
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

ASUNCION CORUJO, LUCIA MASTROLIA, HARRY MANELLI

**Azione del trapianto d'ipofisi sul differenziamento
della tiroide in embrioni di pollo ipofisectomizzati**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 61 (1976), n.3-4, p.
293-299.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1976_8_61_3-4_293_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)

Zoologia. — *Azione del trapianto d'ipofisi sul differenziamento della tiroide in embrioni di pollo ipofisectomizzati* (*). Nota (**) di ASUNCION CORUJO, LUCIA MASTROLIA e HARRY MANELLI, presentata dal Socio P. PASQUINI.

SUMMARY. — The thyroids of precociously hypophysectomized chick embryos cease their process of differentiation during the eleventh to twelfth day of incubation.

To ascertain whether this process is under the control of the hypophysis, in precociously hypophysectomized embryos (White Leghorn and Wyandotte) on the 12th day of incubation, a hypophysis of eighteen days was transplanted onto the chorio-allantois.

The thyroids of the embryos which received the grafts reacquired the morphological and cytological characteristics of the controls after 4 days. The diameter of the follicular light and the width of the epithelial cells increased. The cytomembranes increased, the amount of free ribosomes decreased.

Also the colloid chromophobe in the hypophysectomized embryos becomes chromophylic as in the controls.

Da varie ricerche, condotte su embrioni di pollo, da Tixier (1954), Stoll, Maraud e Lacourt (1961), Mess, Straznicky e Hajos (1966), Corujo, Mastrolia e Manelli (1976, in stampa) risulta che il differenziamento morfologico della tiroide è, almeno in parte, indipendente dall'influenza ipofisaria. Le correlazioni endocrine che si stabilirebbero tra la tiroide e l'ipofisi verso il 10°-11° giorno d'incubazione, stimolerebbero, dopo tale periodo, il differenziamento fisiologico della ghiandola, che si manifesta oltre che con modificazioni citologiche delle cellule follicolari, anche con l'ampliamento del lume follicolare, e quindi con la presenza di una maggior quantità di colloide, probabilmente di composizione diversa, rispetto ai primi stadi di sviluppo dei follicoli.

Per avere un'ulteriore conferma sull'importanza dell'azione ipofisaria sullo sviluppo morfo-fisiologico della tiroide, ma in condizioni sperimentali diverse rispetto a quelle degli Autori su citati, nella presente Nota vengono riportate alcune osservazioni istologiche e citologiche, compiute rispettivamente al M.O. e al M.E., sul differenziamento di tiroidi prelevate da embrioni di pollo precocemente ipofisectomizzati, ai quali è stato però aggiunto un trapianto corioallantoideo di ipofisi di embrione di pollo di 18 giorni.

MATERIALI E METODI

Le ricerche sono state compiute su embrioni di pollo, razze Livorno bianca e Wyandotte. Gli embrioni sono stati ipofisectomizzati, secondo la tecnica di Fugo e Witschi (1938), un pò modificata, e al 12° giorno d'incubazione hanno ricevuto il trapianto d'ipofisi.

(*) Dall'Istituto di Zoologia dell'Università di Roma, diretto dal Prof. H. Manelli.

(**) Pervenuta all'Accademia il 6 ottobre 1976.

L'ipofisi, prelevata da embrioni di 18 giorni, veniva suddivisa in numerosi pezzetti, che erano poi collocati in una biforcazione di due piccoli vasi sanguigni dell'embrione ipofisectomizzato, sulla membrana corionallantoidea. L'uovo veniva poi immediatamente chiuso con mica e parafina e rimesso nell'incubatrice per continuare lo sviluppo.

Gli embrioni sono stati dissezionati a 14, 16 e 18 giorni e mezzo cioè a 2, 4 e 6 giorni dal trapianto. Le loro tiroidi, prelevate immediatamente, sono state fissate per la durata di 2-4 ore in glutaraldeide al 4 %, tamponata a pH 7,3 con cacodilato di sodio 0,1 M. Le stesse sono state poi fissate in tetrossido di osmio all'1 % in tampone di Millonig per 1 ora, quindi disidratate e incluse in araldite.

Le sezioni per l'osservazione al M.O. sono state tagliate ad uno spessore di 1-2 μ e colorate con blu di toluidina all'1 %, o blu di metilene all'1 % e tetraborato di sodio al 2,5 %.

Le sezioni ultrasottili, colorate secondo il metodo di Reynolds (1963), con piccole variazioni, sono state osservate ad un microscopio elettronico Siemens Elmiskop IA.

RISULTATI

1) Osservazioni al microscopio ottico.

a) La tiroide di embrioni normali di pollo, di 14 giorni e mezzo, presenta al M.O. follicoli di forma prevalentemente rotonda, il cui diametro medio del lume oscilla fra i 13 e 13,8 μ . L'epitelio follicolare è costituito da cellule di tipo cubico, in numero da 6 a 9 per sezione, con una altezza media che si aggira intorno ai 4 μ .

Le tiroidi degli embrioni ipofisectomizzati della stessa età presentano un minor numero di follicoli rispetto a quelle degli embrioni normali, e le loro dimensioni sono notevolmente più piccole. Il diametro medio del lume follicolare infatti varia da 4 a 4,5 μ e l'altezza delle cellule oscilla intorno ai 2,2 μ .

Le tiroidi degli embrioni ipofisectomizzati, di 14 giorni e mezzo, ai quali però è stata trapiantata sul corionallantoide l'ipofisi di 18 giorno (la durata dell'azione del trapianto è quindi di 2 giorni), non mostrano nessun cambiamento apprezzabile rispetto alle tiroidi degli ipofisectomizzati della stessa età.

b) A 16 giorni e mezzo il lume follicolare degli embrioni normali oscilla fra 18 e 18,8 μ . Le cellule epiteliali della parete sono generalmente di forma cubica e hanno altezza media di circa 4 μ . I follicoli sono prevalentemente rotondeggianti e l'epitelio, per sezione, consta di 7-10 cellule. Il colloide è cromofilo, come d'altra parte lo era già a 14 giorni d'incubazione. Due giorni più tardi, cioè a 18 giorni e mezzo, i follicoli si sono fortemente ingrossati (il loro diametro oscilla intorno ai 27 μ) mentre le cellule della parete follicolare aumentano di poco, (4-4,5 μ), la loro altezza.

Le tiroidi degli embrioni ipofisectomizzati di 16 giorni e mezzo mostrano un minor numero di follicoli, più piccoli di quelli delle tiroidi normali e il

lume follicolare è cromofobo. Il diametro medio è di circa 6μ e l'altezza delle cellule dell'epitelio follicolare va da 2 a $2,3 \mu$.

Negli embrioni di 18 giorni e mezzo, sempre ipofisectomizzati, il diametro medio del lume aumenta fino a $7-7,6 \mu$ e il colloide è solo leggermente cromofilo. La forma dei follicoli rimane rotondeggiante e le loro cellule hanno un'altezza pressoché uguale a quella degli embrioni di 16 giorni.

Le tiroidi degli embrioni ipofisectomizzati, sui quali è stato fatto agire il trapianto ipofisario per 4-6 giorni, sono completamente diverse dalle tiroidi degli embrioni ipofisectomizzati senza trapianto. Infatti esse presentano caratteristiche sensibilmente uguali a quelle delle tiroidi normali di controllo, cioè, come si può constatare dalla fig. 1, *a* e *b* il lume follicolare e l'epitelio follicolare hanno raggiunto i valori dei controlli ed inoltre il colloide si presenta cromofilo.

2) Osservazioni al microscopio elettronico.

a) Le cellule follicolari delle tiroidi degli embrioni normali di 14 giorni e mezzo presentano un reticolo endoplasmico granulare o α -citomembrane, secondo la classificazione di Sjöstrand, molto esteso, che occupa gran parte del citoplasma e il lume delle cisterne è ampio e meno elettrondenso del citoplasma circostante. I mitocondri sono numerosi e la loro matrice si presenta moderatamente elettrondensa; le creste mitocondriali sono discretamente sviluppate. Il complesso di Golgi è ben sviluppato ed è localizzato nella regione paranucleare; esso è costituito da cisterne il cui lume è solo debolmente elettrondenso e da vescicole rotondeggianti o allungate, di diametro variabile il cui lume a volte è moderatamente elettrondenso. Nel citoplasma si osservano inoltre per lo meno due tipi di strutture vescicolari: un primo costituito da granuli fortemente elettrondensi, delimitati da membrane. Il contenuto di questi granuli appare omogeneo e solo a volte si può osservare una zona meno elettrondensa periferica. Il loro diametro oscilla tra 600 e 1600 \AA . Un secondo tipo di strutture vescicolari è costituito da globuli con matrice omogenea, moderatamente elettrondensa, delimitati da una membrana, il cui diametro può raggiungere a volte 1μ circa. Queste strutture in genere da 3 a 5 per sezione sono localizzate nella zona di citoplasma più prossima al lume follicolare e non è infrequente il caso in cui questi globuli fondono le loro membrane con quella cellulare, riversando il loro contenuto nel lume.

Le cellule tiroidee, degli embrioni ipofisectomizzati di 14 giorni e mezzo, presentano rispetto agli embrioni di controllo, una minor quantità di reticolo endoplasmico granulare ed un maggior numero di ribosomi liberi. I mitocondri hanno forma più allungata e contorni sinuosi. La loro matrice è più densa di quella dei controlli e le creste più numerose. Il complesso di Golgi, anche se ben sviluppato, presenta un minor numero di cisterne, di ampiezza inferiore a quella dei controlli. I granuli scuri sono più numerosi rispetto a quelli degli embrioni normali mentre quelli meno elettrondensi e più grandi sono più scarsi. Sono presenti sulla parete del lume follicolare delle ciglia

riconoscibili per la presenza di microtubuli e del centriolo alla base, e dei microvilli d'aspetto e numero simile a quello dei controlli. Gli spazi intercellulari sono più ampi e sono occupati da lunghe estroflessioni digitiformi delle cellule follicolari.

Le cellule tiroidee degli embrioni ipofisectomizzati, che hanno ricevuto il trapianto per la durata di due giorni, non mostrano differenze apprezzabili rispetto agli embrioni ipofisectomizzati della loro stessa età, ma che non hanno ricevuto il trapianto.

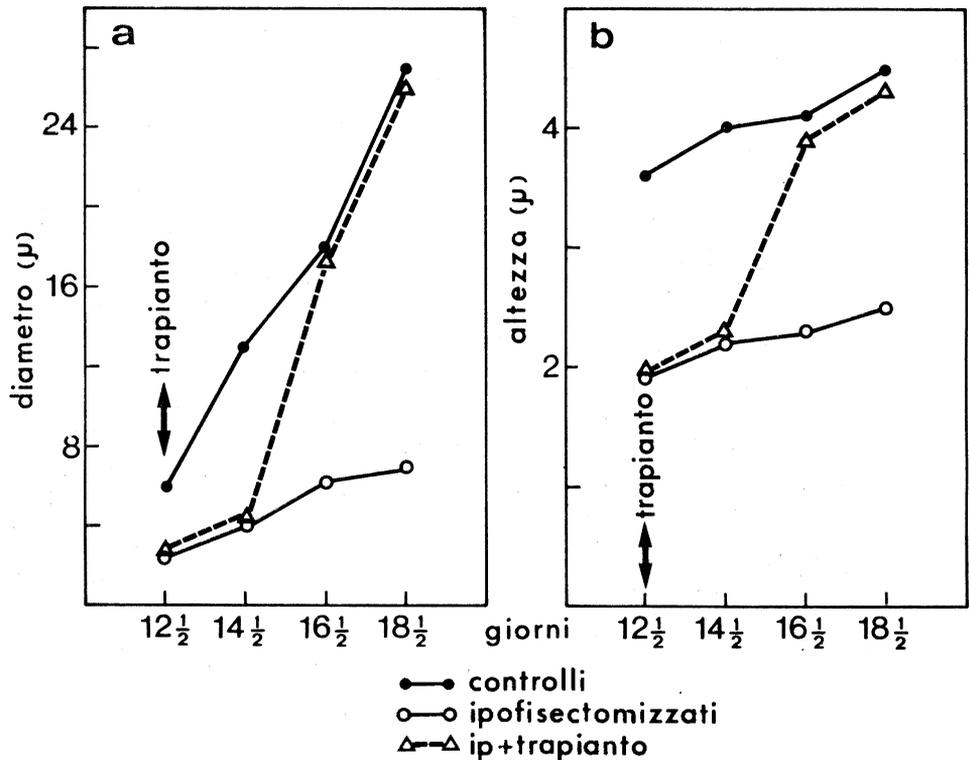


Fig. 1: *a*) Diametro medio, in μ , del lume follicolare tiroideo in embrioni controllo, ipofisectomizzati e ipofisectomizzati con trapianto; *b*) Altezza media, in μ , dell'epitelio follicolare tiroideo in embrioni controllo, ipofisectomizzati e ipofisectomizzati con trapianto.

b) Tra 16 e 18 giorni si osserva nelle cellule follicolari dei controlli un notevole aumento nell'ampiezza del lume delle cisterne del reticolo endoplasmico granulare. I ribosomi liberi sono molto pochi ed appaiono disposti regolarmente lungo le membrane del reticolo. I mitocondri s'ingrossano ed hanno matrice scarsamente elettrondensa, le loro creste sono poco numerose. I granuli fortemente elettrondensi diminuiscono di numero, mentre i globuli moderatamente elettrondensi aumentano di numero e di ampiezza raggiungendo a volte il diametro di 1μ . Questi ultimi sono sempre localizzati nella zona citoplasmica prospiciente il lume follicolare, la cui parete presenta pochi e corti microvilli, assumendo così un contorno piuttosto uniforme.

Negli embrioni ipofisectomizzati di 16 e 18 giorni e mezzo si ha, rispetto ai controlli, una minore quantità di reticolo endoplasmico granulare e un maggior numero di ribosomi liberi. I mitocondri hanno forma allungata, a contorni sinuosi; la loro matrice è più densa di quella dei controlli e le creste mitocondriali sono anche più numerose. I granuli scuri, più numerosi che nei controlli, si riuniscono a formare delle figure circolari e concentriche. I globuli moderatamente elettrondensi sono in minor numero e di dimensioni più piccole di quelle riscontrate nei controlli.

Per quanto riguarda le tiroidi degli embrioni ipofisectomizzati, che hanno ricevuto il trapianto per 4-6 giorni, esse presentano nelle cellule follicolari un reticolo endoplasmico granulare abbondante e con ampie cisterne simile a quello dei controlli. I mitocondri, di grandezza inferiore a quella degli ipofisectomizzati, hanno una matrice moderatamente densa e uno scarso numero di creste. Il complesso di Golgi è ben sviluppato. Si osservano inoltre, rispetto agli embrioni ipofisectomizzati, un minor numero di granuli elettrondensi, mentre aumenta il numero dei grossi globuli moderatamente elettrondensi.

Il lume follicolare è ampio, con colloide denso e la parete è piuttosto liscia con pochi microvilli. Quindi, nel complesso, le caratteristiche di queste tiroidi (embrioni ipofisectomizzati più trapianto) sono sensibilmente simili a quelle delle tiroidi dei controlli della loro stessa età.

Dai dati esposti precedentemente risulta anzitutto che la tiroide degli embrioni ipofisectomizzati reagisce all'azione del trapianto ipofisario riprendendo l'aspetto morfologico e citologico del tutto simile a quello dei controlli. In particolare il lume e lo spessore della parete follicolare riacquistano la grandezza e lo spessore dei controlli. Inoltre il colloide, che è cromofobo nei primi, ridiviene decisamente cromofilo. Questi fatti vengono schematicamente riassunti nei grafici *a* e *b* della fig. 1.

Anche a livello ultrastrutturale si realizza questa situazione di recupero: così per esempio le α -citomembrane aumentano e le cisterne comprese fra di esse si allargano; diminuisce anche il numero di ribosomi liberi nel citoplasma.

Tutte queste modificazioni morfo-citologiche della tiroide dimostrano chiaramente che l'ipofisi trapiantata agisce, ed è logico pensare che essa agisca con l'ormone specifico per la tiroide, cioè la tiroxina. Questa interpretazione viene confortata dalle ricerche di Tixier-Vidal (1954) e da quelle di Mess, Straznicky e Hajos (*loc. cit.*). Il primo ha infatti dimostrato che l'ipofisi degli embrioni di 18 giorni possiede già cellule a funzione tireotropica, mentre Mess e Coll. (*loc. cit.*) hanno dimostrato, con la tecnica del trapianto d'ipofisi - in stadi e in condizioni peraltro diverse dalle nostre - che l'ipofisi isolata dal circolo endocrino, trapiantata in embrioni decapitati, stimola la tiroide alla captazione dello I^{131} . Tuttavia ricerche successive di Maraud e Coll. (1975), pur confermando che il trapianto d'ipofisi in embrioni decapitati di eguale età restaura nella tiroide l'assetto morfo-citologico, hanno messo in evidenza che la ghiandola non raggiunge il volume dei controlli e che dal 16° giorno in poi dello sviluppo la fissazione dello iodio risulta ridotta rispetto ai controlli.

Gli Autori interpretano, in via ipotetica, questo risultato sulla base del mancato intervento dell'ipotalamo.

I risultati delle nostre esperienze dimostrano inoltre, secondo noi, che il differenziamento della ghiandola tiroidea negli embrioni degli uccelli si svolge in due fasi: una, indipendente dallo stimolo ipofisario, che si può osservare negli embrioni ipofisectomizzati ed evidente soprattutto a livello morfologico. In questi embrioni infatti le cellule epiteliali assumono l'assetto cordonale caratteristico della ghiandola e s'inizia la formazione dei follicoli. Nella seconda fase del differenziamento, dal 12° giorno d'incubazione in poi, l'ipofisi e quindi la secrezione di TSH, gioca un ruolo decisivo e si hanno notevoli modificazioni citologiche ed anche di composizione del colloide, dato che quest'ultimo diviene decisamente cromofilo da questo periodo in poi dello sviluppo, mentre permane cromofobo negli embrioni ipofisectomizzati.

Il recupero dello sviluppo delle α -citomembrane che si osserva negli embrioni che hanno ricevuto il trapianto, dimostra infine che le cellule follicolari sintetizzano attivamente il colloide, in quanto esse sono la sede della sintesi della parte polisaccaridica del colloide stesso (Stoll, Maraud e Sparfel, 1959), e quindi si ha, oltre che la prova di una evidente stimolazione ormonale, anche la manifestazione di alcuni momenti funzionali delle cellule follicolari.

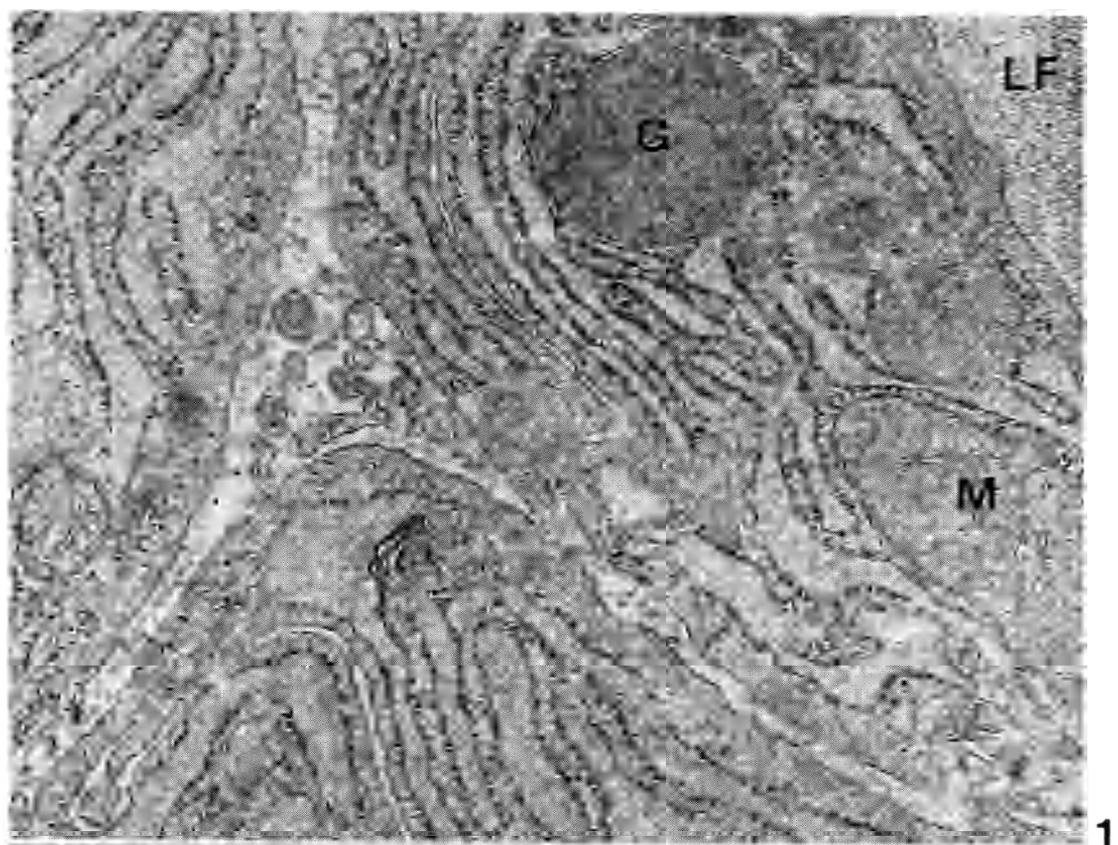
Questo aspetto citologico trova riscontro anche nel cambiamento dell'affinità tintoriale del colloide, che negli embrioni ipofisectomizzati è cromofobo per quasi tutto il periodo d'incubazione, mentre in quelli ipofisectomizzati, che hanno ricevuto il trapianto, diviene, come nei controlli, molto cromofilo.

Non possiamo dalle nostre esperienze dire se l'ipofisi continui a secernere ormone tireotropo in condizioni di trapianto, o se non si limiti solo a rilasciare l'ormone già accumulato nelle sue cellule. Il fatto però che l'effetto della stimolazione ipofisaria sia evidente anche dopo sei giorni dal trapianto potrebbe far pensare che l'azione ipofisaria non sia dovuta alla semplice liberazione dell'ormone tireotropo, ma anche e soprattutto alla secrezione attiva con neosintesi dello stesso ormone.

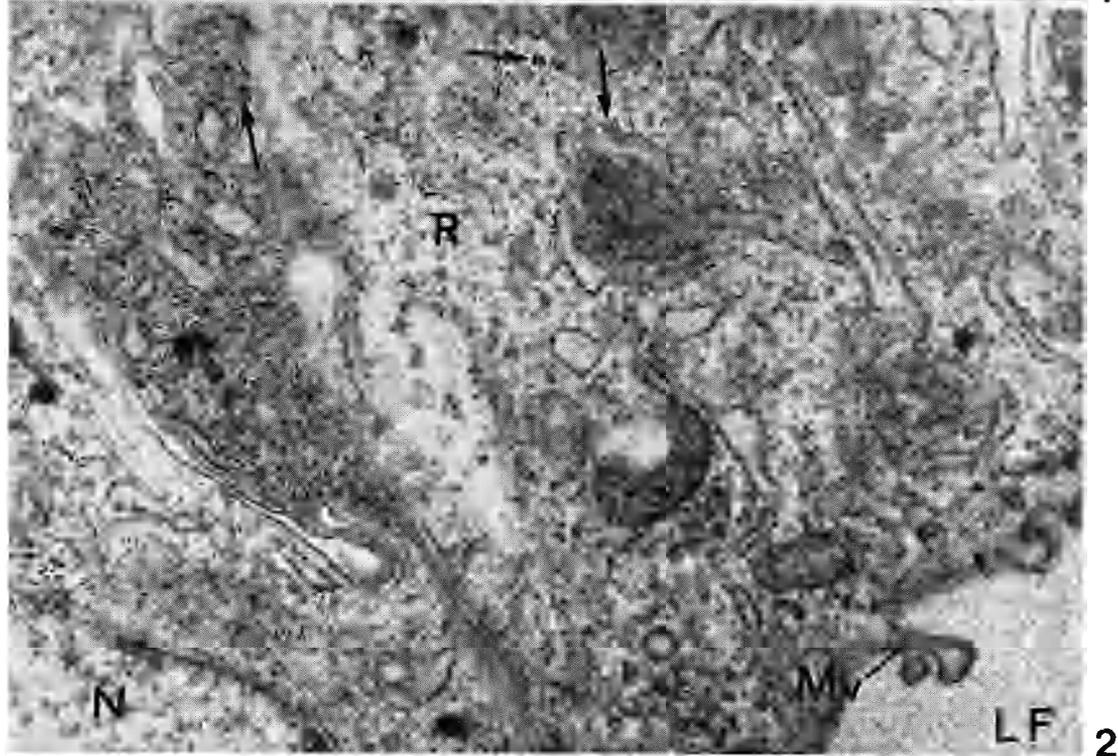
Gli Autori ringraziano vivamente le dott.sse F. Accordi, V. Gallo e E. Grasi Milano per i loro utili suggerimenti, e la sig.ra E. Gilardi e il sig. F. Ventola per la preziosa collaborazione tecnica.

BIBLIOGRAFIA

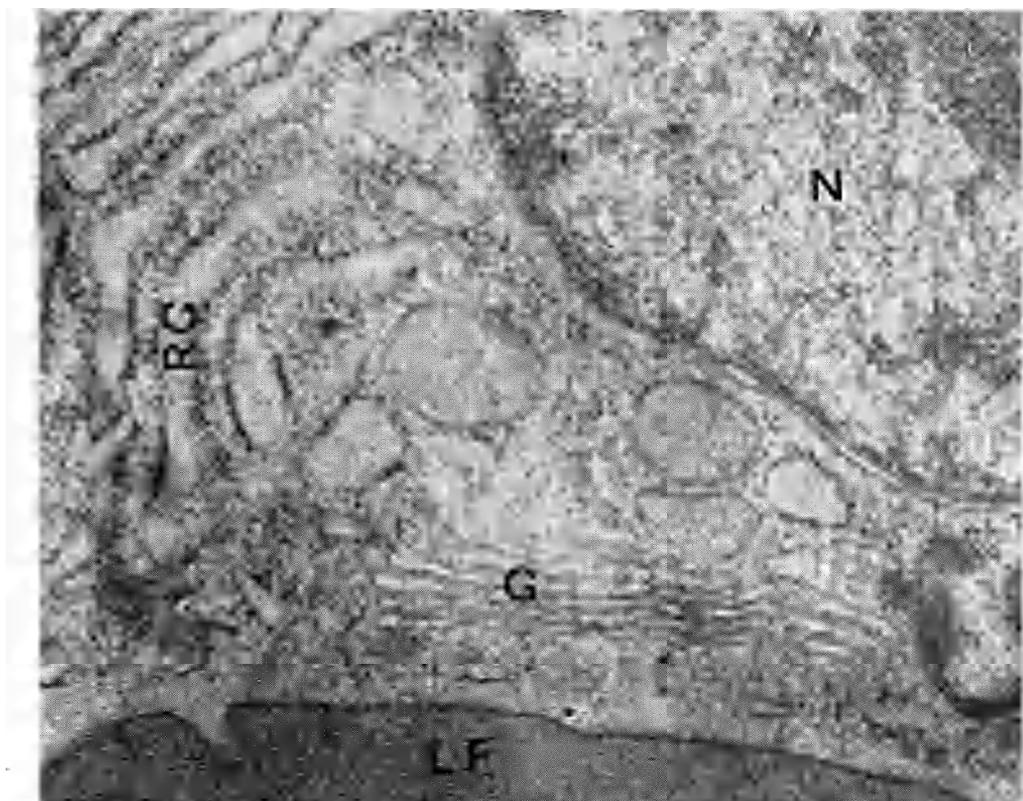
- CORUJO A., MATROLIA L. e MANELLI H. (1976) - *Sul differenziamento della tiroide in embrioni di pollo normali e ipofisectomizzati*. (In corso di stampa su « Riv. di Biol. »).
- FUGO N. W. e WITSCHI E. (1938) - *Removal of the hypophyseal primordium in the chick during the second day of incubation*, « Acta Biol. Latvica », 73-80.
- MARAUD R., AUDINE M. e R. STOLL (1975) - *Sur l'existence des relations hypothalamo-hypophysaires chez l'embryon de poulet*, « C.R. Soc. Biol. », 169, 923-927.



1



2



- MESS B., STAZNICKY K. e HAJOS F. (1966) - *La differenziazione della ghiandola tiroide e la sua dipendenza dall'ormone tireotropo (TSH) in embrioni di pollo normali e decapitati*, « *Rass. Neurol. Veg.* », 20, 359-374.
- REYNOLDS E. S. (1963) - *The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy*, « *J. Cell. Biol.* », 17, 208.
- STOLL R., MARAUD R. e SPARFEL A. (1959) - *Recherches sur le rôle des α -cytomembranes dans le développement de la thyroïde et dans ses tumeurs*, « *Arch. Anat. Morph. Exp.* », 48, 1-24.
- STOLL R., MARAUD R. e LACOURT P. (1961) - *L'ultrastructure de la thyroïde*, « *Ann. Endocrinol.* », 22, 281-304.
- TIXIER A. (1954) - « *Compt. Rend. Soc. Biol.* », 148, 874-891.
- TIXIER-VIDAL A. (1954) - *Étude histophysiologique de l'hypophyse antérieure de l'embryon de poulet*, « *Arch. Anat. micr. Morph. Exp.* », 43, 163-186.

SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE I-II

TAVOLA I

- Fig. 1. - Sezione della tiroide di embrione di pollo controllo di 18 giorni e mezzo: il citoplasma delle cellule follicolari è ricco di reticolo endoplasmico granulare, le cui cisterne raggiungono una notevole ampiezza; vicino al lume follicolare (LF) si può osservare un globulo di colloide (G). M: Mitocondrio ($\times 35.000$).
- Fig. 2. - Sezione della tiroide di embrione di pollo ipofisectomizzato di 18 giorni e mezzo: nel citoplasma delle cellule follicolari abbondano i ribosomi (R) liberi o raggruppati in polisomi (freccia), mentre è scarso il reticolo endoplasmico granulare; il colloide (LF) è cromofobo. Mv: Microvillo ($\times 35.000$).

TAVOLA II

- Fig. 1. - Sezione della tiroide di embrione di pollo ipofisectomizzato di 18 giorni e mezzo che ha ricevuto il trapianto d'ipofisi al 12° giorno d'incubazione. Il reticolo endoplasmico granulare (RG) ha raggiunto dimensioni simili a quelle dei controlli. È ben evidente anche il complesso di Golgi (G) e il lume follicolare (LF) con colloide cromofilo. N: Nucleo ($\times 35.000$).