

Osservazioni sull'ultrastruttura dell'epidermide in embrioni e larve di *Rana esculenta* L. (*)

RIASSUNTO

Vengono descritti gli aspetti morfologici ultrastrutturali delle cellule dell'epidermide in embrioni e larve di *Rana esculenta* L. L'epidermide appare costituita da due strati cellulari sovrapposti; le cellule basali sono identiche in tutta la superficie corporea, e nel loro interno si sviluppano i corpi di Eberth, costituiti da fasci di sottili fibrille. Nello strato superiore sono distinguibili due principali tipi cellulari: le cellule cigliate, presenti in scarso numero, ma diffuse su tutto il corpo dell'animale, con condrioma assai sviluppato e numerose ciglia; le cellule « ghiandolari », caratterizzate da una serie superficiale di vacuoli, il cui contenuto viene riversato all'esterno mediante rottura della membrana cellulare e della parete del vacuolo. Viene inoltre descritto in dettaglio l'aspetto delle cellule ghiandolari dell'organo adesivo: esse sono estremamente allungate, con ergastoplasma ed apparato di Golgi molto sviluppati, e con la parte apicale infarcita di granuli di secreto. In queste cellule sono state studiate le relazioni esistenti tra ergastoplasma, apparato di Golgi e formazione dei granuli di secreto.

È stato infine analizzato, in immagini ad alta risoluzione, il particolare aspetto delle membrane cellulari sul margine libero di tutte queste cellule, e la struttura delle zone di unione tra cellule adiacenti.

L'epidermide nell'embrione e nelle larve di *Rana* è costituita da due strati cellulari sovrapposti. Quello interno poggia sulla lamella basale costituita da strati di fibrille collagene ad orientazione caratteristica e regolare, nel senso che le fibrille di ogni strato sono tutte disposte secondo una medesima direzione, mentre sono perpendicolari rispetto a quelle degli strati adiacenti (WEISS e FERUS, 1954). Lo strato esterno di cellule è in stadi assai precoci di sviluppo, fino allo stadio 15-17 di RUCH (1948), pressoché completamente cigliato, sebbene le ciglia non siano molto numerose. Queste partono da un granulo basale, e con il loro movimento fanno passare una corrente continua di liquido sull'embrione. In seguito la maggior parte

(*) Memoria presentata dall'Accademico SILVIO RANEL.

delle cellule perde le ciglia; queste si rinvergono solo in cellule particolarmente differenziate, ove tuttavia sono molto numerose. Il passaggio dalla vita embrionale a quella larvale, per quanto riguarda l'epidermide, è in buona parte caratterizzato da questa particolare ridistribuzione delle ciglia, che si localizzano in cellule differenziate in questo senso, distribuite irregolarmente su tutta la superficie corporea, ma con particolare frequenza sui margini della pinna codale e attorno all'organo adesivo.

Contemporaneamente a questo processo si assiste anche alla graduale digestione dei globuli vitellini, che vanno via via diminuendo di numero, riducendosi contemporaneamente nelle dimensioni fino a scomparire del tutto.

È curiosa anche l'osservazione che le cellule dell'epidermide, pur essendo in contatto tra loro, lasciano delle ampie lacune, che aumentano in dimensioni parallelamente all'aumento dimensionale delle cellule ed alla scomparsa dei globuli vitellini.

In questo lavoro vengono presi in esame quattro tipi diversi di cellule dell'epidermide:

a) cellule basali, che sono praticamente identiche su tutta la superficie corporea, anche a livello dell'organo adesivo, dove tuttavia perdono la forma triangolare assumendo quella cubica;

b) cellule cigliate definitive, immediatamente riconoscibili per la grande quantità di ciglia e perché appaiono al microscopio elettronico molto più scure delle altre;

c) cellule superficiali « ghiandolari » ad ampia distribuzione e caratterizzate soprattutto da una serie pressoché continua di vacuoli molto vicini tra di loro, per lo più in un unico strato sul margine cellulare esterno;

d) cellule ghiandolari dell'organo adesivo, cilindriche e lunghe oltre 50 micron (quando raggiungono il loro completo sviluppo); con nucleo basale, zona intermedia fortemente basofila e zona apicale letteralmente infarcita di granuli di secreto.

Tutte queste cellule, ad eccezione di quelle dell'organo adesivo, hanno (almeno dopo lo stadio 15) una curiosa forma triangolare; quelle dello strato inferiore con base rivolta verso l'interno dell'animale, ed apice rivolto esternamente, quelle dello strato superficiale invece con base rivolta verso l'esterno dell'animale ed apice rivolto internamente. In complesso ne risulta un sistema di triangoli disposti in duplice fila, ed ingranati tra di loro (Tav. I, fig. 1; Tav. II, fig. 3 e 5).

MATERIALE E METODI.

Embrioni e larve di *Rana esculenta* L., in stadi di sviluppo varianti tra il 15° e il 25° di RUGH (1948), sono stati fissati in glutaraldeide (SABATINI e coll. 1963) e successivamente in acido osmico. L'inclusione è stata fatta in butilmetacrilato o in araldite, seguendo le tecniche usuali.

Le sezioni sono state eseguite con l'ultramicrotomo Philips, o Ultratome LKB, raccolte su griglie con membrana di FORMVAR rinforzata con un leggero strato di carbone, e quindi « colorate » o con permanganato di potassio secondo DROCHMANS

(1960), ovvero con piombo, secondo le tecniche di KARNOVSKY (1961), o di REYNOLDS (1963). Le fotografie sono state eseguite con il microscopio elettronico Philips E.M. 75 B. ovvero con il microscopio elettronico Hitachi HS-7.

Sui medesimi preparati sono state fatte delle sezioni semifini (tra 0,3 e 0,5 μ) per mezzo dell'ultramicrotomo Furieri. Esse sono state colorate con violetto di genziana e fucsina basica MOORE e coll. (1960) ovvero con blu di Toluidina TRUMP e coll. (1961).

CELLULE BASALI.

In stadi precoci di sviluppo l'elemento piú appariscente è costituito da numerosi e grandi globuli vitellini, alcuni perfettamente conservati, altri parzialmente disgregati: il nucleo è grande, circondato da una membrana assai sinuosa, abbastanza numerosi sono i mitocondri, che appaiono rigonfiati, mentre il citoplasma risulta molto povero di altri organuli differenziati. È da tener presente tuttavia che, a causa della grande quantità di globuli vitellini, non è facile ottenere una fissazione perfetta, e forse a questo fatto è da imputarsi l'aspetto particolarmente svuotato che presenta il citoplasma.

In seguito, a partire dallo stadio 20 circa, le caratteristiche tipiche di queste cellule si rendono via via piú manifeste. Il numero dei globuli vitellini si riduce alquanto, i mitocondri assumono una fisionomia piú tipica, e il citoplasma si arricchisce di numerosi organuli, rappresentati da lunghe cisterne appiattite, circondate da ribosomi, da vescicole sparse, da zone di Golgi ben differenziate, e da numerosi ribosomi liberi. Ma l'elemento piú caratteristico di queste cellule è senz'altro rappresentato dai fasci di sottili filamenti che piú tardi costituiranno i cosiddetti corpi di Eberth (Tav. I, fig. 2).

Questi cominciano ad apparire precocemente, ma si rendono pienamente manifesti (almeno al microscopio ottico) solo in larve già molto avanzate nello sviluppo e lunghe oltre 2 cm. RUDNEFF (1865) li descrisse come strutture filamentose, ed EBERTH (1866) ne analizzò minutamente l'aspetto, giungendo alla conclusione, sostenuta anche da altri Autori, che si trattasse di derivati mitocondriali, tanto che tali corpi vennero anche indicati con il termine di « filamenti mitocondriali ». SAGUCHI (1913) suppose che tali strutture nascessero dalla fusione di mitocondri e penetrassero attraverso le membrane cellulari, per unire il derma con l'epidermide. WEED (1934) descrisse queste formazioni come una continuazione fibrillare del connettivo del corion, aventi la funzione di costituire una sorta di connessione tra la parte basale dell'epidermide ed il corion stesso. Secondo CAMERON (1936) invece i corpi di Eberth altro non sarebbero che accumuli di secreto, utilizzato per la costituzione degli elementi del connettivo del derma.

Nel complesso il problema dei corpi di Eberth non trovò una logica risoluzione sulla scorta di studi al microscopio ottico, e dovette attendere l'avvento delle nuove tecniche di microscopia elettronica per essere risolto. Soprattutto in base alle osservazioni di CHAPMAN e DAWSON (1961) i corpi di Eberth possono venire descritti come matasse di materiale fibroso variamente orientato, costituito da sottili fibrille

di cheratina. Queste fibrille si portano essenzialmente verso la membrana cellulare, posta sulla base della cellula, e qui prendono contatto con speciali placche ispessite, poste sulla membrana stessa, lunghe in genere 0,3-0,4 μ . Per la loro particolare morfologia e per il fatto che su di esse si portano i filamenti di cheratina, le placche ispessite poste sulla membrana cellulare alla base della cellula, possono venire considerate come degli emidesmosomi. In effetti i medesimi filamenti di cheratina, che ammassandosi e portandosi verso la base cellulare costituiscono i corpi di Eberth, sfocandosi in modo più disordinato in direzione della membrana cellulare rivolta verso le cellule dell'assisa superiore, si portano a saldarsi sulle placche di classici desmosomi.

Questi non sono nè molto grandi, nè molto numerosi, ma presentano tutte le caratteristiche descritte per i desmosomi di qualsiasi tessuto, e sono localizzati nei punti in cui le membrane cellulari delle due cellule contigue sono in contatto tra di loro e non separate dalle ampie lacune cui si è già accennato.

A livello dell'organo adesivo, come si è già detto in precedenza, le cellule basali perdono la loro forma triangolare, assumendo un aspetto cubico: tuttavia la loro ultrastruttura resta immutata. Tale trasformazione di forma è ovviamente una conseguenza meccanica dell'estremo allungamento presentato dalle cellule dello strato superiore, che diventando cilindriche non sono più costrette ad ingrassarsi con quelle basali. A questo proposito si può constatare come il passaggio dalla forma triangolare a quella cubica avvenga gradatamente, già nelle zone marginali dell'organo adesivo, dove le cellule cigliate e quelle superficiali ghiandolari vanno a loro volta allungandosi per potere avvolgere il gruppo delle cellule a secrezione mucosa.

CELLULE CIGLIATE.

Queste cellule cominciano ad acquistare una morfologia definita solo a partire dallo stadio 20, in quanto in stadi più precoci mostrano ancora dei caratteri comuni con le cellule ghiandolari. Hanno una forma triangolare, con apice rivolto verso l'interno dell'animale, ma sono in genere più grandi delle circostanti cellule di tipo ghiandolare, per cui tendono a sporgere sulla superficie corporea (Tav. II, fig. 4).

Al microscopio elettronico sono chiaramente identificabili sia per la presenza di numerose ciglia sul loro margine, sia per la densità elettronica generale del loro citoplasma, che è nettamente superiore a quella delle cellule circostanti (Tav. III, fig. 8).

Il nucleo è posto in profondità, cioè pressappoco all'apice del triangolo che rappresenta il contorno cellulare; è generalmente lobato, con profonde incisure della membrana e spesso anche a ferro di cavallo.

La forma irregolare del nucleo, già descritta nell'embrione di *Triturus* da KASAHARA (1959), è evidentemente da connettere alle grosse dimensioni che esso ha nelle cellule degli Anfibi, per cui è necessario che la sua superficie si presenti forte-

mente sinuosa, o anche profondamente incisa, in modo da conservare un valore ragionevole al rapporto tra volume e superficie.

Il nucleo a ferro di cavallo si rinviene soprattutto nelle cellule cigliate della pinna codale, caratterizzate dalla presenza di un'enorme goccia lipidica, che occupando buona parte dello spazio citoplasmatico, costringe il nucleo in una zona ristretta, e gli impone questa forma caratteristica. Oltre alle gocce lipidiche sono sempre presenti anche globuli vitellini in diverse fasi di degradazione, ed è soprattutto in queste cellule che sono facilmente osservabili immagini di degenerazione mielinica di detti globuli, con probabili forme di transizione tra esse ed i mitocondri (LANZAVECCHIA, 1964).

Questi ultimi sono particolarmente numerosi e tutta la fascia periferica di citoplasma è praticamente costituita da un addensamento di tali organelli, talvolta pressoché a contatto gli uni con gli altri (Tav. III, fig. 10). La loro presenza in numero così elevato va associata ovviamente all'esistenza delle numerose ciglia vibratili. Il movimento delle ciglia sul margine cellulare richiede infatti delle forti quantità di energia, che possono essere fornite soltanto da un numero adeguato di mitocondri. Questi ultimi hanno un aspetto estremamente polimorfo, potendo apparire nelle sezioni sottili per il microscopio elettronico, con gli aspetti più differenti. Generalmente si presentano come corpiccioli moderatamente allungati, con numerose creste poste trasversalmente, ma sono frequenti anche profili rotondegianti o poligonali con creste orientate senza un particolare ordine, o anche forme parzialmente ramificate. La matrice mitocondriale, in accordo alla generale densità elettronica, che caratterizza l'intera cellula, appare assai opaca, mentre lo spazio all'interno delle creste e della doppia membrana circonferea è molto trasparente agli elettroni: per tale motivo i mitocondri delle cellule cigliate si differenziano da quelli delle più comuni cellule ghiandolari, con matrice trasparente, e ricordano invece quelli delle cellule dell'organo adesivo.

Perpendicolarmente alla superficie cellulare si osservano numerose radici di ciglia (Tav. III, fig. 9), assai lunghe e costituite da un insieme di sottili filamenti. In tali radici vi è un'alternanza di bande chiare e scure con un periodo di circa 600 Å ed in ciascuna di queste bande sono visibili delle sottobande (Tav. IV, fig. 11).

Le radici si inseriscono sul corpo basale formato dalla continuazione dei tubuli periferici che si approfondano nel citoplasma, circondati da un materiale opaco agli elettroni. Nel suo insieme il granulo basale mostra una morfologia identica a quella descritta da GIBBONS (1961) nelle cellule cigliate dell'Anodonta. In sezioni trasversali sono chiaramente visibili i nove gruppi di sottili filamenti che partono dal tratto iniziale del corpo basale del ciglio, formando una figura a stella (Tav. IV, fig. 14). Più in profondità, nella zona terminale, si nota anche il cosiddetto piede basale (Tav. IV, fig. 13).

Di più difficile interpretazione sono le formazioni di aspetto abbastanza irregolare e caratterizzate da una struttura a bande, che si dipartono dalla parte terminale del granulo basale. La striatura che le caratterizza sembra simile a quella della radice, ma un materiale molto denso agli elettroni, rende difficile una buona osservazione (Tav. IV, fig. 12).

La struttura delle ciglia è comune a quella che si può notare in qualsiasi altra cellula cigliata. Sono infatti presenti le nove coppie periferiche di sottili tubicini, e la coppia centrale (Tav. V, fig. 15).

È curioso osservare come all'apice delle ciglia il numero dei tubuli si riduce a metà, ed invece di un totale di dieci coppie (compresa quella centrale), si osservano solo dieci tubuli singoli (Tav. V, fig. 17). È possibile osservare anche immagini di transizione tra le due parti del ciglio con coppie di tubuli e con tubuli singoli (Tav. V, fig. 16). È bene evidenziabile in queste strutture cellulari la tipica costituzione a tre strati della membrana: due strati densi agli elettroni, che circondano uno strato chiaro, per uno spessore complessivo di circa 70-80 Å (Tav. V, fig. 18). Una membrana identica a quella che circonda le ciglia, è anche visibile sul margine libero delle cellule. Su di esso sono inoltre visibili numerosi microvilli corti e tozzi, il cui significato non appare sempre del tutto chiaro. In qualche caso si è potuto dimostrare che tali apparenti microvillosità sono in realtà sezioni di pieghe rilevate sulla superficie cellulare esterna, delimitanti delle aree poligonali, al centro di ciascuna delle quali emerge un ciglio (Tav. IV, fig. 13).

Esternamente alla membrana cellulare, a diretto contatto con essa, si osserva uno strato (di circa 1/10 di μ di spessore) di materiale molto lasso, che sembra costituito da sottili ed irregolari raggi disposti perpendicolarmente alla membrana stessa. È probabile che si tratti di materiale mucoso, secreto dalle circostanti cellule ghiandolari, ed uniformemente distribuito su tutta la superficie corporea dell'animale. Tuttavia l'aspetto di tale materiale varia a seconda della fissazione usata, e del materiale usato per l'inclusione.

La zona di citoplasma compresa tra il nucleo e la fascia apicale ricca di mitocondri, escludendo i numerosi inclusi lipidici e lipoproteici, appare molto ricca di elementi differenziati. Infatti oltre ad alcuni mitocondri, sono presenti numerosi elementi dell'endoplasmic reticulum, ribosomi liberi e associati a membrane, ed una zona di Golgi particolarmente evidente. L'aspetto generale è quindi quello di una cellula ad alta attività, e la presenza di numerose α -citomembrane fa presumere che essa sia capace di secrezione proteica. Secondo FAWCETT (1958) infatti, il cosiddetto « endoplasmic reticulum ruvido » sarebbe connesso con la sintesi di proteine emesse poi dalla cellula sotto forma di secreto, mentre le proteine da usarsi localmente, cioè per la produzione di protoplasma per la crescita o il mantenimento cellulare, verrebbero sintetizzate ad opera dei ribosomi liberi nel citoplasma.

L'apparato di Golgi, che come si è detto è assai sviluppato, potrebbe essere connesso con l'utilizzazione delle grandi quantità di materiale immagazzinate negli inclusi vitellini. Questo apparato risulta costituito dagli elementi tradizionali, e cioè da sistemi di membrane appaiate, e da numerose vescicole di varie dimensioni.

CELLULE GHIANDOLARI DELLO STRATO SUPERFICIALE.

Il corpo delle larve di *Rana* è praticamente rivestito da uno strato di tipiche cellule ghiandolari, a secrezione mucosa, strato che è interrotto unicamente dalle scarse cellule cigliate che sono state precedentemente descritte, dalle cellule del-

l'organo adesivo, nelle quali i processi secretori sono esaltati al massimo, e da altre poche cellule, che non sono state prese in esame in questo lavoro (Tav. I, fig. 1; Tav. II, fig. 3 e 5). Queste cellule appaiono molto trasparenti al microscopio elettronico e sono povere di elementi differenziati, come mitocondri e vescicole dell'endoplasmic reticulum. Il nucleo è posto in profondità nella cellula, è assai grande, di aspetto irregolare ed è circondato da una evidentissima doppia membrana, nella quale si osservano numerosi pori che mettono in comunicazione nucleoplasma e citoplasma.

Gli inclusi vitellini sono molto numerosi durante gli stadi embrionali precoci e vanno quindi gradatamente diminuendo risolvendosi in formazioni di vario aspetto. I mitocondri sono abbastanza numerosi, e sono distribuiti con una certa uniformità nel citoplasma: sono per lo più di grosse dimensioni, allungati o variamente polymorfi, con numerose creste, e con una matrice molto chiara, il che li differenzia da quelli delle cellule cigliate.

L'endoplasmic reticulum è scarsamente differenziato, ed anche i ribosomi liberi sono poco numerosi; molto evidente è invece l'apparato di Golgi, costituito da γ -citomembrane di particolare lunghezza, e numerose vescicole di varie dimensioni.

Numerosi desmosomi tengono unite queste cellule tra di loro, o con quelle dell'assisa inferiore; sono sempre presenti in vicinanza del margine libero della cellula, e su di essi confluiscono i sottili tonofilamenti di cheratina.

La struttura più caratteristica di queste cellule tuttavia è senz'altro rappresentata dalla serie di grossi vacuoli che costituiscono uno strato pressoché continuo immediatamente sotto il margine libero della cellula. Secondo HOLTFRETER (1946) questi vacuoli cominciano a comparire nell'embrione di Rana, quando iniziano i processi di degradazione del vitello, e rimangono, pur con qualche variazione strutturale, durante tutta la Vita larvale (Tav. I, fig. 1; Tav. III, fig. 8).

Nell'embrione, fin verso lo stadio 17, non sono molto grandi, e non costituiscono uno strato continuo sulla superficie cellulare: inoltre, non essendo a stretto contatto tra di loro, conservano una forma rotondeggiante. Analogo aspetto continuano a conservare in vicinanza dell'organo adesivo. In seguito il loro numero aumenta, ed anche le loro dimensioni si fanno maggiori, per cui acquistano, come conseguenza della pressione che esercitano l'uno con l'altro, un tipico aspetto prismatico. Tali vacuoli infatti risultano separati tra di loro da una sottile lamina di citoplasma, che può anche raggiungere lo spessore di poche centinaia di Å, mentre ancor più sottile risulta in genere lo strato citoplasmatico tra membrana superiore del vacuolo, e membrana cellulare esterna. Solamente la parte basale di detti vacuoli, potendosi spingere liberamente verso l'interno della cellula, appare rigonfiata, mentre nel loro complesso queste vescicole corticali costituiscono un insieme estremamente regolare, che può essere paragonato giustamente ad un nido d'ape.

All'interno dei vacuoli si osserva un materiale molto lasso, per lo più coagulato in modo irregolare ad opera dei fissatori usati, e come hanno fatto notare EAKIN e LEHMAN (1957) non tutti i vacuoli presentano un contenuto di medesimo aspetto, e soprattutto nella medesima quantità. Negli stadi più precoci di sviluppo, i vacuoli corticali, oltre ad essere più piccoli, presentano anche un contenuto più

denso, che nelle sezioni semifini per il microscopio ottico, si colora intensamente sia con il blu di Toluidina, sia con la Fucsina basica.

La membrana cellulare libera sulla superficie dell'animale mostra chiaramente la tipica struttura a tre strati di tutte le membrane plasmatiche: inoltre, in accordo con quanto è già stato osservato per altri tessuti, il suo spessore complessivo è di circa 120 Å (Tav. II, fig. 6 e 7) e si differenzia notevolmente da quella dei vacuoli sottostanti, il cui spessore si aggira intorno ai 70 Å (Tav. X, fig. 39).

La superficie cellulare esterna non è rettilinea, ma si presenta complicata da numerose sporgenze regolarmente disposte in corrispondenza dei punti in cui i vacuoli giungono in contatto tra di loro.

Una tale osservazione fa presumere che sulla superficie cellulare siano presenti delle pieghe continue, disposte secondo uno schema pressapoco esagonale che ripeterebbe il disegno, sempre esagonale, determinato dalle pareti dei vacuoli precedentemente descritti.

In queste cellule, nelle larve, non si osservano mai ciglia, tuttavia negli stadi embrionali più precoci, come già è stato detto, le ciglia sono presenti, anche se in numero non molto grande. Tuttavia la presenza di alcuni vacuoli sulla superficie cellulare, e lo spessore della membrana cellulare esterna di circa 120 Å, fanno riconoscere queste cellule, e permettono di distinguerle da quelle che formeranno invece le cellule cigliate definitive.

È talvolta possibile osservare una rottura della membrana cellulare esterna in corrispondenza di un vacuolo, la cui membrana a sua volta si rompe, per cui il contenuto del vacuolo stesso può essere espulso all'esterno della cellula. Sembra accertato che il processo di secrezione si svolge per progressiva rottura dello strato corticale di vacuoli, che poi verrebbero riformati in un periodo successivo. Questo comporterebbe quindi un processo ciclico di attività cellulare, e, come hanno indicato EAKIN e LEHMAN (1957), cellule adiacenti si troverebbero in fasi differenti del processo ciclico di secrezione. È presumibile altresì che il materiale fibrillare che riveste esternamente tutte le cellule, e che è stato descritto a proposito delle cellule cigliate, sia il medesimo materiale che viene riversato all'esterno, all'atto delle rotture dei vacuoli corticali: la sua funzione più probabile è quella di creare uno strato lubrificante, che agevoli i movimenti dell'embrione, e nello stesso tempo lo protegga.

Circa la natura chimica di tale materiale, EAKIN e LEHMAN parlano di una sostanza mucosale o liposale, non meglio definita, mentre SCHULZ e DE PAOLA (1958) nell'epitelio branchiale di Axolotl parlano di una sostanza PAS positiva, di tipo mucopolisaccaridico, che sarebbe tuttavia da collegare anche alla presenza di particolari citosomi, contenenti dei sistemi di membrane che essi battezzano con il termine di α -citomembrane.

MARINI (1960) studiando il margine libero delle cellule branchiali di *Triturus cristatus*, sia al microscopio ottico che all'elettronico, mette in evidenza un strato di vacuoli superficiali, identici praticamente a quelli che sono stati descritti a proposito delle cellule secretorie della pelle di larva di Rana. Tali vacuoli appaiono al microscopio ottico come granuli PAS positivi, e si può osservare anche che i piccoli granuli di identico aspetto sono presenti nella zona di citoplasma compresa

tra il nucleo e il margine cellulare. Secondo Marini si tratterebbe di una sostanza di natura mucoida, elaborata dalle cellule epiteliali, sotto forma di piccoli granuli che coalescendo formerebbero i più grossi vacuoli posti sotto la superficie cellulare.

Non si deve dimenticare a questo proposito che EAKIN e LEHMAN, a proposito delle modalità di formazione dei vacuoli corticali delle cellule epiteliali, pensavano possibile un intervento diretto dei mitocondri, non solo come sorgente di energia per i processi sintetici. È da tenere presente tuttavia che le tecniche impiegate da tali Autori non permettevano una corretta fissazione dei tessuti, e pertanto molte delle loro osservazioni vengono falsate in partenza.

È difficile allo stato attuale delle conoscenze indicare quali sono gli elementi cellulari implicati nella formazione dei vacuoli corticali. Escludendo ovviamente i mitocondri, la cui funzione è da ricercare solo nella necessità di sufficienti sorgenti di energia, sembra anche di dover escludere l'endoplasmic reticulum, in quanto non appare sufficientemente sviluppato per poter presiedere ad un processo di sintesi così intenso, quale sembra essere richiesto per la produzione di una così ingente quantità di materiale. L'unico sistema endocellulare molto sviluppato è costituito dall'apparato di Golgi. Esso è infatti sempre costituito da un discreto numero di γ -citomembrane, particolarmente lunghe, e con caratteristiche morfologiche tali da far pensare ad un intenso processo di gemmazione di microvescicole.

Sembra quindi che l'apparato di Golgi sia l'organulo più intensamente attivo in queste cellule, e pertanto viene spontaneo collegarlo alla produzione del materiale mucoido dei vacuoli corticali.

È doveroso tuttavia far presente che chiare immagini, attestanti il graduale processo di formazione di tali vacuoli, ad opera di una fusione di vescicole dell'apparato di Golgi, non ne sono mai state osservate, per cui il problema risulta ancora aperto.

In prossimità del margine libero delle cellule, al limite tra due cellule adiacenti, siano esse entrambe di tipo ghiandolare, ovvero una ghiandolare e l'altra cigliata, è chiaramente visibile il particolare complesso di giunzione caratterizzato dalla fusione dei due strati esterni della membrana, studiato da SJÖSTRAND (1962) e da FARQUHAR e PALADE (1964) e chiamato da questi ultimi Autori «*zonula occludens*» (Tav. II, fig. 7). Le osservazioni sperimentali di FARQUHAR e PALADE indicano che detta zona deve essere considerata il luogo di massima opposizione alla diffusione lungo gli spazi intercellulari. Nel caso particolare della pelle delle larve di Rana, la funzione della zonula occludens è verosimilmente quella di contribuire al mantenimento di un dislivello di pressione osmotica impedendo la possibilità di scambi con l'esterno attraverso gli spazi intercellulari.

CELLULE DELL'ORGANO ADESIVO.

L'organo adesivo della Rana è una formazione pari, che si trova nella parte ventrale dell'animale, dietro l'apertura boccale. Esso comincia a formarsi verso gli stadi 14-15 (secondo RUGH) e permane pressappoco fino allo stadio 25. La sua

funzione è di secernere un materiale coloso mucoso-proteico, che ha lo scopo di fare aderire la larva ad eventuali punti di appoggio.

Si tratta di differenziazioni dell'epidermide che si riferiscono essenzialmente alle cellule dell'assisa superiore. Le cellule basali infatti non appaiono gran che modificate rispetto agli altri distretti del corpo; sono solo lievemente più spesse e di forma decisamente cubica (Tav. VIII, fig. 30; Tav. IX, fig. 33).

Molto alterate sono invece le cellule dello strato superiore che nel corso del loro differenziamento vanno acquistando una forma cilindrica estremamente allungata: queste cellule infatti possono superare i 50μ di lunghezza (Tav. VIII, fig. 29 e 30; Tav. IX, fig. 34).

Nel suo insieme ciascun organo adesivo risulta come un ispessimento dell'epitelio di rivestimento della larva.

Fin verso lo stadio 17 le cellule dell'organo adesivo non sono particolarmente differenziate e non hanno ancora sviluppato tutti gli organuli caratteristici che compaiono in seguito. Esse non sono ancora allungate, e rimangono avvolte da cellule per lo più cigliate, che delimitano una specie di cavità piriforme, il cui fondo è costituito appunto dall'apice delle cellule ghiandolari (Tav. VI, fig. 19-20 e 29; Tav. VII, fig. 23).

In tale periodo la morfologia di queste cellule è differente da quella che esse avranno al completamento del loro sviluppo, e ciò anche a prescindere dalla loro forma (che, come è stato detto, non è ancora cilindrica) e dall'altissimo numero di inclusi vitellini.

L'ergastoplasma è alquanto sviluppato, e si osserva nelle parte intermedia della cellula, frammisto a corpi di Golgi di ridotte dimensioni (Tav. VI, fig. 21). In rapporto ad essi si osservano granuli di secreto, che si accumulano conformemente a quanto avviene per le cellule che hanno completato il loro sviluppo, nella zona apicale (Tav. VII, fig. 24 e 27). Tali granuli tuttavia differiscono da quelli delle cellule che hanno completato il loro differenziamento, sia per la più bassa densità elettronica, sia per le maggiori dimensioni, e la forma prossima in genere a quella sferica. È evidente quindi che in queste cellule esiste già una certa attività secretoria. Inoltre nella parte apicale della cellula, frammisti a granuli di secreto, sono visibili numerosi corpi multivescicolari, di forma irregolare, di dimensioni variabili, ma sempre caratterizzati da un notevole numero di vescicole (Tav. VII, fig. 24 e 28).

È difficile stabilire il significato di tali formazioni, che sono state osservate nei più disparati tipi di cellule. Sembra che la loro presenza possa essere associata tuttavia ad un particolare meccanismo di segregazione di proteine (POLICARD 1963).

La membrana cellulare sul margine libero è del primo tipo di Farquhar e Palade, cioè con uno spessore complessivo di 120 \AA circa (Tav. VII, fig. 25 e 26). È inoltre ben visibile la *zonula occludens* (Tav. VII, fig. 26) tra due cellule adiacenti.

Le cellule dell'organo adesivo raggiungono il loro completo differenziamento tra lo stadio 19 e 20. Esse sono a contatto tra di loro soltanto per brevi tratti, mentre risultano praticamente circondate da ampie e irregolari lacune, nelle quali si proiettano villi di forma varia (Tav. IX, fig. 33 e 34). Solamente nella parte

apicale le cellule presentano delle ampie superfici di reciproco contatto, e soltanto in tale zona è possibile osservare la presenza di desmosomi.

Il significato delle lacune intercellulari è ovviamente da attribuire alle medesime cause che sono già state ricordate per le altre cellule dell'epidermide, e che in questo caso risultano ovviamente esaltate in considerazione delle dimensioni particolarmente grandi.

Per semplicità di descrizione è opportuno suddividere le cellule in tre zone diverse:

- una zona basale — contenente il nucleo;
- una zona intermedia — essenzialmente caratterizzata da un ricchissimo ergastoplasma e da un enorme apparato di Golgi;
- una zona apicale — nella quale si accumulano i granuli di secreto.

ZONA BASALE.

Oltre al nucleo, che non presenta particolarità morfologiche degne di rilievo, sono presenti in tale zona numerosissimi inclusi vitellini, che possono presentare un processo di degradazione del tutto particolare.

I globuli vitellini mostrano di frequente delle strette relazioni topografiche con i granuli di pigmento che sono particolarmente abbondanti nelle cellule dell'organo adesivo (Tav. VIII, fig. 30; Tav. IX, fig. 35).

Molto spesso si vedono degli inclusi composti e polimorfi formati da residui vitellini e da numerose lamine lipoproteiche variamente orientate, da questi derivate, frammisti con granuli di pigmento (Tav. IX, fig. 35).

FLICKINGER (1960) ha messo in evidenza come il processo di solubilizzazione della lipovitellina dei globuli vitellini sia legato all'azione di un particolare enzima, la fosfoproteinofatasi, che è presente in gran quantità nella frazione contenente i granuli di pigmento: per questo sembra giustificata la presenza di questi granuli in contatto con gli inclusi vitellini.

Gradatamente i globuli vitellini perdono la loro struttura cristallina e si trasformano in corpi rotondeggianti con una matrice granulare o filamentosa molto lassa e frequentemente con dei sistemi laminari lipoproteici per lo più concentrici. Si vengono cioè a formare dei citosomi lamellari simili a quelli descritti da SCHULZ e DE PAOLA (1958) in cellule a secrezione mucoide e considerate da tali Autori come elementi strettamente connessi con tale tipo di secrezione.

Nel nostro caso è certo che si tratti di fasi di degradazione dei globuli vitellini poiché sono facilmente osservabili tutti gli stadi di passaggio; non è possibile tuttavia negare una qualche loro relazione con la sintesi dei granuli di secreto.

Purtroppo trattandosi di cellule a vita molto breve non è possibile controllare le modalità del processo secretivo dopo la scomparsa di tutti gli inclusi vitellini, poiché negli stadi di sviluppo, nei quali il vitello è completamente digerito nell'epidermide, l'organo adesivo è in fase di regressione.

ZONA INTERMEDIA.

In questa zona delle cellule oltre a inclusi vitellini in varie tappe del loro processo di degradazione, sebbene in numero minore rispetto alla zona basale, è evidentissimo in primo luogo un complicato ergastoplasma costituito di α -citomembrane di grande lunghezza e parallele tra di loro, disposte in modo diverso in diverse cellule o in diverse zone della medesima cellula. Esse possono infatti apparire rettilinee e dirette secondo l'asse maggiore della cellula ovvero ripiegate variamente a costituire dei sistemi sinuosi sempre molto ordinati (Tav. VIII, fig. 31; Tav. IX, fig. 34).

Lungo le pareti esterne di queste α -citomembrane, sono visibili numerosi ribosomi, mentre altri ribosomi sono liberi nel citoplasma.

In accordo a numerose osservazioni effettuate in diversi tipi cellulari, i ribosomi appaiono anche in questo caso sempre disposti in serie ordinate di 5-10 elementi circa, vicini tra di loro e con ordinamento spirale (Tav. VIII, fig. 32). Sembra così che essi si trovino in aggregati di tipo polisomico, e quindi in fase di attività sintetica (RICH e coll. 1963).

Si osservano pure numerosi mitocondri per lo più assai lunghi con matrice opaca e numerose creste disposte ordinatamente in senso trasversale; all'interno delle creste di alcuni mitocondri sono visibili dei cristalli prismatici od esagonali di vitello (LANZAVECCHIA 1964).

In queste cellule l'apparato di Golgi raggiunge delle dimensioni eccezionali. In sezioni condotte parallelamente all'asse maggiore, i corpi di Golgi si trovano alternativamente su un lato e sull'altro della cellula, il che, unito ad osservazioni di sezioni condotte obliquamente o trasversalmente all'asse maggiore delle cellule, fa presumere che ci si trovi in presenza di un unico grande apparato di Golgi ad andamento elicoidale.

Nelle zone di Golgi i ribosomi e i mitocondri sono molto scarsi; sono invece presenti delle granulazioni caratteristiche, che possono essere considerate come elementi precursori dei granuli di secreto (Tav. VIII, fig. 31). Eakin, studiando le variazioni morfologiche nel corso dello sviluppo dell'organo adesivo di *Hyla regilla*, ha messo in evidenza la formazione dei granuli di secreto nella zona di Golgi. I granuli, secondo tale Autore, si formerebbero verso la parte più basale della cellula, immediatamente sopra il nucleo, per coalescenza delle microvescicole, prodotte per gemmazione all'estremità delle γ -citomembrane; inoltre durante le prime fasi della loro formazione, i granuli di secreto non sarebbero completamente circondati da una membrana, e attraverso delle aperture i ribosomi penetrerebbero in essi (Tav. X, fig. 38; Tav. VIII, fig. 31).

Le immagini che sono state da noi ottenute confermano in linea di massima le osservazioni di Eakin. In effetti nelle diverse zone di Golgi è possibile osservare delle serie abbastanza ordinate di granuli in diversi stadi della loro formazione. In vicinanza, all'estremità delle membrane di Golgi, si vedono con frequenza dei granuli di forma estremamente irregolare, ed a contenuto molto lasso, mentre altri granuli mostrano una forma sempre più prossima a quella dei granuli completa-

mente formati ed a contenuto gradatamente più compatto. Inoltre sulla superficie di questi granuli, in fase di maturazione, si osservano numerose microvescicole, alcune delle quali parzialmente fuse con la membrana di essi. Non è possibile invece confermare la penetrazione dei ribosomi all'interno dei granuli di secreto. In primo luogo, come si è detto in precedenza, nella zona di Golgi, i ribosomi sono particolarmente scarsi; ed inoltre le loro dimensioni (150 Å) sono molto maggiori rispetto a quelle degli elementi puntiformi che costituiscono il materiale dei granuli di secreto (dimensioni inferiori a 50 Å).

In più è possibile mettere in evidenza una relazione di tipo dinamico tra l'ergastoplasma e l'apparato di Golgi, oltre che tra quest'ultimo e i granuli di secreto.

Queste osservazioni concordano pienamente con quelle condotte da NOVIKOFF (1960), il quale appunto ha messo in evidenza, con tecniche istochimiche al microscopio elettronico una continuità dinamica tra l'endoplasmic reticulum, l'apparato di Golgi, e le microvescicole da questo prodotte. Conclusioni analoghe sono state raggiunte anche da GHIARA (1962) e da CARO e PALADE (1964), in questo ultimo caso con tecniche autoradiografiche sull'ultrastruttura.

In vicinanza della zona di Golgi, l'estremità delle α -citomembrane appare di frequente rigonfiata a clava, e sulle pareti esterne di questo rigonfiamento terminale non sono più visibili ribosomi (Tav. VIII, fig. 31). Vescicole di medesimo aspetto, ma isolate dalle membrane dell'ergastoplasma, sono anche visibili, soprattutto a ridosso dell'apparato di Golgi.

Sembra in altri termini che le α -citomembrane, nel cui interno vengono scaricati i prodotti di sintesi proteica, alle loro estremità producano per gemmazione delle vescicole. Queste si porterebbero verso l'apparato di Golgi e fondendosi con una estremità delle γ -citomembrane scaricherebbero in esse il loro contenuto. Nelle citomembrane di Golgi il materiale verrebbe elaborato e trasformato opportunamente per essere poi condensato nei granuli di secreto. Le numerose microvescicole prodotte per gemmazione delle γ -citomembrane, fondendosi insieme, formano i primi abbozzi dei granuli di secreto; su di questi si portano nuove microvescicole che scaricano in essi il loro contenuto, rendendoli via via più grandi.

La morfologia dei granuli di secreto, nel corso della loro maturazione, è già stata indicata in precedenza; solo in vicinanza o all'interno delle numerose zone di Golgi si possono vedere questi stadi di formazione dei granuli (Tav. X, fig. 38), man mano che si sale verso l'alto della cellula invece, mentre le zone di Golgi si fanno meno frequenti, il contenuto dei granuli di secreto si fa sempre più denso, e il loro aspetto più regolare (Tav. VII, fig. 24 e 28). Finalmente nella zona apicale essi hanno compiuto perfettamente il loro ciclo di maturazione (Tav. VII, fig. 27; Tav. X, fig. 36).

ZONA APICALE.

La zona apicale delle cellule non presenta particolari organuli, ma è praticamente infarcita di granuli di secreto (Tav. VII, fig. 23 e 24; Tav. IX, fig. 40). Questi hanno un aspetto generalmente ovale, un contenuto granuloso molto compatto,

ed una membrana lievemente frastagliata. Il meccanismo mediante il quale i granuli di secreto vengono emessi all'esterno non è chiaro. L'ipotesi sostenuta da Eakin, secondo la quale i granuli verrebbero espulsi attraverso soluzioni di continuo della membrana cellulare, sembra essere la più probabile.

Il margine cellulare esterno delle cellule completamente sviluppate presenta numerosi microvilli non molto lunghi (Tav. VII, fig. 24; Tav. X, fig. 36; Tav. XI, fig. 41 e 42). La membrana cellulare mostra la tipica struttura a tre strati con uno spessore complessivo di circa 80 Å (Tav. X, fig. 37; Tav. XI, fig. 41 e 42).

Tale membrana si costituisce solo quando le cellule hanno raggiunto il loro completo differenziamento morfologico, mentre fino allo stadio 17-18 la membrana cellulare esterna delle cellule dell'organo adesivo ha uno spessore di circa 120 Å (Tav. X, fig. 36 e 39).

Non ci è stato tuttavia possibile cogliere immagini attestanti un tale processo di trasformazione della membrana cellulare e non è neppure possibile per il momento tentare di interpretare il significato della trasformazione che è stata descritta. Le attuali conoscenze sui due tipi di membrane cellulari non permettono infatti di attribuire ancora un significato funzionale a ciascuno di essi.

È anche curiosa l'osservazione sul diverso modo di apparire delle membrane, in conseguenza del diverso mezzo di inclusione. Secondo SJÖSTRAND (1962), nel pancreas dove esistono solo membrane del secondo tipo di FARQUHAR e PALADE (1964), cioè di tipo più sottile, solo l'inclusione in Vestopal permette una buona conservazione della struttura a tre strati, sia con fissazione osmica, che con permanganato di potassio, mentre con l'inclusione in metacrilato non sarebbe possibile ottenere una risoluzione dei tre strati. Questi ultimi appaiono invece visibili solo dopo fissazione con permanganato quando l'inclusione è fatta in Araldite. Anche nella *zonula occludens*, sempre secondo SJÖSTRAND (1962) sarebbero visibili i cinque strati solo dopo inclusione in Vestopal e non in Araldite. Per quanto riguarda la membrana cellulare del secondo tipo, dopo inclusioni con metacrilato, è in realtà molto difficile risolvere la struttura a tre strati, ma in qualche caso essa è stata osservata in maniera perfetta (ad esempio nelle ciglia, vedi fig. 37), mentre appare facilmente visibile dopo inclusione in Araldite, e fissazione sia in acido osmico che in glutaraldeide, seguita da acido osmico (Tav. II, fig. 7; Tav. X, fig. 37 e 38; Tav. XI, fig. 41 e 42).

La *zonula occludens* è ben visibile sia quando le cellule sono completamente differenziate, sia prima del loro completo differenziamento (Tav. VII, fig. 25 e 26; Tav. XI, fig. 43). Essa appare con estrema facilità sia dopo inclusioni in metacrilato che in Araldite, soprattutto in quest'ultimo caso: del resto FARQUHAR e PALADE (1964) avevano già messo in evidenza come l'inclusione in Araldite preceduta da semplice fissazione osmica, permettesse una perfetta risoluzione dei tre strati della membrana cellulare anche del secondo tipo, e dei cinque strati della *zonula occludens*.

La membrana cellulare del primo tipo, cioè di spessore compreso tra 110 e 120 Å, può essere risolta senza alcuna difficoltà anche dopo inclusioni in metacrilato (Tav. VII, fig. 25 e 26): quest'ultimo mezzo di inclusione permette quindi di ricono-

scere immediatamente, e senza dover ricorrere a particolari misurazioni accurate, i due tipi di membrane, in quanto in condizioni normali di osservazione, senza ricorrere a particolari accorgimenti tecnici per diminuire la sublimazione della resina e la conseguente distorsione delle più fini strutture, solamente la membrana del primo tipo appare agevolmente risolta nei suoi tre strati, mentre quella del secondo tipo risulta costituita da un'unica linea opaca.

Gruppo di ricerca del C.N.R. per l'Embriologia: Milano - Istituto di Zoologia dell'Università (Sezione di Microscopia elettronica « Fondazione Carlo Erba »).

BIBLIOGRAFIA

- BRIGHTMAN M. W. and PALAY S. L.: The fine structure of Ependyma in the brain of the rat, *J. Cell Biology*, **19**, 415, 1963.
- CAMERON J. A.: The bodies of Eberth as a source of connective tissue ground substance in *Rana catesbeiana*, *J. Morphol.*, **69**, 279, 1936.
- CARO G. and PALADE E.: Protein synthesis, storage and discharge in the pancreatic exocin cell, *J. Cell Biology*, **20**, 473, 1964.
- CHAPMAN G. B. and DAWSON A. B.: The ultrastructure of the larval Anuran epidermis with special references to the figures of Eberth, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **10**, 425, 1961.
- DROCHMANS P.: Mise en évidence du glycogène dans la cellule hépatique par microscopie électro-nique, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **3**, 553, 1960.
- EAKIN R. M. and LEHMAN P. E.: An electromicroscopic study of developing Amphibian ectoderm, *Wilhelm Roux' Arch. Entwicklungsmech. Organ.*, **150**, 177, 1957.
- EAKIN R. M.: Ultrastructural differentiation of the Oral Sucker in the Treefrog, *Hyla regilla*, *Develop. Biol.*, **7**, 169, 1963.
- EREKTH G. J.: Zur Entwicklung der Gewebe in Schwanz der Froschlurven, *Arch. F. mikro. Anat.*, **2**, 490, 1866.
- FARQUHAR M. G. and PALADE G. E.: Functional organization of Amphibian skin, *Proc. Nat. Acad. Sc.*, **51**, 569, 1964.
- FAWCETT D. W.: Observations on the fine structure of the turtle atrium, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **4**, 63, 1958.
- FAWCETT D. W.: Cilia and flagella, in J. Brachet and A. E. Mirsky Ed., *The Cell*, vol. 2, pag. 217 (Academic Press, New York 1961).
- FLICKINGER R.: Formation, biochemical composition and utilization of Amphibian egg Yolk, *Sympos. on Germ Cells and Develop.*, **28**, 1960.
- GHISARA G. F.: Aspetti strutturali e funzionali delle formazioni basofile del citoplasma, *Boll. Zool.*, **29**, 217, 1962.
- GIBBONS I. R.: The relationship between the fine structure and direction of beat in Gill cilia of Lamellibranch Mollusc, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **11**, 179, 1961.
- LANZAVACCHIA G.: Problemi sull'origine dei mitocondri, in «From molecule to cell», Symposium on Electron Microscopy, Modena, April 1963, Edited by Paolo Buffa, Roma, C.N.R., 1964.
- HOLTREITER J.: Experiments on the formed inclusions of the Amphibian egg, *J. Exp. Zool.*, **103**, 81, 1946.
- KARASAKY S.: Electron microscopic studies on cytoplasmic structures of ectoderm cells of the Triturus embryo during the early phase of differentiation, *Embriologia*, **4**, 247, 1959.
- KARNOVSKY M. J.: Simple methods for staining with Lead at high pH in Electron Microscopy, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **10**, 425, 1961.
- MARINI M.: Prime osservazioni sull'ultrastruttura dell'epitelio branchiale in larve di Anfibii Urodeli, *Rendiconti di scienze fisiche, matematiche e naturali*, XXIX, fasc. 5, 1960.
- MILLONIG G.: Further observations on a phosphate buffer for osmium solutions in fixation, V Intern. Congress for Electron Micr., Philadelphia, 1962, Academic Press, New York, vol. 2, 8.
- MOORE R. D., MUMAW V. and SCHOENBERG M. D.: Optical microscopy of ultrathin tissue sections, *J. Ultrastruct. Research*, **4**, 113, 1960.
- NOVIKOFF A. B.: The liver cell. Some new approaches to its study, *Am. J. Med.*, **29**, 102, 1960.
- ORZALESI N. and BAIKATI A.: Filamentous structures in the inner segment of human retinal rods, *J. Cell Biology*, **20**, 599, 1964.
- POLICARD A., COLLET A., MARTIN C., FREGEMAIN S. et RENET C.: *Nouv. Revue Franç. d'Hémathologie*, **3**, 421, 1962.

- REYNOLDS E.: The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in Electron Microscopy, *J. Cell Biology*, **17**, 208, 1963.
- RICH A., WARNER J. R. and GOODMAN H. M.: The structure and function of polyribosomes, Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, **28**, 269, 1963.
- RUDNEFF A.: Ueber die epidermoidale Schicht der Froschant, *Arch. f. mikro. Anat.*, **1**, 295, 1865.
- RUGH R.: *Experimental Embriology*, Burgess Publ. Comp., Minneapolis, 1948.
- SARATINI D., BENSCH K. and BARNETT R. J.: Cytochemistry and electron microscopy. The preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation, *J. Cell Biology*, **17**, 19, 1963.
- SAGUCHI S.: Ueber Mitochondrien und Mitochondrial Stränge inden Epidermizellen' der Anuren larven nebst Bemerkungen über die frage der Epidermis, *Arch. f. mikro. Anat. Ed., LXXXIII*, **83**, 177, 1913.
- SJÖSTRAND F. S. and ELFVIN L. G.: The layered, asymmetric structure of the Plasma Membrane in the exocrine Pancreas cells of the Cat, *J. Ultrastruct. Research*, **7**, 594, 1962.
- SCHULZ H. und DE PAOLA D.: Delta-cytomembranen und lamelläre Cytosomen ultrastruktur, histochemie und ihre beziehungen ur Schleimsekretion, *Zellforsch. u. mikro. Anat.*, **49**, 125, 1958.
- TRUMP B. P., SMUCKLER E. A. and BENDITT E. P.: A method for staining Epoxy sections for light Microscopy, *J. Ultrastruct. Research*, **5**, 343, 1961.
- WATSON M. L.: Staining of tissue sections for Electron Microscopy with heavy metals, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **4**, 475, 1958.
- WEISS P. and FERRIS W.: Electron microscopic study of the texture of the basement membrane of larval Amphibian skin, *Proc. Nat. Acad. Sc.*, **40**, 528, 1954.
- WEED I. G.: Cytological study of the epidermis of *Rana pipiens* and *Rana clamitans* tadpoles, with special references to the figures of Eberth, *J. Morphol.*, **36**, 213, 1934.

TAVOLE

Fig. 1: Epidermide di embrione di Rana (st. 20): è ben visibile il sistema di cellule triangolari in duplice fila e ingranate tra di loro. ($\times 3.000$). - Fig. 2: Particolare delle cellule basali (st. 22). Il citoplasma è ricco di α -citomembrane, mitocondri e fasci di tonofilamenti variamente orientati. Grossi fasci di questi filamenti costituiscono i corpi di Eberth. Sotto il margine cellulare è visibile la lamella basale, costituita da serie alterne di fibrille collagene. Inclusione in metacrilato. ($\times 29.000$).

M. CAMATINI e G. LANZAVECCHIA - Osservazioni sull'anatomia dell'epidermide in embrioni e larve di *Rana esculenta* L.

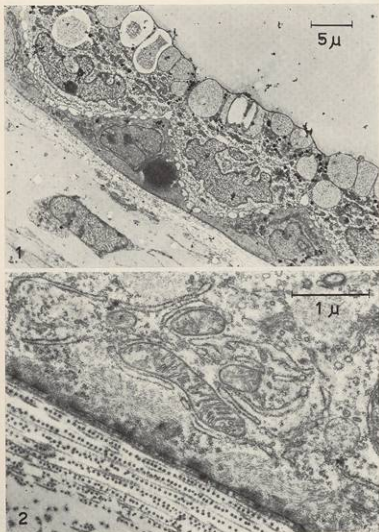
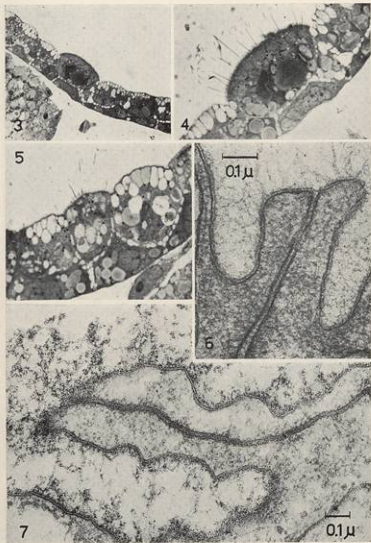


Fig. 3: Sezione semifine di epidermide (embrione st. 25): al centro, tra le cellule ghiandolari dello strato esterno, è ben visibile una cellula cigliata. ($\times 520$). Inclusioni in metacrilato. - Fig. 4: (Particolare della fig. 3). Cellula cigliata al microscopio ottico. ($\times 1.400$). - Fig. 5: Sezione semifine di epidermide (embrione st. 26): è ben visibile lo strato di vacuoli superficiali delle cellule ghiandolari, e l'architettura generale delle cellule. ($\times 1.400$). - Fig. 6: Unione tra due cellule ghiandolari: è ben visibile la membrana cellulare a tre strati, con spessore complessivo di 120 Å, mentre la « zonula occludens » non appare risolta. Inclusioni in metacrilato. ($\times 120.000$). - Fig. 7: Zona di unione tra due cellule ghiandolari. È ben visibile la membrana a tre strati (120 Å di spessore complessivo) e una lunga « zonula occludens ». Inclusioni in Araldite. ($\times 92.000$).

M. CARATTI e G. LASENECCHIA - Osservazioni sull'ultrastruttura dell'epidermide in embrioni e larve di *Rana esculenta* L.



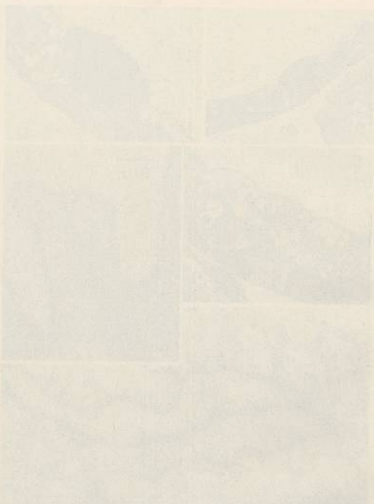


Fig. 8: (Embrione st. 22). A sinistra cellule ghiandolari con la serie di vacuoli superficiali. Sulla destra è visibile una cellula cigliata. Inclusione in metacrilato. ($\times 3.100$). - Fig. 9: (Embrione st. 22). Zona di unione tra una cellula ghiandolare ed una cigliata. In quest'ultima sono visibili dei granuli basali e una lunga radice di un ciglio. Inclusione in metacrilato. ($\times 10.000$). - Fig. 10: (Embrione st. 22). Margine di una cellula cigliata. I mitocondri occupano la zona di citoplasma posta immediatamente sotto i granuli basali delle ciglia, e sono molto vicini gli uni agli altri. Inclusione in metacrilato. ($\times 12.000$).

M. CAMATINI e G. LANZACCHIELLA - Osserezioni sull'ultrastruttura dell'epidermide in embrioni e larve di *Rana esculenta* L.

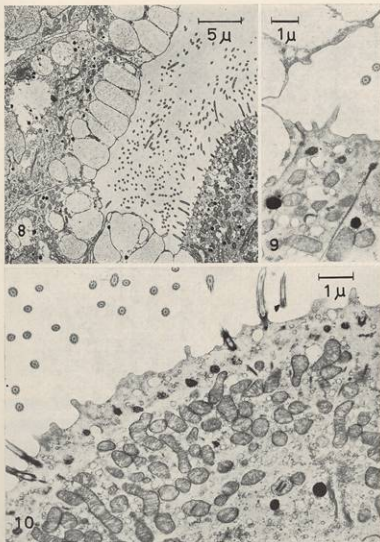




Fig. 11: (Embrione st. 22). Radice di ciglio: evidente la struttura a più filamenti sottili e l'alternanza di bande chiare e scure con periodo di 600 Å. Inclusione in metacrilato. ($\times 92.000$). - Fig. 12: (Embrione st. 22). Formazioni non ben identificate che si dipartono dal granulo basale. La struttura sembra simile a quella della radice. Inclusione in metacrilato ($\times 92.000$). - Fig. 13: (Embrione st. 22). Sezione quasi tangenziale alla superficie di una cellula cigliata. È evidente un sistema di pieghe citoplasmatiche che delimitano delle zone, al centro delle quali emerge un ciglio. Inclusione in metacrilato. ($\times 13.000$). - Fig. 14: Particolare della fig. 13. I grandi basali, sezionati quasi trasversalmente, mostrano il sistema di filamenti che si irradiano (\uparrow), e il piede basale (\uparrow). ($\times 39.000$).

M. CAMARINI e G. LANZAVUCCIA - Osservazioni sull'ultrastruttura dell'epidermide in embrioni e larve di *Rana occulta* L.

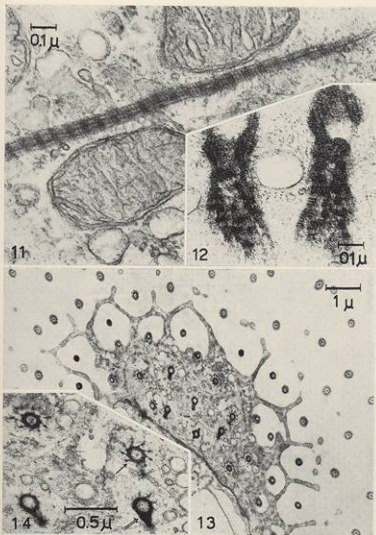
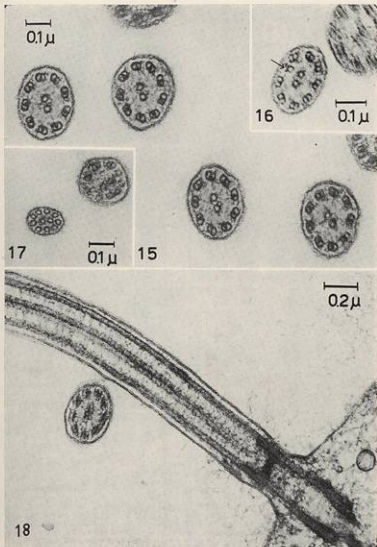


Fig. 15 : (Embrione st. 22). Sezione trasversale di ciglia condotta nella zona intermedia : sono visibili le nove coppie di tubuli periferici e quella centrale. Inclusione in metacrilato ($\times 92.000$). - Fig. 16 : Sezione trasversale di ciglio condotta in una zona prossima a quella terminale. Nel punto indicato dalla freccia, invece di una coppia di tubuli, se ne nota uno solo. Inclusione in metacrilato. ($\times 115.000$). - Fig. 17 : Sezione condotta nella parte terminale del ciglio ; le nove coppie si sono risolte in nove singoli tubuli, mentre resta inalterata la coppia centrale. Inclusione in metacrilato. ($\times 92.000$). - Fig. 18 : (Embrione st. 17). Sezione longitudinale di ciglio ; è chiaramente visibile la struttura a tre strati della membrana che si continua con quella cellulare ed il sistema dei tubuli interni. Inclusione in metacrilato. ($\times 62.900$).

M. CARMESI e G. LANZAVUCCA - Osservazioni sull'ultrastruttura dell'epidermide in embrioni e larve di *Rana esculenta* L.



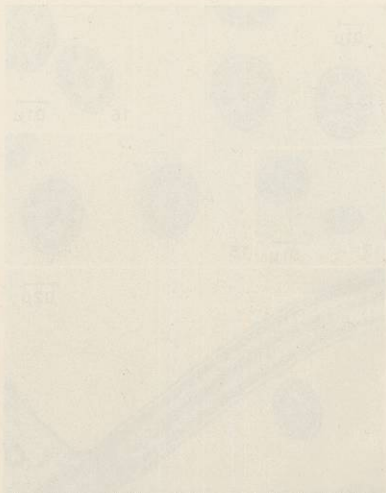
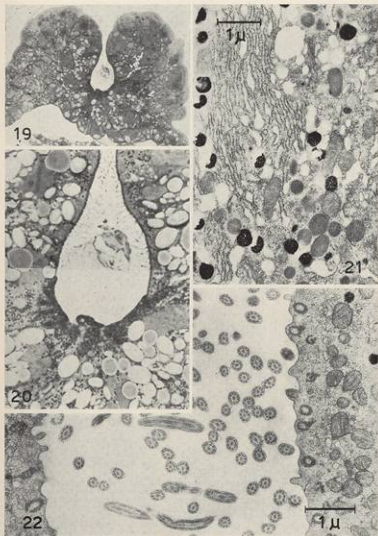


Fig. 19: (Embrione st. 17). Sezione semifine di organo adesivo. Microfotografia al microscopio ottico. - Fig. 20: Particolare ingrandito della foto precedente, in cui si osservano cellule cigliate che tappezzano una cavità piriforme, la cui base è invece costituita da cellule ghiandolari. ($\times 1,400$). - Fig. 21: Particolare di cellula dell'organo adesivo non completamente differenziata (St. 19): si osserva un ergastoplasma sviluppato, frammisto a corpi di Golgi di dimensioni ridotte. ($\times 16,000$). Iniezione in metacrilato. - Fig. 22: (Embrione st. 19). Sezione condotta verso l'apice della cavità piriforme, delimitata da cellule cigliate, visibili su entrambi i lati. Iniezione in metacrilato. ($\times 18,000$).



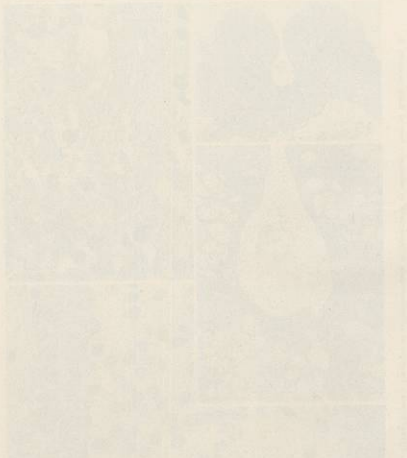


Fig. 23: (Embrione st. 17). Cellule dell'organo adesivo non ancora completamente differenziate dal punto di vista morfologico che funzionale: esse non sono allungate e appaiono evidenti cellule cigliate che delimitano una cavità piriforme, la cui base è costituita dall'apice delle cellule ghiandolari. Iniezione in metacrilato ($\times 3.500$). - Fig. 24: (Embrione st. 17). Particolare di zona apicale di cellula ghiandolare dell'organo adesivo: chiaramente visibili numerosi granuli di secreto ed alcuni corpi multivescicolari. Iniezione in metacrilato ($\times 16.000$). - Fig. 25-26: (Embrione st. 17). «Zonula occludens» al limite tra due cellule: bene risolta la membrana esterna a tre strati e i cinque strati nella parte in contatto tra le due cellule affiancate. Iniezione in metacrilato. ($\times 134.000$). - Fig. 27: (Embrione st. 17). Zona apicale di cellula ghiandolare dell'organo adesivo. Iniezione in metacrilato. ($\times 16.000$). - Fig. 28: Particolare della fig. 24: granuli di secreto e al centro un corpo multivescicolare. Iniezione in metacrilato. ($\times 41.000$).

M. CAMATSI e G. LANAVECCHIA - Osservazioni sull'ultrastruttura dell'epidermide in embrioni e larve di *Rana esculenta* L.

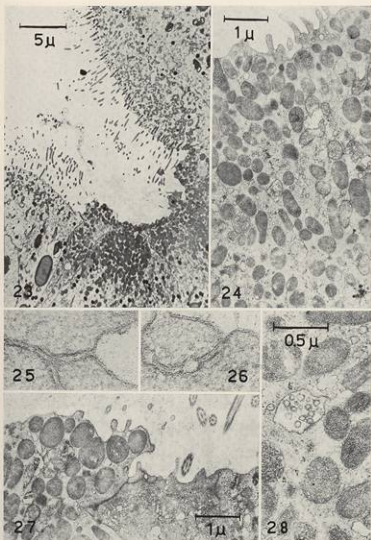
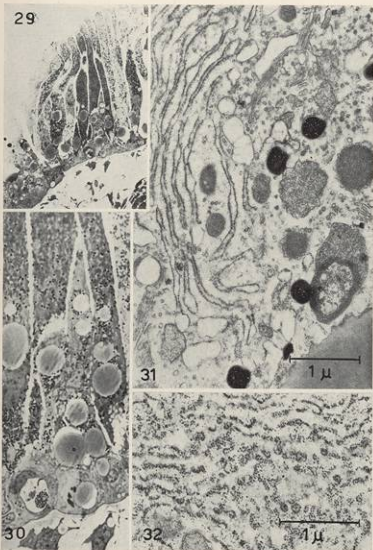


Fig. 29: (Embrione st. 23). Sezione dell'organo adesivo in stadio di completo sviluppo. Fotografia al microscopio ottico. Iniezione in metacrilato. ($\times 420$). - Fig. 30: (Embrione st. 23). Particolare ingrandito della zona basale della foto precedente. Si osservano delle grosse gocce lipidiche, e numerosi granuli di pigmento. Iniezione in metacrilato. ($\times 1.400$). - Fig. 31: (Embrione st. 21). Particolare di cellula dell'organo adesivo completamente differenziata: ergastoplasma molto sviluppato, apparato di Golgi con numerose microvescicole di secreto, granuli di secreto in varie fasi di formazione. L'estremità di alcune α -citomembrane produce per gemmazione delle grosse vescicole, che si portano verso l'apparato di Golgi. Iniezione in metacrilato. ($\times 26.000$). - Fig. 32: (Embrione st. 21). Ribosomi disposti in serie ordinata di 5-10 elementi vicini e con andamento spirale: si tratta presumibilmente di polisomi. Iniezione in Araldite. ($\times 30.000$).

M. CAMATINI e G. JANZAVEDDIA - Osservazioni sull'ultrastruttura dell'*Epidermide* in embrioni e larve di *Bombus esule* L.



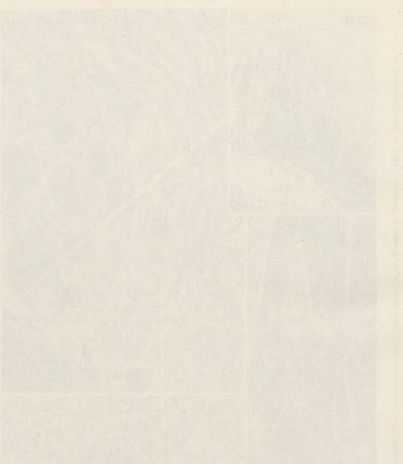
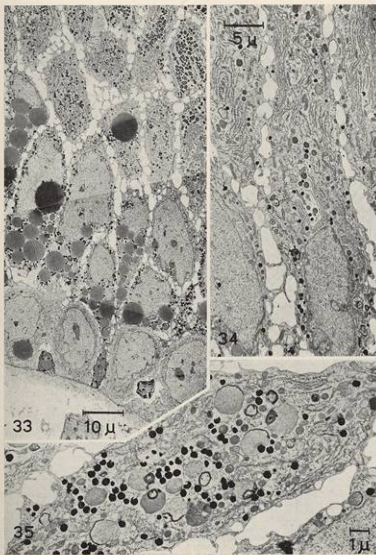


Fig. 33: (Embrione st. 22). Particolare dell'organo adesivo sezionato obliquamente. In basso si notano alcune cellule basali cubiche, con un grande nucleo, quindi si vede una serie di nuclei delle cellule ghiandolari, circondati da un citoplasma molto ricco di inclusi lipidici. Nella parte alta della figura si vedono cellule tagliate nella loro parte intermedia, con uno sviluppato ergastoplasma, e numerosi granuli di secreto. Inclusioni in metacrilato. ($\times 1.400$). - Fig. 34: (Embrione st. 22). Zona intermedia di cellule dell'organo adesivo. Esse appaiono separate da ampie lacune, in cui si proiettano microvilli di forma varia. Il citoplasma appare caratterizzato da uno sviluppato ergastoplasma, alcuni corpi di Golgi, mitocondri ed inclusi vari. Inclusioni in metacrilato. ($\times 2.800$). - Fig. 35: (Embrione st. 22). Particolare di cellula dell'organo adesivo: si vedono inclusi composti e polimeri, formati da residui vitellini con formazioni di tipo mielino frammentati a una serie di granuli di pigmento. Inclusioni in metacrilato. ($\times 6.600$).

M. CAMATSI e G. LANZAVECCHIA - Osservazioni sull'ultrastruttura dell'epidermide in embrioni e larve di *Rana esculenta* L.



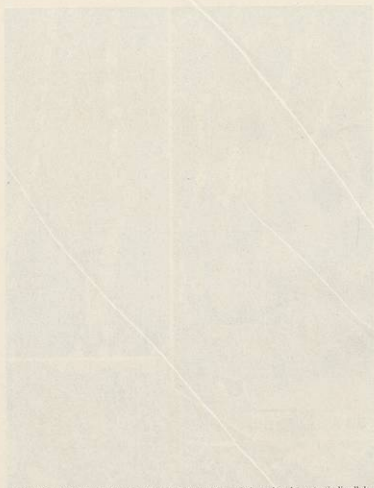
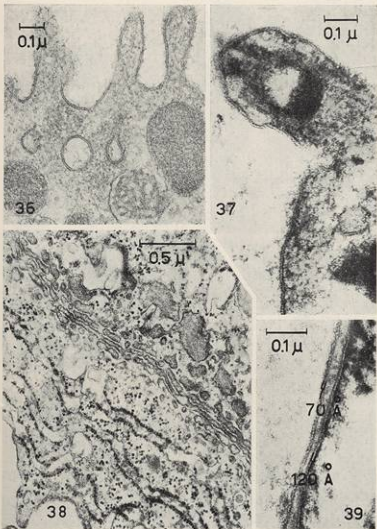


Fig. 36 : (Embrione st. 17). Membrana cellulare esterna, risolta nei suoi tre strati, di cellula ghiandolare dell'organo adesivo ; si nota l'andamento sinuoso di essa che si solleva a costituire dei microrivelli. Iniezione in metacrilato. ($\times 92.000$). - Fig. 37 : (Embrione st. 21). Particolare della parte esterna di cellula cigliata : evidente la struttura a tre strati della membrana cellulare, con uno spessore di 70-80 Å. Iniezione in Araldite. ($\times 122.000$). - Fig. 38 : (Embrione st. 21). Apparato di Golgi di cellula ghiandolare dell'organo adesivo. Sono evidenti alcuni granuli di secreto in stadi molto precoci di formazione. Iniezione in Araldite. ($\times 42.000$). - Fig. 39 : Particolare che mette in evidenza la differenza di spessore tra la membrana cellulare esterna (e) e quella di un vacuolo (v) in una cellula ghiandolare dello strato esterno dell'epidermide. Iniezione in Araldite. ($\times 148.000$).

M. CARATINI e G. LANZAVECCHIA - Osservazioni sull'ultrastruttura dell'epidermide in embrioni e larve di *Rana esculenta* L.



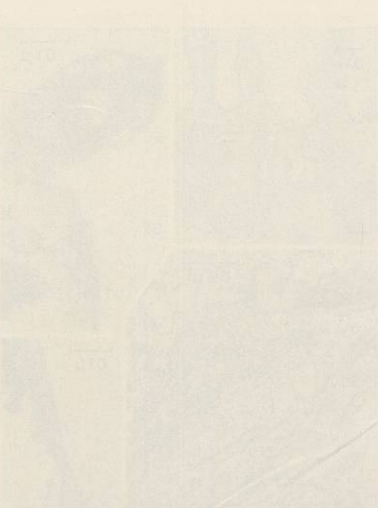


Fig. 40: (Embrione st. 21). Zona apicale dell'organo adesivo: sono evidenti molti granuli di secreto di varia forma, e sul margine cellulare dei brevi microvilli. Inclusionione in Araldite. ($\times 12,900$). - Fig. 41 e 42: Aspetto a forte ingrandimento dei microvilli delle cellule dell'organo adesivo. E ben visibile la membrana a tre strati, di spessore complessivo di 70-80 Å. Inclusionione in Araldite. ($\times 147,000$). - Fig. 43: (Embrione st. 21). Limite tra due cellule dell'organo adesivo: è ben visibile la struttura della membrana a cinque strati nella "zonula occludens". Inclusionione in Araldite. ($\times 147,000$).

M. CAMATINI e G. LANZAVECCHIA - Osservazioni sull'ultrastruttura dell'epidermide in embrioni e larve di *Rana esculenta* L.

