
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

GIORGIO M. BAFFONI

**Effetti della colchicina e della tiroxina sulla
localizzazione delle mitosi nel neurasse in sviluppo
degli Anfi anuri**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 48 (1970), n.4, p. 463–468.*
Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1970_8_48_4_463_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/>

SEZIONE III

(Botanica, zoologia, fisiologia e patologia)

Biologia. — *Effetti della colchicina e della tiroxina sulla localizzazione delle mitosi nel neurasse in sviluppo degli Anfibi anuri*^(*).
Nota di GIORGIO M. BAFFONI, presentata^(**) dal Socio A. STEFANELLI.

SUMMARY. — After administration of colchicine and thyroxine to young toad tadpoles, an increase of the extraventricular mitoses in the CNS is seen: it means that both drugs affect the ventricular migration of dividing cells. The increase of the extraventricular mitoses being independent of the mitotic ratio and of the nervous differentiation, it is inferred that the ventricular migration in the developing nervous system is produced by the modification of the cytoplasmic viscosity, *i.e.* by intrinsic cellular events.

In una precedente Nota [1] ho verificato che nel sistema nervoso centrale degli Anfibi in sviluppo le mitosi extraventricolari (o subependimali) sono eventi rari, ma costanti, i quali non modificano la loro frequenza percentuale fino alla metamorfosi; se ne è dedotto che il progressivo differenziamento del tessuto nervoso e le variazioni dell'attività mitotica nei singoli stadi di sviluppo esaminati non ostacolano la migrazione verso il ventricolo delle cellule in procinto di dividersi; è stato anche visto che la frequenza delle mitosi extraventricolari diversifica tra le varie specie di Anfibi (da 3,5 a 6 %) indipendentemente da affinità filetiche o ecologiche.

In questa Nota espongo i risultati ottenuti da tentativi intesi a modificare la frequenza delle mitosi extraventricolari, nell'intento di chiarire il significato della migrazione ventricolare; tali risultati sono stati ottenuti per effetto di trattamenti con un alcaloide e con un ormone.

L'alcaloide è stato scelto poiché, da alcuni spunti bibliografici, risulta che la colchicina, somministrata ad animali in sviluppo, provoca un aumento di mitosi tra le cellule del grigio mantellare (Watterson *et al.* nel Pollo [2], Shell nella Rana [3]) e che la massima accentuazione del fenomeno si verifica alla quarta ora del trattamento (Bryans [4] e Wenger *et al.* [5] nel Ratto). L'ormone tiroideo è stato scelto poiché in precedenti osservazioni, condotte per analizzare l'influenza della tiroxina sull'attività proliferativa del tessuto nervoso, ho verificato che: «le mitosi extraventricolari aumentano già al secondo giorno di trattamento e divengono progressivamente più numerose

(*) Lavoro eseguito nell'Istituto di Anatomia comparata dell'Università di Modena, Via Berengario 14, 41100-Modena.

(**) Nella seduta dell'11 aprile 1970.

fino al termine dell'esperienza... , quando la densità mitotica dell'epitelio ventricolare declina » [6] (p. 265).

Da uova deposte da una femmina di rospo (*Bufo bufo* L.) ho separato due lotti di girini all'inizio del periodo larvale (a stadio I sec. Rossi [7]); uno di essi è stato trattato con colchicina *Merk* diluita ($5 \cdot 10^{-4}$) nel mezzo di cultura; dopo quattro ore gli animali trattati ed i controlli sono stati fissati in liquido di Sanfelice; inclusi in celloidina-paraffina, essi sono stati affettati in serie trasversali a 7μ di spessore e quindi colorati con emallume di Mayer ed eosina ⁽¹⁾. Dopo aver riscontrato che le frequenze delle mitosi extraventricolari dei controlli erano in buon accordo con quelle verificate nella precedente Nota allo stesso stadio [1] e che quella dei singoli esemplari del lotto trattato presentano oscillazioni entro limiti accettabili (± 3 in campioni di 50 mitosi), ho scelto un animale per ogni lotto e su di esso ho eseguito un accurato esame del midollo spinale. La localizzazione delle mitosi negli animali trattati con tiroxina è stata accertata utilizzando le serie istologiche già in mio possesso (girini di rospo trattati a stadio I con tiroxina *Roche* $5 \cdot 10^{-7}$ e fissati in liquido di Sanfelice nei cinque giorni successivi; sezionati a 7μ di spessore e colorati in emallume-eosina o trattati con il metodo di Feulgen); rimando ai precedenti lavori per maggiori ragguagli tecnici [6, 8, 9]; in questo caso i computi sono stati eseguiti sull'intero neurasse, escludendo però di proposito le zone dell'encefalo oblique o parallele al piano di taglio (norma trasversale).

I risultati confermano che il trattamento con colchicina in Anfibii influenza le mitosi extraventricolari del midollo spinale, la cui frequenza risulta più che triplicata dopo quattro ore di trattamento; l'elaborazione statistica dei dati dimostra che l'aumento di mitosi extraventricolari è significativo. È noto che la colchicina è un veleno mitotico che blocca le cellule in divisione allo stadio di metafase; pertanto la prima ipotesi che sorge è quella che riterrebbe le mitosi extraventricolari effetto dell'affollamento delle mitosi ventricolari; ciò impedirebbe ad un numero sempre maggiore di cellule in divisione di raggiungere l'epitelio ventricolare. Questa supposizione, però, è in contrasto con l'evidenza morfologica: ad esempio nel midollo spinale degli animali trattati l'affollamento di mitosi ventricolari non risulta molto maggiore (fig. 2) che nei controlli (fig. 1) e comunque esso è tale da escludere l'ipotesi di un impedimento per la migrazione ventricolare; inoltre recenti osservazioni sulla localizzazione delle mitosi nel neurasse in sviluppo degli Anfibii hanno documentato che la frequenza delle mitosi extraventricolari non è influenzata dalle variazioni delle densità mitotiche [1] neppure in zone di massima densità, come nell'abbozzo cerebellare di Rospo al termine del periodo larvale. Ne consegue che bisogna ricorrere ad un'altra ipotesi. Ricordo in proposito che alcuni dati ottenuti da culture di tessuti *in vitro* (Stålfelt [10], Vasiliev *et al.* [11]) dimostrano che la colchicina rallenta la motilità cellulare e che ciò si verifica a causa dell'aumento della viscosità citoplasmatica (Savell [12]),

(4) Ringrazio vivamente il dott. G. Nubile per l'aiuto prezioso.

nonostante sia stato verificato di recente che l'alcaloide provoca la degenerazione di microtubuli citoplasmatici e desmosomiali, la quale alla lunga conduce alla dissociazione del tubo neurale (Handel [13]). Pertanto alla luce delle attuali cognizioni l'ipotesi più soddisfacente è quella che interpreta l'aumento delle mitosi extraventricolari prodotto dalla colchicina come dovuto al rallentamento della migrazione ventricolare per effetto delle modificazioni di viscosità del citoplasma cellulare.

TABELLA I.

	Mitosi ventricolari	Mitosi extra ventricolari	Frequenza		Diff. σ_D	P.
			%	σ		
<i>Colchicina:</i>						
trattati	400	100	20	$\pm 1,8$	14 $\pm 2,1$	> 0,01
controlli (st. I)	470	30	6	$\pm 1,0$		
<i>Tiroxina:</i>						
al 3° giorno	351	46	12	$\pm 1,4$	6 $\pm 1,8$	> 0,01
al 5° giorno	460	147	24	$\pm 1,7$	12 $\pm 2,2$	> 0,01
controlli (st. XII)	682	40	5,8	$\pm 0,9$	18,3 $\pm 1,9$	> 0,01

Il trattamento con forti dosi di tiroxina provoca un aumento delle mitosi extraventricolari; i risultati ottenuti (ved. Tabella I) precisano che dopo tre giorni dall'inizio del trattamento con ormone la frequenza delle mitosi extraventricolari è raddoppiata (12 %) rispetto ai controlli (6 %) e che al termine dell'esperienza (al quinto giorno) essa è ulteriormente duplicata (24 %) divenendo quadrupla rispetto ai controlli sia a pari età (6 %) che a stadio di sviluppo simile (5,8 % a st. XII). L'elaborazione statistica dei dati dimostra che l'aumento percentuale delle mitosi extraventricolari diviene significativo al terzo giorno del trattamento, quando è raggiunto l'acme della attività mitotica; un ulteriore aumento significativo di mitosi extraventricolari si verifica tra il terzo e quinto giorno del trattamento, ma quando l'attività mitotica nel sistema nervoso degli animali trattati con ormone è in declino [6, 9]. Questi risultati confermano le precedenti osservazioni [6] basate su impressioni visive. Giova ribadire che l'aumento di mitosi extraventricolari al quinto giorno, quando l'attività mitotica è in declino, conferma l'indipendenza delle frequenze di mitosi extraventricolari dalle variazioni di densità mitotica [1]. L'esame morfologico del midollo spinale negli animali al termine dell'esperienza (quinto giorno), inoltre, mette in evidenza che, a differenza dei controlli, una gran parte delle mitosi extraventricolari (circa il 30 %) è localizzata verso

la superficie del grigio mantellare (fig. 3), specie in corrispondenza della piastra alare (fig. 4). Inoltre in questa sede sono presenti, con una certa regolarità, mitosi di dimensioni inferiori ($6,5 \mu$ di diametro) a quelle ventricolari (8μ); quest'ultima osservazione potrebbe confermare l'ipotesi di Pesetsky [14] secondo la quale l'ormone tiroideo all'epoca della metamorfosi stimolerebbe la proliferazione ependimo-gliare; va però tenuto presente che negli Anuri metamorfosati continuano a formarsi nuove cellule nervose, com'è stato dimostrato dal tardivo differenziamento dei neuroni del V paio di nervi cranici (Kollros e McMurray [15]) e del cervelletto [16], e dalla persistenza di mitosi di dimensioni normali nell'epitelio ventricolare degli animali già metamorfosati [17].

L'interpretazione dell'aumento di mitosi extraventricolari per effetto dell'ormone tiroideo potrebbe essere individuata nel notorio stimolo del differenziamento nervoso che si verifica in tutti i Vertebrati [18]: in tal caso la migrazione ventricolare delle cellule nervose in divisione sarebbe ostacolata dallo sviluppo del neuropilo, dei desmosomi e delle sinapsi. Questa supposizione, però, non risulta verosimile poiché il differenziamento del midollo spinale degli animali al termine del trattamento (fig. 3) risulta inferiore a quello dei controlli in metamorfosi (fig. 5), nei quali (va sottolineato) la migrazione ventricolare continua con la frequenza che aveva all'inizio del periodo larvale (ved. Tabella I). I dati fisiologici sulla metamorfosi non portano lumi in merito, poiché trattano delle modificazioni enzimatiche generali o di quelle legate al cambiamento del tipo di alimentazione, di catabolismo azotato e di pigmento visivo [18, 19]. Il controllo dell'ormone tiroideo sul metabolismo idrico degli Anfibi metamorfosati, verificato da Matty e Green [20], è un fenomeno variabile che può mancare [21], comunque non si sa se esso sia mediato da ormoni corticosteroidi [22] o ipofisari [23]. I risultati ottenuti sulle culture *in vitro* non accennano a modificazioni della motilità cellulare per effetto della tiroxina [24], ma segnalano il rallentamento delle fasi cariocinetiche (Haam e Cappel [24]); ritengo che questo rallentamento può spiegare l'aumento di frequenza delle mitosi extraventricolari solo se si ammetta che sia accompagnato da diminuzione della motilità. La conferma di tale supposizione emerge anche da una serie di considerazioni morfologiche. Va infatti tenuto presente che negli Anuri in metamorfosi si verifica una disidratazione dei tessuti; ritengo che essa sia provocata non solo dalla corneificazione dello strato superficiale dell'epidermide (Adolph [25]), ma anche dal riassorbimento dalle branchie e dalle modificazioni dell'intestino: tutti questi fenomeni provocano una drastica riduzione delle superfici che assorbono l'acqua mentre la filtrazione glomerulare del rene larvale prosegue, perchè il differenziamento dei tubuli renali è completo solo un mese dopo la metamorfosi [26]. L'azione della tiroxina, producendo un aumento di RNA-nucleotidi per la formazione di nuove proteine [27], stimola i processi degenerativi e differenziativi della metamorfosi: mentre i primi si realizzano rapidamente, i secondi, invece, al termine dell'esperienza sono incompleti e risultano arretrati rispetto ad animali di controllo a stadio simile [8, 18].

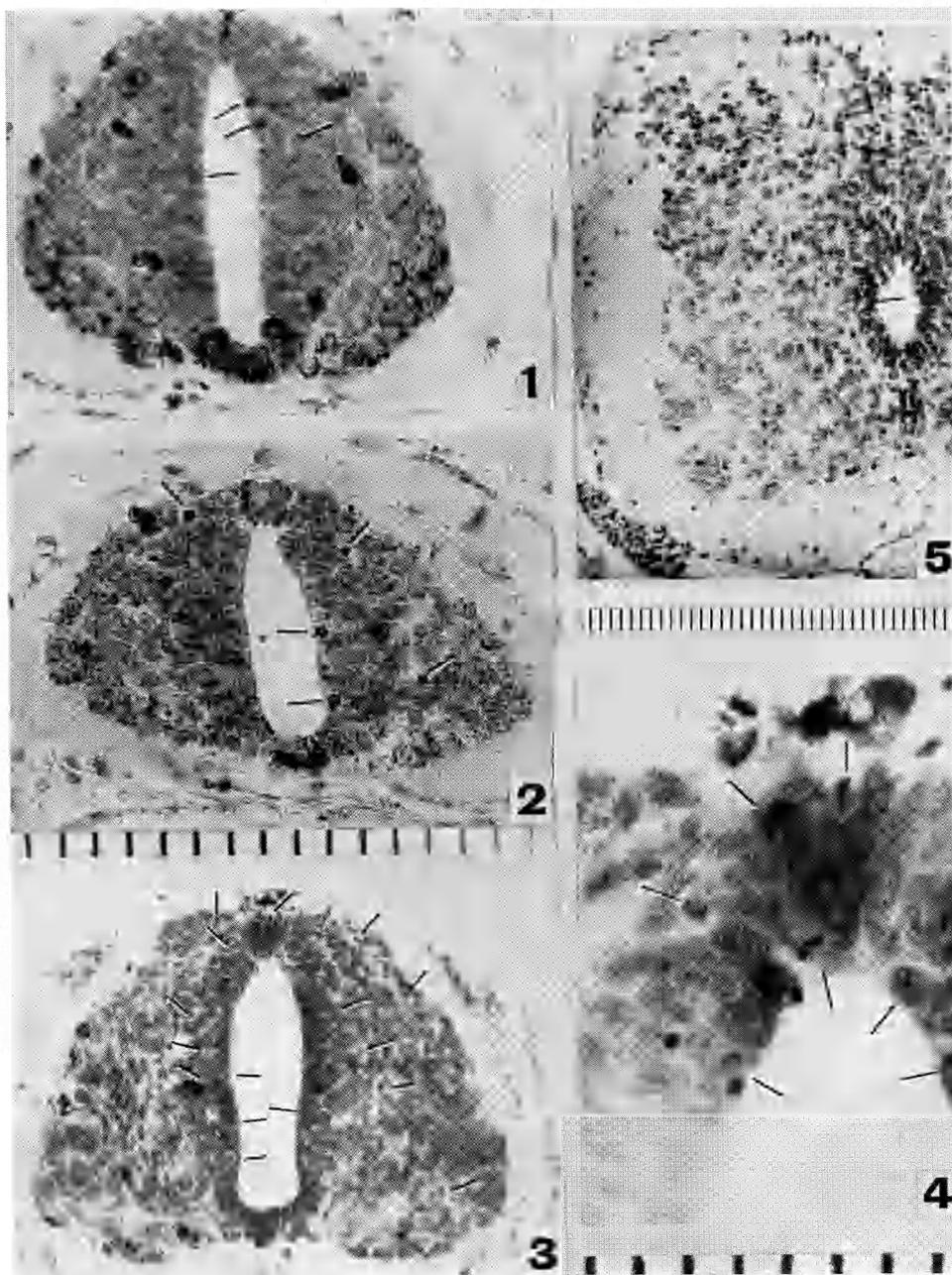
L'osservazione morfologica degli animali trattati, infatti, mette in evidenza che il riassorbimento delle branchie è compiuto, la corneificazione dell'epidermide e le modificazioni dell'intestino sono avanzate, ma la morfologia del rene è simile a quella dei girini all'inizio della prometamorfosi: ne consegue che gli animali trattati vanno incontro ad una disidratazione più grave di quella transitoria che si verifica nella normale metamorfosi; è vero che tale disidratazione si effettua per la mobilitazione dei liquidi intercellulari, ma ciò richiama acqua dalle cellule provocando un aumento della loro viscosità.

CONCLUDENDO: l'azione dell'alcaloide e dell'ormone sulla localizzazione delle mitosi nel sistema nervoso centrale degli Anfibi anuri in sviluppo si esprime nell'aumento di frequenza delle mitosi extraventricolari; ciò significa che un numero maggiore di cellule in mitosi non riesce a raggiungere l'epitelio ventricolare; alla luce delle attuali cognizioni si ritiene che l'ostacolo alla migrazione ventricolare sia rappresentato dalle modificazioni di viscosità citoplasmatica delle cellule in mitosi.

BIBLIOGRAFIA.

- [1] G. M. BAFFONI, « Rend. Acc. Naz. Lincei », ser. 8^a, 47, 405-410 (1969).
- [2] R. L. WATTERSON, P. VENEZIANO e A. BARTHA, « Anat. Record », 124, 379 (1956).
- [3] L. C. SHELL, « Amer. Zoologist », 1, 388 (1961).
- [4] W. A. BRYANS, « Anat. Record », 133, 65-71 (1959).
- [5] T. WENGER, B. VIGHT e B. AROS, « Acta Biol. Acad. Hung. », 17, 175-183 (1966).
- [6] G. M. BAFFONI, « Boll. di Zool. », 26, 255-282 (1959).
- [7] A. ROSSI, « Monit. Zool. Ital. », 66, 133-149 (1959).
- [8] G. M. BAFFONI, « Rend. Acc. Naz. Lincei », ser. 8^a, 23, 495-503 (1957).
- [9] G. M. BAFFONI, « Rend. Acc. Naz. Lincei », ser. 8^a, 27, 427-433 (1959).
- [10] M. G. STÄLFELT, « Exptl. Cell Res. », 1 Suppl., 63-78 (1949).
- [11] J. M. VASILIEV, I. M. GELFAND, L. V. DOMNINA e R. I. RAPPOPORT, « Exptl. Cell Res. », 54, 83-93 (1969).
- [12] H. SAVEL, « Progr. Exptl. Tumor Res. », 8, 189-224 (1966).
- [13] M. A. HANDEL, « Amer. Zoologist », 9, 1122 (1969).
- [14] I. PESETSKY, « Amer. Zoologist », 9, 1122-1123 (1969).
- [15] J. J. KOLLROS e V. MCMURRAY, « Journ. Comp. Neurol. », 102, 47-64 (1955).
- [16] G. M. BAFFONI, « Riv. Neurobiol. » (Perugia), 5, 33-73 (1959).
- [17] G. M. BAFFONI, « Arch. Zool. Ital. », 51, 337-358 (1966).
- [18] Ved. G. M. BAFFONI, « Riv. Biol. » (Perugia), 53, 293-340 (1960).
- [19] Ved. J. A. MOORE, « *Physiology of Amphibians* » (New York and London 1964).
- [20] A. J. MATTY e K. GREEN, « Gen. Comp. Endocr. », 4, 331-338 (1964); 3, 244-252 (1963).
- [21] R. E. TAYLOR e S. B. BARKER, « Gen. Comp. Endocr. », 9, 129-134 (1967); J. MAETZ, in: *Perspectives in endocrinology* (Barrington e Jørgensen Ed., London and New York, 1968).
- [22] J. CRABBÉ, *The sodium retaining action of aldosterone* (Bruxelles 1963).

- [23] S. A. MIDDLEL, C. R. KLEEMAN e E. EDWARDS, «Gen. Comp. Endocr.», 9, 38-48 (1967).
- [24] J. S. LATTI e J. Z. DAVIS, «Arch. Exper. Zellforsch.», 21, 427-435 (1938); E. HAAM e L. CAPPEL, «Amer. Journ. Cancer», 39, 354-359 (1940); E. N. WILLMER, *Cell and tissue in culture* (London and New York 1965).
- [25] E. F. ADOLPH, «Journ. Exptl. Zool.», 47, 179-195 (1927).
- [26] P. GRAY, «Quart. Journ. Micr. Sci.», 78, 445-473 (1936); H. FOX, «Journ. Embryol. Exptl. Morphol.», 10, 103-114 (1962).
- [27] Ved. J. E. EATON e F. FRIEDEN, «Gen. Comp. Endocr.», *Suppl. 2*, 398-407 (1969).



Aspetto del midollo spinale in giovani larve di Rospo (st. I) normali (1), dopo quattro ore di trattamento con colchicina (2), dopo cinque giorni di trattamento con tiroxina (3 e 4-particolare ingrandito) ed in larve di controllo (5) in metamorfosi (st. XII).

Ogni intervallo delle scale in calce = 10 μ . Foto 1 e 2, 3 e 5 agli stessi ingrandimenti.