

---

ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI  
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

# RENDICONTI

---

SALVATORE RUSSO-CAIA, GIORGIO HASSAN

## Osservazioni istochimiche sulla glicerofosfatasi acida nel mesonefro in regressione dell'embrione di pollo

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,  
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 39 (1965), n.6, p. 563–567.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<[http://www.bdim.eu/item?id=RLINA\\_1965\\_8\\_39\\_6\\_563\\_0](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1965_8_39_6_563_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 istochimiche sulla glicerofosfatasi acida nel mesonefro in regressione dell'embrione di pollo* (\*). Nota di SALVATORE RUSSO-CAIA e GIORGIO HASSAN, presentata (\*\*) dal Corrisp. P. PASQUINI.

In precedenti ricerche (Russo-Caia e Hassan, 1965) abbiamo messo in evidenza, con tecniche biochimiche, una solubilizzazione graduale delle fosfatasi acide durante la regressione spontanea del mesonefro che si verifica negli Uccelli alla fine dello sviluppo embrionale.

Quantitativamente le esperienze di centrifugazione frazionata hanno mostrato che mentre nel mesonefro al 14° giorno il 70% circa dell'attività glicerofosfatasi è sedimentabile e solo il 10% è presente nel soprannatante privo di particelle, durante la involuzione la attività solubile sale al 37% del totale al 18°-19° giorno ed al 57% al 20°-21° giorno. Una analoga solubilizzazione si osserva nel mesonefro in regressione nel caso dell'attività fenilfosfatasi.

Considerando la tipica localizzazione endocellulare delle fosfatasi acide (De Duve, 1963; Novikoff, 1963), questi dati biochimici dimostrano un intervento dei lisosomi nella regressione del rene intermedio e indicano una loro modificazione nel corso del fenomeno involutivo.

Nel caso da noi studiato, così come in altri esempi di degenerazione e lisi fisiologica o patologica di tessuti, la solubilizzazione delle fosfatasi acide o di altri enzimi lisosomiali, osservata con tecniche biochimiche dopo omogeneizzazione dell'organo, può avere diverse interpretazioni.

I dati biochimici ottenuti partendo da un omogenato possono essere infatti la risultante di una modificazione complessa della popolazione cellulare, in genere per invasione di macrofagi i cui lisosomi siano più fragili di quelli del parenchima dell'organo in regressione; una seconda eventualità è che essi esprimano la alterazione di lisosomi preesistenti divenuti più fragili, senza però che nella cellula integra si verifichi una rottura della loro membrana; possono infine denunciare la effettiva rottura intracellulare dei lisosomi e la successiva invasione del citoplasma da parte di enzimi litici.

L'indagine istochimica della fosfatasi acida, che permette di studiare con sufficiente precisione la distribuzione intracellulare e la morfologia dei lisosomi, contribuisce efficacemente a chiarire la rottura della modificazione di questi organuli; rappresenta perciò il corollario di ogni indagine biochimica che abbia messo in evidenza la partecipazione dei lisosomi ad un evento biologico.

(\*) Ricerche eseguite nell'Istituto di Istologia ed Embriologia della Facoltà di Scienze dell'Università di Roma (Gruppo di Ricerca per l'Embriologia del C.N.R.).

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

Le nostre osservazioni istochimiche sono state compiute sul mesonefro di embrioni di pollo di 13-14 giorni (periodo in cui l'organo ha raggiunto il massimo sviluppo ed è in piena attività funzionale) e di 20-21 giorni (al momento cioè in cui è pienamente in atto la regressione). Gli organi interi sono stati fissati per 2 ore in glutaraldeide al 25% diluita 1 : 8 con tampone cacodilato a pH 7,2; sia la fissazione che le successive operazioni (a parte naturalmente la incubazione nel substrato) sono state fatte alla temperatura del ghiaccio fondente per conservare l'attività enzimatica ed evitare ogni alterazione dei lisosomi. Le sezioni, dello spessore di 10-15  $\mu$ , sono state ottenute al microtomo congelatore e successivamente poste ad incubare nel mezzo di Gomori per la glicerofosfatasi acida a 38°C per 8 e 15 minuti; la specificità della reazione è stata accertata in preparati di controllo, inibendo la idrolisi del substrato con fluoruro di sodio 0,01 M.

Nella Tavola I sono riprodotte alcune microfotografie rappresentative degli aspetti osservati nel mesonefro di 14 e di 20 giorni.

La struttura istologica del mesonefro degli Uccelli nel momento del suo massimo sviluppo è fondamentalmente simile a quella del metanefro, a parte la maggiore grandezza del glomerulo che ha un diametro di circa 120  $\mu$ . Nel tubulo si distinguono un segmento prossimale, una zona di transizione ed un segmento distale, ed i tipi cellulari presenti in queste varie parti sono simili a quelli del rene definitivo; può mancare una tipica ansa di Henle (Stampfli, 1950).

La distribuzione della fosfatasi acida nel mesonefro in questo stadio (figg. 1 e 2) coincide con quella descritta da Sträus (1959, 1963) e da Novikoff (1960, 1963) nel rene dei Mammiferi; la maggiore attività si osserva infatti nella zona corticale, e le cellule più ricche di enzima sono quelle del tubulo prossimale.

Nei nostri preparati di mesonefro al 14° giorno l'attività enzimatica appare localizzata in granuli di 0,5-1  $\mu$  di diametro; non si osservano quegli aspetti di diffusione citoplasmatica che Wachstein, Meisel e Ortiz (1962) hanno trovato nel rene normale dei Mammiferi, considerandoli almeno in parte dovuti alla glucoso-6-fosfatasi.

Raramente, e solo in alcuni tubuli, la reazione enzimatica è a questo stadio localizzata in granuli di dimensioni maggiori; nel metanefro del pulcino dopo la schiusa invece questo quadro è molto più frequente, probabilmente in relazione alla più completa funzionalità del rene definitivo. È noto infatti dalle osservazioni di Straus e Novikoff che il numero e la grandezza dei lisosomi variano nel rene in rapporto alla entità dei fenomeni di riassorbimento proteico.

Gli altri elementi del nefrone (glomeruli, tubuli distali, collettori) mostrano, con i tempi di incubazione da noi usati, una attività fosfataseica molto più debole o assente.

Profondamente diverso è il quadro istochimico del mesonefro al 20°-21° giorno (Tav. I, figg. 3-6), nel quale - istologicamente - si osserva la obliterazione del lume dei tubuli con sfaldamento delle cellule epiteliali della

parete e scomparsa della membrana basale, mentre i glomeruli appaiono ridotti di volume e in avanzata degenerazione.

La reazione della fosfatasi acida appare nell'organo in regressione molto più intensa e più largamente diffusa in tutti gli elementi del nefrone, pur essendo anche in questo caso i tubuli prossimali i più fortemente positivi; l'aspetto delle sezioni a piccolo ingrandimento è tipico, e contrasta nettamente con quello del mesonefro funzionante.

A più forte ingrandimento si nota che l'enzima è ora prevalentemente localizzato in granuli molto più grandi dei normali lisosomi osservati nel mesonefro al 14° giorno; benché ovviamente solo una indagine al microscopio elettronico ne possa precisare la struttura, il loro aspetto è quello di citolisomi.

Formazioni di questo tipo sono state descritte in cellule sofferenti e in via di autolisi in molte condizioni fisiologiche o patologiche (vedi Novikoff, 1961), tra le quali alcune alterazioni renali sperimentali. Novikoff (1959) ha per esempio osservato nel ratto la formazione di citolisomi dopo legatura dell'uretere, e Janigan e Santamaria (1961) hanno descritto nella nefrosi da saccarosio aspetti molto simili a quelli da noi osservati.

In molte zone del mesonefro in involuzione l'attività fosfatasica è particolarmente intensa, e si osserva la aggregazione ed apparente fusione dei citolisomi, con la comparsa di larghe zone di positività della reazione che in alcuni casi occupano abbastanza regolarmente il contorno del tubulo.

Si osservano anche con una certa frequenza aspetti che sembrano indicare una diffusione dell'enzima nel citoplasma; va infatti considerata anche la possibilità che la fosfatasi acida - divenuta extralisosomiale - resti nel tessuto senza diffondere e sia perciò rilevabile istochimicamente. Novikoff (1961) ritiene che ciò possa avvenire in particolari condizioni di fissazione e ricorda, tra i casi in cui sembra di « vedere » la solubilizzazione dell'enzima, la cheratinizzazione delle cellule epiteliali morte, la coda in regressione del girino e - particolarmente interessante per noi - il rene dopo legatura dei vasi.

Anche Janigan e Santamaria del resto descrivono, nella nefrosi sperimentale del ratto, una reazione diffusa e massiccia nel citoplasma, e riportano figure che ricordano molto i quadri da noi osservati.

È perciò verosimile che la fissazione in glutaraldeide da noi usata possa aver mantenuto nel tessuto anche una parte dell'attività fosfatasica solubile. Questa ipotesi riceve un appoggio diretto dalle recentissime osservazioni di Janigan (1965), il quale ha dimostrato che la glutaraldeide è il fissativo che meglio conserva l'attività solubile, ed uno indiretto da quelle di Pearse, La Ham e Janigan (1963), i quali non hanno potuto osservare nessun aumento di attività fosfatasica e nessun quadro particolare nel mesonefro in regressione di embrioni di pollo fissati con formolo-calcio.

Alcune prove da noi effettuate con questo fissativo ci hanno peraltro fornito quadri che, pur non essendo evidenti come quelli della glutaraldeide, dimostrano ugualmente - in concordanza con i dati biochimici - una diffe-

renza nel numero e nella grandezza dei lisosomi tra il mesonefro attivo e quello in regressione.

In conclusione, le presenti osservazioni istochimiche sulla fosfatasi acida dimostrano una partecipazione diretta dei lisosomi al processo di degenerazione cellulare che si verifica durante la regressione del mesonefro nell'embrione di pollo; le immagini osservate (formazione di citolisomi e di masse più cospicue dovute alla loro aggregazione, diffusione della reazione nel citoplasma) sono in accordo con i risultati delle nostre precedenti ricerche biochimiche che hanno dimostrato una solubilizzazione dell'enzima nel corso del fenomeno involutivo.

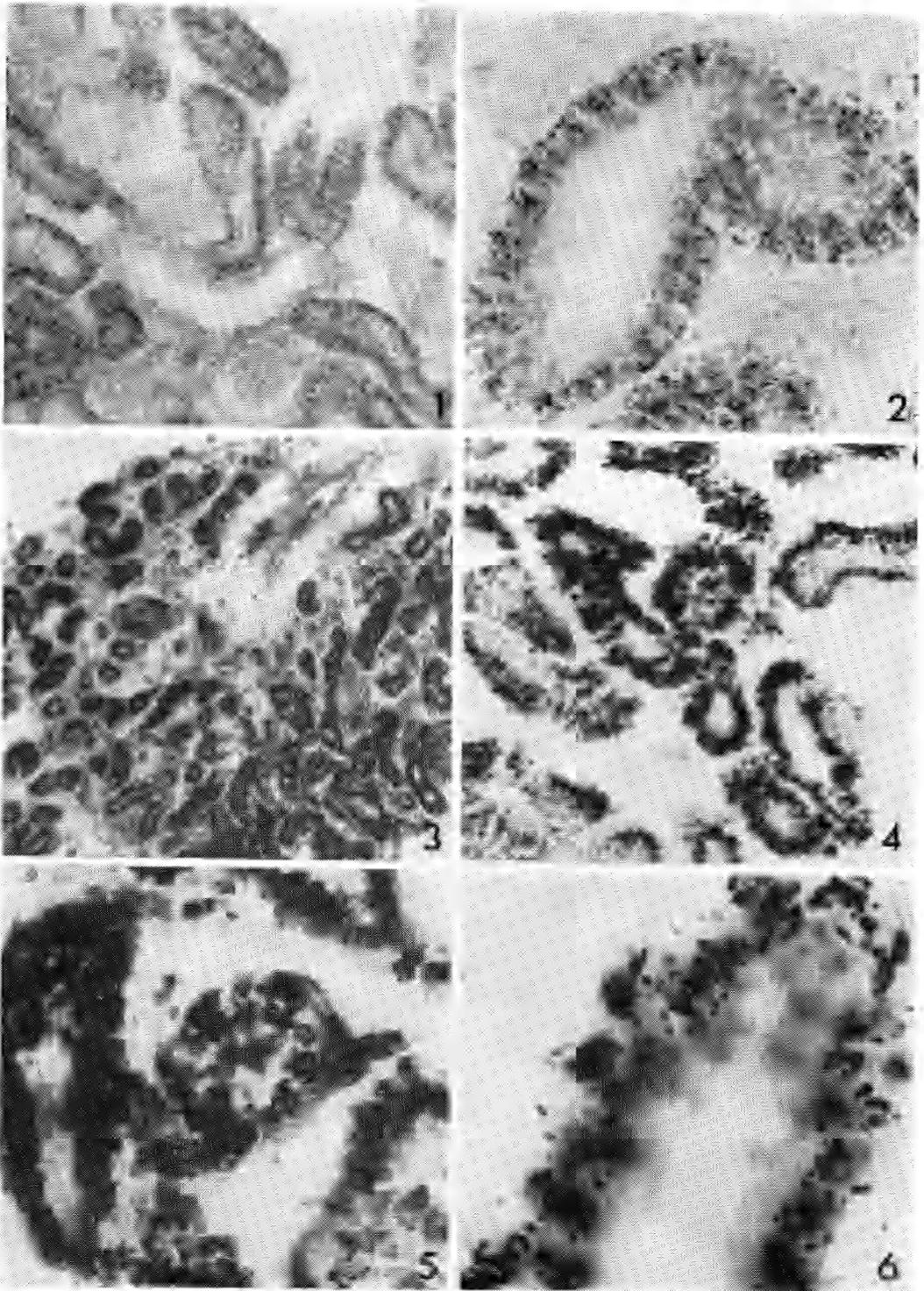
#### BIBLIOGRAFIA.

- C. DE DUVE, *The lysosome concept*. In: *Ciba Found. Symp. on Lysosomes*, 1; Churchill, London (1963).
- D. T. JANIGAN, *The effects of aldehyde fixation on acid phosphatase activity in tissue blocks*, « J. Histochem. Cytochem. », 13, 476 (1965).
- D. T. JANIGAN, A. SANTAMARIA, *A histochemical study of swelling and vacuolation of proximal tubular cells in sucrose nephrosis in the rat*, « Am. J. Pathol. », 39, 175 (1961).
- A. B. NOVIKOFF, *The proximal tubule cell in experimental hydronephrosis*, « J. Biophys. Biochem. Cytol. », 6, 136 (1959).
- A. B. NOVIKOFF, *The rat kidney: cytochemical and electron microscopic studies*. In: *Biology of Pyelonephritis*, 113; Churchill, London (1960).
- 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).
- A. G. E. PEARSE, Q. N. LA HAM, D. T. JANIGAN, *Developmental histoenzymology of the chick kidney*, « Folia Histochem. Cytochem. », 1, 409 (1963).
- 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).
- H. R. STAMPFLI, *Histologische Studien am Wolff'schen Körper (Mesonephros) der Vögel und über seinen Umbau zu Nebenhoden und Nebenovar*, « Rev. Suisse Zool. », 57, 237 (1950).
- V. STRAUS, *Rapid cytochemical identification of phagosomes in various tissues of the rat and their differentiation from mitochondria by the peroxidase method*, « J. Biophys. Biochem. Cytol. », 5, 193 (1959).
- V. STRAUS, *Comparative observations on lysosomes and phagosomes in kidney and liver of rats after administration of horse-radish peroxidase*. In: *Ciba Found. Symp. on Lysosomes*, 151; Churchill, London (1963).
- M. WACHSTEIN, E. MEISEL, J. ORTIZ, *Intracellular localization of acid phosphatase as studied in mammalian kidneys*, « Lab. Invest. », 11, 1243 (1962).

SUMMARY. — Observations made by the Gomori technique on glutaraldehyde-fixed tissues demonstrate direct intervention of lysosomes in the process of cellular degeneration which occurs during the regression of mesonephros in the chick embryo.

The observed histochemical aspects are formation of cytolysosomes, aggregation of droplets forming large and irregular acid phosphatase masses, and diffusion of the reaction in the cytoplasm.

These morphologic features agree with previous biochemical results, which indicate a release of acid phosphatase during the regression of mesonephros.





## SPIEGAZIONE DELLA TAVOLA I

*Sezioni al congelatore di mesonefro di embrioni di pollo al 13° ed al 21° giorno di sviluppo. Fissazione in glutaraldeide per 2 ore, incubazione nel mezzo di Gomori per la glicerofosfatasi acida per 15 minuti.*

Fig. 1. - Mesonefro al 13° giorno; 200 ×.

Fig. 2. - Mesonefro al 13° giorno; 600 ×.

Fig. 3. - Mesonefro al 21° giorno; 150 ×.

Fig. 4. - Mesonefro al 21° giorno; 250 ×.

Fig. 5. - Mesonefro al 21° giorno; 800 ×.

Fig. 6. - Mesonefro al 21° giorno; 1.500 ×.

*Spiegazioni nel testo.*