
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

PAOLO CARINCI

Caratteri istochimici e chimico-fisici della colloide tiroidea in *Bos taurus* durante lo sviluppo

Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 36 (1964), n.2, p. 217–223.

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1964_8_36_2_217_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/>

Istochimica. — *Caratteri istochimici e chimico-fisici della colloide tiroidea in Bos taurus durante lo sviluppo* (*). Nota di PAOLO CARINCI, presentata (**) dal Socio O. M. OLIVO.

La colloide tiroidea è costituita da un glicoprotide altopolimero (tiroglobulina), su cui avvengono i processi di iodinazione dei radicali tirosinici, di combinazione in unità tironiniche, di liberazione per proteolisi dei peptidi attivi. L'ordinata sequenza di tali processi è condizionata dalla struttura e dalla organizzazione spaziale della colloide, che rappresenta quindi una sostanza intimamente ingranata nei meccanismi di formazione degli ormoni tiroidei [6, 7, 8, 9].

Mentre sono ben conosciute composizione chimica e proprietà fisico-chimiche della colloide nell'adulto [5, 10], pochi dati si hanno su tale materiale durante lo sviluppo.

Per quanto riguarda la tiroide fetale bovina i dati morfologici [1, 2] e biochimici [11-13] fanno ritenere assai precoce (secondo-terzo mese) l'istituirsi della funzione della ghiandola; certo in connessione con l'attività della tiroide nella regolazione dei processi del differenziamento e dell'accrescimento durante l'ontogenesi.

Mi è sembrato pertanto interessante, per la conoscenza della istofisiologia della tiroide, esaminare la composizione chimica e i caratteri fisico-chimici della colloide durante lo sviluppo, mediante analisi istotopochimica, dosaggi biochimici delle frazioni carboidrate ed esame delle proprietà fisico-chimiche della colloide isolata.

In questa Nota riferirò i dati relativi alle ricerche istochimiche ed al comportamento elettroforetico degli estratti tiroidei durante lo sviluppo in confronto con le proprietà della colloide adulta.

MATERIALE E METODI.

Per queste ricerche mi sono servito di tiroide di feti bovini di lunghezza CR compresa fra cm 14 e cm 50, e cioè di età dalla 12^a alla 25^a settimana di sviluppo (cm 14-16-18-20-22-26-30-32-39-40-41-45-50) e di animali adulti.

Per l'esame istochimico ho impiegato una serie di tecniche standard per i mucopolisaccaridi su materiale fissato in Bouin ed incluso in paraffina: PAS; Alcian blu 8 GN e Bleu di Toluidina, tamponati a vari pH; metilazione (HCl 0,1 N — 60° C — 90 min); trattamento con acetone acido (HCl 0,1

(*) Dall'Istituto di Istologia e Fisiologia generale dell'Università di Bologna diretto dal prof. Carlo Rizzoli.

(**) Nella seduta dell'8 febbraio 1964.

N — 90 min—60° C; [3]; digestioni enzimatiche sulle sezioni microscopiche con sialidasi (dal *Vibrio cholerae*—Sigma — 37° C per 3–5–7 h) — ialuronidasi testicolare (Jalovis Vister — 1 mg/ml — tampone fosfati pH 7 — 37° C per 3 h) — ialuronidasi batterica (Hyason 30 T.R.U./ml — tampone acetati pH 5,6 — 37° C per 3 h) — papaina (Light Co. — tampone acetati pH 5,6—37° C per 30, 90 min, 2–4–6h).

Con tali tecniche è stato possibile precisare la natura carboidrata, il carattere polianionico, il tipo di radicali acidi presenti, il rapporto fra carboidrati e frazioni proteiche della colloide esaminata.

Per l'esame elettroforetico le tiroidi, liberate dal grasso e dalle fascie, erano pesate, sezionate al congelatore, estratte con H₂O (3–4 v/peso) a 4° C per 24 h. Dopo centrifugazione il soprannatante, opportunamente diluito, veniva impiegato come tale per il frazionamento elettroforetico.

L'elettroforesi su carta è stata eseguita in apparecchio a strisce orizzontali, carta Whatman n° 1, 150–200 Volt, 2,5 mA/striscia, 12–15 ore di migrazione. I ferogrammi, essiccati all'aria, venivano colorati con il nero amido (proteine), Pas (glucidi), Alcian Bleu e Bleu di Toluidina (gruppi acidi).

L'elettroforesi in fase libera è stata eseguita in apparecchio Tiselius, modello Hilgher, in Veronal sodico—Veronal acido pH 8,6.

Le determinazioni all'ultracentrifuga sono state eseguite in apparecchio analitico Phywe, a 50.000 R/m in H₂O per 75 minuti.

RISULTATI SPERIMENTALI.

Ricerche istochimiche.

I risultati istochimici da me ottenuti si possono così descrivere.

A) Comparsa e caratteri istochimici della colloide fetale.

La prima comparsa di materiale colloideo extracellulare si osserva nel feto bovino di cm 14 (12^a settimana). A tale stadio la tiroide è ancora costituita da nidi e cordoni solidi di cellule epiteliali con nucleo vescicoloso. Qua e là all'interno di alcuni di tali nidi cellulari si osservano piccole quantità di materiale omogeneo ossidabile con il Pas, debolmente basofilo.

Nel feto di cm. 16 (13^a settimana) sono già comparsi i follicoli perfettamente costituiti, specie nella parte profonda dell'organo. Gli elementi epiteliani che rivestono i follicoli sono prismatici, alti (media μ 15) con il nucleo vescicoloso. La colloide dei follicoli di aspetto omogeneo, compatto al centro, vacuolizzata alla periferia, è intensamente Pas positiva (presenza di gruppi glicol), debolmente basofila con il Bleu di Toluidina (pH 5,1) e tingibile con l'Alcian (pH 2,5–3) (presenza di gruppi acidi). La basofilia viene rimossa dal trattamento con metanolo acido ed acetone acido; in nessun caso viene ripristinata dopo saponificazione. I gruppi acidi che impartiscono la basofilia

alla colloide sono dunque rimovibili per blanda idrolisi acida in mezzo organico. Il controllo con il Pas dimostra che il trattamento con metanolo acido od acetone acido non estrae la colloide dalle sezioni (persistenza della positività all'ossidazione periodica). La basofilia viene lentamente abolita (dopo 7 h) dal trattamento con sialidasi, senza solubilizzazione del materiale colloide (persistenza della Pas positività). Anche il trattamento con ialuronidasi batterica e testicolare sopprimono la basofilia della colloide. Gli enzimi pro-

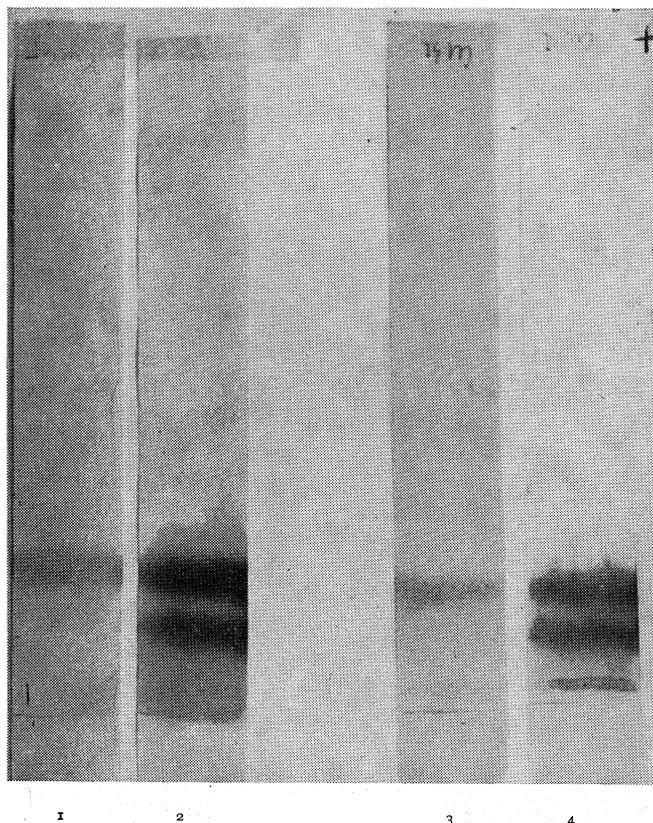


Fig. 1. - Frazionamento elettroforetico su carta di estratti di tiroidei fetali (pH 8,6).

1-2 feto cm 45; 3-4 feto cm 32 (1, 3 Pas 2, 4 nero-amido).

teolitici, quali la papaina attivata, digeriscono invece il materiale colloideo sulle sezioni, senza variarne la reattività per i coloranti basici.

Negli stadi successivi (cm 18-20-22-32-39-41-45-50) si osserva il progressivo perfezionarsi della struttura follicolare della tiroide. Le proprietà istochimiche della colloide restano sostanzialmente immutate. In tutti i casi esaminati si è riscontrata intensa Pas positività, debole basofilia all'Alcian e al Bleu di Toluidina, rimuovibile irreversibilmente per blanda idrolisi cloridrica in mezzo organico. Anche la sensibilità agli enzimi si mantiene immutata rispetto a quanto descritto per la colloide nei precedenti stadi.

B) Proprietà istochimiche della colloide adulta.

Nell'animale adulto la colloide si presenta intensamente Pas positiva, debolmente basofila all'Alcian e al Bleu di Toluidina. Tale basofilia è rimovibile per digestione protratta con sialidasi. Anche il trattamento con metanolo acido e acetone acido porta una perdita irreversibile della basofilia, non ripristinabile dopo saponificazione.

Ricerche elettroforetiche.

Negli estratti acquosi di tiroide di feto di cm. 18 (13^a-14^a settimana) il frazionamento elettroforetico mette in evidenza 3 bande a diversa mobilità

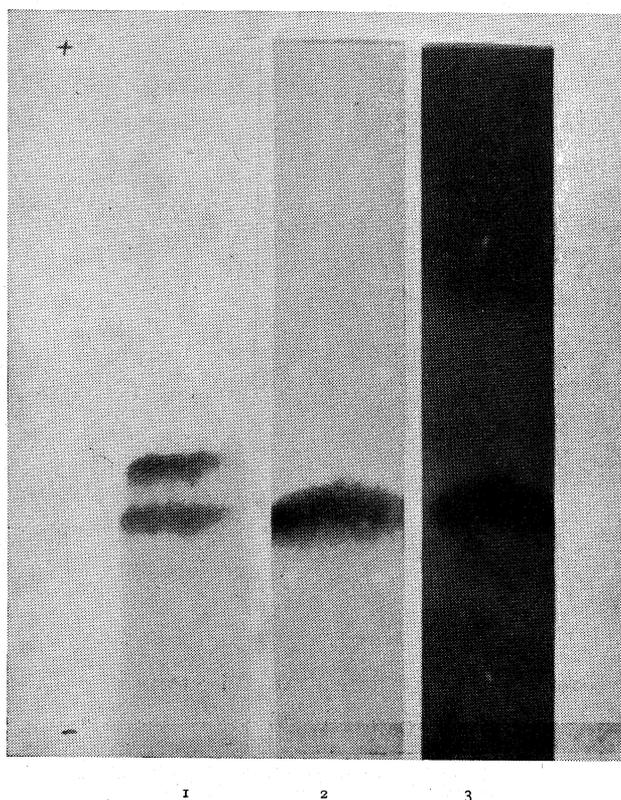


Fig. 2. - Confronto fra la mobilità dell'estratto tiroideo e le frazioni sieriche (pH 8,6).

1 siero fetale (nero-amido); 2-3 estratto tiroideo fetale (2 nero-amido; 3 Pas).

e di diverso comportamento chimico analitico (pH 8,6). La banda di media velocità è colorabile con il nero-amido, intensamente reagente con l'acido periodico-Schiff, non basofila con l'Alcian e con il Bleu di Toluidina. Si tratta pertanto di una frazione proteica con una componente carboidrata (glicoproteina). La banda a più rapido spostamento, non reattiva al nero-amido

e al Pas, positiva all'Alcian e al Bleu di Toluidina, è presumibilmente costituita da componenti aniste del tessuto interstiziale. La terza frazione, a minore spostamento, è colorabile con il nero-amido, non reagisce al Pas, né all'Alcian e al Bleu di Toluidina.

La frazione Pas positiva, anche migrata in borati (pH 10,5), appare monodispersa; a pH 5,5 (tampone acetati) il movimento anodico di tale frazione è assai ridotto, così da ritenere vicino il suo punto isoelettrico (pI).

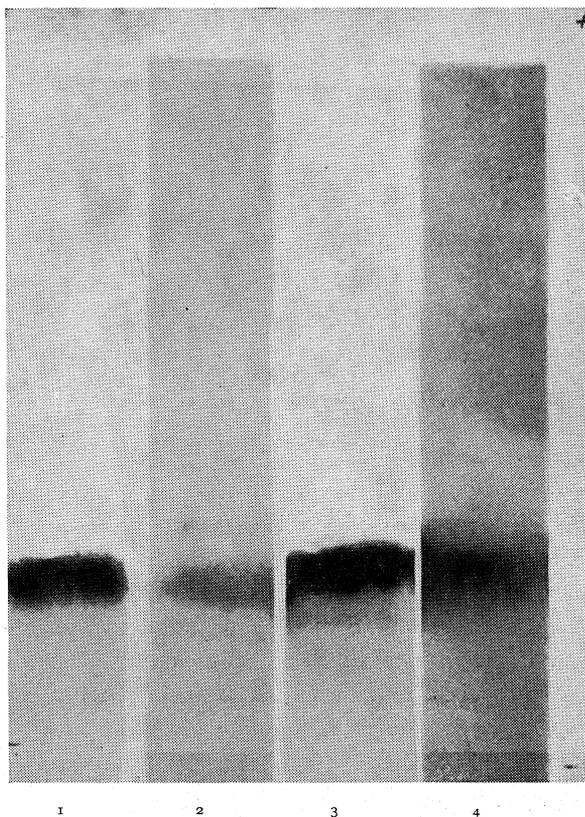


Fig. 3. - Confronto della mobilità su carta degli estratti tiroidei fetali e adulti (pH 8, 6).

1-2 estratto tiroide feto cm 26; 3-4 estratto tiroide adulto (1, 3 nero-amido; 2, 4 Pas).

Dalla tiroide dove già istochimicamente è ben riconoscibile la colloide nei follicoli (feto cm 18) è dunque estraibile un materiale glicoproteico, idro-solubile, di pI vicino a 5,5.

Nelle tiroidi successivamente esaminate (feti cm 22-26-32-41-45-50) il comportamento fisico-chimico del materiale glicoproteico estraibile con H₂O rimane immutato. In tutti i casi gli estratti contengono un'unica frazione nero-amido e Pas positiva, non basofila. Incostante è la presenza di una seconda frazione proteica non coniugata a carboidrati e a velocità di spostamento post-glicoproteina (fig. 1).

Il confronto su strisce contemporaneamente allestite degli estratti di tiroidei di feti di lunghezza progressiva dimostra che la velocità di migrazione rimane costante per tutto il periodo considerato, e cioè dal primo comparire della colloide alla completa organizzazione del parenchima tiroideo.

Tentativi di valutare la velocità di migrazione per confronto con le proteine seriche, migrando contemporaneamente sieri fetali ed estratti tiroidei, dimostrano che è dell'ordine delle alfa-globuline (fig. 2). Poiché le alfa-globuline hanno una velocità, in fase libera di $\text{cm}^2 5,5 \cdot 10^{-5} \text{ sec}^{-1} \text{ Volt}^{-1}$ è pertanto probabile che la colloide fetale abbia valori dello stesso ordine di grandezza.

Per confronto è stato anche valutato il comportamento elettroforetico della colloide adulta. Su carta tale materiale presenta un'unica frazione nero-amido e Pas positiva. Il carattere monodisperso è confermato dal comportamento in fase libera (velocità di migrazione $\text{cm}^2 5,78 \cdot 10^{-5} \text{ sec}^{-1} \text{ Volt}^{-1}$) e all'ultracentrifuga.

Dagli estratti purificati secondo il metodo di Derrien e coll. [5] si ottiene una unica frazione su carta, colorabile con il nero-amido e col Pas. Il confronto diretto su carta della colloide adulta e fetale conferma ulteriormente l'omogeneità del materiale estratto (fig. 3).

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.

I dati esposti si possono così commentare.

1° Nella tiroide fetale durante lo sviluppo, si osserva una notevole coincidenza nelle modalità con cui si istituisce il metabolismo dello jodio [11], la comparsa di materiale colloide istochimicamente dimostrabile, l'estrazione dall'organo di glicoproteine a mobilità pseudo-globulinica.

2° Dal punto di vista istochimico il materiale colloide risulta notevolmente caratterizzato in confronto ad altre mucoproteine di origine epiteliale (es. muco delle cellule caliciformi, secreto della sottomascellare . . .) [3] dai suoi caratteri di intensa Pas positività, di debole basofilia sensibile alla sialidasi, al trattamento con metanolo acido ed acetone acido. Il comportamento istochimico della colloide rimane sostanzialmente immutato per tutto lo sviluppo fetale ed è identico a quello della colloide dell'adulto.

3° Il comportamento istochimico permette di avanzare l'ipotesi che la colloide tiroidea è costituita fin dal suo primo apparire da un glicoprotide, debolmente acido, presumibilmente per radicali sialici (sensibilità alla sialidasi). A differenza di altre mucine epiteliali non si osserva salificazione interna fra gruppi aminici proteici e radicali acidi carboidrati rimuovibile mediante digestione enzimatica della frazione proteica [14].

4° Dal punto di vista elettroforetico la colloide estratta è costituita da una sola specie molecolare, di mobilità pseudoglobulinica, di pI vicino a 5,5, di natura glicoproteica. Fin da quando è estraibile in quantità sufficienti per l'analisi elettroforetica, composizione molecolare (una sola banda),

mobilità nel campo elettrico, comportamento reattivo rimangono costanti e identici a quelli dell'adulto.

5° A differenza di altre mucine epiteliali, nelle quali si osserva una progressiva maturazione biochimica del materiale prodotto (esempio cellule mucipare dell'intestino) [12] la colloide tiroidea viene secreta, fin dal suo primo apparire, con le medesime caratteristiche di composizione che contraddistinguono il prodotto dell'adulto. Ciò sta, con ogni probabilità, a significare, che i processi di elaborazione chimica dell'ormone, cui la colloide partecipa, acquisiscono, fin da momenti precoci dello sviluppo, una stabile e definitiva configurazione biochimica.

REFERENZE BIBLIOGRAFICHE.

- [1] BENAZZI, «Arch. It. Embr. Anat.», 30, 452 (1932).
- [2] BUCCIANTE L. e MASPES P. E., «Arch. It. Embr. Anat.», 27, 419 (1929).
- [3] CARINCI P., «Boll. Soc. It. Biol. Sper.», 39, 482 (1963).
- [4] DERRIEN e coll., «Bioch. Biophys. Acta», 3, 436 (1949).
- [5] GROSS Y., «Inter. Rew. Citol», 6, 265 (1957).
- [6] INGBAR S. e GALTON V., «Ann. Rew. Phys.», 25, 361 (1963).
- [7] PLASKETT L. G., BARNABY C. F. e LLOYD G. L., «Biochem. J.», 87, 473 (1963).
- [8] PLASKETT L. G., BARNABY C. F., LLOYD G. I., «Biochem. J.» 89, 479 (1963).
- [9] ROCHE J., DELTOUR G. H., MICHEL R. e LISSITZY S., «C. R. Soc. Biol., Paris», 114, 1647 (1950).
- [10] ROCHE J. e MICHEL R., «Adv. in Prot. Chem.», 6, 253 (1951).
- [11] WOLFF J., CHAIKOFF I. e NICHOLS C. W., «Endocrinology», 44, 510 (1949).
- [12] ZACCHEO D. e VIALE G., «Mon. Zool. It.», Suppl., 58, 543 (1960).
- [13] KONEFF A., NICHOLS C. W., WOLFF J., CHAIKOFF I., «Endocrinology», 45, 242 (1949).
- [14] QUINTARELLI G., «Experientia», 19, 230 (1963).