
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

SALVATORE RUSSO-CAIA

**Osservazioni istochimiche sulla localizzazione della
fosfatasi acida durante la metamorfosi di *Musca*
domestica L.**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 43 (1967), n.1-2, p.
129–134.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1967_8_43_1-2_129_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 localizzazione della fosfatasi acida durante la metamorfosi di Musca domestica L.* (*). Nota (**)
di SALVATORE RUSSO-CAIA, presentata dal Corrisp. P. PASQUINI.

SUMMARY. — Histochemical observations have been made by the Gomori technique on the localization of acid glycerophosphatase in some glutaraldehyde or formol-calcium fixed tissues of metamorphosing *Musca domestica*. The degeneration of larval epidermis and midgut depends upon autolytic processes with the direct intervention of lysosomes: the observed histochemical aspects indicate in effect striking changes in their morphology and a strong diffusion of the enzyme in the cytoplasm. The first stages of larval muscle histolysis take place on the contrary without any histochemically detectable intervention of acid phosphatase, which is only afterwards present in uni or multinucleate haemocytes which phagocytize the muscle fragments.

Alcune osservazioni biochimiche su omogenati in saccarosio di larve e pupe (Russo-Caia, 1965) hanno mostrato che la fosfatasi acida ha nei tessuti di *Musca domestica* caratteristiche lisosomiali, e che la sedimentabilità e attività dell'enzima sono le stesse prima e dopo l'inizio della metamorfosi.

Ciò indica che nella pupa non si verifica una solubilizzazione della fosfatasi di entità tale da modificare il rapporto tra attività sedimentabile e solubile nell'omogenato dell'intero animale, ma naturalmente non esclude che enzimi lisosomiali intervengano nella istolisi di singole strutture larvali destinate a trasformarsi o a scomparire.

Per controllare questa ipotesi, che le attuali conoscenze sulla funzione delle idrolasi acide (De Duve e Wattiaux, 1966) rendono molto verosimile, è utile lo studio istochimico della fosfatasi acida che — compiuto con criteri che ne garantiscano la specificità — permette di conoscere con notevole precisione la distribuzione intracellulare, la morfologia e le eventuali modificazioni dei lisosomi. Nella metamorfosi degli Insetti è spesso incerto il ruolo primario o secondario che i fagociti esercitano nella dissoluzione delle strutture larvali; diventa quindi particolarmente interessante studiare istochimicamente nei singoli organi la entità dei fenomeni di auto e di eterolisi, cioè dei due fondamentali meccanismi con cui operano gli enzimi lisosomiali.

Le mie osservazioni, di cui in questa Nota si riferiscono i primi risultati, sono state compiute su larve e su pupe in vari stadi della metamorfosi, fissate in glutaraldeide o formolo-calcio e tagliate al criostato (1). Sulle sezioni, mon-

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

(**) Pervenuta all'Accademia il 22 luglio 1967.

(1) Ringrazio la signora Vera Autuori-Pezzoli ed il signor Pierpaolo Gaggi per il gentile aiuto tecnico.

tate su coprioggetti, è stata eseguita la reazione di Gomori con le modalità indicate da Holt (1959), e successivamente la colorazione con verde metile - pironina secondo Unna - Brachet. Sezioni non trattate per la fosfatasi sono state colorate con il reattivo di Feulgen, con blu di toluidina, ematossilina ferrica, ematossilina - eosina, Mallory - Azan.

Nelle tavole sono riportate alcune immagini più significative, riguardanti la localizzazione della glicerofosfatasi acida nell'epidermide (Tav. I), nell'intestino medio (Tav. II) e nella muscolatura (Tav. III).

Gli aspetti istologici con i quali si verifica il rinnovamento dell'epidermide durante lo sviluppo post-embrionale dei Ditteri sono descritti in modo particolarmente ampio nei lavori di Kowalevsky (1887), Van Rees (1888) Perez (1910) e Robertson (1936). Fondamentalmente esso avviene per la proliferazione dai dischi immaginali del torace e dell'addome di cellule che si estendono progressivamente in tutte le direzioni e finiscono col formare uno strato continuo. Le cellule della vecchia epidermide, che nella larva erano appiattite e distese, assumono contorni irregolari e si peduncolizzano, fino ad apparire come « sospese » alla cuticola; contemporaneamente vanno incontro a profonde modificazioni regressive che si manifestano nel citoplasma e nei nuclei, fortemente picnotici (Tav. I, figg. 1, 3). La fase terminale è il distacco di questi elementi nella cavità corporea (dai nuclei picnotici dell'epidermide larvale derivano in gran parte le « goccioline cromatiche » caratteristiche di questo stadio), e la probabile eliminazione dei loro residui ad opera di elementi fagocitari.

Fin dalle primissime ore della metamorfosi la reazione per la fosfatasi acida è fortemente positiva nelle cellule dell'epidermide larvale, e non si osservano differenze nella sua intensità nelle diverse zone. L'attività enzimatica appare localizzata in granuli numerosi e distinti, disposti in prevalenza dal lato esterno delle cellule, cioè verso la cuticola (Tav. I, fig. 2). Questa polarità è ancor più evidente (e i granuli fosfatasi più grandi e numerosi) in stadi e nelle zone in cui le cellule epidermiche appaiono peduncolizzate (Tav. I, fig. 3). La fosfatasi acida è invece assente, o al massimo presente in pochissimi e piccolissimi granuli, nelle cellule dei dischi immaginali da cui, per attiva moltiplicazione, si riforma l'epidermide definitiva (Tav. I, fig. 4). Particolarmente interessante è il quadro istochimico che si osserva in stadi più avanzati, in cui si verifica la completa dissoluzione dell'epidermide larvale; la reazione per la fosfatasi acida è intensissima, e l'enzima appare localizzato non più in granuli discreti, ma in masse voluminose che spesso confluiscono fino ad occupare tutto il citoplasma. Carichi di fosfatasi sono anche i frammenti di cellule epidermiche distaccate (Tav. I, fig. 5).

Il canale digerente va incontro, durante la metamorfosi dei Ditteri, a profondi cambiamenti che interessano non solo la forma e la relativa grandezza delle diverse parti, ma anche la natura del rivestimento epiteliale. L'intestino medio (« stomaco », « mesenteron »), che è la parte funzionalmente più importante in quanto sede dei processi di digestione e assorbimento, subisce le trasformazioni più radicali; anche in questo caso le più complete descrizioni

istologiche del fenomeno sono quelle di Kowalevsky (1887), Van Rees (1888), Perez (1910) e Robertson (1936).

Come nel caso della epidermide, alla formazione di un nuovo strato epiteliale continuo da parte degli istoblasti attivamente proliferanti corrisponde il distacco e la involuzione del vecchio epitelio larvale che viene rigettato nel lume; la massa delle cellule larvali, circondata dagli elementi di un tessuto « reticolare » che ha meccanicamente contribuito al suo distacco, va successivamente incontro ad una lenta e completa degenerazione, di cui sono aspetti caratteristici la perdita dei confini cellulari con formazione di una struttura sinciziale (Tav. II, fig. 1) e la picnosi dei nuclei (Tav. II, fig. 2). Tappa finale di questo processo è la formazione del « corpo giallo » che persiste per tutta la vita pupale (Tav. II, fig. 4). In tutti gli stadi di questo processo di degenerazione la positività della reazione per la fosfatasi acida nelle strutture larvali è intensissima (Tav. II, figg. 3, 4); aspetti istochimici come quello dell'intestino medio non si osservano, per tutta la durata della metamorfosi, in nessun altro degli organi destinati a trasformarsi o a scomparire.

Le ricerche istologiche sulla trasformazione dei muscoli larvali durante la metamorfosi degli Olometaboli sono state in passato molto numerose, ed hanno spesso portato a risultati contrastanti; oltre agli Autori già citati, sono soprattutto da ricordare – per quanto riguarda in particolare i Ditteri – le osservazioni di Berlese (1902), Mercier (1906) e quelle recentissime di Crossley (1965), che ha compiuto anche una concisa rassegna di gran parte della precedente letteratura.

Punto centrale della discussione, resa particolarmente complessa dal fatto che i fenomeni di istolisi non sono gli stessi nei diversi ordini, hanno varia estensione e successione temporale nei diversi muscoli e sono accompagnati dalla contemporanea istogenesi delle fibre immaginali, è stato il ruolo dei fagociti, capaci secondo alcuni di attaccare muscoli apparentemente normali, secondo altri di intervenire solo sui frammenti (sarcoliti) a disintegrazione avvenuta. Questo punto sembra oggi chiarito, in quanto le osservazioni più recenti (Evans, 1936; Robertson, 1936; Jones, 1956; Whitten, 1964; Crossley, 1965) concordemente dimostrano che la fagocitosi interviene solo dopo che il muscolo si è frammentato spontaneamente. Resta ancora però da stabilire con certezza quali siano, tra i numerosi tipi di emociti descritti da vari Autori (Akesson, 1953; Jones, 1962; Whitten, 1964; Crossley, 1964), quelli capaci di una attività fagocitica. Uno degli aspetti istologici più comuni del muscolo in istolisi è la presenza, in mezzo alle fibre frammentate e dislocate, di un grande numero di elementi cellulari molto caratteristici con il citoplasma completamente infarcito di grosse granulazioni, il nucleo poco visibile e il confine cellulare non ben delimitabile (Tav. III, figg. 1, 2). È soprattutto a questi elementi, osservati da tempo e classicamente descritti come « Körnchenkulgen » da Weismann (1864) e « sphères de granules » da Perez (1910), che è stata tradizionalmente attribuita la funzione fagocitaria.

Istochimicamente la reazione per la fosfatasi acida è debolmente positiva (con tempi brevi di incubazione) nei numerosi emociti che fin dalle primis-

sime ore della metamorfosi si affollano intorno ai muscoli in iniziale involuzione (Tav. III, fig. 3); è negativa nelle fibre e a livello delle caratteristiche formazioni granulari sparse tra di esse negli stadi più avanzati della istolisi (Tav. III, fig. 2). Carichi di granuli fosfatasi sono invece rari elementi di diametro maggiore alla periferia dei muscoli (Tav. III, figg. 2, 4). Ugualmente positiva, con una localizzazione dell'enzima in granuli più grandi, è la reazione in particolari formazioni che si osservano già nelle pupe di poche ore e che rappresentano probabilmente sincizi formati, intorno ad un frammento di muscolo, da più elementi fagocitari (Tav. III, figg. 5, 6). In complesso l'intervento istochimicamente rivelabile della fosfatasi acida nei fenomeni di istolisi muscolare appare perciò piuttosto limitato, soprattutto in paragone agli aspetti istochimici « drammatici » che si osservano nella involuzione dell'epidermide e dell'intestino medio.

Nella precedente Nota sono state ricordate alcune ricerche (Misch, 1962; Rasch e Gawlik, 1964; Lockshin e Williams, 1965) che dimostrano la esistenza nei tessuti degli Insetti di organuli che hanno istochimicamente e al microscopio elettronico caratteristiche simili a quelle dei lisosomi dei Vertebrati; altre osservazioni in questo senso sono state successivamente fatte da Locke e Collins (1965) e da Walker (1966) in cellule del corpo grasso.

Prove dirette di un intervento dei lisosomi nei fenomeni di istolisi della metamorfosi hanno inoltre fornito le ricerche di Schin e Clever (1965) che hanno visto al microscopio elettronico una diffusione citoplasmatica della fosfatasi acida durante la involuzione delle ghiandole salivari di *Chironomus*, e quelle di Scharrer (1966) e di Osinchak (1966) che hanno attribuito ai lisosomi e alle idrolasi in essi contenute un ruolo essenziale nella regressione delle ghiandole protoraciche di alcuni Blattodei.

In conclusione, i risultati delle presenti ricerche istochimiche su tessuti in istolisi di *Musca domestica* dimostrano una modificazione delle strutture contenenti la fosfatasi acida, con formazione di citolisomi e diffusione dell'enzima nel citoplasma, durante la massiccia autolisi dell'epidermide e dell'intestino medio; la istolisi dei muscoli larvali avviene invece nella prima fase (frammentazione, formazione di sarcoliti) senza modificazioni della fosfatasi acida, e solo in seguito si osserva la partecipazione di questo enzima, localizzato in cellule dell'emolinfa capaci (isolatamente o con la formazione di elementi sinciziali) di una attività fagocitica. La regressione delle strutture larvali avviene perciò nella metamorfosi con l'intervento dei lisosomi, e i due meccanismi con i quali agiscono le idrolasi acide (auto ed eterolisi) coesistono ed operano nei diversi tessuti ed organi con diversa importanza.

BIBLIOGRAFIA.

- AKESSON B., *Observations on the haemocytes during the metamorphosis of Calliphora erythrocephala* (Meig.), « Ark. Zool. », 6, 203 (1953).
- BERLESE A., *Osservazioni su fenomeni che avvengono durante la ninfosi degli insetti metabolici. Parte II. Tessuto muscolare (miociti)*, « Riv. Patol. Veget. », 10, 1 (1902).
- CROSSLEY A. C. S., *An experimental analysis of the origins and physiology of haemocytes in the blue blow-fly Calliphora erythrocephala* (Meig.), « J. Exp. Zool. », 157, 375 (1964).
- CROSSLEY A. C. S., *Transformations in the abdominal muscles of the blue blow-fly Calliphora erythrocephala* (Meig) during metamorphosis, « J. Embryol. exp. Morphol. », 14, 89 (1965).
- DE DUVE C., WATTIAUX R., *Functions of lysosomes*, « Ann. Rev. Physiol. », 28, 435 (1966).
- EVANS A. C., *Histolysis of muscle in the pupa of the blow-fly Lucilia sericata* (Meig.), « Proc. R. Ent. Soc. London », A 11, 52 (1936).
- HOLT S. J., *Factors governing the validity of staining methods for enzymes, and their bearing upon the Gomori acid phosphatase technique*, « Exp. Cell Res. », suppl. 7, 1 (1959).
- JONES J. C., *The hemocytes of Sarcophaga bullata Parker*, « J. Morphol. », 99, 233 (1956).
- JONES J. C., *Current concepts concerning insect hemocytes*, « Amer. Zool. », 2, 209 (1962).
- KOWALEVSKY A., *Beiträge zur Kenntnis der nachembryonalen Entwicklung der Musciden*, « Zeitschr. wiss. Zool. », 45, 542 (1887).
- LOCKE M., COLLINS J. V., *The structure and formation of protein granules in the fat body of an insect*, « J. Cell. Biol. », 26, 857 (1965).
- LOCKSHIN R. A., WILLIAMS C. M., *Programmed cell death. - I. Cytology of degeneration in the intersegmental muscles of the pernyi silkworm*, « J. Ins. Physiol. », 11, 123 (1965).
- MERCIER L., *Les processus phagocytaires pendant la métamorphose des Batraciens anoures et des Insectes*, « Arch. Zool. Exp. Gén. », 5, 1 (1906).
- MISCH D. W., *Localization of acid phosphatase in tissues of metamorphosing flesh-fly larvae*, « J. Histochem. Cytochem. », 10, 666 (1962).
- OSINCHAK J., *Ultrastructural localization of some phosphatases in the prothoracic gland of the insect Leucophaea maderae*, « Zeitschr. Zellforsch. », 72, 236 (1966).
- PEREZ C., *Recherches histologiques sur la métamorphose des Muscides; Calliphora erythrocephala Mg.*, « Arch. Zool. Exp. Gén. », 4, 1 (1910).
- RASCH E. M., GAWLIK S., *Cytolysosomes in tissues of metamorphosing Sciariid larvae*, « J. Cell. Biol. », 23, 123 A (1964).
- ROBERTSON C. W., *The metamorphosis of Drosophila melanogaster, including an accurately timed account of the principal morphological changes*, « J. Morphol. », 59, 351 (1936).
- RUSSO-CAIA S., *Aspetti biochimici della metamorfosi degli Insetti. Attività solubile e sedimentabile della glicerofosfatasi acida nei tessuti larvali e pupali di Musca domestica*, « Rend. Acc. Naz. Lincei », 39, 556 (1965).
- SCHARRER B., *Ultrastructural study of the regressing prothoracic glands of Blattarian insects*, « Zeitschr. Zellforsch. », 69, 1 (1966).
- SCHIN K. S., CLEVER U., *Lysosomal and free acid phosphatase in salivary glands of Chironomus tentans*, « Science », 150, 1053 (1965).
- VAN REES J., *Beiträge zur Kenntniss der inneren Metamorphose von Musca vomitoria*, « Zool. Jahrb. Anat. Ontog. », 3, 1 (1888).
- WALKER P. A., *An electron microscope study of the fat body of the moth Philosamia during growth and metamorphosis*, « J. Ins. Physiol. », 12, 1009 (1966).
- WEISMANN A., *Die nachembryonale Entwicklung der Musciden nach Beobachtungen an Musca vomitoria und Sarcophaga carnaria*, « Zeitschr. wiss. Zool. », 14, 187 (1864).
- WHITTEN J. M., *Haemocytes and the metamorphosing tissues in Sarcophaga bullata, Drosophila melanogaster, and other Cyclorrhaphous Diptera*, « J. Ins. Physiol. », 10, 447 (1964).

SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE I-III

Ogni gradazione delle scale riportate sotto le microfotografie è uguale a 10μ ; tutte le sezioni sulle quali è stata eseguita la reazione di Gomori sono state successivamente colorate con verde metile-pironina.

TAVOLA I.

Istolisi dell'epidermide.

- Fig. 1. - Modificazione della forma cellulare e picnosi dei nuclei nell'epidermide larvale di una pupa di 12 ore; color. Feulgen - v. luce.
- Fig. 2. - Localizzazione della fosfatasi acida (incubaz. 15') nelle cellule appiattite dell'epidermide larvale di una pupa di 4 ore: l'enzima è presente in numerosi granuli disposti dal lato della cuticola.
- Fig. 3. - La polarità dei granuli fosfatasi è particolarmente evidente, in stadi successivi, nelle cellule epidermiche pedunculizzate; pupa di 12 ore, incubaz. 15'.
- Fig. 4. - L'attività fosfatasi, presente in tutte le cellule larvali in involuzione, è assente negli elementi dell'epidermide immaginale in attiva proliferazione; pupa di 12 ore, incubaz. 15'.
- Fig. 5. - Degenerazione avanzata dell'epidermide larvale in una pupa di 25 ore; la reazione per la fosfatasi acida (incubaz. 15') è intensissima sia nelle cellule ancora intere che nei frammenti in dissoluzione; l'enzima non è più localizzato in granuli discreti, ma in masse voluminose che spesso occupano tutto il citoplasma.

TAVOLA II.

Istolisi dell'intestino medio.

- Fig. 1. - All'interno dello strato continuo di epitelio immaginale neoformato è visibile la massa delle cellule larvali in degenerazione, rigettate nel lume; notare l'aspetto sinciziale e, in basso, il tessuto reticolare; pupa di 8 ore, color. ematoss. - eos.
- Fig. 2. - Fig. 2. - Piconsi dei nuclei larvali all'interno della massa epiteliale in involuzione; pupa di 8 ore, color. Feulgen - v. luce.
- Fig. 3. - Fortissima positività della reazione per la fosfatasi acida (incubaz. 15') nella massa di cellule epiteliali in degenerazione; pupa di 8 ore, sezione vicina a quella della fig. 1.
- Fig. 4. - Fortissima positività della reazione per la fosfatasi acida (incubaz. 15') nel « corpo giallo » di una pupa di 48 ore.

TAVOLA III.

Istolisi muscolare.

- Fig. 1. - Caratteristico aspetto istologico di un muscolo larvale in degenerazione: frammentazione e dislocazione delle fibre, presenza di emociti carichi di grosse granulazioni (« sfere di granuli »), nuclei muscolari picnotici; pupa di 8 ore, color. ematoss. ferr.
- Fig. 2. - La reazione per la fosfatasi acida è negativa (incubaz. 30') nelle fibre muscolari e negli emociti granulari infiltrati tra di esse; è nettamente positiva in un elemento fagocitico, situato alla periferia, nel cui citoplasma è presente un sarcolita; pupa di 8 ore.
- Fig. 3. - Inizialeistolisi di un muscolo, immediatamente dopo la formazione del pupario; la reazione per la fosfatasi (incubaz. 15') è completamente negativa nelle fibre, discretamente positiva nei numerosi emociti che si affollano nelle vicinanze.
- Fig. 4. - Altro elemento fagocitico, contenente un sarcolita, con numerosi granuli fosfatasi nel citoplasma; pupa di 8 ore, incubaz. 15'.
- Fig. 5, 6. - Sincizi formati, intorno a sarcoliti, da più fagociti; la fosfatasi acida è localizzata in granuli piuttosto voluminosi; pupa di 12 ore, incubaz. 15'.





