

---

ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI  
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

# RENDICONTI

---

SALVATORE RUSSO-CAIA

**Aspetti biochimici della metamorfosi degli Insetti.  
Attività solubile e sedimentabile della glicerofosfatasi  
acida nei tessuti larvalie pupali di *Musca domestica*  
L.**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,  
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 39 (1965), n.6, p. 556–562.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<[http://www.bdim.eu/item?id=RLINA\\_1965\\_8\\_39\\_6\\_556\\_0](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1965_8_39_6_556_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.** — *Aspetti biochimici della metamorfosi degli Insetti. Attività solubile e sedimentabile della glicerofosfatasi acida nei tessuti larvali e pupali di Musca domestica L.* (\*). Nota di SALVATORE RUSSO-CAIA, presentata (\*\*\*) dal Corrisp. P. PASQUINI.

È noto che la istolisi di gran parte dei tessuti larvali rappresenta il fenomeno più caratteristico nello sviluppo post-embriionale dei Ditteri superiori, così come degli altri Insetti a metamorfosi completa.

Istolisi e istogenesi permettono la riorganizzazione dell'individuo in totale isolamento dall'ambiente esterno, e si svolgono sotto il controllo di un preciso meccanismo ormonale; ad esse corrispondono, a livello biochimico, complesse modificazioni che interessano tutti i costituenti dell'organismo larvale (Russo-Caia, 1960; Gilbert e Schneiderman, 1961; Agrell, 1964).

Tutt'ora incerto, malgrado le molte recenti ricerche sulla fisiologia della metamorfosi, è il meccanismo con il quale avviene la dissoluzione delle strutture larvali. Gli aspetti istologici del fenomeno sono infatti vari, ed hanno dato luogo a discussioni soprattutto per quanto riguarda il ruolo dei fagociti; gli elementi dell'emolinfia partecipano certamente alla lisi dei tessuti larvali, ma non è certo che ne siano i diretti responsabili, in quanto si pensa da alcuni che la loro azione si eserciti su cellule già morte o in via di autolisi.

Anche in specie molto simili sono stati descritti aspetti diversi: nella *Calliphora*, per esempio, abbondano nel sangue pupale emociti carichi di granuli provenienti dalla disintegrazione dei tessuti; nella *Lucilia* invece lisi e frammentazione dei muscoli avvengono spontaneamente, e gli emociti sembrano interessati solo nella fase finale di digestione dei residui (per altri esempi, vedi Wigglesworth, 1954).

Poiché in ogni caso si deve postulare l'intervento di enzimi capaci di dissolvere le strutture larvali, il problema - in termini biochimici - consiste nel sapere se la istolisi è conseguenza della attivazione di sistemi preesistenti nei tessuti, o se invece è compiuta da molecole enzimatiche portate dagli elementi fagocitari.

Un contributo notevole alla conoscenza dei fenomeni di degenerazione e lisi spontanea o patologica è stato portato negli ultimi anni dalle osservazioni di De Duve (1963) e Novikoff (1961, 1963) sulla localizzazione endocellulare delle idrolasi acide; queste ricerche hanno condotto alla identificazione dei lisosomi ed alla ipotesi che la autodigestione del citoplasma sia

(\*) Ricerche eseguite nell'Istituto di Istologia ed Embriologia della Facoltà di Scienze, Università di Roma (Gruppo di Ricerca per l'Embriologia del C.N.R.) e nell'Istituto di Biologia e Zoologia generale della Facoltà di Medicina, Università Cattolica, Roma.

(\*\*) Nella seduta dell'11 dicembre 1965.

una conseguenza della liberazione e solubilizzazione degli enzimi litici in essi contenuti.

Tipici enzimi lisosomiali sono le fosfatasi acide, il cui comportamento durante lo sviluppo post-embriale di *Musca domestica* è stato studiato in precedenti ricerche (Russo-Caia, 1960; Rimatori e Ciavattini, 1960; Russo-Caia, Ciavattini e Cecere, 1962); l'attività *totale* di questi enzimi resta durante lo sviluppo larvale e la metamorfosi praticamente costante, con oscillazioni molto modeste, e si distingue nettamente da quella dei corrispondenti enzimi alcalini.

Considerando questi dati, ho ritenuto interessante studiare le caratteristiche di sedimentabilità e attivabilità della glicerofosfatasi acida durante la metamorfosi, per vedere se la situazione endocellulare dell'enzima si modifica nel corso della istolisi dei tessuti larvali.

Le esperienze sono state compiute su larve e pupe di *Musca domestica* provenienti da un ceppo allevato in laboratorio; 20-30 individui (larve al III stadio, pupe a 9-16 ore dall'inizio della metamorfosi) sono stati privati della cuticola (o del pupario) al microscopio da dissezione e successivamente omogenati, alla temperatura del ghiaccio fondente, in saccarosio 0,30 M con un omogenizzatore Potter-Elvehjem (pistone di teflon; *clearance* 0,250 mm; velocità 1.500 giri/minuto) per 30-40 secondi.

Nelle prove di attivabilità l'attività glicerofosfatasi acida di questo omogenato totale (dosaggio colorimetrico del fosforo liberato secondo Fiske e Subbarow; contatto con il substrato 15 minuti a 37°C, 1 ora a 0°C) è stata determinata dopo preincubazione di 30 minuti a 0°C in presenza di saccarosio 0,30 M, di saccarosio ipotonico (0,06 M), di saccarosio 0,30 M più Triton 0,1 %.

Per la centrifugazione frazionata (centrifuga refrigerata MSE Highspeed 18; rotore angolare 8×50) è stato adottato in alcune prove lo schema (I) usato in precedenti ricerche (Russo-Caia e Hassan, 1965), in altre quello (II) di Hsu e Tappel (1964); in entrambi i casi la precipitazione dei lisosomi, dopo allontanamento della I frazione, è stata ottenuta centrifugando a 40.000 g per 30 minuti in presenza di tampone acetato 0,1 M a pH 5 (Conchie, Hay e Levvy, 1961). Sulle frazioni l'attività enzimatica è stata determinata dopo un contatto con il substrato di 30 minuti a 37°C e di 2-4 ore a 0°C.

I risultati delle prove di attivazione dell'omogenato totale sono riportati nel grafico della fig. 1, nel quale i valori di attività fosfatasi (medie di 6 determinazioni) sono espressi in percentuale, posta uguale a 100 l'attività in saccarosio 0,30 M. L'attivabilità dell'enzima in saccarosio ipotonico o in presenza di Triton è rispettivamente del 128% e del 175% negli omogenati di larve e del 138% e del 170% negli omogenati di pupe.

La ripartizione dell'attività fosfatasi dopo centrifugazione frazionata è indicata dai grafici della fig. 2, nei quali i valori (medie di 5 determinazioni) sono espressi in percento dell'attività dell'omogenato totale. I risultati del frazionamento secondo il I schema mostrano che nella frazione contenente

cellule intere, frammenti e nuclei è presente il 29% di attività enzimatica nelle larve, il 41% nelle pupe; l'attività sedimentabile a 40.000 g in tampone acetato è rispettivamente del 59% e del 45%; l'attività solubile del 22% e del 23%. Il rapporto tra attività sedimentabile e solubile si inverte se il frazionamento avviene in presenza di Triton.

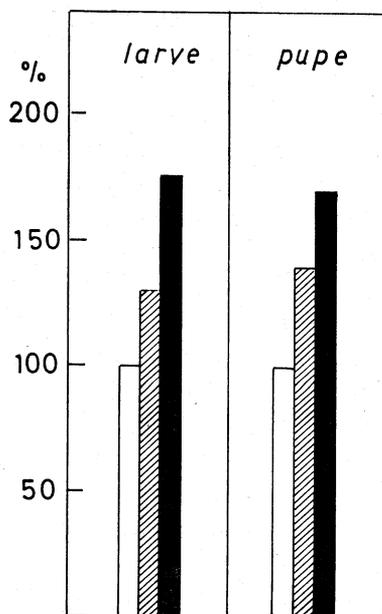


Fig. 1. - Attivabilità della glicerofosfatasi acida negli omogenati totali di larve e pupe di *Musca domestica*.

Colonnine bianche: attività enzimatica, posta uguale a 100, in saccarosio 0,30 M; colonnine tratteggiate: attività enzimatica in saccarosio ipotonico; colonnine nere: attività enzimatica in presenza di Triton 0,1%.

Con il II schema si ha nella I frazione (cellule, frammenti e nuclei) il 22% di attività nelle larve, il 32% nelle pupe. L'attività solubile è rispettivamente del 19% e del 20%, l'attività sedimentabile a 40.000 g del 68% e del 52%. Se questa frazione sedimentabile viene incubata per 10 minuti a 0°C con Triton o con acqua distillata (in modo da provocare la rottura dei lisosomi) e poi nuovamente centrifugata a 40.000 g (in modo da ottenere la sedimentazione delle membrane) la sua attività fosfatasi diventa in gran parte solubile (50% nelle larve, 39% nelle pupe, sempre in rapporto all'attività totale) e si trova nel soprannatante; una percentuale minore resta legata alle membrane.

L'insieme di questi risultati mostra innanzitutto che la fosfatasi acida studiata ha caratteristiche di sedimentabilità e attivabilità che ne indicano la localizzazione lisosomiale: la maggior parte dell'attività enzimatica presente negli omogenati in saccarosio è infatti legata a particelle che sedimen-

tano a 40.000 g in presenza di tampone acetato, e diventa solubile in seguito allo shock osmotico o all'azione del Triton.

Questo dato è in accordo con alcune recenti osservazioni morfologiche, che dimostrano nei tessuti degli Insetti la presenza di organuli che hanno istochimicamente e al microscopio elettronico le caratteristiche dei lisosomi dei Vertebrati.

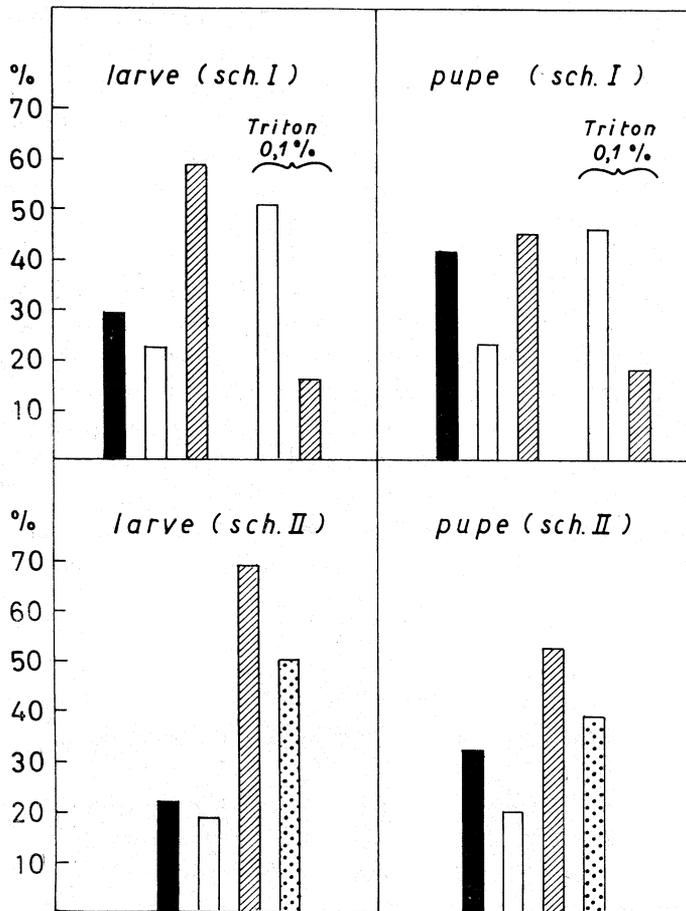


Fig. 2. - Ripartizione percentuale e solubilizzazione dell'attività glicerofosfatasi acida dopo centrifugazione frazionata di omogenati di larve e pupe, in assenza o in presenza di Triton.

Schema I - colonnine nere: cellule intere e nuclei; colonnine bianche: attività solubile; colonnine tratteggiate: attività sedimentabile a 40.000 g. Schema II - colonnine nere: cellule intere e nuclei; colonnine bianche: attività solubile; colonnine tratteggiate: attività sedimentabile a 40.000 g; colonnine a punti: solubilizzazione, dopo trattamento con acqua o con Triton, dell'attività sedimentabile.

Misch (1962) ha studiato con il metodo di Gomori la localizzazione della fosfatasi acida nell'intestino e nelle ghiandole salivari delle larve di *Sarcophaga*, ed ha riferito un apparente aumento di attività ed una maggiore diffusione della reazione in coincidenza con la istolisi.

Rasch e Gawlik (1964) hanno dimostrato in larve di *Sciara coprophila* (ghiandole salivari, intestino, tubuli di Malpighi) una attività fosfatasica acida che con il metodo di Barka appare localizzata in granuli citoplasmatici di circa  $1 \mu$ ; al microscopio elettronico questa fosfatasi è presente in formazioni più o meno complesse le più grandi delle quali ricordano i citolisomi e sono più frequenti, almeno nelle ghiandole salivari, subito dopo l'impupamento.

Lockshin e Williams (1965 *a*) hanno descritto l'intervento di organuli morfologicamente simili a lisosomi nella degenerazione dei muscoli intersegmentali dell'addome di *Antheraea pernyi* che si verifica dopo la schiusura. Dal punto di vista biochimico questi Autori (1965 *b*) hanno osservato nei muscoli in degenerazione una più elevata attività libera delle catepsine; la fosfatasi acida ha ugualmente caratteristiche lisosomiali, ma non è stato possibile dimostrarne la solubilizzazione in quanto l'enzima sembra in questo caso contenuto in particelle estremamente fragili che non resistono alla omogenizzazione in saccarosio.

I risultati delle presenti esperienze di centrifugazione frazionata, condotte secondo due diversi schemi, sono concordanti e mostrano che la percentuale di attività solubile (cioè del soprannatante privo di particelle) è la stessa sia nelle larve che nelle pupe. L'attività sedimentabile a 40.000 g presente negli omogenati di tessuti larvali appare più elevata di quella presente nelle pupe, ma a questa differenza corrisponde - pressoché esattamente in percentuale - una minore attività fosfatasica della I frazione (nuclei, frammenti, cellule intere).

Il rapporto tra attività solubile e sedimentabile resta perciò lo stesso nelle larve e nelle pupe; ciò che varia, probabilmente per una diversa agglutinabilità delle particelle, è la ripartizione dell'attività sedimentabile tra il I *pellet* (ottenuto centrifugando a 700 g) ed il II (ottenuto centrifugando a 40.000 g).

I risultati delle prove di attivazione sull'omogenato totale confermano i dati della centrifugazione, poiché l'attivabilità dell'enzima è la stessa nelle larve e nelle pupe.

Nella istolisi dei tessuti larvali di *Musca domestica* non si verifica quindi una solubilizzazione della fosfatasi acida, e l'enzima mantiene la sua localizzazione lisosomiale e la sua sedimentabilità sia prima che dopo l'inizio della metamorfosi.

Nello sviluppo embrionale dei Vertebrati una netta solubilizzazione della fosfatasi acida si osserva tipicamente, negli Uccelli, nella regressione del dotto di Müller dell'embrione maschio (Scheib-Pfleger e Wattiaux, 1962) ed in quella del mesonefro (Russo-Caia e Hassan, 1965).

Durante il riassorbimento dei tessuti codali nella metamorfosi di *Bufo* invece, la ripartizione dell'attività fosfatasica nelle varie frazioni resta invariata (Hassan e Autuori, 1964), e si ritiene che la lisi sia operata soprattutto da enzimi idrolitici contenuti nei macrofagi.

I risultati qui esposti potrebbero indicare il prevalere di questo meccanismo anche nella metamorfosi di *Musca domestica*; ulteriori ricerche sono in corso per studiare gli aspetti istochimici del fenomeno.

Concludendo, dalle presenti osservazioni sull'attività fosfatasi acida dei tessuti larvali e pupali di *Musca domestica* risulta: *a*) che l'enzima studiato ha caratteristiche che ne fanno presumere la localizzazione in una classe di organuli simili ai lisosomi dei Vertebrati; *b*) che sedimentabilità e attivabilità dell'enzima sono le stesse negli omogenati di larve mature e di pupe poco dopo l'inizio della metamorfosi; *c*) che perciò nella istolisi dei tessuti larvali di *Musca* non si verifica una solubilizzazione della fosfatasi acida simile a quella osservata in alcuni fenomeni di regressione spontanea o patologica di organi e tessuti.

## BIBLIOGRAFIA.

- I. AGRELL, *Physiological and biochemical changes during insect development*, in *Physiology of Insecta*, I, 91. Academic Press, N.Y. (1964).
- J. CONCHIE, A. J. HAY, G. A. LEVY, *Mammalian glycosidases. - 3. The intracellular localization of  $\beta$ -glucuronidase in different mammalian tissues.* « Biochem. J. », 79, 324 (1961).
- C. DE DUVE, *The lysosome concept*, in *Ciba Found. Symp. on Lysosomes*, I, Churchill, London (1963).
- L. I. GILBERT, H. A. SCHNEIDERMAN, *Some biochemical aspects of insect metamorphosis*, « Amer. Zool. », I, 11 (1961).
- G. HASSAN, F. AUTUORI, *The behaviour of some acid phosphatases in the tail of Bufo vulgaris tadpole before and during metamorphosis*, « Acta Embryol. Morphol. Exp. », 7, 314 (1964).
- L. HSU, A. L. TAPPEL, *Lysosomal enzymes of rat intestinal mucosa*, « J. Cell Biol. », 23, 233 (1964).
- R. A. LOCKSHIN, C. M. WILLIAMS, *Programmed cell death. - I. Cytology of degeneration in the intersegmental muscles of the pernyi silkworm*, « J. Ins. Physiol. », II, 123 (1965 a).
- R. A. LOCKSHIN, C. M. WILLIAMS, *Programmed cell death. - V. Cytolytic enzymes in relation to the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms*, « J. Ins. Physiol. », II, 831 (1965 b).
- D. W. MISCH, *Localization of acid phosphatase in tissues of metamorphosing flesh-fly larvae*, « J. Histochem. Cytochem. », 10, 666 (1962).
- A. B. NOVIKOFF, *Lysosomes and related particles*, in *The Cell*, II, 423. Academic Press, N.Y. (1961).
- A. B. NOVIKOFF, *Lysosomes in the physiology and pathology of cells: contributions of staining methods*, in *Ciba Found. Symp. on Lysosomes*, 36. Churchill, London (1963).
- E. M. RASCH, S. GAWLIK, *Cytolysosomes in tissues of metamorphosing sciarid larvae*, « J. Cell Biol. », 23, 123 A (1964).
- A. RIMATORI, M. G. CIAVATTINI, *Studio delle fenilfosfatasi nell'accrescimento larvale e nella metamorfosi di Musca domestica L.*, « Ric. Scient. », 30, 863 (1960).
- S. RUSSO-CAIA, *Aspetti biochimici della metamorfosi degli Insetti (Osservazioni in Musca domestica L.)*, « Ric. Scient. », 30, 1861 (1960).
- S. RUSSO-CAIA, M. G. CIAVATTINI, F. CECERE, *Osservazioni sulla attività delle glicerofosfatasi durante lo sviluppo larvale e la metamorfosi di Musca domestica L.*, « Rend. Acc. Naz. Lincei », 32, 264 (1962).
- S. RUSSO-CAIA, G. HASSAN, *Attività solubile e sedimentabile delle fosfatasi acide nello sviluppo e nella regressione del mesonefro dell'embrione di pollo*, « Acta Embryol. Morphol. Exp. », 8, 119 (1965).
- D. SCHEIB-PFLEGER, R. WATTIAUX, *Etudes des hydrolases acides des canaux de Müller de l'embryon de poulet. - I. Activités totales et solubles des canaux d'embryons de 8 à 10 jours d'incubation*, « Developm. Biol. », 5, 205 (1962).
- V. B. WIGGLESWORTH, *The Physiology of Insect Metamorphosis*. Cambridge Univ. Press. (1954).

SUMMARY. — Observations have been made, by fractional centrifugation, on the distribution of acid glycerophosphatase activity in sucrose homogenates of larval and pupal tissues of *Musca domestica*.

The sedimentation and activation properties of the enzymatic activity indicate the localization in subcellular particles similar to Vertebrate lysosomes. The ratio between sedimentable and soluble activity and the activation in total homogenates by Triton or hypotonic treatment are the same in mature larvae and in histolysing pupae.

These data indicate that during the hystolysis of larval tissues in metamorphosing *Musca* there is not a release of acid phosphatase like that observed in some other processes of spontaneous and pathological regression.