

Glicoproteine di superficie e differenziamento delle cellule piriformi nei Rettili squamati, *Podarcis muralis* e *Lacerta bilineata*

ULIANO ROBERTO, RICCHIARI LOREDANA,
PRISCO MARINA, ANDREUCCETTI PIERO
*Dipartimento di Biologia Evolutiva e Comparata
Università degli Studi di Napoli Federico II*

Abstract

The investigation performed in two squamate reptiles, *Lacerta bilineata* and *Podarcis muralis*, demonstrates that the differentiation of pyriform cells, which are connected to the oocyte by an intercellular bridge, is characterized by the progressive appearance on the cell surface of specific glycoproteins. Using a lectin panel we demonstrated that, during previtellogenesis, the pattern of distribution of α -N-GalNAc containing glycoproteins significantly changes and that these modifications are probably related to the differentiation of pyriforms, that starts from small stem cells via intermediate cells.

Introduzione

Nei Rettili squamati l'epitelio follicolare che circonda gli ovociti previtellogeni è caratterizzato dalla presenza di un particolare tipo di cellule, le cellule piriformi, in comunicazione con l'ovocita mediante ponti citoplasmatici (Ghiara *et al.*, 1968; Neaves, 1971; Taddei, 1972; Bou-Resly, 1974; Hubert, 1976; 1985; Andreuccetti *et al.*, 1978; 1979; Laughran *et al.*, 1981; Klosterman, 1987; Ibrahim & Wilson, 1989; Taddei & Andreuccetti, 1990; Motta *et al.*, 1995; 1996). Si tratta di cellule con funzione nutrice, simili a quelle presenti negli ovaroli politrofici degli insetti (confronta per review Mahajan-Miklos & Cooley, 1994) che, attraverso i ponti trasferiscono RNA, mitocondri, ribosomi e vescicole all'ovocita (Motta *et al.*, 1995). Nella lucertola *Podarcis sicula*, che vive nelle zone temperate del sud Europa, le cellule piriformi compaiono all'inizio della previtellogenesi e derivano dal differenziamento delle cellule follicolari piccole (Filosa *et al.*, 1979). Nei follicoli primari, fino a 100 μ m di diametro, infatti, l'epitelio follicolare è costituito da un monostrato di cellule piccole, di forma appiattita, staminali, che, nei follicoli di 150-200 μ m di diametro, si differenziano progressivamente, in maniera asincrona, in cellule piriformi, passando per uno stadio intermedio, quello di cellule intermedie. Una volta che le cellule piriformi si sono differenziate l'epitelio follicolare

si presenta come una struttura complessa, per la contemporanea presenza di cellule piccole, intermedie e piriformi (Filosa, 1973; Filosa *et al.*, 1979; Andreuccetti *et al.*, 1978). Questa organizzazione è riscontrabile in follicoli di diametro compreso tra 600 e 1500 μm ; successivamente, alla fine della previtellogenesi, le cellule intermedie e piriformi vanno in apoptosi (Motta *et al.*, 1996) e l'epitelio progressivamente ritorna monostratificato e monomorfo, per la presenza delle sole cellule piccole, e tale rimane per tutta la fase vitellogena (Filosa, 1973).

Recentemente è stato messo in evidenza che in *Podarcis sicula* il differenziamento delle cellule follicolari è accompagnato dalla comparsa sulla loro superficie di glicoproteine con residui glucidici terminali di α -N-acetilgalattosamina (α -GalNAc) O-linked (Andreuccetti *et al.*, 2001).

Scopo del presente lavoro è stato quello di verificare se in altri Rettili squamati il processo differenziativo delle cellule piriformi segue le stesse modalità e se durante tale processo le cellule piriformi espongono sulla loro superficie glicoproteine dello stesso tipo di quelle rilevate in *Podarcis*. Le specie prese in esame sono state *Lacerta bilineata* e *Podarcis muralis*. Le osservazioni riportate in questo lavoro dimostrano che anche in queste due specie di Rettili squamati il pattern che porta al differenziamento delle cellule piriformi segue sostanzialmente lo stesso andamento rilevato in *Podarcis* e che il differenziamento delle cellule piriformi è caratterizzato anche in questo caso dalla comparsa di glicoproteine di superficie contenenti residui terminali α -GalNAc.

Materiali e metodi

La sperimentazione è stata effettuata su follicoli ovarici in vari stadi di accrescimento di *Podarcis muralis* e *Lacerta viridis*, catturate nel Parco del Matese in differenti periodi dell'anno da personale autorizzato e stabulate in apposite gabbie a temperatura ambiente.

Microscopia ottica

I follicoli sono stati fissati in Bouin per 24 ore, disidratati e inclusi in paraffina. Sezioni di 7 μm sono state colorate con colorazione tricromica (Galgano modificata).

Fissazione ed inclusione per l'analisi citochimica in post-embedding al microscopio ottico a fluorescenza

I campioni, sia lamine che follicoli, sono stati fissati in paraformaldeide al 4% e glutaraldeide allo 0,1% in tampone sodio cacodilato 0,1M a pH 7,3 per 2,5 ore a t.a.. Dopo tre lavaggi di 10min. ciascuno in sodio cacodilato 0,1M a 4°C, i campioni sono stati trattati con una soluzione 0.2 M NH_4Cl in cacodilato per 1 ora a t.a. per bloccare i gruppi aldeidici liberi del fissativo; poi disidratati in una serie

ascendente di alcoli e ossido di propilene e inclusi in Epon.

Tecniche di marcatura per il post-embedding al microscopio ottico a fluorescenza

Sezioni di 1µm di spessore dei campioni, ottenute su lama di diamante, sono state fatte aderire su vetrini puliti prima con acqua e sapone e successivamente lavati in BDW ed asciugati in stufa a 45°C overnight. Le sezioni così ottenute sono state deresinizzate su vetrino con 500µl di una soluzione 2,4M di KOH in metanolo anidro-ossido di propilene nel rapporto di 2:1 per 3 min. (modificato da Maxwell, 1978). Seguivano poi un lavaggio in acqua corrente per 15 min. e tre lavaggi per 5 min. in PBS.

Una volta deresinizzate, le sezioni di ciascun vetrino sono state incubate per non meno di 20 min. al buio in camera umida con le varie lectine (WGA, PSA, DBA, ConA, BPA, LCA, PNA, UEA-I, e le due isolectine GSI-A₄, GSI-B₄), sciolte nell'apposito tampone ad una concentrazione variabile a seconda della lectina utilizzata (vedere tabella I).

LECTINA	TAMPONE	CONCENTRAZIONE [µg/ml]
Arachis hypogaea (PNA)	PBS	30
Bauhinia purpurea (BPA)	PBS	30
Canavalia ensiformis (ConA)	TBS-Ca-Mn	30
Dolichos biflorus (DBA)	PBS	30,60
Griffonia simplicifolia I, isolectina A ₄ (GS-I-A ₄)	PBS-Ca	30
Griffonia simplicifolia I, isolectina B ₄ (GS-I-B ₄)	PBS-Ca	30
Pisum sativum (PSA)	TBS	30
Triticum vulgare (WGA)	PBS	15,30
Ulex europaeus I (UEA-I)	PBS	30,60
Lens culinaris (LCA)	PBS	30
Glycine max (SBA)	PBS	30

Tabella 1. Concentrazioni d'uso per le incubazioni delle lectine fluoresceinate.

PBS, tampone fosfato 10mM - pH7,3; PBS-Ca, tampone fosfato addizionato con CaCl₂ 500mM - pH7,45; TBS, tampone tris-HCl 50mM - pH7,3; TBS-Ca-Mn, tampone tris-HCl addizionato con CaCl₂ 1mM e MnCl₂ 1mM.

I controlli sono stati effettuati preincubando le lectine a t.a. con i rispettivi zuccheri aptenici ad una concentrazione di 0,2M per 60min. prima dell'incubazione (vedi tabella II). Dopo l'incubazione i vetrini sono stati lavati in PBS e successivamente in una soluzione di PBS con 50 µg/ml di parafenildiammina, un

agente usato per prolungare la fluorescenza; quindi, montati con una soluzione di glicerolo 90% e PBS 10% più 50 µg/ml di parafenildiammina ed infine il vetrino coprioggetto sigillato con smalto, ed i campioni osservati al microscopio a fluorescenza con gli obiettivi 40X, e 63X ad immersione.

LECTINA	SPECIFICITÀ	MONOSACCARIDI INIBITORI
<i>Arachis hypogaea</i> (PNA)	β Gal1,3GalNAc > α and β Gal	D-Gal
<i>Bauhinia purpurea</i> (BPA)	GalNAc > Gal	D-GalNAc
<i>Canavalia ensiformis</i> (ConA)	α Man > α Glc > α GlcNAc.	Metil- α -Man
<i>Dolichos biflorus</i> (DBA)	α GalNAc1,3GalNAc > α GalNAc	D-GalNAc
<i>Griffonia simplicifolia</i> I, isolectina A ₄ (GS-I-A ₄)	α GalNAc >> α Gal	D-GalNAc
<i>Griffonia simplicifolia</i> I, isolectina B ₄ (GS-I-B ₄)	α Gal	D-Gal
<i>Pisum sativum</i> (PSA)	α Man > α Glc = α GlcNAc	Metil- α -Man
<i>Triticum vulgare</i> (WGA)	β GlcNAc1,4 β GlcNAc > GlcNAc > Neu5Ac	D-GlcNAc
<i>Ulex europaeus</i> I (UEA-I)	α L-Fuc	L-Fuc
<i>Lens culinaris</i> (LCA)	α Man > α Glc = α GlcNAc	Metil- α -Man
<i>Glycine max</i> (SBA)	α GalNAc > β GalNAc	D-Gal

Tabella II. Lectine usate, loro specificità e corrispondenti monosaccaridi inibitori.

Da Goldstein and Poretz 1986. *Gal*, galattosio; *GalNAc*, N-acetilgalatto-sammina; *GlcNAc*, N-acetilglucosammina; *Fuc*, fucosio; *Man*, mannosio; *Metil- α -Man*; metil-alfa-mannoside; *Neu5Ac*, acido sialico.

Trattamento per l'eliminazione dei lipidi di membrana

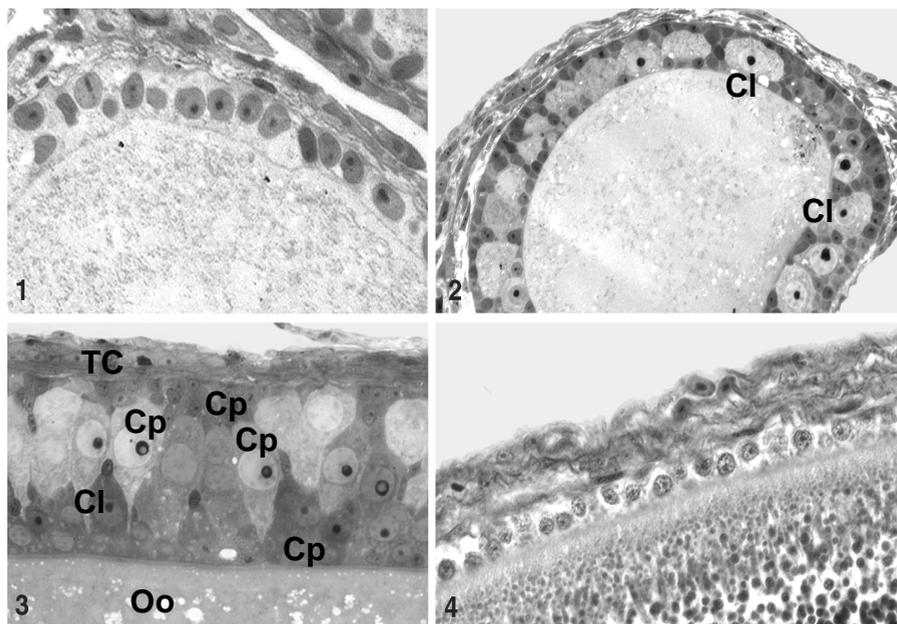
Al fine di stabilire se la eventuale positività riscontrata a livello di superficie fosse da ascrivere a glicolipidi e/o glicoproteine, parallelamente alla procedura per la marcatura in post-embedding al microscopio ottico a fluorescenza è stato effettuato un trattamento per la rimozione selettiva dei lipidi di membrana. Per questo, alcuni vetrini, prima dell'incubazione, venivano trattati con una miscela di cloroformio e metanolo anidro nel rapporto di 2:1 (Suzuki *et al.*, 1993), dopodiché si procedeva all'incubazione con lectine fluoresceinate (DBA, WGA e ConA.). Per verificare la specificità delle marcature ottenute dopo i trattamenti su indicati, alcuni vetrini sono stati utilizzati come controllo, eseguendo una preincubazione delle lectine con il rispettivo zucchero inibitore alla concentrazione di 0,2M.

Procedura di rimozione degli zuccheri terminali legati al gruppo-OH (β -eliminazione)

È stata effettuata una rimozione degli zuccheri legati ai gruppi ossidrilici -OH di aminoacidi serina e treonina con lo scopo di determinare il tipo di legame degli

oligosaccaridi al "core" proteico delle glicoproteine. Per questo i vetrini sono stati trattati come per il post-embedding e, poi, incubati in 0,1N NaOH per 2hr. a 37°C (modificato da Egea *et al.*, 1989). In ogni caso il trattamento di β -eliminazione, veniva seguito dall'incubazione, come per il post-embedding al microscopio ottico a fluorescenza, con alcune delle lectine fluoresceinate (DBA, ConA alla concentrazione di 30 μ g/ml).

Il trattamento con la β -eliminazione in campioni marcati con ConA funziona come controllo positivo, dal momento che è stato ampiamente dimostrato (In: The lectins. Properties, Functions and Application in Biology and Medicine. Ed: Liener I.E., Sharon N. & Goldstein I.J.) che tale lectina si lega in modo specifico a gruppi saccaridici contenenti mannosio N-linked.



Figs. 1-11. Follicoli ovarici di *Podarcis muralis*

Fig. 1. Follicolo di 120 μ m di diametro. L'epitelio follicolare è costituito da un monostrato di cellule piccole. X 800.

Fig. 2. Follicolo di 160 μ m in diametro. L'epitelio si presenta pluristratificato e fanno la loro comparsa le cellule intermedie (CI). X 600.

Fig. 3. Follicolo previtellogenico di circa 1000 μ m in diametro. Nell'epitelio si riconoscono tre tipi di cellule: le piccole (Cp), al di sotto della lamina basale e in contatto con la zona pellucida, le intermedie (CI) e le piriformi (CP). Oo= ovocita; TC= cellule della teca. X 880.

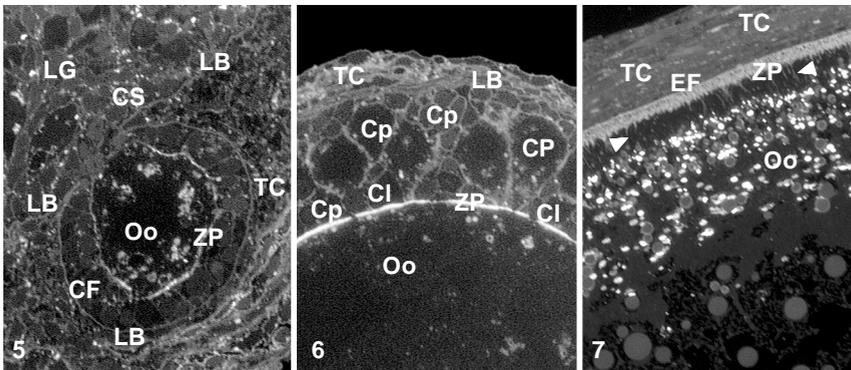
Fig. 4. Follicolo di 2100 μ m in diametro, vitellogenico. Nell'epitelio follicolare si ritrovano nuovamente solo cellule piccole, in seguito alla scomparsa per apoptosi delle cellule intermedie e piriformi. X 600.

Risultati e discussione

Le osservazioni sono state condotte nei follicoli in vari stadi di accrescimento partendo da follicoli primari con epitelio monostratificato e omeomorfo fino a follicoli vitellogenici.

Le osservazioni condotte nel follicolo di *L. muralis* hanno rilevato che i follicoli di 100 μm presentano un epitelio omeomorfo e monostratificato caratterizzato da sole cellule piccole (Fig. 1) Le prime cellule intermedie sono riscontrabili nei follicoli di 160 μm di diametro (Fig. 2); le cellule piriformi invece compaiono nei follicoli di 300-400 μm di diametro, che pertanto risultano caratterizzati da epitelio polimorfo e pluristratificato. Questo tipo di organizzazione si ritrova per tutta la fase previtellogenica (Fig. 3). Con l'inizio della vitellogenesi e con la progressiva scomparsa delle cellule piriformi, l'epitelio follicolare si ripresenta monostratificato e omeomorfo, con sole cellule piccole (follicoli >1800 μm) (Fig. 4).

In *Lacerta bilineata* il differenziamento delle cellule piriformi segue lo stesso pattern descritto in *L. muralis*. Le uniche differenze sono dovute al fatto che in *L. bilineata* il primo differenziamento delle piriformi si registra nei follicoli di 500 μm in



Figs. 5-7. Sezioni di *P. muralis* trattate con lectina WGA

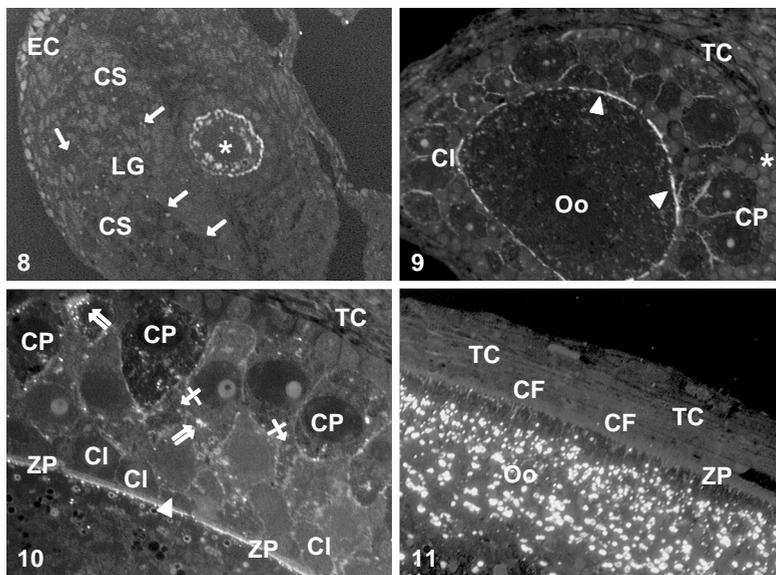
Fig. 5. I siti di legame della WGA sono evidenti nel citoplasma di alcune cellule germinali (frecche) e somatiche (SC) presenti nella lamina germinale (LG), ma anche a livello del citoplasma oocitario (Oo), della zona pellucida (ZP), delle cellule follicolari (CF) e della teca (TC) in un follicolo primario. BL0 lamina basale. X 880.

Fig. 6. Follicolo di 300 μm in diametro con cellule piriformi in via di differenziamento. I siti di legame sono presenti sulla superficie delle cellule piccole (Cp), intermedie (CI) e piriformi (CP), così come sulla zona pellucida (ZP), sulla lamina basale (BL), sulle cellule tecali (TC) e in vacuoli citoplasmatici dell'ovocita (Oo). X 880.

Fig. 7. Follicolo di circa 3000 μm in diametro con epitelio follicolare monostratificato. I siti di legame per la WGA sono evidenti su tutto l'epitelio follicolare (EF), sulla zona pellucida (ZP), sulla teca (TC), nelle cripte della superficie oocitaria (punte di freccia) dove avviene l'endocitosi della vitellogenina e all'interno dell'ovocita stesso (Oo). X 880.

diametro e la loro scomparsa in follicoli di c.ca 2500 μm .

L'uso di lectine fluoresceinate ha permesso di rilevare che il differenziamento delle cellule piriformi in entrambe le specie è accompagnato da una variazione nella distribuzione di glicoproteine di membrana con residui terminali di α -GalNAc. Delle lectine testate, infatti, mentre alcune (WGA, LCA, PSA e ConA) marcavano indistintamente tutti i vari costituenti dei follicoli in accrescimento (Figs. 5-7) ed altre (UEA-I, PNA, SBA, BPA, GSI-A4 e GSI-B4) non presentavano nessuna



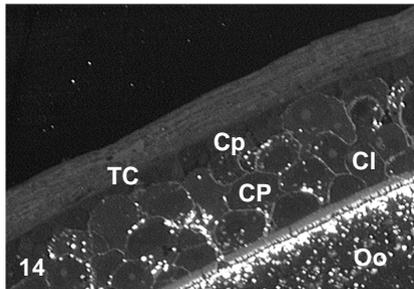
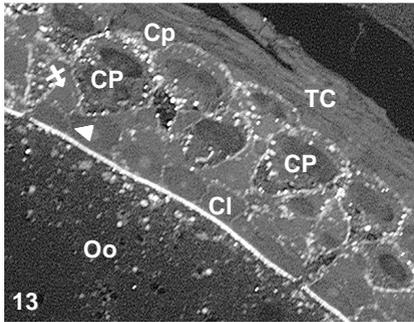
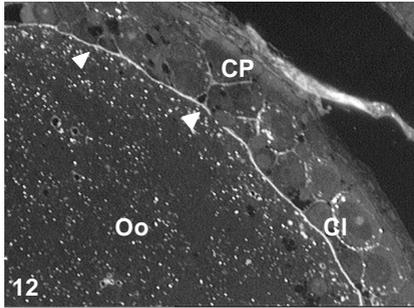
Figs. 8-11. Sezioni di *P. muralis* trattate con lectina DBA

Fig. 8. Sezione di ovario contenente la lamina germinale (LG) e un ovocita in diplotene circondato da un epitelio follicolare monostratificato (*). Non si evidenzia positività alla lectina né sui clusters di cellule germinali (freccie) né sulle cellule somatiche (SC) presenti nella lamina germinale; siti di legame sono invece presenti a livello del follicolo e sui nuclei dell'epitelio celomico (EC). X 440.

Fig. 9. Follicolo di 250 μm in diametro. Siti di legame per la lectina sono evidenti sulla superficie delle cellule piccole (punte di freccia) in contatto con l'ovocita (Oo), sulle cellule intermedie (CI) e sulle piriformi rotondeggianti (CP). Anche la zona pellucida (ZP) e i vacuoli citoplasmatici sono marcati. Nessun sito di legame si riscontra invece né sulle cellule piccole (*) situate sotto la lamina basale né sulla teca (TC). X 880.

Fig. 10. Follicolo di 1000 μm in diametro. I siti di legame per la DBA sono evidenti sulla superficie delle cellule piccole (punta di freccia) in contatto con l'ovocita, delle cellule intermedie (CI), sulle piriformi (CP), sulla zona pellucida (ZP) e in vacuoli citoplasmatici all'interno delle cellule follicolari (doppie frecce). Nessuna marcatura sulla teca (TC) e sulla superficie di contatto tra cellule piccole (freccie sbarrate) nello spessore dell'epitelio. X 1380.

Fig. 11. Follicolo vitellogenico di 3000 μm in diametro: si vedono siti di legame a livello del cortex ovocitario e dei vacuoli presenti nell'ooplasma (Oo). Le cellule follicolari (CF), la teca (TC) e la zona pellucida (ZP) non risultano più marcate. X 880.



Figs. 12-14. Follicoli ovarici di *Lacerta bilineata* trattati con la lectina DBA

Fig. 12. Follicolo di 250 µm in diametro. Si riscontrano siti di legame per la DBA sulla superficie di cellule piccole (punte di freccia), intermedie (CI) e piriformi (CP) rotondeggianti, così come sulla zona pellucida (ZP) e in vacuoli citoplasmatici dell'ovocita (Oo) e delle cellule intermedie e piriformi. X 880.

Fig. 13. Follicolo di 700 µm in diametro. La DBA marca le cellule piccole (punta di freccia) in contatto con l'ovocita, le cellule intermedie (CI) e le cellule piriformi (CP), e vacuoli citoplasmatici sia dell'ovocita (Oo) sia delle cellule follicolari. Non si trova marcatura sulla teca (TC), sulle cellule piccole in contatto con la lamina basale (Cp) e localizzate tra le piriformi (freccia sbarrata). CP= cellule piriformi; CI= cellule intermedie; ZP= zona pellucida. X 880.

Fig. 14. Follicolo di 1800 µm in diametro. Il pattern di marcatura risulta pressochè invariato, con una notevole positività nel cortex ovocitario e su tutto l'epitelio follicolare ad eccezione delle cellule piccole (Cp) al di sotto della lamina basale. TC= teca; CP= cellule piriformi; CI= cellule intermedie; Oo= ovocita. X 880.

affinità di legame per le differenti componenti del follicolo (dati non mostrati), la DBA ha mostrato invece un pattern di marcatura differente a seconda dello stadio follicolare esaminato (Figs. 8-11).

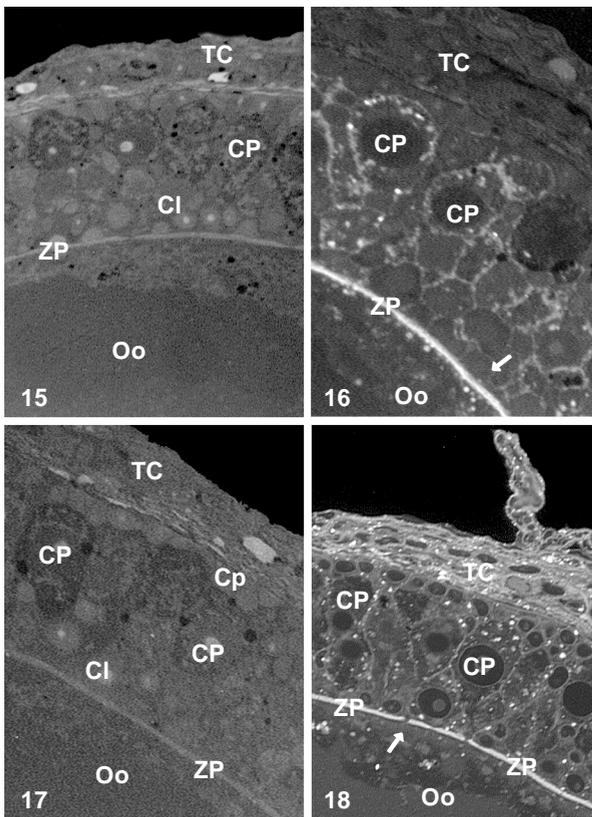
La positività alla DBA, una lectina che lega gruppi saccaridici terminali α -GalNAc, assente nelle cellule germinali non organizzate in follicoli, compare per la prima volta nei follicoli primari, sulla superficie di alcune cellule piccole ma soprattutto a livello della zona pellucida e all'interno dell'ovocita (Fig. 8). In follicoli di maggiori dimensioni (500 µm), la DBA si lega sulla superficie delle cellule piccole a contatto con l'ovocita, e delle cellule intermedie e delle prime piriformi, ancora rotondeggianti, che si vanno differenziando (Fig. 9). Nei follicoli di 500-900 µm la superficie e il citoplasma di tutte le piriformi, ormai completamente differenziate, risultano marcati (Fig. 10). Questo pattern di marcatura si mantiene per tutta la durata della fase previtellogena (follicoli fino a 2000 µm). Al momento della regressione delle cel-

lule intermedie e piriformi (follicoli di 1500-2000 μm), il legame della DBA sulla superficie cellulare diminuisce gradualmente, per scomparire del tutto alla fine della previtellogenesi. Nei follicoli vitellogenici, la positività alla DBA si ritrova principalmente nel citoplasma dell'ovocita, sui globuli di vitello in formazione, ma non sulla teca né sull'epitelio follicolare costituito da sole cellule piccole (Fig. 11).

È interessante notare che le cellule piccole prive di un contatto diretto con l'ovocita, situate o al di sotto della lamina basale o tra le cellule piriformi (Fig. 9, 10), non sono mai marcate dalla DBA.

In *Lacerta bilineata*, la distribuzione dei glicoconiugati specificamente riconosciuti dalla DBA, nei follicoli previtellogenici con piriformi in via di differenziamento o completamente differenziate, è paragonabile a quello descritto in *Podarcis muralis* (Figs. 12-14).

Dagli esperimenti di controllo effettuati in entrambe le specie, si è rilevato che il legame della DBA è specifico, dal momento che esso è completamente abolito preincubando la lectina con il suo zucchero aptenico (Fig. 15) e che il legame



Figs. 15-18. Controlli

Fig. 15. Follicolo di 1200 μm in diametro. La marcatura non è più presente sulle sezioni trattate con la lectina DBA preincubata con il suo zucchero aptenico D-GalNAc. Oo=ovocita; CP=cellule piriformi; TC=teca; ZP=zona pellucida. X 880.

Fig. 16. Follicolo di 1200 μm in diametro. Su sezioni trattate con metanolo-cloroformio per eliminare i lipidi di membrana non si riscontra nessuna variazione nel pattern di marcatura. Oo=ovocita; CP= cellule piriformi; TC= teca; ZP= zona pellucida; freccia= cellula piccola. X 880.

Fig. 17. Follicolo di 1200 μm in diametro. Nessuna marcatura con DBA è evidente dopo b-eliminazione. Oo=ovocita; CP=cellule piriformi; TC=teca; ZP=zona pellucida; Cp=cellula piccola. X 880.

Fig. 18. Follicolo di 1200 μm in diametro. In sezioni trattate con b-eliminazione la marcatura con la Con-A si mantiene intatta. Oo=ovocita; CP=cellule piriformi; TC=teca; ZP=zona pellucida; freccia=ponte intercellulare. X 880.

riguarda gruppi glucidici terminali di glicoproteine, poiché non si riscontrano variazioni di legame in seguito a trattamento del campione con cloroformio/metanolo, trattamento che è capace di estrarre i lipidi dalle membrane (Fig. 16). È stato infine messo in evidenza con il trattamento di β -eliminazione, che abolisce la marcatura della DBA (Fig. 17) su tutto l'epitelio follicolare, ma non quella dalla ConA (che lega zuccheri N-linked) (Fig. 18), che i gruppi saccaridici terminali di α -GalNAc, cui la DBA si lega, sono O-linked.

Conclusioni

Le osservazioni da noi condotte dimostrano che in *L. muralis* e *L. bilineata*, così come in altri Rettili squamati (Hubert, 1985; Andreuccetti, 1992), l'epitelio follicolare si modifica profondamente durante la fase previtellogena per la progressiva comparsa di tre tipi cellulari: le cellule piccole, le cellule intermedie e le cellule piriformi; la loro distribuzione spaziale e temporale suggerisce che, come in *P. sicula* (Filosa *et al.*, 1979), le piccole siano cellule staminali da cui si differenziano le piriformi. Da questo studio risulta infine che solo le cellule piccole destinate al differenziamento in cellule piriformi sono contraddistinte dalla comparsa sulla loro superficie di glicoproteine con catene terminali di α -GalNAc, O-linked, la cui presenza può favorire sia il contatto e/o la fusione tra la membrana delle cellule follicolari piccole e quella ovcitaria e sia il mantenimento dello stato differenziato delle cellule piriformi presenti nell'epitelio follicolare dei Rettili squamati.

Ringraziamenti

Lavoro finanziato dalla Regione Campania (P.O.P., 1999) e dal MURST ("Differenziamento ovcitario in vertebrati non mammiferi"). Si ringrazia il Sig. G. Falcone per l'elaborazione delle immagini fotografiche. Esemplari catturati con autorizzazione del 1/06/2000 n. SCN/2D/2000/9213 del Ministero dell'Ambiente.

Riassunto

Le osservazioni condotte in *Lacerta bilineata* e in *Podarcis muralis*, catturate nel Parco del Matese, dimostrano che il differenziamento delle cellule piriformi, un particolare tipo di cellule follicolari collegate all'ovocita mediante ponti intercellulari, segue il pattern tipico dei Rettili squamati. L'uso di dodici lectine fluoresceinate ha inoltre permesso di dimostrare che durante il loro differenziamento, che si verifica a partire dalle cellule piccole via cellule intermedie, le cellule piriformi espongono sulla loro superficie glicoproteine caratterizzate dalla presenza di residui saccaridici terminali di α -Gal NAc legati a molecole di ossigeno, che possono giocare un ruolo determinante sia nel garantire i rapporti tra cellule piriformi ed ovcita sia nel mantenere lo stato differenziato di tali cellule.

Bibliografia

- Andreuccetti P., Taddei C., Filosa S., 1978 - Intercellular bridges between follicles cells and oocyte during the differentiation of follicular epithelium in *Lacerta sicula* Raf. Cell Sci., 33: 341-350.
- Andreuccetti P., Limatola L., Ghiara G., 1979 - Secretory activity of pyriform cells during the oocyte growth in *Lacerta sicula* Raf. J. Submicrosc. Cytol. Pathol., 11: 369-377.
- Andreuccetti P., 1992 - An ultrastructural study of differentiation of pyriform cells and their contribution to oocyte growth in representative squamata. J. Morphol., 212: 1-11.
- Andreuccetti P., Famularo C., Gualtieri R., Prisco M., 2001 - Pyriform cell differentiation in *Podarcis sicula* is accompanied by the appearance of surface glycoproteins bearing α -GalNAc terminated chains. Anat. Rec., 263: 1-9.
- Bou-Resly M., 1974 - Ultrastructural studies on the intercellular bridges between the oocyte and follicle cells in the lizard *Acanthodactylus scutellatus* Hardy. Anat. Entwickl. Gesch., 143: 239-254.
- Egea G., Goldstein I. J., Roth J., 1989 - Light and electron microscopic detection of (3-Gal-b,1-4,GlucNAc-pl) sequences in asparagin-linked oligosaccharides with the *Datura stramonium* lectin. Histochem., 92: 515-522.
- Filosa S., 1973 - Biological and cytological aspects of the ovarian cycle in *Lacerta sicula* Raf. Mon. Zool. Ital., 7: 151-165.
- Filosa S., Taddei C., Andreuccetti P., 1979 - The differentiation and proliferation of follicle cells during oocyte growth in *Lacerta sicula*. J. Embryol. Exp. Morphol., 15: 297-316.
- Ghiara G., Limatola E., Filosa S., 1968 - Ultrastructural aspect of nutritive process in growing oocytes of lizard. Bocciarelli D. S. (ed). Electron Microscopy. Vol. 2 Rome. Tip. Poliglotta, pp. 331-332.
- Goldstein I. J., Poretz R. D., 1986 - Isolation, physicochemical characterization, and carbohydrate-binding specificity of lectins. In *The Lectins: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine*. Liener I. E., Sharon N. and Goldstein I. J. (eds.), pp. 35-247.
- Hubert J., 1976 - Etude ultrastructurale des cellules piriformes du follicle ovarien chez 5 saurien. Arch. Anat. Microscop., 65: 47-58.
- Hubert J., 1985 - Origin and development of oocytes. In: Gans, Billet, Maderson (eds.): *Biology of the Reptilia*. Development A. Vol. 14. NY; J. Wiley & Sons, pp. 41-74.
- Ibrahim M. M., Wilson I. B., 1989 - Light and electron microscope studies on ovarian follicles in the lizard *Chalcides ocellatus*. J. Zool. London, 218: 187-208.
- Klosterman L., 1987 - Ultrastructural and quantitative dynamics of the granulosa of ovarian follicles of the lizard *Gerrhonotus coeruleus* (Fam. Anguinae). J. Morphol., 192: 125-144.
- Laughran L. J., Larsen J. H., Schoeder P. C., 1981 - Ultrastructure of developing ovarian follicle and ovulation in the lizard *Anolis carolinensis* (Reptilia). Zoomorphology, 98: 191-208.
- Martinez-Menarguez J. A., Aviles M., Madrid J. F., Castels M. T., Balestra J., 1993 - Glycosilation in Golgi apparatus of early spermatidis of rat. A high resolution lectin

- cytochemical study. Eur. J. Cell Biol., 61: 21-33.
- Maxwell M. H., 1978 - Two rapid and simple methods used for the removal of resins from 1,0 mm thick epoxy sections. J. Microsc. Vol. 112, 2: 253-255.
- Mahajan-Miklos S., Cooley L., 1994 - Intercellular cytoplasm transport during *Drosophila* oogenesis. Dev. Biol., 165: 336-351.
- Motta C. M., Castriota Scanderberg M., Filosa S., Andreuccetti P., 1995 - Role of pyriform cells during the growth of oocytes in the lizard *Podarcis sicula*. J. Exp. Zool., 273: 247-256.
- Motta C. M., Filosa S., Andreuccetti P., 1996 - Regression of the epithelium in late previtellogenic follicles of *Podarcis sicula*: a case of apoptosis. J. Exp. Zool., 276: 233-241.
- Neaves W. B., 1971 - Intercellular bridges between follicle cells and the oocyte in the lizard *Anolis carolinensis*. Anat. Rec., 170: 285-302.
- Suzuki E., Sano A., Kuriki T., Miki T., 1993 - Separation and determination of phospholipids in plasma employing thin-layer chromatographic plate with concentration zone or solid phase extraction. Biol. Pharm. Bull., 16: 1, 77-80.
- Taddei C., 1972 - Significance of pyriform cells in ovarian follicle of *Lacerta sicula*. Exp. Cell Res., 72: 562-566.
- Taddei C., Andreuccetti P., 1990 - Structural modification of the nuclear components during lizard oogenesis in relation to the differentiation of the follicular epithelium. Cell Differ. Dev., 29: 205-215.