Atti Accademia Nazionale dei Lincei

Classe Scienze Fisiche Matematiche Naturali

Rendiconti

Sergio Filoni, Maria Vittoria Donatelli

Azione della tiroxina su code di larve di Triturus taeniatus coltivate in vitro

Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. **42** (1967), n.2, p. 273–279.

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1967_8_42_2_273_0>

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

Articolo digitalizzato nel quadro del programma bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica) SIMAI & UMI
http://www.bdim.eu/

Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali. Rendiconti, Accademia Nazionale dei Lincei, 1967.

Biologia. — *Azione della tiroxina su code di larve di* Triturus taeniatus *coltivate* in vitro (*). Nota di SERGIO FILONI e MARIA VITTORIA DONATELLI, presentata (**) dal Socio A. STEFANELLI.

SUMMARY. — The present research was intended to test if tyroxin would exert any toxic effect on tissue explants cultivated *in vitro*. To this purpose tails from larval newts (*Triturus taeniatus*) at the stage 59–60, according to Glückshon, were treated with tyroxin Roche diluted 1 : 1.000.000 during 3–6–9 days of culture.

The control tails were left to grow in a tyroxin-lacking medium for the same period of time.

The results suggested that tyroxin does not have any toxic effect on the tissue explants; in fact it does not induce any degeneration in the tails cultivated *in vitro*. Extensive histological changes of the caudal tissues, absolutely comparable with those obtained during normal metamorphosis could be observed. No one of these changes was observed in the tails grown in a tyroxin-lacking medium.

INTRODUZIONE.

Fin dalle prime ricerche di Gudernatsch [1] e Cotronei [2], numerosissimi sono i lavori concernenti lo studio dei meccanismi che influenzano i processi della metamorfosi negli Anfibi. Una vasta rassegna bibliografica sull'argomento è stata riportata da Baffoni [3] e da Etkin [4].

La grande attività della tiroxina sulla metamorfosi, quando venga dissolta nel mezzo esterno o inoculata in larve di Anfibi, è ormai accertata (Romeis [5]; Kosmin e Resnitsckenko [6]; Allen [7]; Etkin [8] e molti altri) e perciò l'influenza della tiroide sulla metamorfosi deve considerarsi come il risultato della secrezione di tiroxina.

Un problema di grande importanza era di stabilire se l'azione dell'ormone tiroideo nell'indurre trasformazioni metamorfiche fosse diretta o indiretta. L'argomento è stato affrontato sia con trapianti eterotopici, sia trapiantando i tessuti che si trasformano o riassorbono durante la metamorfosi tra animali metamorfosanti in tempi diversi (Kornfeld [9]; Uhlenhuth [10]; Sembrat [11]; Helff [12, 13, 14]; Helff e Clausen [15]; Helff [16]; Schwind [17]; Fukai [18]; Blacher, Liosner e Worozowa [19]). Tuttavia, questi metodi sperimentali non erano in grado di escludere un'eventuale azione induttrice esercitata dai tessuti stessi dell'ospite, anch'essi in via di trasformazione metamorfica.

Notevoli progressi in questo campo si sono ottenuti mediante impianti di frammenti di agar impregnato di ormone tiroideo (Hartwig [20]) o con

(*) Ricerca eseguita nel Centro di Neuroembriologia del C.N.R., presso l'Istituto di Anatomia Comparata « G. B. Grassi » dell'Università di Roma.

(**) Nella seduta dell'11 febbraio 1967.

pellets di colesterolo–tiroxina (Kaltenbach [21, 22, 23, 24, 25]; Weiss e Rossetti [26]; Pesetsky e Kollors [27]; Kollros [28] per indurre cambiamenti locali. Ma anche questa tecnica talvolta non esclude possibili effetti indiretti nella stessa area locale (Etkin [4]).

Risultati convincenti si sono ottenuti nel nostro Istituto grazie al metodo comparativo (Baffoni e Catte [29, 30]; Baffoni [31]). Confrontando le modificazioni subite dalle cellule di Mauthner fra larve di Anuri e Urodeli in seguito a trattamento con tiroxina, gli Autori hanno chiaramente dimostrato che il neurone mauthneriano non è direttamente suscettibile all'ormone tiroideo.

Recentemente, l'azione della tiroxina è stata studiata su tessuti espiantati *in vitro* (Weber [32]; Shaffer [33]). Tuttavia, come risulta dalla ricerca bibliografica da noi eseguita, l'effetto dell'ormone tiroideo *in vitro* è stato studiato solo su tessuti che durante la metamorfosi subiscono un processo involutivo. In particolare Weber [32], riuscì ad ottenere l'involuzione di code di *Xenopus laevis* trattate *in vitro* con tiroxina, ma osservò che il riassorbimento della pinna delle code isolate avveniva molto più precocemente che in girini esposti alle stesse concentrazioni di tiroxina.

Era pertanto lecito sospettare che i fenomeni involutivi fossero dovuti anche ad un qualche effetto tossico della tiroxina *in vitro*. Abbiamo perciò ritenuto opportuno verificare l'azione dell'ormone tiroideo su code espiantate di un Anfibio Urodelo (*Triturus taeniatus*) in cui la metamorfosi non porta alla distruzione dell'intera coda, ma ad una trasformazione della sua istologia.

Materiale e metodo.

Sono stati eseguiti espianti di code di larve di *Triturus taeniatus* allo stadio 59–60 (sec. Glücksohn [34]).

Allo scopo di ottenere le migliori condizioni di ossigenazione, le codine espiantate sono state coltivate su tessuto di acetato di cellulosa galleggiante nel mezzo di cultura secondo la tecnica di Shaffer [35].

Il mezzo di cultura era costituito da soluzione fisiologica di Niu–Twitty addizionata e solfodiazina 0,05%, a dicristicin 100 unità per cc. ed a siero di vitello giovane, scaldato per dieci minuti a 60° C, al 3%.

Sono stati eseguiti 30 espianti. Quindici codine venivano usate come controllo; al mezzo di cultura delle altre 15, al terzo giorno veniva aggiunta tiroxina Roche nella concentrazione di 1 : 1.000.000.

Sia le code trattate che quelle di controllo sono state fissate dopo 6, 9, 12 giorni di cultura, in Bouin, tagliate secondo il piano sagittale e trasverso a 7 μ di spessore e colorate con emallume e eosina.

Contemporaneamente alla cultura *in vitro*, individui di *Triturus taeniatus* allo stadio 59–60 sono stati trattati con tiroxina 1 : 1.000.000 e fissati nove giorni dopo il trattamento.

DESCRIZIONE DEI RISULTATI.

Aspetto morfologico ed istologico di code di Triturus taeniatus *allo stadio 59–60 dopo 6–9–12 giorni di cultura in mezzo privo di tiroxina.*

Osservazioni macroscopiche. – L'aspetto delle code coltivate in soluzione fisiologica per 6–9–12 giorni non differiva, in generale, da quello presentato al momento dell'operazione ad esclusione di una maggior trasparenza della muscolatura (Tav. I, fig. 1).

Nel punto prossimale alla zona di amputazione si notava la formazione di un piccolo rigenerato.

In seguito a stimolazione diretta, le codine espiantate rispondevano mediante contrazioni, dimostrando così la loro vitalità.

Osservazioni miscroscopiche. – Sia le code espiantate per 6 giorni, che quelle coltivate per un periodo più lungo (9–12 giorni) mostrano un aspetto istologico perfettamente sovrapponibile.

L'istologia delle code coltivate *in vitro* non differisce sostanzialmente da quella riscontrata in code di individui normali allo stesso stadio (Tav. II, fig. 5). In particolare l'epidermide appare bistratificata, limitata all'esterno da una cuticola continua. Interposte fra i due piani cellulari si trovano le grosse cellule del Leydig. Al di sotto dell'epidermide, il derma è molto sottile, con numerosi cromatofori. Sono assenti le ghiandole pluricellulari. Procedendo verso l'interno, si osserva un sottile strato di cellule mesenchimali e quindi la muscolatura ben conservata.

Le vertebre hanno l'arco neurale ed emale cartilaginei (Tav. II, fig. 7).

Di particolare interesse è stata l'analisi istologica del rigenerato nel punto prossimale alla zona di asportazione. L'epidermide è ben rigenerata, la notocorda si differenzia normalmente sebbene sia considerevolmente ridotta in misura. Anche a carico del midollo spinale avviene un processo rigenerativo notevole, che porta alla costituzione di un midollino neoformato presentante all'estremità una dilatazione ampollare. La dimostrazione di un processo rigenerativo *in vitro* era già stata data da Stefanelli e coll. [36] su code isolate di *Hyla arborea*.

Code di Triturus taeniatus *allo stadio 59–60 dopo 3–6–9 giorni di cultura in mezzo con tiroxina 1 : 1.000.000.*

Osservazioni macroscopiche. – Modificazioni morfologiche apprezzabili macroscopicamente, sono chiaramente visibili solo in code coltivate in mezzo di cultura con tiroxina dopo 6–9 giorni. Esse mostrano una muscolatura più ispessita di quella dei controlli ed inoltre una notevole riduzione della pinna dorsale e ventrale (Tav. I, figg. 2, 4). Anche in code trattate con tiroxina si è notato un notevole processo rigenerativo in corrispondenza della regione di taglio.

Osservazioni microscopiche. – *Dopo 3 giorni di cultura*: L'istologia delle code trattate non differisce sostanzialmente da quella di una coda di controllo se si fa esclusione dell'epidermide. Questa, pur essendo ancora bistratificata, presenta un raggrinzimento della cuticola che in alcuni punti si mostra distaccata dallo strato esterno dell'epidermide.

Dopo 6 giorni di cultura: Si osserva una riduzione notevole delle pinne codali, soprattutto di quella ventrale (Tav. I, fig. 4).

Le maggiori modificazioni istologiche sono a carico dell'epidermide che non ha più un aspetto larvale. Essa è infatti pluristratificata con cuticola nettamente distaccata, con cellule di Leydig notevolmente ridotte sia in numero che in dimensioni (Tav. II, fig. 6).

Dopo 9 giorni di cultura: Le modificazioni istologiche sono assai notevoli e riguardano sprattutto la pelle e la colonna vertebrale.

La pelle: l'epidermide risulta pluristratificata, priva di cuticola, con rarissime cellule di Leydig; le poche cellule di Leydig presenti sono ridotte in dimensioni. Al di sotto dello strato epidermico, il derma più ispessito presenta numerosi cromatofori specie in corrispondenza delle prime dorsali e ventrali atrofizzate. In questa regione l'epidermide appare costituita da un numero di strati notevolmente superiore a quello riscontrato nella pelle che ricopre la muscolatura della coda.

Le vertebre: nella maggioranza dei casi, il processo di ossificazione interessa non solo il corpo vertebrale, ma anche l'arco neurale ed emale (Tav. II, fig. 8). I corpi vertebrali sono fra loro separati da un anello cartilagineo intervertebrale.

Il midollo spinale e la muscolatura sono ben conservati.

Code di larve di Triturus taeniatus *allo stadio 59–60 dopo 9 giorni di trattamento con tiroxina 1 : 1.000.000.*

La coda presenta una muscolatura più ispessita e le pinne dorsale e ventrale sono quasi completamente atrofizzate. La loro atrofia è nettamente superiore a quella presentata dalle code trattate *in vitro* per lo stesso periodo di tempo. L'epidermide è pluristratificata e priva di cuticola. Le cellule di Leydig sono pressoché assenti, comunque volumetricamente ridotte, nell'epidermide si può distinguere lo strato corneo e lo strato malpighiano. Nel derma si sono osservate numerose ghiandole pluricellulari. Le vertebre sono completamente ossificate.

Discussione.

I risultati ottenuti nella presenta ricerca, da un lato dimostrano che l'ormone tiroideo ha un effetto diretto nell'indurre trasformazioni istologiche dei tessuti codali degli Anfibi Urodeli e dall'altro escludono la sospettata azione tossica della tiroxina sui tessuti espiantati.

Infatti, al contrario di quanto avviene per la coda degli Anuri trattata *in vitro* con tiroxina (Weber [32]), la coda degli Urodeli non va incontro a

degenerazioni (se si esclude il riassorbimento delle pinne codali), ma subisce profonde trasformazioni istologiche in tutto simili a quelle che si ottengono nella metamorfosi normale.

Oltre al parziale assorbimento delle pinne codali, sono risultate particolarmente interessanti le modificazioni metamorfiche a carico della pelle e della colonna vertebrale.

L'epidermide risulta pluristratificata, priva di cuticola, con rarissime cellule di Leydig, il derma più ispessito, le vertebre in via di ossificazione. L'influenza dell'ormone tiroideo sul processo di ossificazione è nota. Già Terry [37] aveva osservato che in seguito a tiroidectomia sia l'ossificazione che la crescita delle ossa degli arti in *Rana pipiens* era fortemente ritardata. Kaltembach [22] mediante impianti di pellets di colesterolo–tiroxina in arti posteriori di girini di *Rana pipiens*, ottenne l'ossificazione e l'accrescimento dell'arto. Risultati analoghi sono stati ottenuti da Kuhn e Hammer [38] in larve di *Salamandra*, *Ambystoma* e *Xenopus*.

I risultati da noi constatati dimostrano che la tiroxina influenza il processo di ossificazione anche *in vitro*.

Come appare dai dati riportati, è evidente che l'effetto della tiroxina sui tessuti codali è più marcato *in vivo* che *in vitro*. Al contrario Weber [32] notò che il riassorbimento delle pinne codali dello Xenopus sotto l'effetto della tiroxina era molto più rapido *in vitro* che *in vivo*.

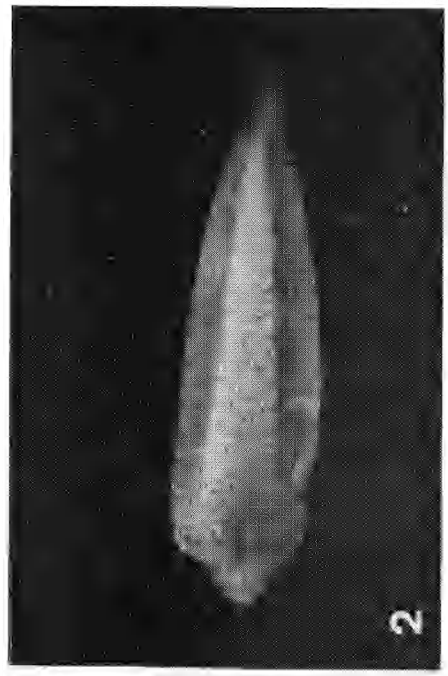
Per spiegare l'apparente discordanza bisogna considerare che in cultura, mancando l'apporto di sangue, viene seriamente compromesso l'assorbimento dell'ormone che può penetrare solo per diffusione dall'esterno verso l'interno. Da ciò si comprende come in cultura le modificazioni metamorfiche siano più modeste e più lente, soprattutto per i tessuti più interni. D'altra parte, l'assenza di sangue, se non consente un'uniforme distribuzione dell'ormone, facilita i processi involutivi poiché favorisce l'accumulo di sostanze tossiche, dovuto alla mancata eliminazione delle cellule in via di degradazione. Riteniamo che su queste basi possa interpretarsi la differenza nell'intensità d'azione della tiroxina *in vitro*, tra strutture in via di riassorbimento e strutture in via di trasformazione.

È opportuno sottolineare che le trasformazioni metamorfiche da noi constatate *in vitro* sono state ottenute ad una temperatura di 18° C. Infatti è noto che gli effetti della tiroxina sulla metamorfosi sono strettamente dipendenti dalla temperatura alla quale viene eseguito il trattamento (Hartwig [39] e molti altri).

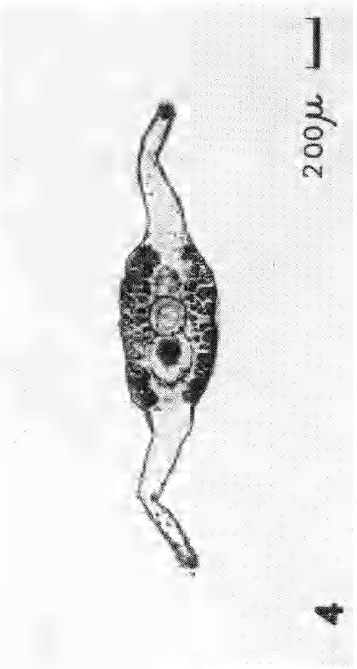
In conclusione, i risultati ottenuti in questa ricerca, escludendo una eventuale azione tossica della tiroxina *in vitro*, mettono in evidenza la validità della tecnica di cultura degli organi sensibili all'ormone tiroideo per far luce su alcuni problemi, ancora aperti, sulla azione diretta e indiretta della tiroxina.

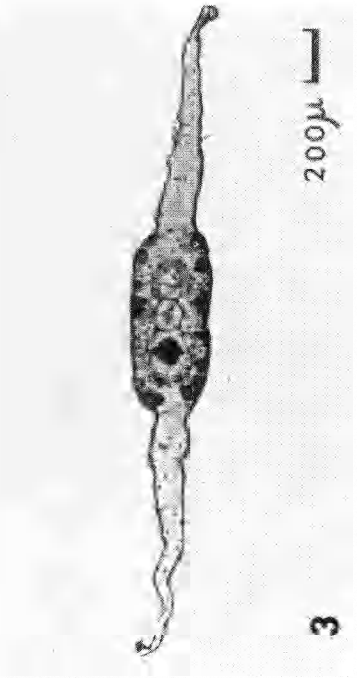
BIBLIOGRAFIA.

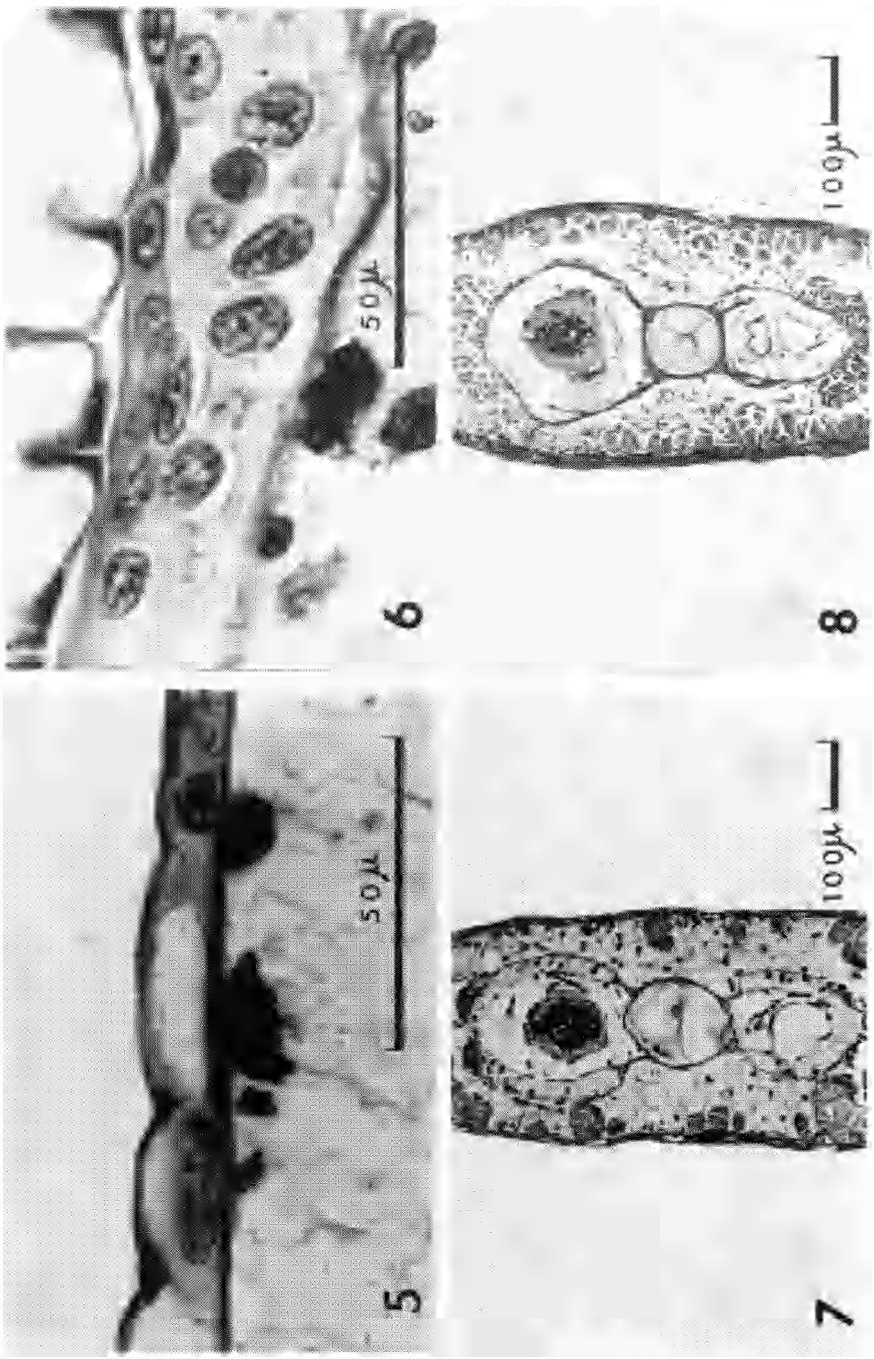
[1] J. F. GUDERNATSCH, « Arch. Entw. mechan. », *35*, 457 (1912).
[2] G. COTRONEI, « Bios. », *2*, 27 (1913).
[3] G. M. BAFFONI, « Riv. Biol. », *53*, 293 (1960).
[4] W. ETKIN, in *Physiology of the Amphibia*. Academic press, N.Y.–London, p. 427 (1964).
[5] B. ROMEIS, « Biochem. Zeitsch. », *141*, 121 (1923).
[6] N. P. KOSMIN e M. S. RESNITSCHENKO (Trans. Lab. Exp. Biol. Zoopark. Moscow. », *3*, 1 (1927).
[7] B. M. ALLEN, « Anat. Rec. », *54*, 45 (1932).
[8] W. ETKIN, « J. Exp. Zool. », *71*, 317 (1935).
[9] W. KORNFELD, « Arch. Entw. mechan. », *40*, 369 (1914).
[10] E. UHLENHUTH, « J. Exp. Zool. », *24*, 237 (1917).
[11] K. SEMBRAT, « Compt. Rend. Soc. Biol. », *90*, 894 (1924).
[12] O. M. HELFF, « J. Exp. Zool. », *45*, 1 (1926).
[13] O. M. HELFF, « Physiol. Zool. », *1*, 463 (1928).
[14] O. M, HELFF, « Physiol. Zool. », *2*, 334 (1929).
[15] O. M. HELFF e H. J. CLAUSEN, « Physiol. Zool. », *2*, 575 (1929).
[16] O. M. HELFF, « Biol. Bull. », *60*, 11 (1931 a).
[17] J. SCHWIND, « J. Exp. Zool. », *66*, 1 (1933).
[18] T. FUKAI, « Folia Anat. Jap. », *12*, 159 (1934).
[19] L. J. BLACHER, D. LIOSNER e M. WORONZOWA, « Bull. Acad. Polonaise Sc. et Let. », *B 2*, 325 (1934).
[20] H. HARTWIG, « Biol. Zentralbl., », *60*, 473 (1940).
[21] J. C. KALTENBACH, « Anat. Rec. », *103*, 544 (1949).
[22] J. C. KALTENBACH, « J. Exp. Zool. », *122*, 21 (1953 a).
[23] J. C. KALTENBACH, « J. Exp. Zool. », *122*, 41 (1953 b).
[24] J. C. KALTENBACH, « J. Exp. Zool. », *122*, 449 (1953 c).
[25] J. C, KALTENBACH, « J. Exp. Zool. », *140*, 1 (1959 b).
[26] P. WEISS e F. ROSSETTI, « Proc. Natl. Acad. Sc. U. S. », *37*, 540 (1951).
[27] I. PESETSKY e J. KOLLROS, « Exp. Cell. Res. », *11*, 477 (1956).
[28] J. KOLLROS, « Science », *128*, 1505 (1958).
[29] G. M. BAFFONI e G. CATTE, « Rend. Acc. Naz. Lincei », ser. VIII, *9*, 282 (1950).
[30] G. M. BAFFONI e G. CATTE, « Riv. Biol. », *43*, 373 (1951).
[31] G. M. BAFFONI, « Rend. Acc. Naz. Lincei », ser. VIII, *14*, 138 (1953).
[32] R. WEBER, « Experientia », *18*, 84 (1962).
[33] B. M. SHAFFER, « J. Emb. Exp. Morph. », *11*, 77 (1963).
[34] S. GLÜCKSOHN, « Arch. Entw. Organ. », *125*, 341 (1931).
[35] B. M. SHAFFER, « Exp. Cell. Res. », *11*, 244 (1956).
[36] A. STEFANELLI, G. THERMES e R. MASSIDA, « Rend. Sem. Fac. Sc. Univ. Cagliari », *20*, 1 (1950).
[37] G. S. TERRY, « J. Exp. Zool. », *24*, 567 (1918).
[38] O. KUHN e H. O. HAMMER, « Experientia », *12*, 231 (1956).
[39] H. HARTWIG, « Arch. Entw. mechan. », *134*, 562 (1936).


2

1


200μ
4


200μ
3


50 µ
6
100 µ
8
50 µ
5
100 µ
7

SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE I E II

TAVOLA I.

Fig. 1. – Coda di una larva di *Triturus taeniatus* allo stadio 59–60 (sec. Glücksohn) dopo 9 giorni di cultura in mezzo privo di tiroxina.

Fig. 2 – Coda di una larva di *Triturus taeniatus* allo stadio 59–60 dopo 6 giorni di cultura in mezzo contenente tiroxina 1 : 1000.000.

Fig. 3. – Sezione trasversale della coda della fig. 1.

Fig. 4. – Sezione trasversale della coda della fig. 2.

TAVOLA II.

Fig. 5. – Particolare di una coda di *Triturus taeniatus* allo stadio 59–60 (sec. Glücksohn) dopo 9 giorni di cultura in mezzo privo di tiroxina. Epidermide tipicamente larvale con grosse cellule di Leydig e limitata all'esterno da una cuticola continua.

Fig. 6. – Particolare di una coda di *Triturus taeniatus* allo stadio 59–60 dopo 6 giorni di cultura in mezzo contenente tiroxina 1 : 1000.000. Epidermide pluristratificata con cuticola distaccata.

Fig. 7. – Particolare di una coda di *Triturus taeniatus* allo stadio 59–60 dopo 12 giorni di cultura in mezzo privo di tiroxina. Arco neurale ed emale cartilaginei.

Fig. 8. – Particolare di una coda di *Triturus taeniatus* allo stadio 59–60 dopo 9 giorni di cultura in mezzo contenente tiroxina 1 : 1000.000. Vertebra ossificata.