor during early retinal neurogenesis. *Development.* **127**: 1641–1649.

Dulka J.G (1993). Sex pheromone systems in goldfish: comparisons to vomeronasal systems in tetrapods. *Brain Behav. Evol.* **42(4-5)**: 265-280.

Ebbesson S.O.E., Heimer L. (1968). Olfactory bulb projections in two species of sharks. *Anat. Rec.* **160**: 210-217.

Ebbesson SOE and Schroeder DM. (1971). Connections of the nurse shark's telencephalon. *Science* **173**: 254 – 256.

Eisthen H.L, Northcutt RG (1996). Silver lampreys (*Ichthyomyzon unicuspis*) lack a gonadotropin-releasing hormone- and FMRFamide-immunoreactive terminal nerve. *J. Comp. Neurol.* **370(2)**: 159-172.

Estève E., Bagot M., Joly P., Souteyrand P., Beylot-Barry M., Vaillant L., Delaunay M., Avril M.F., Laroche L., Grange F., Thomine E., Wechsler J. (1999). A prospective study of cutaneous intolerance to topical mechlorethamine therapy in patients with cutaneous T-cell lymphomas. French Study Group of Cutaneous Lymphomas. *Arch Dermatol.* **135(11)**:1349-53.

Farah M.H. (2006). Neurogenesis and cell death in the ganglion cell layer of vertebrate retina. *Brain Res. Rev.* **52**: 264–274.

Farbman, A.I., Gesteland, R. C. 1974 Fine structure of the olfactory epithelium in the mud puppy, *Necturus maculosus*. *Am. J. Anat.* **139**: 227-244.

Faucette J.R. (1969). The accessory olfactory bulbs and the lateral telencephalic wall of the rat-fish, *Chimaera*. *J. Comp. Neurol.* **137(4)**: 407-431.

Filoni S., Margotta V. (1971). A study of the regeneration of the cerebellum of *Xenopus laevis* (Daudin) in the larval stages and after metamorphosis. *Arch.Biol. (Liège)*. **8**: 433 – 470.

Föske H. (1934). Das Geruchsorgan von *Xenopus laevis*. *Z. Anat. Entw.* **103**: 519-550.

Frade J. M., Bovolenta P., Martinez–Morales J. R., Arribas A., Barbas J. A., Rodriguez–Tebar A. (1997). Control of early cell death by BDNF in the chick retina. *Development.* **124**: 3313–3320.

Frade J. M., Rodriguez–Tebar A., Barde Y. A. (1996). Induction of cell death by endogenous nerve growth factor through its p75 receptor. *Nature.* **383**: 166–168.

Franceschini V., Del Grande P., Minelli G., Ciani F. (1992). 6-H3 thymidine uptake in the central nervous system of newt following lesion and cold shock. *J. Hirnforsch.* **33**: 235 – 239.

Fulda S., Scaffidi C., Pietsch T., Krammer P.H., Peter M.E., Debatin K.M. (1998). Activation of the CD95 (APO-1/Fas) pathway in drug- and gamma-irradiation-induced apoptosis of brain tumor cells. *Cell Death Differ.* **5(10)**:884-893.

Galli–Resta L., Ensini M. (1996). An intrinsic time limit between genesis and death of individual neurons in the developing retinal ganglion cell layer. *J. Neurosci.* **16(7)**: 2318–2324.

Garcia–Porrero J. A., Ojeda J. L. (1979). Cell death and phagocytosis in the neuroepithelium of the developing retina. A Tem and Sem study. *Experientia.* **35**: 375–376.

Garcia-Verdugo J.M., Ferron S., Flames N., Collado L., Desfilis E., Font E. (2002). The proliferative ventricular zone in adult vertebrates: a comparative study using reptiles, birds, and mammals. *Brain Res. Bull.* **57**: 765 – 775.

Gaze R. M., Grant P. (1992). Spatio–temporal patterns of retinal ganglion cell death during *Xenopus* development. *J. Comp. Neurol.* **315**: 264–274.

Glücksman A. (1940). Development and differentiation of the tadpole eye. *Br. J. Ophthalmol.* **24**: 154–178.

Glücksman A. (1951) Cell death in normal vertebrate ontogeny. *Biol. Rev.* **26**: 59–86

Glücksman A. (1965). Cell death in normal development. *Arch. Biol. (Liege).* **76**: 419–437.

Gona A.G. (1976). Autoradiographic studies of cerebellar histogenesis in the bullfrog tadpole during metamorphosis: the external granular layer. *J. Comp. Neurol.* **165**: 77 – 87.

Gorlick D.L., Kelley D.B. (1987). Neurogenesis in the vocalization pathway of *Xenopus laevis*. *J. Comp. Neurol.* **257**: :614 – 627.

Graw J. (1996). Genetic aspects of embryonic eye development in vertebrate. *Dev. Genet.* **18(3)**: 181-197.

Grossi V. (A.A. 2006-2007). La morfogenesi dell’occhio della lucertola *Podarcis s. sicula*. Facoltà di Scienze MM FF NN. Corso di Laurea in Biologia Generale ed Applicata. Tesi di Laurea in Zoologia. Relatore: Prof. D’Aniello B.

Guerin M.B., McKernan D.P., O’Brien C.J., Cotter T.G. (2006). Retinal ganglion cells: dying to survive. *Int. J. Dev. Biol.* **50**: 665–674.

Hansen R.S. (1998). Effects of system apertures and defocus on the measured phase shift in interferometric displacement measurements. *Appl Opt.* **37(2)**: 340-9.

Harris W.A. (1997). Cellular diversification in the vertebrate retina. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **7**(5): 651–658.

Harada T., Harada C., Parada L.F. (2007). Molecular regulation of visual system development: more than meets eye. *Genes Dev.* **8**: 960–976.

Hensey C., Gautier J. (1999). Developmental regulation of induced and programmed cell death in *Xenopus* embryos. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **887**: 105–119.

Herrick C.J. (1910). The morphology of the forebrain in Amphibia and Reptilia. *J. Comp. Neurol.* **20**: 413 – 547.

Herrick C.J. (1924). The nucleus olfactorius anterior of the opossum. *J. Comp. Neurol.* **37**: 373 – 396.

Hoke K. L., Fernald R. D. (1998). Cell death precedes rod neurogenesis in embryonic teleost retinal development. *Dev. Brain Res.* **11**: 143–146.

Holt C. E., Bertsch T. W., Ellis H. M., Harris W. A. (1988). Cellular determination in the *Xenopus* retina is independent of lineage and birth date. *Neuron*. Mar. **1**(1): 15–26.

Hu M., Easter S.S. (1999). Retinal neurogenesis: the formation of the initial central patch of postmitotic cells. *Dev. Biol.* **207**: 309-321.

Hughes W.F., McLoon S.C. (1979). Ganglio cell death during normal retinal development in the chick: comparisons with cell death induced by early target field destructions. *Exp. Neurol.* **66**: 587-601.

Ino H., Chiba T. (2000). Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in the adult and development mouse nervous system. *Mol. Brain Res.* **78**: 163-174.

Jacobson L. (1811). Description anatomique d'un organe observe dans les mammiferes. *Ann. Mus. Hist. Natl. (Paris)*. **18**: 412-424.

Jacobson M. (1968). Development of neuronal specificity in retinal ganglion cells of *Xenopus*. *Dev. Biol.* **17**(2): 202–218.

Jacobson M. D., Weil M., Raff M. C. (1997). Programmed cell death in animal development. *Cell.* **88**: 347–354.

Jagtap P., Szabó C. (2005) “Poly(ADP-Ribose) Polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors.” *Nature Reviews – Drugs Discovery* **4**.

Jean Y. H., Ayyagari R., Resnick M.A., Gordenin D. A., Burgers P.M. (2003). Okazaki fragment maturation in Yeast. II. Cooperation between the polymerase and 3'-5'-exonuclease activities of pool delta in the creation of a ligatable nick. *J. Biol. Chem.* **278**: 1626–1633.

Johns P. R., Easter S. S. Jr. (1977). Growth of the adult goldfish eye. II. Increase in retinal cell number. *J. Comp. Neurol.* **176(3)**: 331–341.

Jonsson Z.O., Hubscher U. (1997). Proliferating cell nuclear antigen: more than a clamp for DNA polymerases. *BioEssays* **19**: 967–975.

Jonsson Z.O., Hindges R., Hubscher U. (1998). Regulation of DNA replication and repair proteins through interaction with the front side of proliferating cell nuclear antigen. *Embo J.* **17**: 2412–2425.

Kahn A.J. (1974). An autoradiographic analysis of the time of appearance of neurons in the developing chick neural retina. *Dev. Biol.* **38(1)**: 30–40.

Kelman Z., Donnell M. (1995). Structural and functional similarities of prokaryotic and eukaryotic DNA polymerase sliding clamps. *Nucleic Acids Res.* **23 (18)**: 3613–20. Review. Erratum in: *Nucleic Acids Res.*, 1995. **23 (23)**: 493–498.

Kerr J.F.R., Wyllie A.H., Currie A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetic. *Br. J. Cancer.* **26**: 239-257.

Kim M.Y., Zhang T., Kraus W.L. (2005) “Poly(ADP-ribosylation) by PARP-1: ‘PAR-laying’ NAD⁺ into a nuclear signal.” *Gene and Development*; **19**:1951-1967.

Kluck R.M., Bossy-Wetzel E., Green D.R., Newmeyer D.D. (1997). The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *275(5303)*: 1132-1136.

Krishna T.S., Fenyo D., Kong X.P., Gary S., Chait B.T., Burgers P., Kuriyan J. (1994). Crystallization of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.* **241(2)**: 265–268.

Kuan C.Y., Roth K.A., Flavell R.A., Rakic P. (2000). Mechanisms of programmed cell death in the development brain. *Trends Neurosci.* **23**: 291-297.

Kuppfer M. (1916). *Sehorgane am Mantelrande der Pecten-Arten*. Gustav Fischer, Jena.

Kurki P., Wanderlaan M., Dolbeare F., Gray J., Tan E.M. (1986). Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/Cyclin during the cell cycle. *Exp. Cell. Res.* **166**: 209–219.

Kurki P., Wanderlaan M., Tan E.M. (1988). Monoclonal antibodies to proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/Cyclin as probes for proliferating cells by immunofluorescence microscopy and flow cytometry. *J. Immunol. Methods.* **22**: 49–59.

Lamb T.D., Collin S. P., Pugh E.N. (2007). Evolution of the vertebrate eye: opsins, photoreceptors, retina and eye cup. *Nat. Rev. Neurosci.* **8**: 960–976.

LaVail M.M., Rapaport D.H. (1991). Cytogenesis in the monkey retina. *J. Comp. Neurol.* **309**(1): 86–114.

Lebedev O.A., Coates M.I. (1995). The postcranial skeleton of the Devonian tetrapod *Tulerpeton curtum* Lebedev. *Zool. J. Linn. Soc.* **114**: 307-348.

Levine E.M., Green E.S. (2004). Cell-intrinsic regulators of proliferation in vertebrate retinal progenitors. *Semin. Cell. Dev. Biol.* **15**(1): 63–74.

Livesey F.J., Cepko C. (2001). Vertebrate neural cell-fate determination: lesson from the retina. *Nat. Rev. Neurosci.* **2**(2): 109-118.

Lois C., Alvarez-Buylla A. (1993). Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**(5): 2074 – 7.

Maga G., Villani G., Tillement V., Stucki M., Locatelli G.A., Frouin I., Spadai S., Hubscher U. (2001). Okazaki fragment processing: modulation of the strand displacement activity of DNA Polymerase delta by the concerted action of replication protein A, proliferating cell nuclear antigen and flap endonuclease 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 14298–14303.

Mathis U., Schaeffel F., Howland H.C. (1988). Visual optics in toads (*Bufo americanus*). *J. Comp. Physiol. [A]*. **163**(2): 201–213.

Margotta V., Morelli A. (1996). Encephalic matrix areas and post-natal neurogenesis under natural and experimental conditions. *Anim. Biol.* **5**: 117 -131.

Margotta V., Morelli A., Alfei L. (1999a). PCNA positivity in the telencephalic matrix areas in the adult of a lizard, *Podarcis sicula*. *J. Brain Res.* **3**: 271-276.

Margotta V., Morelli A., Alfei L. (1999b). PCNA positivity in the telencephalic matrix areas in the adult of a newt, *Triturus carnifex*. *J. Brain Res.* **39**: 523-528.

Margotta V., Morelli A., Alfei L. (2000). PCNA positivity in the telencephalic matrix areas in the adult of a frog, *Rana esculenta*. *Rend. Fis. Acc. Lincei* **11**: 185-196.

Marquardt T., Gruss P. (2002). Generating neuronal diversity in the retina: one for nearly all. *Trends Neurosci.* **25(1)**: 32-38.

Martinez S., Puelles L. (2000). Neurogenetic compartments of the mouse diencephalons and some characteristic gene expression patterns. In *Mouse brain development*. A.M. Goffinet, P. Rakic, ed. Springer, Berlin, pp. 91 – 106.

Martin-Partido G., Rodriguez-Gallardo L., Ivarez I.S., Navascues J. (1988). Cell death in the ventral region of the neural retina during the early development of the chick embryo eye. *Anat. Rec.* **222**: 272-281.

Martin-Teva J.L., Cuadros M.A., Calvente R., Almendros A., Navascues J. (1999). Naturally occurring cell death and migration of microglial precursors in the quail retina during normal development. *J. Comp. Neurol.* **412**: 255–275.

Mathis J.M., Simpson E.R., Prough R.A. (1988). Hormonal regulation of the xenobiotic metabolizing enzymes. *Mol. Cell Endocrinol.* **60**:105-108.

Meyer D.L., Fackler I.R., Jadhao A.G., D’Aniello B., Kicliter E. (1997). Differential labelling of primary olfactory subcomponents by SBA (lectin) and NADPH-d histochemistry in the frog *Pipa*. *Brain Res.* **762**: 275 – 280.

Mayordomo R., Valenciano A.I., De La Rosa E.J., Halbook F. (2003). Generation of retinal ganglion cells is modulated by caspase-dependent programmed cell death. *Eur. J. Neurosci.* **18**: 1744-1750.

Meyer D.L., Fackler I.R., Jadhao A.G., D’Aniello B. and Kicliter E. (1997). Differential labelling of primary olfactory subcomponents by SBA (lectin) and NADPH-d histochemistry in the frog *Pipa*. *Brain Res.* **762**: 275-280.

Minelli G., Del Grande P., Franceschini P. (1982). Uptake of 6-H3 thymidine in the normal and regenerating CNS of *Rana esculenta*. *Z. Mikrosk. Anat. Forsch.* **96**: 201-213.

Morcillo Francisco J., Hidalgo-Sánchez M., Martín-Partido G. (2004) Spatial and temporal patterns of apoptosis during differentiation of the retina in the turtle. *Anat. Embryol.* **208**: 289–299.

Morcillo Francisco J., Hidalgo-Sánchez M., Martín-Partido G. (2006). Spatial and temporal patterns of proliferation and differentiation in the developing turtle eye. *Brain Res.* **1103(1)**: 32–48.

Morcillo J., Martínez–Morales J. R., Trousse F., Fermin Y., Sowden J. C., Bovolenta P. (2006). Proper patterning of the optic fissure requires the sequential activity of BMP7 and SHH. *Development*. **133**: 3179–3190.

Nazak T., Masutani T., Akangawa T., Sugimura T., Esuni H. (1994). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **198**: 54-51.

Nguyen V.S., Straznicky C. (1989). The development and the topographic organization of the retinal ganglion cell layer in *Bufo marinus*. *Exp. Brain Res.* **75(2)**: 345–353.

Nottebohm F. (1985). Neuronal replacement in adulthood. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **457**: 143 – 161.

Northcutt R.G. (1972). Afferent projection of the telencephalon of bullfrog (*Rana catesbeiana*). *Anat. Rec.* **172**: 374.

Ohsawa, S., Hamada, S., Yoshida, H., Miura, M. (2008). Caspase-mediated changes in histone H1 in early apoptosis: prolonged caspase activation in developing olfactory sensory neurons. *Cell Death and Differentiation*. **15**: 1429–1439.

Onishchenko L.S., Tverskikh N.M., Chetverukhin V.K. (1983). Autoradiographic study of the proliferative activity of the preoptic recess ependyma in yearling and juvenile common frogs. *Tsitologiya* **25**: 98-101.

Oppenheim R.W. (1991). Cell death during development of the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* **14**: 453-501.

Panchen, A. L. (1991). The early tetrapods: classification and the shapes of cladograms. In *Origins of the higher groups of tetrapods: controversy and consensus* (ed. H.-P. Schultze & L. Trueb).pp. 100-144. Ithaca, NY: Cornell University Press.

Péquignot M.O., Provost A.C., Salle S., Taupin P., Sainton K.M., Marchant D., Martinou J.C., Ameisen J.C., Jais J.P. and Abitbol M. (2003). Major role of BAX in apoptosis during retinal development and in establishment of a functional postnatal retina. *Dev. Dyn.* **228**: 231–238.

Pérez-Cañellas M.M. and García-Verdugo J.M. (1996). Adult neurogenesis in the telencephalon of a lizard: A [³H] thymidine autoradiographic and bromodeoxyuridine. *Brain Res. Des. Brain Res.* **93(1-2)**: 49 – 61.

Polenov A.L., Chetverukhin V.K. (1993). Ultrastructural radioautographic analysis of neurogenesis in the hypothalamus of the adult frog, *Rana temporaria*, with special reference to physiological regeneration of the preoptic nucleus. II. Types of neuronal cells produced. *Cell Tissue Res.* **271**: 351 – 362.

-
- Potiquet M. (1891). Le canal de Jacobson. *Rev. Laryngol (Paris)* **2**: 737 – 753.
- Prada C., Puga J., Pérez-Méndez L., López R., Ramírez G. (1991). Spatial and Temporal Patterns of Neurogenesis in the Chick Retina. *Eur. J. Neurosci.* **3(6)**: 559–569.
- Pritz M.B. (2003). Cell proliferation during early hindbrain development in *Alligator*. *Brain Behav. Evol.* **62**: 193-200.
- Provis J.M. (1987). Patterns of cell death in the ganglion cell layer of the human fetal retina. *J. Comp. Neurol.* **259**: 237–246.
- Rager G. (1980). Development of the retinotectal projection in the chicken. *Adv. Anat. Embryol. Cell. Biol.* **63**: 1-90.
- Rager U, Rager G, Frei B. (1993). Central retinal area is not the site where ganglion cells are generated first. *J. Comp. Neurol.* **334(4)**: 529-544.
- Rankin S.L., Partlow G.D., McCurdy R.D., Giles E.D., Fisher K.R., (2004). The use of proliferating cell nuclear antigen immunohistochemistry with a unique functional marker to detect postnatal neurogenesis in paraffin-embedded sections of the mature pig brain. *Brain Res. Protoc.* **13**: 69 – 75.
- Rapaport D.H., Stone J. (1983). The topography of cytogenesis in the developing retina of the cat. *J. Neurosci.* **9**: 1824–1834.
- Reese B.E., Johnson P.T., Baker G.E. (1996). Maturational gradients in the retina of the ferret. *J. Comp. Neurol.* **375(2)**: 252–723.
- Reznikov K.I., Maliovanova S.D. (1979). Cell proliferation and migration in the roof of the mesencephalon (tectum) in *Xenopus laevis*. II. Cell proliferation and differentiation of the tectum. *Ontogenez* **10**: 350 – 358.
- Ryabokon N.I., Goncharova R.I., Duburs G., Hancock R., Rzeszowska-Wolny J. (2007) “Changes in poly(ADP-ribose) level modulate the kinetics of DNA strand break rejoining.” *Mutation Research* **637**: 173–181.
- Rodríguez-Pérez L.M., Pérez-Martín M., Jiménez A.J. Fernández-Llebrez P. (2003). Immunocytochemical characterisation of the wall of the bovine lateral ventricle. *Cell Tissue Res.* **314**: 325 – 335.
- Rolli V., Ruf A., Augustin A., Schulz G.E., Ménissier-de Murcia J., de Murcia, G., (2000) “Poly(ADP-ribose) Polymerase: structure and function.” In Shall, S., Editor. From “DNA Damage and Stress Signalling to Cell Death: Poly ADP-Ribosylation Reactions.” De Murcia G. and Shall S.; Oxford University Press, New York 35–79.

-
- Romero-Aleman M.M., Monzon-Mayer M., Yanes C., Lang D. (2004). Radial glial cells, proliferative periventricular cells, and microglia might contribute structural repair in the cerebral cortex of the lizard *Gallotia galloni*. *Exp. Neurol.* **188**: 74 – 85.
- Roth K.A., D'Sa C. (2001). Apoptosis and brain development. *Ment. Retard. Dev Disabil. Res. Rev.* **7**: 261-266.
- Royce GJ .and Northcutt RG. (1969). Olfactory bulb projections in the tiger salamander (*Ambystoma tigrinum*) and the bullfrog (*Rana catesbeiana*). *Anat. Rec.* **163**: 254.
- Ruysch F. (1703). *Thesaurus Anatomicus Tertius*, 70, plate IV. Fig. 5, 48-49. Wolters. Amsterdam.
- Rudebeck R. (1945). Contribution to forebrain morphology in Dipnoi. *Acta Zool.* **26**: 9-159
- Scalia F., Harpern M., Knapp H., Riss W. (1968). The efferent connections of the olfactory bulb in the frog: A study of degenerating unmyelinated fibers. *J. Anat.* **103**: 245 – 262.
- Scalia F., Ebbesson S. (1971). The central projections of the olfactory bulb in a teleost (*Gimnotoras funebris*). *Brain Behav. Evol.* **4**: 376 – 399.
- Schnitzlein H.N (1964). Correlation of habit and structure in the fish brain. *Am. Zool.* **136**: 21-32.
- Schnitzlein H.N, Crosby E.C (1967). The telencephalon of the lungfish, Protopterus. *J. Hirnforsch.* **9(2)**: 105-149.
- Schreiber V., Hunting D., Trucco C., Gowans B., Grunwald D., de Murcia G., de Murcia JM. (1995) “A dominant-negative mutant of human poly(ADP-ribose) polymerase affects cell recovery, apoptosis and sister chromatid exchange following DNA damage.” *The Proceedings of the National Academy of Sciences online USA*; **92**:4753–4757.
- Schreiber V., Amé J.C., Dollé P., Schultz I., Rinaldi B., Fraulob V., Ménissier-de Murcia J., de Murcia G. (2002) “Poly(ADP-ribose) polymerase-2 (PARP-2) is required for efficient base excision DNA repair in association with PARP-1 and XRCC1.” *Journal of Biological Chemistry*; **277(25)**:23028-36.
- Schuch K. (1934). Das Geruchsorgan von *Triton alpestris*. *Zool. Jahrb. Anat.* **59**: 69-134.

Scottoni A. (2006). Il sistema nervoso di *Xenopus laevis* durante l'ontogenesi: uno studio immunostochimico sulla PCNA. Tesi di laurea.

Sengelaub D.R., Finlay B.L. (1982). Cell death in the mammalian visual system during normal development. I. Retinal ganglion cells. *J. Comp. Neurol.* **204**: 311–317.

Sevdel O. (1895). Über die Nasenhöhle und das Jacobson'sche Organ der Amphibien. *Morphol. Jahrb.* **23**: 453-543.

Shall S., de Murcia G. (2000). Poly(ADP-ribose) polymerase-1: What have we learned from the deficient mouse model?. *Mutation Research.* **460**: 1-15.

Sharma S. C., Ungar F. (1980). Histogenesis of the goldfish retina. *J. Comp. Neurol.* **191(3)**: 373–382.

Silver J., Hughes F. W. (1973). The role of cell death during morphogenesis of the mammalian eye. *J. Morphol.* **140**: 159–170.

Simonian, N.A., Coyle, J.T. (1996). Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **36**: 83-116.

Smith S. (2001) "The world according to PARP." *Trends in Biochemical Sciences;* **26(3)**:174-179.

Snow R. L., Robson J. A. (1995). Migration and differentiation of neurons in the retina and optic tectum of the chick. *Exp. Neurol.* **134(1)**: 13–24.

Stiemke M.M., Hollyfield J.G. (1995). Cell birthdays in *Xenopus laevis* retina. *Differentiation* **58(3)**: 189-193.

Story H. (1964). The olfactory bulbar formation and related nuclei of the paddlefish (*Polyodon spathula*). *J. Comp. Neurol.* **123**: 285-297.

Stuart F. (2001). How the olfactory system makes sense of scents. *Nature.* **413**: 211-218.

Stubbe P., Gatz J., Heidemann P., Mühlen A., Hesch R. (1978). Thyroxine-binding globulin, triiodothyronine, thyroxine and thyrotropin in newborn infants and children. *Horm Metab Res.* **10(1)**:58-61.

Straznicky C., Chegade M. (1987) The formation of the area centralis of the retinal ganglion cell layer in the chick. *Development* **100**: 411–420.

Straznicky K., Gaze R. M. (1971). The growth of the retina in *Xenopus laevis*: an autoradiographic study. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **26(1)**: 67–79.

Tay D., Straznicky C. (1980). The development of the nucleus isthmi in *Xenopus*: an autoradiographic study. *Neurosci. Lett.* **16**: 313 – 318.

Tom S., Henriksen L.A., Bambara R.A. (2000). Mechanism whereby Proliferating Cell Nuclear Antigen stimulates flap endonuclease1. *J. Biol. Chem.* **275**: 10498–10505.

Tong W.M., Cortes U., Wang Z.Q. (2001) “Poly(ADP-ribose) polymerase: a guardian angel protecting the genome and suppressing tumorigenesis.” *Biochimica et Biophysica Acta* **155**: 27-37.

Trevor D., Lamb. Shaun P., Collin and Edward N., Pugh JR. (2007). Evolution of the vertebrate eye: opsins, photoreceptors, retina and eye cup. *Nature Reviews Neuroscience* **8**: 960-976.

Turner D.L., Snyder E.Y., Cepko C.L. (1990). Lineage-independent determination of cell type in the embryonic mouse retina. *Neuron* **4**. 833-845.

Ullrich O., Diestel A., Bechmann I., Homberg M., Grune T., Hass R., Nitsch R. (2001a) “Turnover of oxidatively damaged nuclear proteins in BV-2 microglial cells is linked to their activation state by poly-ADP-ribose polymerase.” *FASEB Journal*; **15**:1460–1462.

Uray N.J., Gona A.G., Hauser K.F. (1988). Autoradiographic studies of cerebellar histogenesis in the premetamorphic bullfrog tadpole: II. Formation of the interauricular granular band. *J. Comp. Neurol.* **269**: 118 – 129.

Valenciano Ana I., Boya P., De LA Rosa J.(2009). Early neural cell death: numbers and cues from the development neuroretina. *Int. J. Dev. Biol.* **52**: 214-228.

van Wassenaer A.G., Kok J.H.(2004) Hypothyroxinaemia and thyroid function after preterm birth. *Semin Neonatol.* **9(1)**:3-11.

Vecino E., Caminos E., Becker E., Rudkin B. B., Evan G. I. and Martín-Zanca D. (1998). Increased levels of TrkA in the regenerating retinal ganglion cells of fish. *Neuroreport.* **9(15)**: 3409–3413.

Vecino E., Hernandez M., Garcia M. (2004). Cell death in the developing vertebrate retina. *Int. J. Dev. Biol.* **48**: 965–974.

Villar-Cheda B., Pérez-Costas E., Meléndez-Ferro M., Abalo X.M., Rodríguez-Muñoz R., Anadón R., Rodicio M.C. (2002). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunoreactivity and development of the pineal complex and habenula of the sea lamprey. *Brain Res. Bull.* **57**: 285-287.

Villar-Cheda B., Abalo X.M., Anadon R., Rodicio M.C. (2005a). The tegmental proliferation region in the sea lamprey. *Brain Res. Bull.* **66**: 431-435.

Villar-Cheda B., Perez-Costas E., Melendez-Ferro M., Abalo X.M., Rodriguez-Munoz R., Anadon R., Rodicio M.C. (2005b). Cell proliferation in the forebrain and midbrain of the sea lamprey. *J. Comp. Neurol.* **494**: 986-1006.

Virag L., Salzman A.L., Szabo C. (1998a) "Poly(ADP-ribose) synthetase activation mediates mitochondrial injury during oxidant-induced cell death." *The Journal of Immunology*; **161**:3753–3759.

Virag L., Scott G.S., Cuzzocrea S., Marmer D., Salzman A.L., Szabo C. (1998b). Peroxynitrite-Induced Thymocyte Apoptosis: the Role of Caspases and Poly (ADPRibose) Synthetase (PARS) Activation. *Immunology*; **94**:345–355.

Virag L., Szabo C. (2002) "The Therapeutic Potential of Poly(ADP-Rybose) Polymerase Inhibitors." *Pharmacological Reviews.* **54**: 375-429.

Virag L. (2005) "Structure and Function of Poly(ADP-ribose) Polymerase-1: Role in Oxidative Stress-Related Pathologies." *Current Vascular Pharmacology.* **3**: 3.

Vogel M., Möller K. (1980). Cellular decay in the rat retina during normal post-natal development: A preliminary quantitative analysis of the basic endogenous rhythm. *Albrecht von Graefes Arch. Klin. Exp. Ophthalmol.* **212**: 243–260.

Waga S., Bauer G., Stillman B. (1994). Reconstitution of complete SV40 DNA replication with purified replication factors. *J. Biol. Chem.* **269**: 10923–10934.

Walsh C., Polley E.H. (1985). The topography of ganglion cell production in the cat's retina. *J. Neurosci.* **3**: 741–750.

Warbrick E. (2000). The puzzle of PCNA's many patterns. *BioEssays.* **22**: 997–1006.

Wei S., Liu J.H., Epling-Burnette P.K., Gamero A.M., Ussery D., Pearson E.W., Elkabani M.E., Diaz J.I., Djeu J.Y. (1996). Critical role of Lyn kinase in inhibition of neutrophil apoptosis by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol.* **157(11)**: 5155-62.

Weiss G. (1986). Die Struktur des Geruchsorgans und des Telencephalons beim südafrikanischen Krallenfrosch, *Xenopus laevis* (Daudin), und ihre Veränderungen während der Metamorphose. PhD dissertation, University of Regensburg.

Wett R.W., Fraser S.E. (1988). Multipotent precursors can give rise to all major cells types of the frog retina. *Science* **239**: 1142-1145.

Wistow G.J., Piatigorsky J. (1988). Lens crystallins: the evolution and expression of proteins for a highly a specialized tissue. *Annu. Rev. Biochem.* **57**: 479-504.

Wride M.A. (1996). Cellular and molecular features of lens differentiation: a review of recent advances. *Differentiation* **61(2)**: 77-93.

Wullimann M.F., Puelles L. (1999). Postembryonic neural proliferation in the zebrafish forebrain and its relationship to prosomeric domains. *Acta Embryol.* **199**: 329- 348.

Wullimann M.F., Knipp S. (2000). Proliferation pattern changes in the zebrafish brain from embryonic through early postembryonic stages. *Anat. Embryol.* **202**: 385- 400.

Wullimann M.F., Mueller T. (2004). Identification and morphogenesis of the eminentia thalami in the zebrafish. *J. Comp. Neurol.* **471**: 37- 48.

Wullimann M.F., Rink E., Vernier P., Schlosser G. (2005). Secondary neurogenesis in the brain of the African clawed frog, *Xenopus laevis*, as revealed by PCNA, delta-1, neurogenin-related-1, and NeuroD expression. *J. Comp. Neurol.* **489**: 387- 402.

Wyllie A.H. (1981). Cell death: a new classification separating apoptosis of necrosis. In: Bowen ID , Lockshin RA (eds) *Cell Death in Biology and Pathology*. Chapman, London. 9-33.

Xu H., Zhang P., Liu L., Lee M.Y.W.T. (2001). A novel PCNA binding motif indentified by the panning of a random peptide display library. *Biochemistry.* **40**: 4512–4520.

Yakes F.M., Van Houten B. (1997). Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. **94(2)**:514-519.

Yeo W., Gautier J. (2004). Early neural cell death: dying to become neurons. *Dev. Biol.* **274**: 233-244.

Yoshino J., Tochinai S. (2004). Successful reconstitution of the non-regenerating adult telencephalon by cell transplantation in *Xenopus laevis*. *Develop. Growth Differ.* **46**: 523 – 534.

Young R.W. (1984). Cell death during differentiation of the retina in the mouse. *J. Comp. Neurol.* **229**: 362–373.

Young R.W. (1985). Cell differentiation in the retina of the mouse. *Anat. Rec.* **212(2)**: 199-205.

Yu S., Andrabi Shaida A., Hongmin W., Kim No Soo, Poirier Guy G., Dawson Ted M., Dawson Valina L. (2006) “Apoptosis-inducing factors mediates poly(ADP-ribose) (PAR) polymer-induced cell death.” *The National Academy of Sciences of the USA.* **103**: 18314-18319.

Yuzhakov A., Kelman Z., Hurwitz J., O’Donnell M. (1999). Multiple competition reactions for RPA order the assembly of the DNA polymerase delta holoenzyme. *Embo J.* **18**: 6189–6199.

Zaniolo K., Desnoyers S., Leclerc S., Guérin S.L. (2007) “Regulation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) gene expression through the post-translational modification of Sp 1: a nuclear target protein of PARP-1.” *BMC Molecular Biology*; **8**: 96.

Zimmerman R.P., Polley E.H., Fortney R.L. (1988). Cell birthdays and rate of differentiation of ganglion and horizontal cells of the developing cat's retina. *J. Comp. Neurol.* **274(1)**: 77–90.

Zupanc G.K., Horschke I. (1995). Proliferation zones in the brain of adult gymnotiform fish: a quantitative mapping study. *J. Comp. Neurol.* **353**: 213 – 233.