

HARRY MANELLI

Una vita di ricerca



Lo studioso della natura si meraviglia di più e si stupisce di meno man mano che diventa familiare con essa; ma di tutti i miracoli perenni che essa offre alla sua analisi quello che è forse più meritevole di ammirazione è lo sviluppo di una pianta o di un animale a partire dal suo embrione.

Thomas Huxley, 1907

Eri (Harry) Manelli si è laureato all'Università di Bologna in Scienze Naturali nel 1950 e in Scienze Biologiche nel 1956. È stato assistente alla cattedra di Anatomia comparata a Bologna e alla cattedra di Zoologia di Roma rispettivamente dal 1952 al 1959 e dal 1960 al 1969. Dopo la libera docenza in Embriologia e Morfologia sperimentale (1962) e in Anatomia comparata (1964), ha svolto una intensa attività didattica come incaricato di Embriologia degli Invertebrati presso l'Università di Roma (1963-1975), di Anatomia comparata presso l'Università dell'Aquila (1966-1969) e di Zoologia all'Università di Roma (1965-1969). Dal 1969 al 1971 è stato professore straordinario di Istologia ed Embriologia all'Università di Perugia e successivamente professore ordinario di Zoologia a Roma fino al suo collocamento in quiescenza nel 1998.

Ha diretto per dieci anni l'Istituto di Zoologia e per sei anni il Dipartimento di Biologia Animale e dell'Uomo della Facoltà di Scienze MFN, del quale ha impostato la struttura organizzativa e il percorso curricolare didattico e scientifico. È stato presidente del Consiglio di Corso di Laurea in Scienze Biologiche negli anni delle grandi contestazioni studentesche di Roma (1976-1979) e delegato dei Rettori Antonio Ruberti e Giorgio Tecce all'Istituto per il Diritto allo Studio Universitario (1976-1985). È stato per dieci anni membro del Comitato scientifico del MURST, settore 05 Scienze Biologiche, per l'attribuzione dei contributi 40%, funzione che ha svolto con generale apprezzamento da parte della comunità dei biologi italiani afferenti alla Facoltà di Scienze MFN.

Negli anni 1960-1968 Manelli ha goduto di contributi e borse di studio che gli hanno consentito di frequentare e compiere ricerche, anche per lunghi periodi, presso l'Institut d'Embriologie Expérimentale du Collège de France, diretto dal Prof. Etienne Wolff, e presso il Wenner Green Institute di Stoccolma e la Stazione Zoologica di Napoli, sotto la guida del Prof. John Runnström di Stoccolma. Con una borsa NATO ha partecipato al «First international summer Course on Advances in experimental Embryology», tenuto a Napoli presso la Stazione Zoologica e diretto dal Prof. Giuseppe Reverberi, dal 30 settembre al 30 novembre 1963. Ha beneficiato da parte delle Facoltà di Scienze MFN di Bologna e di Roma di premi di operosità scientifica nel periodo 1955-56 che 1960-67, e da parte dell'Accademia dei Lincei del premio "Giovanni Battista Grassi" per la Zoologia, Parassitologia e Talassografia biologica per l'anno 1968.

Ha assistito e diretto, nell'arco della sua attività didattica universitaria (1952-1998), non meno di 100 studenti nella programmazione ed elaborazione della tesi di laurea. Ha diretto e coordinato per 14 anni (1982-1996) un progetto nazionale di ricerca su «Differenziamento e morfogenesi nello sviluppo embrionale e post-embrionale» costituito da circa 150 ricercatori appartenenti a 22 unità operative locali di dieci Università italiane. Dal 1992 al 2000 è stato coordinatore del dottorato di ricerca in Biologia animale presso l'Università di Roma "La Sapienza". Ha curato l'edizione italiana della «Zoologia generale» di Remane, Storch e Welsch; nel 1998 ha pubblicato, in collaborazione con Leo Raunich e Giovanni Giudice, un testo di «Biologia dello sviluppo». Dal 1977 al 2009 è Vicesegretario organizzativo eletto del Gruppo Embriologico Italiano (GEI) [del quale sono stati Segretari il Prof. Pasquale Pasquini (1953-1977), il Prof. Silvio Ranzi (1977-1993) e il Prof. Alberto

Stefanelli (1994-2008)]. Del GEI ha curato la programmazione e la realizzazione dei convegni annuali, che hanno il compito di “fare il punto” delle ricerche embriologiche.

È Professore emerito dell'Università di Roma “La Sapienza”; nel 1986 è stato insignito della medaglia d'oro dei benemeriti della Scuola, della Cultura e dell'Arte dal Ministero della Pubblica Istruzione. È socio dell'Accademia Nazionale delle Scienze detta dei XL, dell'Accademia Nazionale di New York, dell'Istituto Lombardo, dell'Accademia Benedettina di Bologna, dell'Accademia Marchigiana di Arti, Scienze e Lettere. È membro della European Society for Comparative Endocrinology, dell'International Society of Developmental Biology e della Società Italiana di Istochimica. È socio onorario dell'Unione Zoologica Italiana, Presidente onorario dell'Associazione Nazionale degli Insegnanti di Scienze Naturali.

ATTIVITÀ DI RICERCA

A) MORFOGENESI DELL'APPARATO RENALE NEGLI ANFIBI ANURI

È stato studiato, con il metodo dei trapianti embrionali e delle asportazioni localizzate di abbozzi, il differenziamento del rene di Anfibi anuri (*Rana esculenta*, *Bufo bufo* e *Bufo viridis*) analizzando le interrelazioni di sviluppo fra i tre componenti: pronefro, dotto di Wolff e mesonefro. Il pronefro deriva da un abbozzo formato con il concorso dei primi tre o quattro somiti postotici; la sua assenza produce atrofia e riduzione del dotto nel tratto fra pronefro e mesonefro. Il dotto di Wolff non ha origine segmentale: esso si forma da una propaggine posteriore dell'abbozzo pronefrico che si accresce in direzione caudale; non è però escluso che i somiti adiacenti al percorso del dotto concorrano in qualche modo alla sua formazione. L'assenza del dotto influisce sulla funzionalità del pronefro e soprattutto sul differenziamento definitivo del mesonefro. Anche il tratto terminale del dotto di Wolff si forma a spese del blastema nefrico, se pur non si può escludere, nella formazione di questa struttura, la partecipazione dell'intestino cloacale, purché esso sia indotto, per contatto, dallo stesso blastema nefrico. A proposito dei rapporti nello sviluppo fra dotto di Wolff e cloaca, si è osservato che il materiale cloacale trapiantato non sembra esercitare sul dotto alcuna attrazione. Per quanto si riferisce al mesonefro, si è potuto dimostrare che esso è già irrevocabilmente determinato allo stadio di bottone caudale incipiente e che, per il suo differenziamento definitivo e per l'espletamento della funzione secretoria, è necessaria la presenza del dotto. Il mesonefro sembra però possedere, anche negli Anuri, una certa capacità di “auto-differenziamento”, data la comparsa di piccole unità blastematiche, le quali però non completano il loro differenziamento, qualora il dotto sia assente.

B) DIFFERENZIAMENTO DELL'ISOLOTTO SANGUIGNO IN ANFIBI E UCCELLI, IN VIVO E IN VITRO

B1 – Sviluppo dell'isolotto sanguigno in *Xenopus laevis*

In uno studio sullo sviluppo normale dell'isolotto sanguigno di *Xenopus laevis*, eseguito dallo stadio 27 allo stadio 42 secondo le tavole di sviluppo di Nieukoop, su embrioni trattati con benzidina allo scopo di evidenziare le emoproteine, si è osservato che, a partire dagli stadi 33-34, compare una netta positività alla

benzidina accompagnata anche dalla comparsa di evidenti aggregati di ferritina, talora circondati da citomembrane; è positiva anche la reazione alla perossidasi. Questo quadro è una prova che, a questi stadi, è già presente una sintesi proteica. Successivamente le cellule endoteliali si uniscono mediante desmosomi e si estendono a circondare le cellule eritroidi formando in questo modo le lacune sanguigne primitive. Queste poi si anastomizzano con i vasi provenienti dal cuore e le cellule sanguigne (prevalentemente rosse) entrano progressivamente in circolo, in un quadro di maturazione paragonabile all'eritroblasto basofilo e ortocromatico dell'adulto.

B2 – *Differenziamento ematico in vitro di blastemi di pollo*

Per verificare se in espianti di varia età varino anche le frazioni elettroforetiche delle emoglobine e se tali frazioni siano da correlare con le generazioni delle cellule sanguigne, sono state fatte colture di blastema di pollo (questo tipo di colture è stato definito da Etienne Wolff organotipico). È risultato da questi esperimenti che non esiste un nesso evidente fra qualità di emoglobine sintetizzate e generazioni di cellule sanguigne e che l'esame spettrofotometrico degli emolizzati degli espianti manifesta una notevole sproporzione fra proteine ed eme.

Che la condizione di espianto organotipico porti all'arresto o almeno ad un forte rallentamento della sintesi dell'emoglobina, risulta abbastanza chiaramente non solo dallo studio morfologico ma anche da quello biometrico e citospettrofotometrico delle colture differenziate in espianti di età variabile da 22-24 e 48-52 a 90-100 ore di incubazione, coltivati per un periodo sufficiente a far raggiungere alle cellule sanguigne l'età media di otto giorni. Tenendo presente che fino a 48-52 ore il sangue embrionale consta di elementi della sola prima generazione e che a 90-100 ore di una popolazione mista delle due generazioni, dagli espianti in questione sono stati ricavati i seguenti dati: a) in tutti i tipi di espianto si rinvengono soltanto eritrociti della prima generazione, come è dimostrato anche dalla distribuzione dei valori delle aree citoplasmatiche e dei valori del rapporto nucleo-plasmatico, che coincidono quasi esattamente con quelli degli eritrociti della prima generazione nei controlli; b) in base alle curve nell'u.v. per il materiale proteico e alle curve nel visibile per l'emoglobina, il citoplasma degli eritrociti degli espianti presenta un contenuto proteico approssimativamente uguale a quello degli eritrociti dei controlli. Sembra dunque logico ritenere che la sintesi delle globine continui in espianto e che invece si arresti o rallenti fortemente quella dell'eme; in altre parole, e confermando l'ipotesi precedentemente avanzata, nelle nostre condizioni sperimentali il differenziamento morfologico e la sintesi emoglobinica appaiono essere due processi distinti.

B3 – *Coltura di blastemi ematici con fegato embrionale*

Blastemi ematici di 5, 6, 7 giorni sono stati coltivati anche insieme a pezzetti di fegato embrionale, con l'idea che il fegato possa influire in qualche modo sul differenziamento degli eritrociti. È noto infatti che nei mammiferi il fegato embrionale mantiene attiva *in vitro* l'ematopoiesi midollare. I risultati dimostrano che i traccianti elettroforetici non presentano differenze significative fra i due tipi di espianti *in vitro*, né fra questi e i controlli *in vivo*.

C) DIFFERENZIAMENTO DI GHIANDOLE ENDOCRINE NEGLI UCCELLI E RECIPROCHE CORRELAZIONI DURANTE LO SVILUPPO IN VIVO E IN VITRO

C1 – Colture organotipiche di surrenali embrionali o adulte

Queste ricerche sono iniziate nel 1961 a Parigi presso l'Institut d'Embriologie expérimentale du Collège de France diretto dal prof. Etienne Wolff. Colture organotipiche di surrenali embrionali o adulte – in qualche caso stimolate con ACTH – associate alle gonadi e ai canali di Müller indifferenziati di pollo e di anatra hanno dimostrato che le surrenali, sia embrionali che adulte, non secernono ormoni mascolinizanti, e in pochi casi soltanto piccole quantità di ormoni femminilizzanti.

Lo studio del differenziamento funzionale, *in vivo* e *in vitro*, delle surrenali e delle gonadi è stato affrontato con tecniche istochimiche riguardanti gli enzimi interessati al metabolismo degli steroidi, quali la idrossisteroide deidrogenasi (HSDH), e gli enzimi interessati al metabolismo dei carboidrati, quali la glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6PDH) e la 6-fosfo gluconico deidrogenasi (6PGDH).

Nella surrenale *in vivo*, la $\Delta^5 - 3 \beta$ -HSDL, che catalizza la trasformazione del pregnenolone in progesterone, è presente fin dal 5° giorno di incubazione e permane fino a 4 gg dopo la schiusa (ultimo stadio studiato); nelle gonadi invece l'enzima è presente soltanto a partire dall'8° giorno. Anche *in vitro* si ha sostanzialmente lo stesso comportamento dell'enzima caratteristico degli steroidi presente negli espianti di surrenali di 4 e 5 gg, e di 7 gg negli espianti di gonadi.

Le deidrogenasi G6PDH e 6PGDH, che operano nel metabolismo dei carboidrati (il primo catalizzando l'ossidazione del glucosio-6-fosfato in 6 fosfogluco-solattone, e il secondo la decarbossilazione ossidativa dell'acido fosfogluconico a ribulosio-6-fosfato), sono presenti dai 4 gg in poi, sempre e soltanto nel tessuto interrenale.

Da questi dati appare chiaro che i due tipi di enzimi, quello dei pentosofosfati e quello degli steroidi, compaiono più o meno alla stessa età e sono localizzati nel medesimo tessuto; questo fatto potrebbe essere considerato una prova a sostegno della teoria secondo la quale i metabolismi espressi da questi enzimi sono paralleli e in qualche modo correlati.

C2 – Correlazioni fra ipofisi, surrenali e gonadi

In un altro filone di ricerche è stato affrontato, sempre con tecniche istochimiche, il problema delle correlazioni fra l'ipofisi, le surrenali e le gonadi, per verificare se anche negli uccelli si compia ciò che avviene nei mammiferi (Haynes), nei quali l'ipofisi stimolerebbe la produzione di ormoni steroidi tramite l'attivazione della fosforilasi che scinde il glicogeno in glucosio – 6 – fosfato, il quale nelle surrenali viene metabolizzato per mezzo dei pentoso-fosfati. *In vivo*, in embrioni ipofisectomizzati precocemente, si è visto che, mentre il differenziamento morfologico delle surrenali e delle gonadi non subisce fino ai 18-19 gg alterazioni significative, il comportamento degli enzimi sopra citati risentirebbe dell'assenza dell'ipofisi a partire dal 16°-17° giorno di incubazione. *In vitro* si è osservato che l'attività della ISDG e delle 6PGDH e G6PDH diminuisce fortemente nelle surrenali di 9, 12, 18 gg coltivate per 6,7 gg. L'aggiunta di ACTH al mezzo di coltura, se fatto all'inizio dell'esperimento, favorisce e prolunga fino al 12°-13° giorno il mantenimento delle strutture citomorfologiche delle attività enzimatiche

deidrogenasiche. Questo risultato dimostra che: a) l'ACTH può agire sulle surrenali anche al di fuori del circolo endocrino e i suoi effetti si rivelano parallelamente sia a livello istologico che a quello istoenzimologico; b) le surrenali embrionali manifestano una "sensibilità" differenziale a seconda dell'età, e ciò è correlabile con quanto succede *in vivo*, dove soltanto a partire da 16-18 gg l'ipofisi sembra prendere sotto il suo diretto controllo le surrenali e le gonadi; c) l'ACTH è capace di stimolare e potenziare sia il metabolismo dei pentosofosfati, sia quello degli steroidi. Questo dato corrisponde a quello di Haynes e Berthet, secondo i quali l'ACTH nei mammiferi promuove la sintesi degli steroidi, agendo proprio sul metabolismo dei carboidrati, che nelle surrenali si svolge in buona parte via pentosofosfati.

Altre esperienze di associazione in coltura organotipica tra gonadi indifferenziate di pollo (5-6 gg di incubazione) e ipofisi embrionali, sempre di pollo di 11 o 17-18 gg di sviluppo, mettono in evidenza che l'azione dell'ipofisi – che si manifesta morfologicamente con maggior produzione del numero e del volume dei gonociti – nel caso delle ipofisi più mature, porta a una riduzione del tessuto somatico, a cui corrisponde anche una riduzione delle attività enzimatiche. Nessun cambiamento del differenziamento sessuale inibisce, o quanto meno influenza, il differenziamento morfo-funzionale delle gonadi per mezzo della prolattina o dell'FSH e/o di tutti e due questi ormoni. In ogni caso è certo che anche in coltura organotipica la prolattina e/o l'FSH continuano ad essere secreti e quindi ad agire.

C3 – Timo e borsa di Fabrizio

Nel contesto delle interazioni fra le ghiandole che costituiscono il principale asse endocrino già conosciuto, quello cioè che collega l'ipofisi con le surrenali e le gonadi, si è cercato di scoprire se anche altre ghiandole, come il timo e la borsa di Fabrizio, negli uccelli, entrino più o meno direttamente in questo asse.

A questo scopo sono state trapiantate ipofisi di embrione di pollo di 18 gg di incubazione sulla membrana corio-allantoidea di embrioni di 12 gg parzialmente decerebrati a 36-40 ore di incubazione. Tutte e due le ghiandole degli embrioni trattati – cioè quelli che hanno ricevuto il trapianto dell'ipofisi – presentano, a 19 gg di incubazione, un progresso delle loro condizioni di sviluppo rispetto agli embrioni decerebrati di controllo. In particolare il timo presenta un miglioramento delle cellule midollari epiteliali e la borsa di Fabrizio un aumento del numero dei follicoli e un progresso del differenziamento delle pliche epiteliali.

Questi risultati suggeriscono che il timo e la borsa, oltre che per la loro funzione immunologica, possono essere considerati organi endocrini e perciò correlati con la funzione ipofisaria. Resta da chiarire se i progressi osservati nella borsa di Fabrizio siano causati direttamente dall'ipofisi o non piuttosto dall'azione dell'asse ipofisi-timo-borsa.

D) FECONDAZIONE, POLISPERMIA E SVILUPPO EMBRIONALE NEI RICCI DI MARE

Queste ricerche sono cominciate nell'anno 1960 alla Stazione Zoologica di Napoli e al "Wenner Green Institute" di Stoccolma, sotto la direzione del Prof. John Runnström dell'Università di Stoccolma. In seguito le ricerche sono continuate autonomamente all'Università di Roma e, in periodi alterni, alla Stazione Zoologica

di Napoli: dal 1961 al 1969, con il sostegno di contributi del Consiglio Nazionale delle Ricerche, al quale rinnovo un sincero ringraziamento. Ricordo con nostalgia i vari periodi di permanenza alla Stazione Zoologica che allora era uno straordinario punto di incontro del fior fiore di naturalisti e biologi di molte parti del mondo (basti pensare che dal 1872, anno di nascita della Stazione, agli anni '60 del ventesimo secolo, sono "transitati" da quell'Istituto, che disponeva di strutture e strumenti all'avanguardia e soprattutto di variatissimo e abbondante materiale biologico marino (nel mio caso i ricci di mare a "tutte le ore del giorno"!) ben 13 Premi Nobel.

La finalità delle mie ricerche era quella di approfondire le conoscenze sui meccanismi morfofisiologici e chimici corticali della fecondazione dei ricci di mare ed in particolare quelle di difesa contro la polispermia.

Due composti organici del mercurio, l'acido paracloromercurifenil-sulfonico (PCMPS) e l'acido salicil- γ -idrossimercuri- β -metossipropil-fenilacetico (MersalyI, MS), impiegati a concentrazioni variabili da 10^{-7} a 10^{-14} M e fatti agire generalmente per 15 minuti sulle uova non fecondate, determinano la polispermia (cioè due o più spermatozoi penetrano nell'uovo). Questa varia in rapporto alla concentrazione del mercuriale, alla concentrazione degli spermatozoi, e alle mutevoli condizioni fisiologiche delle uova. Con il trattamento di un detergente, il solfato laurilico, che blocca in differenti momenti, dopo la inseminazione, la penetrazione degli spermatozoi soprannumerari, è stato possibile seguire la progressione della polispermia e dimostrare che le uova rimaste monospermiche si sviluppano normalmente, nonostante il pretrattamento con il mercuriale; perciò le anomalie di sviluppo delle uova polispermiche – quali la segmentazione fortemente irregolare, il blocco della gastrulazione, la frequente dissociazione e le citolisi endomesodermiche, ecc – sono da attribuirsi allo stato polispermico e non all'azione del composto del mercurio. Il meccanismo che verosimilmente determina questo tipo di polispermia risiede nella capacità dei mercuriali di interagire con i gruppi sulfidrilici, quali la cisteina, il mercaptoetanolo e la mercaptoetilamina, azione che si mette in evidenza con la scomparsa o la riduzione della polispermia nelle uova pretrattate con mercuriali.

Anche il pretrattamento con acido iodobenzonico (10^{-3} M) abbassa l'effetto polispermico del mercuriale e ciò conferma che gli SH sono coinvolti nell'azione del composto mercurico sulla superficie dell'uovo.

A livello citomorfologico è stato osservato che il mercuriale non modifica né la velocità della fecondazione primaria, né la struttura della membrana di fecondazione o degli strati superficiali dell'uovo (neppure a livello submicroscopico sono state rilevate alterazioni a carico delle strutture predette: dati inediti) e che i luoghi e le modalità di attacco degli spermatozoi soprannumerari mettono in evidenza che nell'uovo esiste, già prima della fecondazione, una polarità prossimo-distale, intesa nel senso che gli spermatozoi si attaccano più facilmente alla regione prossimale.

Le ricerche sono proseguite studiando anche le condizioni che determinano o proteggono l'uovo dalla polispermia. In un gruppo di esperimenti si è indotta la polispermia con il ML marcato con Hg^{203} . Si è così dimostrato che il mercuriale reagisce soltanto con la superficie citoplasmatica dell'uovo intatto; se invece l'uovo viene omogeneizzato, la concentrazione di ML è 100 volte più intensa. Da questo dato si evince che la maggior parte dei gruppi SH non reagiscono con il mercuriale, in quanto la membrana plasmatica dell'uovo si oppone alla penetrazione del composto mercurico; si è così potuto osservare che il grado di incorporazione del

mercurio attivo mette in evidenza qual è la quantità dei gruppi SH presente nella superficie e nell'uovo intero, offrendo l'opportunità di misurare separatamente le due quantità degli SH nei diversi strati della superficie dell'uovo. Si dimostra così che la membrana di fecondazione, costituita dalla membrana vitellina e dalla lamella formata dai corpi corticali, contiene una esigua parte del materiale marcato (2-7%), mentre la maggior parte di esso è contenuto nello strato periferico del citoplasma ovulare. Circa il 30% del materiale marcato deve dunque essere contenuto nello spazio perivitellino e i gruppi SH di questa frazione sono molto probabilmente quelli che svolgono l'attiva protezione contro la polispermia.

Per verificare ulteriormente a quali strutture siano legati i gruppi SH e ipotizzando che gli stessi facciano parte di qualche tipo di proteina superficiale, sono state fatte ricerche sull'azione di alcune proteasi, quali la tripsina, la pronasi e il lisozima, sull'uovo vergine. È risultato che gli SH reattivi, con il ML Hg²⁰³, non dovrebbero essere superficiali poiché la tripsina e la pronasi, grosse molecole, distaccano soltanto una piccola parte del materiale radioattivo; quindi la sede degli SH proteici non dovrebbe essere né la membrana vitellina, né la membrana plasmatica, ma più verosimilmente il cortex vero e proprio con le sue componenti, quali i corpi corticali, le citomembrane, ecc.

In prospettiva l'utilizzazione del mercuriale marcato potrebbe essere rivolta a studiare e comprendere i meccanismi di interazione, non solo degli strati superficiali, ma anche delle diverse regioni negli embrioni di riccio in via di sviluppo, che sono ancora poco conosciuti.

E) MORFOLOGIA E FILOGENESI DELLE SURRENALI NEI VERTEBRATI, CON PARTICOLARE RIFERIMENTO ALLA CLASSE DEGLI ANFIBI E A QUALCHE SPECIE DI PESCI

Negli anni 1975-90 sono state compiute altre ricerche, in collaborazione con allievi, collaboratori, colleghi, su due temi: morfogenesi e filogenesi delle surrenali nei vertebrati, e struttura e funzione dei ribosomi durante lo sviluppo embrionale.

Premessa – Nell'evoluzione dei vertebrati, tutte le ghiandole endocrine tendono a realizzare un processo di connessione e di concentrazione cellulare. La ghiandola surrenale è un buon esempio di questo processo, il quale ha inizio a partire da una condizione di grande dispersione delle sue cellule.

Sono qui riportati alcuni dati sull'anatomia delle varie strutture delle surrenali nelle tappe filogenetiche dei pesci e della multiforme classe degli anfibi.

Anatomia - La surrenale è composta da due tipi di tessuti: il primo, l'interrenale, deriva dal mesoderma intermedio, che secreta ormoni steroidi, i quali controllano la regolazione dell'acqua, il bilancio salino e il metabolismo glucidico e lipidico; il secondo, quello cromaffine, deriva invece dalle creste neurali, che secernono le catecolamine (adrenalina e noradrenalina), le quali mettono l'organismo in grado di affrontare e superare le difficoltà ambientali (Coupland). La surrenale è perciò coinvolta nella regolazione delle relazioni autoecologiche e sinecologiche dell'organismo, in rapporto con i sistemi nervoso e vascolare.

Il processo di connessione e concentrazione si attua gradualmente, sia all'interno della singola specie, sia fra le diverse specie e anche fra le categorie sistematiche

superiori. Queste connessioni sono sviluppate soprattutto nei vertebrati superiori (rettili, uccelli e mammiferi), mentre nei vertebrati meno evoluti si riscontrano vari gradi di dispersione. Così nelle nostre ricerche si è osservato che nei pesci i due tipi di cellule (interrenali e cromaffini) sono decisamente separati e sparsi all'interno del tessuto renale, mentre negli anfibi si assiste ad una concentrazione graduale dalle forme primitive alle forme più evolute. In generale, nell'ontogenesi di questi vertebrati, la ghiandola è sistemata sulla superficie ventrale del rene ed è composta da piccoli corpi o isolette, che variano di numero, di dimensione e di posizione nelle differenti specie; spesso è a contatto con la vena cava e con le vene renali efferenti. Negli anfibi più primitivi, i gimnofioni, questi caratteri sono poco conosciuti; secondo Gabe il loro modello si avvicinerebbe a quello degli Urodeli. In molte specie di questi ultimi, secondo le nostre ricerche, le isole sono piccole, poste vicino al margine mediale della faccia ventrale del rene, con il numero, la dimensione e la dispersione che differiscono nelle varie specie. La surrenale è anche spesso in contatto con le vene renali efferenti, a distanza variabile dalla vena cava.

Negli anuri la ghiandola è composta da isolette – più strettamente raggruppate che nei gimnofioni e negli urodela – e formano una striscia gialla sulla superficie renale ventrale. La posizione della ghiandola varia rispetto all'asse sagittale mediano del rene ed è mediale a questo asse negli archeobatraci (*Discoglossus pictus* e *Xenopus laevis*).

Nei neobatraci invece (*Rana esculenta* e *Bufo bufo*) la surrenale è spesso laterale all'asse sagittale mediano e le isolette sono a contatto con le vene renali efferenti, più larghe nelle specie in cui esse sono mediali, e con le vene più ristrette nelle specie in cui esse sono laterali.

Istologia – La surrenale degli anfibi è composta da cordoni fasciati da connettivi, che li separano l'uno dall'altro e dagli organi che li circondano. I cordoni possono essere sottili, composti da poche cellule organizzate in un singolo strato o in piccoli gruppi; questo succede negli anuri archeobatraci e nella maggior parte degli urodela. In queste specie di anfibi i cordoni consistono soprattutto di cellule steroidogeniche, mentre le cellule cromaffini possono essere assemblate in piccoli gruppi alla periferia dei cordoni steroidogenici, oppure completamente isolate da essi. Negli anuri neobatraci e in qualche urodela i cordoni sono grossi e multistratificati, composti da cellule steroidogeniche e cromaffini, mescolate fra di loro a formare grossi gruppi.

Ultrastruttura – A livello ultrastrutturale, le cellule steroidogeniche mostrano caratteristiche citologiche tipiche: forma rotondeggiante o poligonale, nucleo lobato con grosse masse di cromatina, molte gocce lipidiche rotondeggianti, mitocondri con creste tubolari, lisosomi, granuli di glicogeno e un reticolo endoplasmatico liscio ben sviluppato. Alcune differenze, collegate all'attività stagionale, riguardano il numero, la dimensione e il contenuto delle gocce lipidiche, come pure la configurazione delle creste mitocondriali e del reticolo endoplasmatico.

In ricerche sulle surrenali di alcuni anuri (*Rana esculenta*, *Rana montezumae*, *Racophorus leucomystax*) sono state osservate cellule particolari, simili a quelle di Stilling nei mammiferi, che sono acidofile e presentano un citoplasma ricco di granuli sferici fortemente elettrodensi, con il diametro che varia da 0,4 a 0,8 μm , pochi mitocondri di piccola dimensione con le creste lamellari e scarsa quantità di reticolo sia liscio che rugoso. In situazioni simili, in altri animali, gli autori ritengono che questo tipo di cellule sia collegato alla funzione steroidogenica. Le cellule cromaffini degli anuri e degli urodela possono essere distinte per i due tipi di

catecolamine: uno ad adrenalina (A) e un altro a noradrenalina (N): le prime contengono granuli rotondeggianti e debolmente elettrocondensanti, le seconde granuli fortemente elettrocondensanti e di varia forma. In molti anuri e in qualche urodelo esiste un terzo tipo di cellule nominate "cromaffini finemente granulate". Queste cellule si differenziano da quelle A e N, perché contengono granuli piccoli e caratterizzati da un alto rapporto nucleo/plasmatico, una consistente quantità di reticolo endoplasmatico rugoso e molti ribosomi liberi.

Ricerche citochimiche – L'acetilcolinesterasi (AChE) e la fosfatasi acida sono presenti nelle cellule cromaffini di molti anfibi. In particolare l'attività della AChE è positiva in tutti i tipi di queste cellule in *Rana esculenta*, *Bufo bufo*, *Discoglossus pictus* e *Xenopus laevis*, anche se con intensità variabile da specie a specie. Questo stesso enzima è stato studiato in molti urodeli e si è trovato che è più attivo nelle cellule a noradrenalina che in quelle ad adrenalina. In generale negli anuri è presente anche la fosfatasi acida: in particolare è evidente nei lisosomi di tutte le cellule cromaffini e nelle membrane dei granuli A, mentre è pressoché negativa nei granuli N.

Sviluppo – Negli anuri e negli urodeli il blastema della surrenale è composto da cellule con differente origine: le cellule interrenali che derivano dal mesoderma, e le cellule cromaffini che derivano dalla cresta neurale. All'inizio della metamorfosi il blastema ghiandolare è situato fra la vena cava, l'aorta dorsale e le superfici della rete dorsale. Durante la metamorfosi e in parte nel periodo giovanile il blastema ruota e si sposta ventralmente e lateralmente, nello stesso tempo organizzandosi in cordoni delimitati da tessuti connettivi. In *Discoglossus pictus*, *Xenopus laevis* e *Triturus cristatus*, la rotazione è già completata alla fine della metamorfosi, mentre in *Rana esculenta* e *Bufo bufo* la surrenale continua il suo spostamento nel periodo postmetamorfico per raggiungere la sua posizione definitiva, cioè quella laterale.

Le cellule cromaffini in *Rana esculenta* fin dall'inizio contengono granuli più piccoli di quelli degli adulti, non distinguibili sulla base della loro elettrocondensità in A e N. Il differenziamento dei granuli nei due tipi, il loro accrescimento e la segregazione nelle varie cellule si compie durante la metamorfosi. Lo spostamento della surrenale metamorfica avviene soprattutto per mezzo di movimenti cellulari attivi, messo in evidenza dalla reazione positiva dell'acetilcolinesterasi nelle cellule steroidogeniche.

Considerazioni evolutive – Che il carattere evolutivo appaia chiaramente dai risultati delle indagini sullo sviluppo della struttura morfologica e istochimica della surrenale nei pesci e negli anfibi è fuori di dubbio. Infatti le analisi delle variazioni di questa ghiandola mette in evidenza che la stessa è dapprima diffusa e dispersa all'interno del rene dei pesci, con esiguo o nessun contatto fra i tessuti cromaffini e steroidogenico, costituendo così una condizione primitiva detta "plesiomorfa". Nel corso della filogenesi nei vertebrati le cellule cromaffini e steroidogeniche si associano sempre più nel tempo, fino a costituire un organo compatto esterno al rene, riducendo i contatti con esso. Questo ultimo tipo di surrenale è caratteristico degli amnioti – cioè rettili, uccelli e mammiferi – e viene detto "apomorfico" o derivato. Negli anfibi, a partire dai gimnofioni, passando attraverso gli urodeli per arrivare agli anuri, la surrenale presenta moltissimi caratteri intermedi, fra cui i principali sono: 1) la ghiandola non è mai immersa nel tessuto renale, 2) gradualmente si colloca sulla sua superficie, 3) infine i tessuti cromaffini e steroidogenico si sovrappongono. Questo modello di surrenale è detto "tipo anfibio".

Più difficile è evidenziare le cause che determinano l'iter evolutivo: l'ambiente, come fattore epigenetico, gioca sicuramente un ruolo importante, soprattutto nel "processo del passaggio" dall'acqua alla terraferma, processo verosimilmente ancora in atto! Forse anche le interazioni funzionali fra le catecolamine e gli steroidi possono contribuire, sotto vari aspetti, all'evoluzione.

Concludendo: i fatti evolutivi esistono, rimangono da approfondire le cause che li determinano.

F) STRUTTURA E FUNZIONE DEI RIBOSOMI NELLO SVILUPPO EMBRIONALE DEL POLLO E DEGLI ANFIBI

Durante lo sviluppo embrionale del pollo la composizione del sistema ribosomale subisce alcune evidenti modificazioni che portano a classi ribosomali più ricche di contenuto proteico. Infatti, mentre la subunità ribosomale minore (40S) mostra un valore costante della sua densità, uguale a 1.555, la maggiore (60S) mostra un graduale cambiamento del rapporto RNA/proteina, che, durante lo sviluppo embrionale, passa dal valore di 1.635 a quello di 1.615. Inoltre si è anche osservato che il pattern ribosomale si modifica nel senso che si ha un graduale accrescimento del numero di frazioni aggregate.

Questi risultati inducono a ipotizzare una interazione fra i due eventi e a richiedere un intervento dei polisomi nella sintesi proteica. Perciò è possibile pensare che durante lo sviluppo embrionale i ribosomi siano coinvolti in processi regolativi e che le variazioni osservate – cioè la modificazione del pattern polisomale e la variazione della densità della subunità 60S – siano controllate da un meccanismo concernente i fattori proteici di inizio.

Sono state poi compiute altre ricerche su un anfibio, il rospo comune (*Bufo bufo*) utilizzando sistemi "cell-free" programmati con acido poliuridilico ad alta e bassa concentrazione di Mg^{++} , con o senza l'aggiunta di fattori d'inizio esogeni e sistemi programmati con RNA poliadenilato delle subunità ribosomiali (40S e 60S) dell'uovo vergine di *Bufo bufo*, allo scopo di verificare se il ribosoma, prima della fecondazione, sia bloccato in modo da impedire la traduzione e, in caso contrario, se il regolatore di tale processo vada ricercato in un altro componente dell'apparato della sintesi proteica. In tutte queste condizioni i ribosomi ricomposti con le subunità dell'uovo vergine, hanno dimostrato un'attività sintetica leggermente superiore rispetto a quella dei ribosomi ricostituiti dalle subunità dell'embrione (stadio di bottone codale) e dell'adulto, funzionalmente corrispondenti. Questi risultati indicano che il controllo della sintesi proteica nelle uova vergini di *Bufo bufo* non agirebbe tramite una limitazione della capacità sintetica del ribosoma.

In una indagine comparata sui ribosomi dell'uovo vergine e quelli degli embrioni e dell'adulto di *Bufo bufo*, si è osservato che la dissociazione completa dei monomeri si raggiunge per le tre popolazioni quando il rapporto tra K^+ e Mg^{++} è pari ad 80 ($200 \mu M KCl / 2,5 \mu M MgCl_2$). Questi dati portano a ritenere che il ribosoma non sia probabilmente, in questa specie di anfibio (e anche in altre) il fattore segnalatore della traslazione nella sintesi proteica e che questo ruolo vada cercato in altri componenti del "protein synthesis machinery". Ne seguirebbe che i ribosomi delle uova non fecondate di *Bufo bufo* siano del tutto comparabili con quelli funzionalmente corrispondenti degli embrioni in sviluppo, e perciò non sembrerebbe

esistere uno speciale meccanismo inibitore dei ribosomi di *Bufo bufo* durante lo sviluppo embrionale.

Nonostante questi dati della nostra ricerca su una specie di anfibio, esiste però una opinione sostenuta da parecchi autori – su altri animali e in particolare sul riccio di mare – secondo la quale il ribosoma è fortemente coinvolto nella riattivazione della sintesi proteica dopo la fecondazione, e che tale coinvolgimento sembra dovuto ad uno dei due seguenti meccanismi: a) il ribosoma dell'uovo fecondato è bloccato da un fattore proteico legato ad esso, dopo la fecondazione; questo fattore viene in qualche modo rimosso, e il ribosoma può riattivarsi; b) il blocco della sintesi proteica è dovuto al fatto che il ribosoma non trova i fattori necessari per riciclare i messaggeri; dopo la fecondazione però questi fattori compaiono nel citoplasma ovulare (attraverso uno smascheramento dei fattori già presenti ma inattivi) e in questo modo il ribosoma è abilitato ad iniziare la traslazione.

Ancora per saggiare l'attività dei ribosomi sono state fatte ricerche in *Bufo bufo* sull'associazione di queste particelle traslanti e non traslanti con il fattore di elongazione 2 (EF2). A questo scopo si è utilizzata la tossina difterica che caratterizza il trasferimento del gruppo ADP-riboso dalla NAD a EF2 negli eucarioti; infatti, per la specificità e l'assoluta stechiometria di questa reazione è possibile misurare con grande precisione la quantità di EF2 che si associa con i ribosomi, già sapendo che questo fattore è legato non solo ai ribosomi traslanti, ma anche ai monoribosomi impegnati nella sintesi proteica.

I risultati dimostrano che nelle uova non fecondate e negli embrioni la quantità di EF2 associata ai monoribosomi diminuisce gradualmente dall'uovo non fecondato fino allo stadio di bottone codale nel quale il livello di EF2 è circa 1/3 del suo valore iniziale. Inoltre è stata registrata una quantità anche più bassa di questo fattore associato ai poliribosomi del bottone codale. Questi risultati suggeriscono che il legame fra EF2 e i monoribosomi non complesso può far pensare che esista un meccanismo regolatore che sottende il riciclaggio della traslazione.

G) RICERCHE VARIE

a) Sono stati studiati *in vivo* e *in vitro* i processi rigenerativi della coda delle larve (girini) di alcuni anfibii anuri (*Rana esculenta*, *Bufo bufo* e *Xenopus laevis*) e di blastemi, dischetti e segmenti di plateminti turbellari tricladi (*Planaria torva* e *Procerodes dohrmi*). Il dato più significativo ricavato dall'insieme degli esperimenti è sembrato essere quello collegato alla pluripotenzialità dei neoblasti (cellule omologabili alle staminali, che si rinvengono nei metazoi generalmente meno evoluti: poriferi, celenterati, plateminti, anellidi, ecc.; con una eccezione, quella degli anfibii nei vertebrati), i quali non avrebbero soltanto il ruolo di elementi destinati ad entrare in attività esclusivamente in occasione di traumi e di fenomeni implicanti processi rigenerativi, ma anche quello di intervenire a costituire o a ricostituire quelle strutture che nei vari momenti della vita l'organismo consuma o perde, quali per esempio le cellule germinali, che sarebbero appunto rimpiazzate dai neoblasti.

b) Morfogenesi ed istogenesi del cervelletto nell'embrione di pollo.

c) Struttura istologica e citologica della corteccia cerebellare di alcune specie di squalo e batoidei.

d) “Di alcune anomalie di sviluppo conseguenti all’azione di basse temperature su ova ed embrioni di *Rana esculenta* e *Bufo bufo*”. Questo lavoro, che contiene molti dati delle ricerche compiute negli anni 1949-50 per la tesi di laurea in Scienze naturali di Manelli, all’università di Bologna, è stato stampato nei Rendiconti dell’Accademia delle Scienze, detta dei XL: IV, 12,159-182, 1961. Le anomalie interessano soprattutto i derivati ectodermici (neurasse o organi di senso), e con intensità decrescenti quelli mesodermici (corda e miotomi) e endodermici (intestino, fegato e pancreas). Le anomalie si sono riscontrate, nella loro espressione più grave, negli stadi di segmentazione e di blastula incipiente in *Bufo* e negli stadi di blastula e gastrula in *Rana*. Si è anche riscontrato che *Rana* è più sensibile di *Bufo* all’azione del freddo, e che in ambedue le specie le anomalie diminuiscono di intensità dalla testa alla coda e dal dorso verso il ventre.

ALTRE ATTIVITÀ CULTURALI

1 – *Aggiornamento e formazione dei docenti di Scienze Naturali*

Impegnativo e prolungato nel tempo è stato il contributo che Manelli ha dato all’aggiornamento e alla formazione degli insegnanti di Scienze Naturali della Scuola Media di I e II grado.

In un primo periodo, a Roma, negli anni 1975-80, ha proseguito ed integrato l’attività a favore dei docenti di scienze, svolta precedentemente, con spirito volontaristico dai Proff. Maria Piazza, valorosa insegnante nei licei di Roma, e poi da Valerio Giacomini, botanico di fama internazionale presso l’università di Roma.

Questa attività consisteva nell’organizzare circa due volte al mese lezioni o seminari su temi specifici delle discipline naturalistiche – chimica, geologia, biologia e più raramente fisica – aggiornati dalle conoscenze acquisite nelle ricerche sulle stesse discipline all’Università ed altri Istituti scientifici.

A seguito della costituzione dell’Associazione Nazionale degli Insegnanti di Scienze Naturali (A.N.I.S.N.), fondata a Sorrento nel marzo 1979 e regolamentata con lo “Statuto di Rimini” nel 1980, anche i docenti di Roma e del Lazio hanno costituito una “Sezione Lazio” presieduta da E. Manelli.

Nella decade 1980-90 sono proseguite, in sede locale, le attività associative con modalità sostanzialmente uguali a quella del quinquennio precedente; si sono poi intensificati i rapporti con le sezioni che via via si andavano formando nelle varie regioni, e si è avuta così una buona partecipazione ai convegni nazionali tenutisi nelle sedi di Roma, Alghero e Genova.

La tematica di fondo sviluppata in questi convegni ha riguardato l’importanza dello studio delle discipline naturalistiche, a supporto ed integrazione di un “nuovo umanesimo” inteso come stagione culturale più ricca e per vari aspetti nuova, perché accresciuta dallo studio più approfondito del mondo naturale.

In un terzo periodo, il più ricco di risultati, che va dal 1992 ad oggi, l’azione di coordinamento dell’associazione, da parte del consiglio direttivo nazionale presieduto da Manelli, si è sviluppata secondo alcune linee discusse e condivise

negli incontri annuali e attraverso la rivista, fra cui: a) una guida alla professionalità docente, che permetta programmazioni e percorsi didattici collegiali, senza però limitare gli apporti e la creatività personali, di cui si deve tener conto nel percorso attuativo; b) la valorizzazione delle competenze all'interno dell'Associazione, con reciproci confronti; c) la collaborazione del territorio, nel cui ambito realizzare una rete di collegamenti così da produrre idee, proposte e progetti validi per lo sviluppo culturale; d) i rapporti con l'Università, non passivi ma attivi, nel senso che i docenti universitari rappresentano "il sapere sapiente e i docenti della scuola il sapere insegnato", in modo da costruire un ponte interattivo e continuo.

Con questo impianto collaborativo, a rete, e con la stipula di un protocollo d'intesa fra Ministero della Pubblica Istruzione e A.N.I.S.N., si sono potute realizzare numerose iniziative, sia a livello locale che a livello nazionale. Nel primo caso, presso la sede di Zoologia del Dipartimento di Biologia Animale, si sono tenuti nei 16 anni di vita scolastica numerosissimi seminari e corsi di aggiornamento, integrati in parecchie occasioni con esercitazioni di laboratorio e/o escursioni pratiche sul campo in vari ambienti naturali del Lazio e di altre regioni.

A livello nazionale nei suoi otto anni di presidenza (1990-1998) Manelli ha promosso la progettazione e lo svolgimento di quattro corsi nazionali di formazione, curando in questo ambito i rapporti con le strutture istituzionali, in particolare con il Ministero della Pubblica Istruzione e con le Regioni attraverso i loro uffici scolastici; ha inoltre contribuito alla promozione ed organizzazione di quattro congressi nazionali svoltisi a Trieste, Pisa, Palermo e Milano.

Alla fine del mandato di Presidente nazionale (1998), l'Assemblea dei soci lo ha nominato Presidente onorario dell'Associazione.

Manelli ha anche fondato nel 1992 la rivista «Le scienze naturali nella scuola», che ha diretto fino al ????. In essa vengono dibattute le varie tematiche relative all'insegnamento e all'apprendimento, in altre parole come costruire percorsi didattici per la formazione dei ragazzi, adatti a sviluppare in essi l'orientamento naturalistico ed ecologico, cioè la capacità di edificare gradualmente e criticamente (tenendo ben presenti le capacità e le tendenze dei giovani durante il loro crescere) un nuovo concetto di natura, intesa non più come realtà statica, lineare e chiusa bensì complessa, aperta e perciò dinamica. Si è anche tentato di aprire un dibattito sui presupposti teorici e metafisici, condivisi fra le categorie degli "umanisti" e degli "scienziati", necessario alla costituzione di un linguaggio almeno in parte condiviso e quindi idoneo alla comprensione reciproca.

Credo che questo obiettivo sia fondamentale per la crescita culturale dei ragazzi e dei cittadini.

Della rivista finora sono stati pubblicati trentadue numeri.

Nell'ambito del "Progetto Scuola", attuato da diversi anni dall'Accademia nazionale delle Scienze detta dei XL, Manelli ha contribuito a programmare e realizzare tre seminari a carattere didattico e scientifico per gli insegnanti di scuola media superiore. Gli argomenti sono stati i seguenti: a) "Valorizzazione della divulgazione scientifico-naturalistica, con riferimento all'educazione ambientale", in videoconferenza tra il Ministero della Pubblica Istruzione e dieci scuole superiori di varie città italiane; b) "Continuità del vivente: dall'ontogenesi alla filogenesi"; c) "Genetica ed epigenetica".

2 – Attività presso l'Istituto Nazionale per la Fauna Selvatica

Impegnativa è stata anche l'attività che Manelli ha svolto come Presidente dell'Istituto Nazionale per la Fauna Selvatica (I.N.F.S.) a Ozzano Emilia (Bologna) nel periodo 1981-2001.

Sotto la sua azione, in stretta collaborazione con la Direzione, l'I.N.F.S. si è trasformato da semplice strumento tecnico-scientifico di consulenza degli Organi centrali (Ministeri) e periferici (Regioni e Province) in materia venatoria, ad un accreditato centro di ricerca teorica e applicata sulle tematiche di conservazione della fauna selvatica italiana. Questa evoluzione ha comportato non solo un ripensamento degli obiettivi e una riqualificazione degli organici, ma anche la realizzazione di maggiori e moderne strutture di laboratorio (come quella di genetica e di veterinaria) e di intervento sul territorio.

Purtroppo negli ultimi anni della presidenza di Manelli la scarsità delle risorse finanziarie non ha consentito il programmato potenziamento del personale né l'ampliamento delle attività.