
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

LONGINO CONTOLI AMANTE

**Produzione dell'acido di fecondazione dopo
trattamento con mersalyl nelle uova di *Paracentrotus
lividus* (Lamarck)**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 44 (1968), n.6, p. 864–868.*
Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1968_8_44_6_864_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*

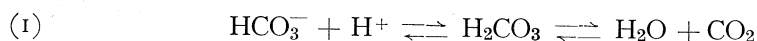
<http://www.bdim.eu/>

Biologia. — *Produzione dell'acido di fecondazione dopo trattamento con mersalyl nelle uova di Paracentrotus lividus (Lamarck)* (*).
Nota di LONGINO CONTOLI AMANTE, presentata (**) dal Corrisp. P. PASQUINI.

SUMMARY. — *Paracentrotus lividus* eggs treated before the insemination with the mercurial compound mersalyl, with the aim of obtaining a high percentage of polyspermy, produces in sea water during the first few minutes after the fertilization, a decrease of pH (caused by the production of fertilization acid), the rate and entity of which are quite similar to those of controls.

Consequently it seems that only one spermatozoon, the first one which activates the egg, would be sufficient to produce the complete release of the fertilization acid.

È noto (Runnström per primo nel 1933; Borei 1934; Laser e Rothschild 1939; Allen, Markmann e Rowe 1958; Mehl e Swann 1961; Aketa 1961 *a* e *b*; Ohnishi e Sugiyama 1963, e altri) che durante la fecondazione delle uova di ricci di mare, per un breve periodo di tempo (all'incirca da 30'' a 7' dopo l'inseminazione) si verifica una tendenza all'abbassamento del pH dell'acqua di mare nella quale si trovano le uova; tale tendenza è normalmente mascherata dalla presenza nella stessa acqua di mare di un sistema « tampone » di una certa efficacia:



essa può tuttavia essere messa in evidenza sia misurando la CO_2 prodotta in seguito allo spostamento verso destra dell'equilibrio indicato nella (1), sia fecondando le uova in acqua di mare artificiale resa per quanto è possibile priva di HCO_3^- (infatti la CO_2 dell'aria tende a disciogliersi nell'acqua di mare per dare quindi, attraverso la (1), ioni HCO_3^-).

Tale fenomeno, riscontrato in molte specie dai citati autori e da altri, è spesso brevemente indicato come « produzione dell'acido di fecondazione » in quanto sembra consistere nella liberazione di protoni da una sostanza acida presente nell'uovo; secondo Runnström e Immers (1956), l'acido di fecondazione corrisponderebbe alla liberazione di una glicoproteina acida; secondo Aketa (1961 *a* e *b*), tale proteina potrebbe essere presente, prima della fecondazione, entro i granuli corticali; anche il lavoro di Ishihara (1964) suggerisce chiaramente che l'acido di fecondazione prodotto dalle uova di ricci di mare corrisponde almeno in gran parte alla liberazione di una glicoproteina acida.

(*) Ricerche eseguite presso la Stazione Zoologica di Napoli e l'Istituto di Zoologia della Università di Roma con i fondi del C.N.R. nell'ambito del Gruppo di ricerca per l'Embriologia per lo studio del differenziamento.

(**) Nella seduta dell'8 giugno 1968.

Un altro importante fenomeno nella fecondazione dei ricci di mare è costituito dalla difesa contro la polispermia, evidenziabile in modo particolare quando, in seguito al trattamento con alcuni agenti chimici, tale difesa cessa di funzionare e si ha una elevata percentuale di uova polispermiche.

Uno degli agenti più efficaci ed usati in tal senso è il mersalyl (acido salicil- γ -idrossimercuri- β -metossipropil-amideacetico) (Runnström e Manelli 1964); nella concentrazione da 10^{-4} a 10^{-5} M, per un periodo di tempo di 20'-30' prima della fecondazione, il mersalyl provoca la polispermia nella grande maggioranza delle uova; ma mentre la sua azione fisiologica è ben evidente, non altrettanto si può dire del meccanismo strutturale di tale azione. La morfologia microscopica ed ultramicroscopica (Manelli e Runnström 1964, vedi Runnström 1966) delle uova non presenta alterazioni degne di nota, mentre si sta indagando sulle possibili modificazioni indotte dal mersalyl a livello biochimico (Manelli e Ferrini 1967, Ferrini e Manelli 1967).

In questo quadro è sembrato opportuno verificare l'eventuale effetto del trattamento col mersalyl sulla produzione dell'acido di fecondazione.

MATERIALE E METODO.

Il materiale di studio era costituito da gameti di *Paracentrotus lividus* del Golfo di Napoli; le uova, private meccanicamente del jelly-coat mediante aspirazione attraverso un sottile setaccio, venivano trattate con una soluzione di mersalyl in acqua di mare, quindi lavate ripetutamente con acqua di mare normale, e poi con acqua di mare artificiale senza HCO_3^- ; quindi una sospensione molto densa di tali uova era posta sotto un pH metro a scala espansa « Beckman » e inseminata con una o due gocce di sperma molto concentrato; parallelamente si procedeva ad allestire un controllo costituito da uova non pretrattate con mersalyl.

Le variazioni del pH erano lette sia direttamente all'apparecchio, sia registrate mediante una unità registratrice della « Texas Instruments ». Durante tutto l'esperimento le uova erano continuamente tenute in sospensione ed in leggero movimento con un agitatore magnetico.

Dopo la lettura, le uova venivano lavate con acqua di mare normale (anche allo scopo di riportarle a pH 8-8,2), e quindi osservate, alla prima segmentazione, per verificare la percentuale di fecondazione ed il grado di polispermia ottenuto.

La percentuale di uova polispermiche ha subito grandi fluttuazioni nei diversi esperimenti, andando da circa il 30 al 90 %, mentre il numero delle uova polispermiche dei controlli non trattati col mersalyl rimaneva intorno al 2-5 %.

La fig. 1 mostra la variazione del pH nel tempo causata dalla produzione dell'acido di fecondazione, sia in uova controllo che in uova trattate per 20' con una soluzione $1 \cdot 10^{-5}$ M di mersalyl in acqua di mare; non c'è apprezzabile differenza tra le due curve, per quanto le uova polispermiche fossero in un caso circa il 3 %, nell'altro circa il 59 %.

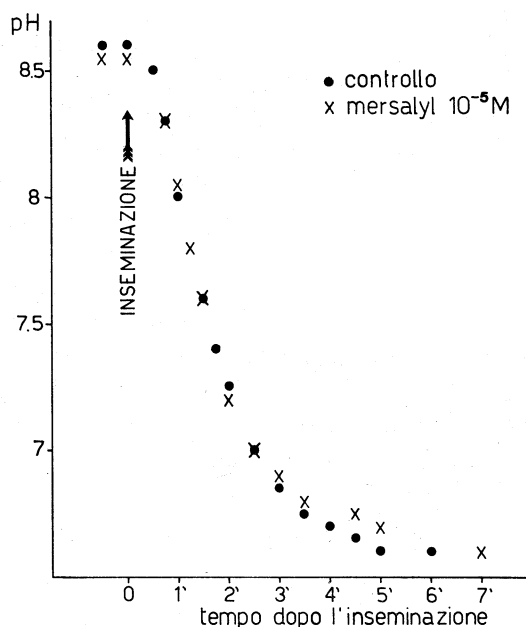


Fig. 1.

La fig. 2 mostra i risultati di un altro esperimento: le tre curve ottenute col pHmetro registratore sono state sovrapposte per comodità di confronto; mentre non si notano differenze circa l'inclinazione delle curve, sembra che vi sia solo una piccola differenza nel « periodo latente » prima dell'inizio della produzione di acido: il periodo stesso sembra un poco più lungo nei controlli. Nel suddetto esperimento sono state usate, per un tempo di 15', due concentrazioni diverse di mersalyl: $1 \cdot 10^{-5}$ e $1 \cdot 10^{-4}$ M; mentre nel primo caso la polispermia è stata del 70–80 %, con una grande maggioranza di uova dispermiche che davano alla prima divisione 4 blastomeri, nel secondo caso la polispermia è stata dell'85–90 %, con una preponderanza di uova fortemente polispermiche, molte delle quali non si potevano segmentare o si segmentavano in modo parziale ed irregolare; in diversi punti sulla superficie di tali uova si notavano accumuli di « lamelle », e questi punti corrispondevano a siti di entrata di spermatozoi (Runnström e Manelli 1964, fig. 13).

DISCUSSIONE.

Manelli e Ferrini (1967) e Ferrini e Manelli (1967) hanno usato mersalyl marcato con ^{203}Hg al fine di studiare i gruppi SH delle proteine che reagiscono col mercuriale. Dai loro esperimenti risulta che l'uovo intatto non lega più di 1/100 della quantità di ^{203}Hg legato dalle uova omogeneizzate: questo indica che il mersalyl è prevalentemente trattenuto da siti reattivi sulla superficie dell'uovo stesso, la quale d'altronde ha una struttura alquanto complessa. È quindi opportuno studiare la localizzazione di tali siti.

I presenti risultati possono contribuire entro certi limiti a tale localizzazione, escludendo uno dei possibili meccanismi di azione del mersalyl.

La condizione indispensabile per la liberazione dell'acido di fecondazione è la apertura dei granuli corticali; ciò si verifica mediante la fusione tra la membrana dei granuli e la « plasmalemma ». È probabile che un ritardo nell'apertura dei granuli corticali possa contribuire alla polispermia, ritardando

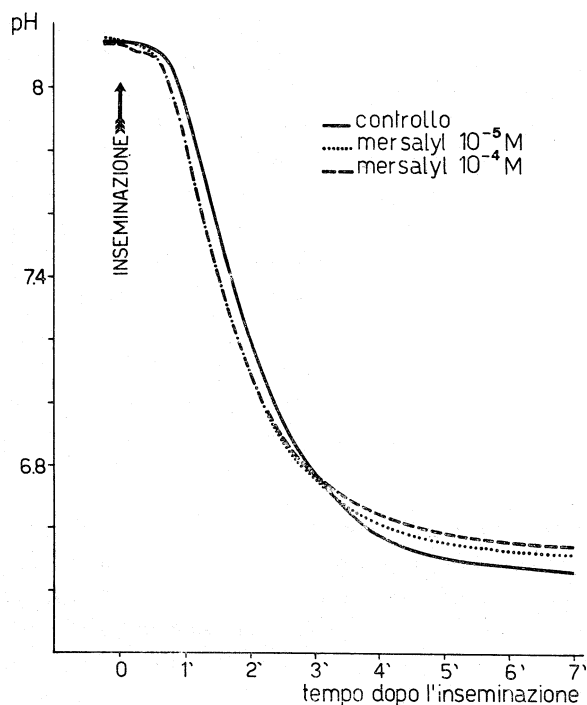


Fig. 2.

la velocità di propagazione dell'impulso che inizia dal punto di attaccamento dello spermatozoo. Dalle presenti osservazioni risulta comunque che il mersalyl non provoca la polispermia attraverso un processo di questo tipo, dato che la produzione dell'acido di fecondazione, legata a sua volta all'apertura dei granuli corticali, non è modificata in seguito al trattamento con detto mercuriale.

C'è un'altra possibilità che sembra a priori possibile, e cioè che il rigonfiamento del gel proveniente dai granuli corticali possa essere inibito o rallentato dall'azione del mersalyl; tuttavia non sembra probabile che il gel in tali condizioni possa liberare idrogenioni alla stessa velocità di un gel in condizioni normali.

Le curve della fig. 2, che si riferiscono a campioni pretrattati con due diverse concentrazioni di mercuriale, coincidono completamente; come già detto, la concentrazione più bassa causa soprattutto dispermia, mentre in quella maggiore più di due spermatozoi, spesso almeno 4-5, entrano nell'uovo;

tuttavia non c'è differenza nella velocità di produzione di acido tra i suddetti campioni ed il controllo: questo indica che la velocità (ed entità) della produzione di acido alla fecondazione dipende dall'uovo e non dal numero degli spermatozoi.

È quindi evidente che basta un solo spermatozoo, il primo entrato nell'uovo, per scatenare la reazione che porta alla liberazione di tutto l'acido di fecondazione, mentre i successivi spermi entrati non influenzano tale processo. La liberazione dell'acido di fecondazione sembra dunque avvenire in questo caso come un processo del tipo « tutto o nulla »: una volta iniziato, cioè, procede per proprio conto sino alla fine.

Se la produzione dell'acido è legata all'apertura dei granuli corticali (Aketa, *loc. cit.*), poiché a sua volta l'apertura dei granuli è legata al propagarsi dell'onda di attivazione (Allen 1954; Sugiyama 1953, 1956), non stupisce che in seguito a questo processo, capace di autopropagarsi, anche la liberazione di acido possa verificarsi completamente in seguito alla attivazione dovuta al primo spermatozoo e non essere influenzata da eventuali spermatozoi soprannumerari.

È interessante ricordare che, secondo Warburg (1910), l'aumento della respirazione in seguito alla fecondazione è quasi lo stesso in uova normali e polispermiche. D'altra parte, il tasso di polispermia non è indicato in questi esperimenti di Warburg.

Ringraziamento. Desidero ringraziare vivamente il prof. P. Pasquini per il grande impulso dato ininterrottamente al lavoro del nostro Gruppo, il prof. J. Runnström per la guida ispiratrice e l'appoggio morale, la sig.ra A. Runnström ed il dott. C. Nuzzolo per la generosa collaborazione, la Stazione Zoologica di Napoli ed il prof. H. Manelli per i preziosi consigli e suggerimenti.

BIBLIOGRAFIA.

- AKETA K., « Embryologia (Nagoya) », 5, 397 (1961).
AKETA K., « Embryologia (Nagoya) », 5, 406 (1961).
ALLEN R. D., « Exp. Cell. Res. », 6, 403, 412 e 422 (1954).
ALLEN R. D., MARKMANN B. e ROWE E. C., « Exp. Cell. Res. », 15, 346 (1958).
BOREI H., « Z. Vergleich. Physiol. », 20, 258 (1934).
FERRINI U. e MANELLI H., « Rend. Ist. Lombardo Sc. e Lett. », (B), 101, 1 (1967).
ISHIHARA K., « Exp. Cell. Res. », 36, 354 (1964).
LASER H. e ROTHSCCHILD LORD, « Proc. Roy. Soc. », B, 126, 539 (1934).
MANELLI H. e FERRINI U., « Rend. Ist. Lombardo Sc. e Lett. », (B), 101, 191 (1967).
MEHL J. W. e SWANN M. M., « Exp. Cell. Res. », 22, 233 (1961).
OHNISHI T. e SUGIYAMA M., « Embryologia (Nagoya) », 8, 79 (1963).
RUNNSTRÖM J., « Biochem. Z. », 258, (1933).
RUNNSTRÖM J., « Adv. Morph. », 5, 221 (1966).
RUNNSTRÖM J. e IMMERS J., « Exp. Cell. Res. », 10, 354 (1956).
RUNNSTRÖM J. e MANELLI H., « Exp. Cell. Res. », 35, 157 (1964).
SUGIYAMA M., « Biol. Bull. », 104, 210 (1953).
SUGIYAMA M., « Exp. Cell. Res. », 10, 364 (1956).
WARBURG O., « Hoppe-Seyler Z. Physiol. Chemie », 66, 305 (326) (1910).