
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

SALVATORE RUSSO-CAIA, ANGELA CIANNI

**Osservazioni sulla attività di alcune esterasi durante
lo sviluppo larvale e la metamorfosi di *Musca
domestica* L.**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 33 (1962), n.1-2, p.
99-105.*

Accademia Nazionale dei Lincei

http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1962_8_33_1-2_99_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/>

Biologia. — *Osservazioni sulla attività di alcune esterasi durante lo sviluppo larvale e la metamorfosi di Musca domestica L.*^(*). Nota ^(**) di SALVATORE RUSSO-CAIA e ANGELA CIANNI, presentata dal Corrisp. A. STEFANELLI.

Precedenti ricerche sul comportamento di alcuni enzimi idrolitici durante lo sviluppo larvale e la metamorfosi di *Musca domestica* L. hanno mostrato che spesso si osservano modificazioni della loro attività in rapporto più o meno definito con le varie fasi dello sviluppo post-embrionale (Russo-Caia, 1960)⁽¹⁾.

Il significato di queste modificazioni, che interessano settori diversi del metabolismo, è spesso di difficile interpretazione; durante la metamorfosi infatti ai fenomeni biochimici connessi alla morfogenesi ed al differenziamento se ne sovrappongono altri legati alla lisi delle strutture larvali.

L'attività di alcune idrolasi presenti nella larva praticamente scompare quando termina l'accrescimento e, con la formazione del pupario, cessa ogni assunzione di alimenti dall'esterno; così ad esempio si comportano la proteinasi alcalina, la glicerico e fenilfosfatasi alcalina, la amilasi. Una possibile spiegazione di questo comportamento è che si tratti di enzimi extracellulari in rapporto con la funzione dell'apparato digerente, che durante la metamorfosi è inattivo e va incontro ad una completa riorganizzazione morfologica.

L'attività di altre idrolasi invece (per esempio della alanilglicina-dipeptidasi, della proteinasi acida, della glicerico e fenilfosfatasi acida) non scompare durante la metamorfosi; evidentemente queste attività enzimatiche non sono collegate unicamente alla presenza ed al funzionamento del canale alimentare, ma svolgono un ruolo più complesso nel metabolismo cellulare.

A questo tipo di enzimi appartiene una « lipasi » capace di idrolizzare la tributirina, che secondo alcune ricerche compiute nel nostro Istituto da Ciavattini, Rimatori e Sileoni (1959)⁽²⁾, è dimostrabile anche durante la metamorfosi, pur osservandosi una notevole diminuzione di attività con l'inizio della vita pupale.

Osservazioni sul contenuto di glucidi e lipidi totali nello sviluppo post-embrionale di *Musca domestica* (Russo-Caia e Cecere, 1960)⁽³⁾ hanno inoltre mostrato, in accordo con altri dati della letteratura, che durante la metamor-

(*) Ricerche eseguite nell'Istituto di Zoologia ed Anatomia comparata della Università di Camerino, con il contributo della Shell Internationale Research.

(**) Pervehuta all'Accademia il 5 luglio 1962.

(1) S. RUSSO-CAIA, « Ric. Scient. », 39, 1861 (1960).

(2) M. G. CIAVATTINI, A. RIMATORI, P. SILEONI, « Ric. Scient. », 29, 1874 (1959).

(3) S. RUSSO-CAIA, F. CECERE, « Ric. Scient. », 39, 1577 (1960).

fosi viene utilizzata una gran parte (il 71 %) dei materiali lipidici presenti all'inizio della vita pupale.

Partendo da queste osservazioni ci è sembrato interessante estendere lo studio delle esterasi durante lo sviluppo post-embriionale dei Ditteri; abbiamo perciò compiuto un serie di determinazioni di queste attività enzimatiche impiegando differenti substrati.

Le nostre osservazioni sono state compiute su un ceppo di *Musca domestica* L. mantenuto da alcuni anni in laboratorio sempre nelle stesse condizioni di allevamento. I criteri con i quali è stata fatta la seriazione degli stadi di sviluppo sono quelli, già illustrati, adottati in tutte le precedenti ricerche sulla metamorfosi; le larve sono state cioè ordinate in base al peso di 10 individui, le pupe in base al tempo trascorso dalla formazione del pupario.

Gli omogenati sono stati preparati in acqua bidistillata a 2°C, in genere con 10 individui dello stesso stadio, nella proporzione di 10 mg di materiale per ml di H₂O. Questa concentrazione è stata scelta dopo alcuni dosaggi eseguiti anche su omogenati più (5 mg/ml) o meno (20 mg/ml) diluiti.

La attività esterasica è stata determinata con il metodo acidimetrico di Glick (1949)⁽⁴⁾, già utilizzato in altre ricerche (Russo-Caia, 1956, 1959)⁽⁵⁾; i substrati utilizzati sono in questo caso la tributirina, il metilbutirrato, l'etilbutirrato, dai quali si libera per idrolisi enzimatica acido butirrico. La reazione avviene in mezzo alcalino, che neutralizza progressivamente l'acido liberato; la misura dell'attività enzimatica si ha titolando con acido cloridrico la diminuzione di alcalinità del mezzo (rispetto ad un bianco al tempo zero) dopo un determinato tempo di attività dell'enzima ad una determinata temperatura. La titolazione con acido cloridrico procede fino al viraggio del blu di bromotimolo usato come indicatore (pH 6,5). Si ottengono così valori di titolazione inversamente proporzionali alle quantità di acido butirrico liberate, e quindi alle quantità di estere idrolizzate dall'enzima; sottraendo questi valori da quelli del bianco al tempo zero, essi diventano direttamente proporzionali all'attività enzimatica.

In particolare nelle presenti ricerche, dopo una serie di esperienze preliminari, la miscela enzima-substrato è stata posta ad incubare a 39°C per 60'; i substrati sono stati preparati in tampone glicina-soda (secondo Glick) a pH 8,5; la titolazione è stata fatta con HCl 0,06 N.

I risultati ottenuti sono riportati nei grafici, nei quali ogni punto rappresenta la media dei valori di titolazione di un omogenato fatto per lo più con 10 individui.

Tra le diverse serie di dosaggi, una completa (comprendente cioè tutto lo sviluppo post-embriionale) è stata compiuta utilizzando lo stesso omogenato con i diversi substrati; ciò è stato fatto a scopo di controllo delle serie ottenute

(4) D. GLICK, *Techniques of Histo & Cytochemistry*. N. Y., Intersci. Publ. Co., 1949.

(5) S. RUSSO-CAIA, « Ric. Scient. », 26, 2529 (1956); ID., « Rend. Acc. Naz. Lincei », 26, 709 (1959).

con omogenati diversi, per evitare gli eventuali errori dovuti ad una non perfetta corrispondenza degli stadi di sviluppo. I valori ottenuti partendo da un omogenato unico sono risultati perfettamente comparabili a quelli degli altri dosaggi; nei grafici quindi non sono stati contraddistinti in modo particolare.

La fig. 1 si riferisce alla attività enzimatica osservata usando come substrato la tributirina; essa è presente fin dai primi stadi considerati, ed aumenta notevolmente durante il primo periodo di sviluppo larvale, raggiungendo i valori massimi nelle larve di circa 20 mg di peso. A partire da questo mo-

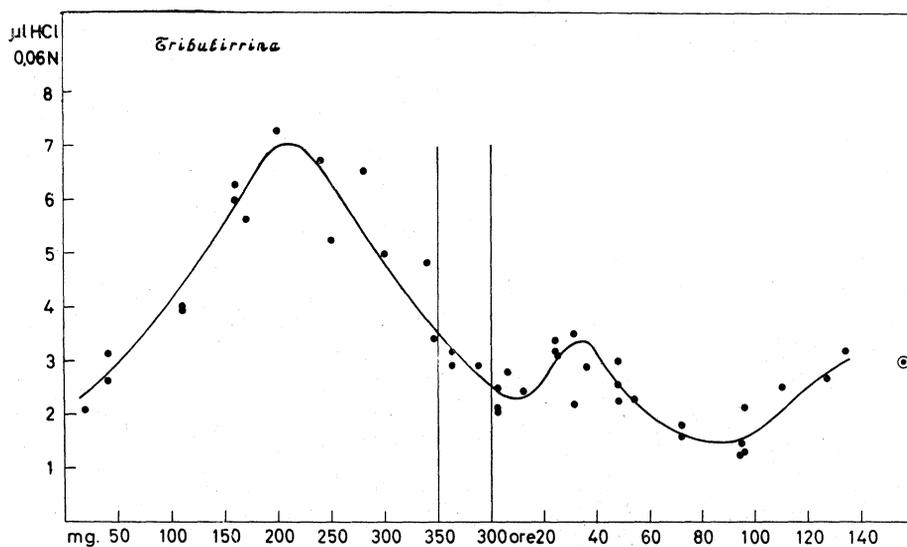


Fig. 1. - Attività esterasica a pH 8,5 (substrato tributirina) durante lo sviluppo larvale e la metamorfosi di *Musca domestica*.

In ordinate, le attività enzimatiche espresse in μl di HCl 0,06 N; in ascisse, gli stadi di sviluppo ordinati in base al peso (di 10 individui) per le larve, in base alle ore trascorse dallo impupamento per le pupe. La prima linea verticale indica la fine dell'accrescimento larvale, la seconda la formazione del pupario; il simbolo all'estrema destra il valore medio nelle immagini.

mento, pur proseguendo ancora l'accrescimento larvale (che porterà ad individui di 35 mg ed oltre), l'attività enzimatica tende a diminuire. La diminuzione si accentua soprattutto nella pre-metamorfosi, cioè in quel periodo - indicato nel grafico tra due linee verticali - in cui la larva non si alimenta più e perde anzi una parte del peso raggiunto. Con la formazione del pupario si mantengono i valori della pre-metamorfosi, e durante la vita pupale si osservano solo piccole oscillazioni con una tendenza all'aumento dopo la 100^a ora. I valori medi delle immagini non alimentate, subito dopo la schiusa, sono praticamente simili a quelli osservati nell'ultimo periodo di vita pupale.

Nella fig. 2 sono riportati in grafico i valori di attività esterasica ottenuti usando come substrato il metil-butirrato. Anche in questo caso l'attività

enzimatica, presente fin dai primi stadi considerati, aumenta notevolmente durante lo sviluppo larvale ed il massimo viene raggiunto nelle larve di 25-30 mg di peso; nelle larve più grandi, ed ancor più in quelle prossime alla metamorfosi, l'attività esterasica diminuisce. La diminuzione è però relativamente molto minore di quella che si osserva con la tributirrina, per cui l'attività enzimatica resta nella pre-metamorfosi ad un livello piuttosto elevato; nelle prime 24 ore di vita pupale si osserva anzi un aumento, che porta a valori dell'ordine di quelli osservati nelle larve di 25-30 mg. Dalla 24^a alla 100^a ora l'attività esterasica diminuisce progressivamente, per poi aumentare di nuovo nel periodo finale della metamorfosi. I valori medi delle immagini sono anch'essi elevati.

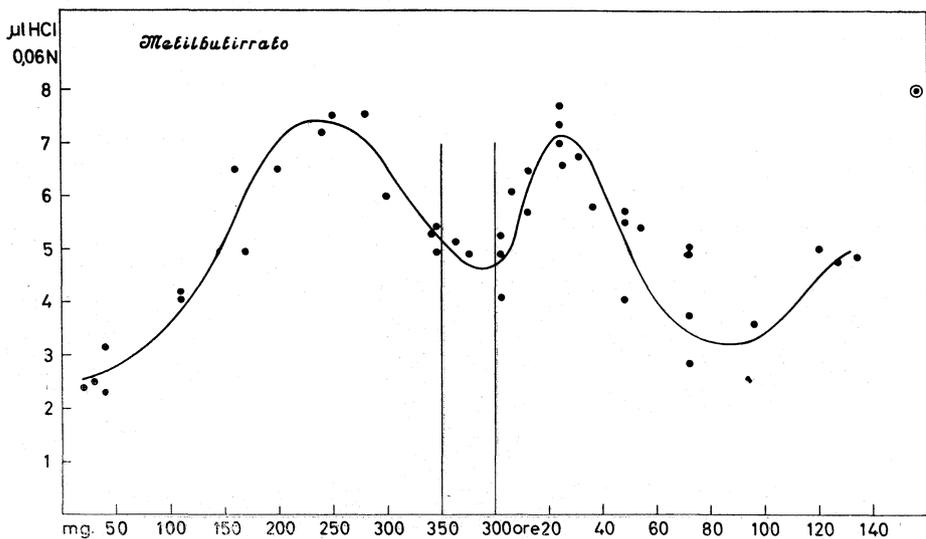


Fig. 2. - Attività esterasica a pH 8,5 (substrato metilbutirrato) durante lo sviluppo larvale e la metamorfosi di *Musca domestica*.

Valgono le stesse indicazioni della fig. 1.

Il comportamento dell'attività idrolitica nei riguardi dell'etil-butirrato, illustrato nel grafico della figura 3, è praticamente simile a quello osservato con il metil-butirrato.

I risultati delle presenti ricerche mostrano che durante tutto lo sviluppo post-embrionale di *Musca domestica* è presente, a pH 8,5, una attività idrolitica nei riguardi della tributirrina, del metilbutirrato, dell'etilbutirrato.

La idrolisi dei tre esteri ha un andamento simile nello sviluppo larvale; l'attività enzimatica è infatti sempre presente fin dai primi stadi considerati ed aumenta progressivamente nel periodo di intenso accrescimento, raggiungendo però in ogni caso i valori più elevati prima che sia completato lo sviluppo ponderale della larva. In seguito le attività esterasiche tendono a diminuire, soprattutto nella pre-metamorfosi; la diminuzione, relativamente ai

valori raggiunti durante lo sviluppo larvale, è molto più accentuata nel caso della tributirinasì. Questa differenza quantitativa fra le attività enzimatiche sui diversi substrati si rende ancor più manifesta nella vita pupale; mentre infatti la idrolisi della tributirina resta, con modeste oscillazioni, ad un livello non molto elevato che viene mantenuto nelle immagini, le curve di scissione del metilbutirato e dell'etilbutirato hanno durante la metamorfosi un andamento ad U. Nel primo periodo di vita pupale e nelle immagini appena schiuse e non ancora alimentate questi substrati vengono scissi come nelle larve in piena alimentazione. È possibile che vi siano delle relazioni tra il

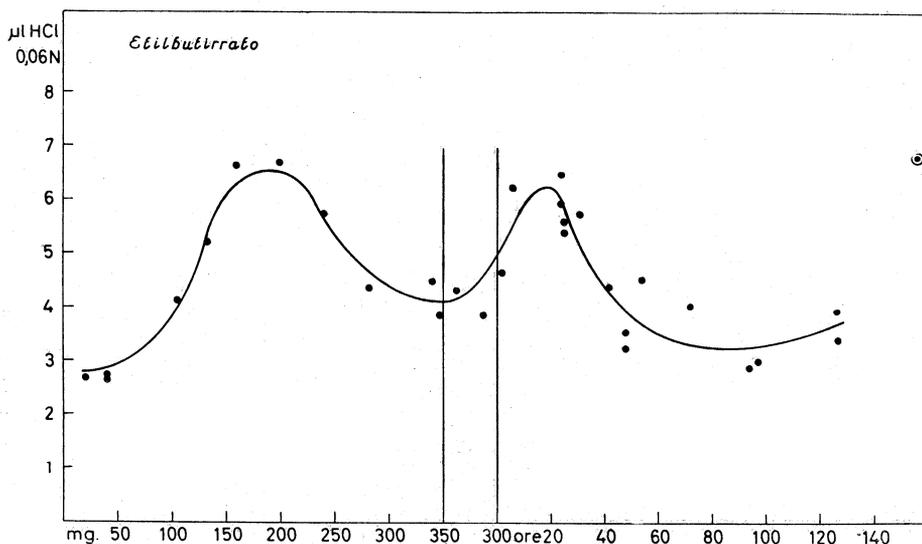


Fig. 3. - Attività esterasica a pH 8,5 (substrato etilbutirato) durante lo sviluppo larvale e la metamorfosi di *Musca domestica*.

Valgono le stesse indicazioni della fig. 1.

consumo di ossigeno, che ha tipicamente un andamento ad U, e l'attività di questi enzimi che hanno presumibilmente il compito di preparare i materiali necessari per il fabbisogno energetico della morfogenesi.

Si può concludere quindi che vi è una diversa scissione dei diversi substrati nei vari momenti dello sviluppo post-embriale; non si può decidere se ciò dipende dall'azione di più enzimi, o dalla diversa velocità con cui uno stesso enzima scinde - in momenti diversi - diversi substrati.

È noto infatti che le esterasi costituiscono un gruppo di enzimi con limiti poco netti, sprovvisti di una stretta specificità, per cui ognuno di essi può virtualmente scindere ogni estere interamente organico (Baldwin, 1957)⁽⁶⁾. Soprattutto incerti sono i confini che, nel gruppo delle esterasi, si devono

(6) E. BALDWIN, *Dynamic Aspects of Biochemistry*, Cambridge Univ. Press, 1957.

assegnare in base al substrato scisso alle vere «lipasi» (Sarles, 1955⁽⁷⁾; Overbeek, 1957⁽⁸⁾; Myers, 1960⁽⁹⁾; Hofstee, 1960⁽¹⁰⁾). Ciò malgrado, nella letteratura biologica si parla spesso di «attività lipasica» anche usando come substrati esteri di acidi grassi a corta catena, come la tributirina; il termine ha infatti, se non altro, il vantaggio di essere immediatamente evocativo del settore metabolico interessato. Le diverse concezioni su questo argomento sono state già esaminate da uno di noi (Russo-Caia, 1956, 1959)⁽⁵⁾; in questa sede interessa solo sottolineare il fatto, di notevole interesse biologico, che enzimi lipolitici provenienti da differenti tessuti scindono i diversi substrati con velocità diverse, «preferiscono» cioè (Baldwin, 1957)⁽⁶⁾ l'uno o l'altro substrato.

Dalle nostre osservazioni risulta che una attività esterasica, più o meno elevata a seconda del substrato, è presente in ogni momento della metamorfosi; ciò indica che la funzione di questi enzimi non si esaurisce nella digestione extracellulare dei lipidi alimentari introdotti dalla larva e, più tardi, dalla immagine.

Questa digestione avviene negli Insetti con un meccanismo fondamentalmente simile a quello operante nei Vertebrati (Gilmour, 1961)⁽¹¹⁾: i grassi neutri cioè (trigliceridi) vengono idrolizzati dalle lipasi con liberazione di acidi grassi.

Considerando che una delle caratteristiche delle lipasi è la facilità con cui esse catalizzano non solo la idrolisi, ma anche la sintesi degli esteri (Baldwin, 1957)⁽⁶⁾, l'attività enzimatica sulla tributirina può quindi essere messa in rapporto nelle larve sia con la liberazione di acidi grassi dai lipidi alimentari che con la costituzione delle riserve lipidiche; analogo significato si può attribuire a questa attività enzimatica durante la vita pupale, nella quale le riserve vengono progressivamente eliminate.

La liberazione di acidi grassi rappresenta naturalmente solo la prima tappa di una serie di trasformazioni che altri sistemi enzimatici operano per la utilizzazione dei lipidi come sorgenti energetiche; purtroppo la funzione nel metabolismo cellulare delle esterasi più semplici è ancora oscura (Myers, 1960⁽⁹⁾; Gilmour, 1961⁽¹¹⁾) ed è quindi difficile valutare esattamente il significato che può avere una elevata attività di questi enzimi. In base ai risultati delle presenti ricerche si può però sottolineare il fatto che l'attività esterasica sul metilbutirato e sull'etilbutirato è elevata (ed in ciò differisce dalla attività «lipasica» sulla tributirina) non solo nel periodo larvale ma anche durante la metamorfosi, quando cioè l'insetto copre con la utilizzazione dei lipidi la maggior parte del suo fabbisogno energetico.

(7) H. SARLES, «Arch. Biol. Méd.», 31, n. 1 (1955).

(8) G. A. OVERBEEK, «Clin. Chim. Acta», 2, 1 (1957).

(9) D. K. MYERS, in: *The Enzymes* (ed. P. D. Boyer, H. Lardy, K. Myrback), vol. 4, Acad. Press., N. Y., 1960.

(10) B. H. J. HOFSTEE, in: *The Enzymes* (ed. P. D. Boyer, H. Lardy, K. Myrback), vol. 4, Acad. Press., N. Y., 1960.

(11) D. GILMOUR, *Biochemistry of Insects*. Acad. Press, N. Y., 1961.

Durante la vita pupale degli Olometaboli infatti l'impiego dei materiali energetici avviene, nelle linee generali, con modalità simili a quelle che si osservano nello sviluppo embrionale di vari Vertebrati ed Invertebrati e nella metamorfosi degli Anfibi Anuri (Urbani, 1957, 1959⁽¹²⁾; Russo-Caia, 1960⁽¹³⁾; Russo-Caia e Cecere, 1960⁽¹³⁾); in tutte quelle condizioni in cui gli organismi si comportano, in una fase del loro ciclo vitale, come « sistemi chiusi », solo una piccola parte delle sostanze azotate viene consumata, mentre è accentuata la utilizzazione dei glucidi e dei lipidi.

Alcune precedenti ricerche sulle attività esterasiche e lipasiche degli Insetti sono state già considerate da uno di noi (Russo-Caia, 1960)⁽¹³⁾ e numerosi altri dati sono contenuti nella monografia di Gilmour (1961)⁽¹⁴⁾; qui ci limiteremo solo a ricordare che secondo le osservazioni di Baker e Paretzky (1958)⁽¹³⁾, una attività lipasica (tributirrina) è presente soprattutto, in *Musca domestica*, nell'intestino medio. Questi Autori però non hanno potuto osservare in nessuno stadio, ed in nessun organo, una attività esterasica (etilbutirrato).

Una idrolisi enzimatica del metil ed etilbutirrato risulta invece dalle osservazioni di van Asperen e coll., cui si devono le più complete ricerche sulle caratteristiche di questi enzimi nei Ditteri (van Asperen, 1959, 1960; van Asperen e Oppenoorth, 1960; Oppenoorth e van Asperen, 1960, 1961⁽¹⁴⁾). I problemi affrontati estesamente da questi Autori riguardano il meccanismo di azione degli insetticidi contenenti fosforo ed i fenomeni di resistenza alla azione tossica di queste sostanze. Naturalmente non desideriamo entrare nel merito di queste ricerche; le abbiamo però volute ricordare soprattutto per sottolineare la importanza che lo studio delle attività enzimatiche durante l'intero ciclo di sviluppo dei Ditteri può avere non solo per i problemi generali di biochimica dello sviluppo e della morfogenesi — che sono quelli che più direttamente ci interessano — ma anche per i problemi della fisiologia degli Insetti e della lotta contro di essi con agenti chimici.

In conclusione, le presenti ricerche mostrano che una attività esterasica nei riguardi della tributirrina, del metilbutirrato, dell'etilbutirrato, è presente durante tutto lo sviluppo post-embriionale di *Musca domestica* L.; la idrolisi dei tre esteri è quantitativamente diversa nei vari momenti dello sviluppo, e le differenze sono soprattutto evidenti durante la metamorfosi. Si ritiene che l'attività di questi enzimi debba essere considerata non solo in rapporto alla digestione extracellulare dei lipidi alimentari, ma anche e soprattutto in relazione al metabolismo della vita pupale.

(12) E. URBANI, « Rend. Sci. Ist. Lomb. », B 92, 69 (1957); ID., « Acta Embryol. Morphol. Exp. », 2, 171 (1959).

(13) F. D. BAKER, D. PARETSKY, « Arch. Biochem. Biophys. », 77, 328 (1958).

(14) K. VAN ASPEREN, « J. Ins. Physiol. », 3, 306 (1959); ID., « Biochem. Pharmacol. », 3, 136 (1960); K. VAN ASPEREN, F. J. OPPENOORTH, « Ent. exp. & appl. », 3, 68 (1960); F. J. OPPENOORTH, K. VAN ASPEREN, « Science », 132, 298 (1960); ID., « Ent. exp. & appl. », 4, 311 (1961).