
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

GISEPPE REVERBERI, GIUSEPPINA ORTOLANI, MARIA
FERNANDEZ

**Su alcune singolari cellule «a perossidasi» delle larve
di Ascidie**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 47 (1969), n.5, p. 375–380.*
Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1969_8_47_5_375_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/>

Embriologia. — *Su alcune singolari cellule « a perossidasi » delle larve di Ascidie* (*). Nota di GIUSEPPE REVERBERI, GIUSEPPINA ORTOLANI e MARIA FERNANDEZ, presentata (**) dal Corrisp. P. PASQUINI.

SUMMARY. — Swimming larvae of *Phallusia mamillata*, *Ascidia malaca* and *Ascidella aspersa*, show, as a result of certain treatments (Nadi and benzidin-reaction; toluidin-blue colouration) some peculiar cells between the ventral surface of the intestine and the epidermis. These cells, which have been described by Ries in the past, are not, as supposed, mesenchymal cells in migration from the tail to the base of the palps, but entodermal cells. They contain peroxidases, which probably are implicated in the elaboration of a mucopolysaccharide substance which is utilized for the construction of the tunic of the metamorphosing ascidia.

INTRODUZIONE.

Un fatto interessante, messo in evidenza alcuni anni fa (1, 2) nell'uovo di Ascidie, è quello che si riferisce alla costituzione enzimatica del plasma formativo della semiluna gialla. Ries [1], con l'impiego di reazioni citochimiche (Nadi e benzidina con H_2O_2) mostrò che esso è ricco in « fenolasi » e « perossidasi ». Queste, insieme con tale plasma, vengono segregate, lungo lo sviluppo, nei territori destinati a dare la muscolatura della larva.

Ries cercò di intendere il significato di questa singolare localizzazione enzimatica, e allestì, al riguardo, diversi esperimenti (dislocazione del plasma mediante centrifugazione; distruzione dei blastomeri portatori di esso); una soddisfacente spiegazione venne però solo a seguito di alcuni esperimenti che facevano uso di inibitori specifici [3, 4]: i risultati di tali esperimenti precisarono che gli enzimi messi in evidenza da Ries erano enzimi mitocondriali, e che la loro segregazione nei territori destinati a dare origine alla muscolatura della larva, era ampiamente giustificata dalla funzione esercitata dai mitocondri stessi.

Nel corso della sua ricerca Ries aveva rilevato che i blastomeri destinati a dare il mesenchima non posseggono fenolasi e perossidasi; e perciò deve essere rimasto alquanto interdetto nel constatare che le cellule *mesenchimali* delle larve natanti ne erano provviste. Al proposito egli scrive: [2] « Von der ersten Furchungsteilung bis zur geschlüpften Larve bleiben Nadi- und Benzidin-Reaktion im Myoplasma unverändert kräftig. Eine Stunden nach dem Schlüpfen, aber tritt eine neue Erscheinung ein: es beginnt eine sehr intensive Benzidin-Reaktion in den winzigen Drüsenzellen an der Spitze der drei Haftzäpfchen am Vorderende der Larve (fig. 14). Nach einigen weiteren Stunden, etwa 10-15 Stunden nach dem Schlüpfen, klingen die

(*) Lavoro eseguito presso l'Istituto di Zoologia della Università di Palermo.

(**) Nella seduta del 15 novembre 1969.

Reaktionen in dem Muskelzellen des Schwanzes ab, *und nun tritt ganz allmählich zunehmend eine kräftige Reaktion in dem sich vermehrenden Mesenchymzellen ein*». E nella citata fig. 14, che riporta una larva di *Ascidia mentula* trattata con la benzidina, pone a spiegazione le seguenti parole «... dann setz... eine maximale Anfärbung in dem Mesenchymzellen ein, die ihre Lage zwischen Darmanlage und Schwanzwurzel verlassen, und sich in ganz besonderer Weise anordnen». Secondo l'Autore, dunque, la cellule messe in evidenza dalla reazione con la benzidina non sarebbero che cellule mesenchimatiche in via di migrazione.

Nel corso delle nostre numerose ricerche sulle Ascidie noi abbiamo rilevato molte volte, nelle larve, le cellule descritte da Ries, ma non abbiamo mai potuto convincerci della loro natura mesenchimale.

Il presente lavoro è stato eseguito allo scopo di definire la natura di queste cellule e possibilmente la loro funzione.

MATERIALE E TECNICA.

La ricerca fu condotta su larve natanti da alcune ore e su larve in via di metamorfosi di *Ascidia malaca*, *Phallusia mamillata*, *Ascidiella aspersa* e *Ciona intestinalis*.

Il trattamento col Nadi reattivo e la Benzidina e l'acqua ossigenata fu fatto secondo le indicazioni di Ries [2] con lievi modificazioni.

RISULTATI.

a) Se si trattano con benzidina acetica + H_2O_2 delle larve da alcune ore natanti di *A. malaca*, *Phallusia mamillata* e *Ascidiella aspersa*, si nota una immediata e intensa colorazione bleu metallico della muscolatura; con lievissimo scarto di tempo si colorano, anche, delle grosse cellule situate tra l'intestino e l'epidermide. Queste sono le cellule descritte dal Ries. La loro disposizione è molto singolare, formando esse due file parallele che corrono dalla radice della coda alla base dei palpi, in prossimità dei quali si voltano alquanto dorsalmente. L'aspetto complessivo è quello di una doppia bottoniera. Ogni fila della bottoniera è costituita di circa 14-16 cellule. La colorazione bleu che prendono a seguito del trattamento è viva e permanente, a differenza di quella della muscolatura, invece, che dopo alcuni minuti si attenua e scompare.

In Tav. I, figg. *a, b*; Tav. II, figg. *a, b*, sono riportate alcune larve; da notare la notevole grandezza delle cellule, la loro ubicazione, la loro disposizione regolare.

Col Nadi-reattivo (questo trattamento non sembra che sia stato fatto dal Ries), si ha pure, una intensa, ma tardiva, colorazione di queste cellule: con tale trattamento, però, esse non si colorano in bleu ma in rosso vinoso (Tav. III, figg. *a, b*): la colorazione è inoltre piuttosto unita. La colorazione

è del tutto diversa da quella della muscolatura che è bleu ed è immediata: si sa che essa è dovuta a una reazione enzimatica (citocromossidasi).

Queste annotazioni valgono principalmente per la larve di *Phallusia* e *A. malaca*: meno per quelle di *Asciidiella aspersa* (nella quale la reazione è molto tenue) e non per le larve di *Ciona* nelle quali la reazione è del tutto negativa.

Le cellule ora descritte sono bene evidenti anche nelle larve vive al contrasto di fase (Tav. IV, figg. *a*, *b*).

b) Se il trattamento con la benzidina o con la Nadi è portato su larve che stanno entrando in metamorfosi il quadro è diverso: le cellule di Ries non sono più disposte in doppia fila ma sono riunite in piccoli gruppi: la loro ubicazione è, inoltre, più superficiale e precisamente sull'epidermide (Tav. III, fig. *b*).

Nelle larve che, poi, hanno già riassorbito la coda e sono in metamorfosi avanzata, le cellule di Ries si rinvengono nella tunica in via di costruzione (Tav. III, fig. *c*).

c) Per quanto riguarda la natura mesenchimale di queste cellule vanno fatti i seguenti rilievi. Senza dubbio le cellule mesenchimali *presuntive* non danno reazione positiva né con la benzidina né con la Nadi; ciò non esclude che la possano dare le cellule mesenchimali *definitive*: però secondo queste nostre ricerche ciò non è vero. Oltre tutto le cellule mesenchimali definitive tanto morfologicamente quanto dimensionalmente sono del tutto diverse dalle cellule descritte da Ries. La stessa disposizione in due file parallele fa escludere che esse siano cellule mesenchimali in migrazione.

Piuttosto il fatto che esse siano localizzate sulla parete dell'intestino, o immediatamente tra esso e l'epidermide, porta a ritenere che esse derivino dall'entoderma.

d) Per quanto riguarda il significato funzionale di queste cellule è da far rilevare che il modo con cui reagiscono al trattamento con la benzidina ha il carattere tipico di una reazione enzimatica: e poiché tale reazione è quella delle perossidasi si può, dunque, asserire che le cellule in questione sono « cellule a perossidasi ».

Questa supposizione è suffragata dai risultati che si ottengono con l'impiego di alcuni inibitori specifici di tali enzimi (KCN, azide sodica, idrossilamina). Uova messe in questi inibitori (1/100M in KCN; 1/10M azide; 1/10 idrossilamina) allo stadio di neurula dettero larve che al trattamento con la benzidina non dettero reazione colorata.

e) Al contrario, la colorazione che le cellule prendono con la Nadi non ha alcun carattere di reazione enzimatica; essa ha invece tutti i caratteri di un secreto cellulare. Si presenta così il problema della natura di questo secreto.

Fu detto che nelle larve in corso di metamorfosi le cellule di Ries non hanno più la disposizione a bottoniera e non sono più localizzate ventralmente all'intestino ma che si rinvengono nella tunica che si va costruendo. Ciò porta

a domandarci se esse non siano implicate, appunto, nella costruzione della tunica: la quale, come si sa, è fatta di mucopolisaccaridi. Allo scopo di verificare questa ipotesi le larve furono trattate con il bleu di toluidina che è specifico per i mucopolisaccaridi acidi. Il risultato fu una bella intensa colorazione (metacromatica).

f) Questo ultimo risultato induce a ritenere che le cellule di Ries costruiscono mucopolisaccaridi per la tunica. Ciò conviene con quanto è stato trovato da Materazzi e Vitaioli [5] i quali hanno messo in evidenza (in *A. malaca*), su sezioni microscopiche, delle cellule che si colorano intensamente con l'Alcian bleu, e che, per la grandezza e la ubicazione, sono sicuramente le cellule di Ries. Al riguardo è da far notare che Materazzi [6] ha ulteriormente messo in evidenza che queste cellule non prendono la colorazione con l'Alcian bleu se le larve furono fatte sviluppare da uova coltivate in acqua di mare priva di joni SO_4 .

A seguito di questa indicazione anche noi abbiamo fatto sviluppare delle uova in acqua priva di joni SO_4 e abbiamo applicato successivamente, alle larve da esse derivate, il trattamento con la benzidina, la Nadi e il bleu di toluidina: le cellule di Ries non si colorano in alcun caso.

DISCUSSIONE.

I risultati delle presenti indagini apportano dati sulla origine, il destino e la funzione delle cellule descritte da Ries.

Secondo Ries queste cellule sono di natura mesenchimale: secondo le nostre ricerche, invece, esse sono di natura entodermica. In un primo tempo fanno parte dell'intestino; in un secondo tempo se ne distaccano.

La loro funzione è indicata, innanzitutto, dalla ubicazione nella tunica della larva metamorfosata: a tale riguardo è da far rilevare che esse sono presenti solo nelle specie a tunica massiccia (*Phallusia*, *A. malaca*, *A. aspersa*) mentre sono assenti in *Ciona*, che ha una tunica molto sottile e, in ogni caso, di natura completamente diversa da quella delle specie elencate. La loro funzione sarebbe quella di costruire mucopolisaccaridi per la tunica.

L'ipotesi, oltre che dalla colorazione che esse prendono col bleu di toluidina, trova credito nel fatto che nelle larve sviluppate da uova messe in acqua di mare priva di joni SO_4 tale colorazione non si verifica più; è noto che i mucopolisaccaridi acidi contengono dei residui solforici.

CONCLUSIONE.

Noi ammettiamo che nello sviluppo delle Ascidi si sintetizzano due perossidasi diverse caratterizzate rispettivamente per il tempo di comparsa, per la ubicazione e per la funzione.

Una di esse è già presente nell'uovo vergine, e viene segregata con i mitocondri, dopo la fecondazione, prima nella semiluna gialla e poi nei blasto-

meri destinati alla muscolatura della larva. La sua funzione non è conosciuta, ma data la sua occorrenza nei mitocondri potrebbe ritenersi associata con la catena respiratoria: al riguardo va fatto notare che una citocromo-c perossidasi, che ossida il citocromo-c usando acqua ossigenata, è stata isolata da Altschul *et al.* [7] dal lievito.

La seconda perossidasi sarebbe, invece, quella localizzata nelle cellule a bottoniera qui descritte: essa compare solo nella larva da più ore natante. La sua funzione sarebbe associata alla sintesi dei mucopolisaccaridi.

L'isolamento delle due perossidasi e uno studio comparativo *in vitro* delle loro funzioni e della loro natura chimica potrebbe essere un attraente argomento di ricerca futura.

Ringrazio il sig. Giovanni Randazzo per la utile cooperazione tecnica prestata nel corso di questo lavoro.

BIBLIOGRAFIA.

- [1] E. RIES, « *Pubbl. Staz. Zool. Napoli* », 16 (1937).
- [2] E. RIES, « *Arch. f. exper. Zellforsch.* », 23, 95 (1939).
- [3] G. REVERBERI, « *Acta Embryol. Morphol. Exper.* », 1, 12 (1957 a).
- [4] G. REVERBERI, « *Pubbl. Staz. Zool. Napoli* », 29, 187 (1957 b).
- [5] G. MATERAZZI e L. VITAIOLI, « *Experientia* », 22, 436 (1966).
- [6] G. MATERAZZI, « *Acta Embryol. Morphol. Exper.* », 10, 101 (1967).
- [7] A. M. ALTSCHUL, R. ABRAMS e T. R. HOGNESS, « *J. Biol. Chem.* », 142, 303 (1942).

SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE I-IV

TAVOLA I.

Fig. *a* - Larva di *A. malaca* dopo trattamento con benzidina: sono evidenti nella regione ventrale tra l'intestino e l'epidermide numerose grosse cellule disposte regolarmente in fila: a questa fila che apicalmente volge dorsalmente fa riscontro sulla parte controlaterale un'altra fila; nell'insieme le due fila costituiscono una doppia bottoniera ($\times 375$).

Fig. *b* - La stessa larva a ingrandimento più forte: le cellule della bottoniera sono più evidenti: da notare la loro rilevante grandezza che le distingue nettamente dalle cellule mesenchimali, che, d'altra parte, non danno alcuna reazione positiva alla benzidina ($\times 750$).

TAVOLA II.

Fig. *a* - Larva di *A. malaca* trattata con la benzidina: notare nelle cellule « a fila » le granulazioni intensamente colorate a seguito della reazione ($\times 950$).

Fig. *b* - Larva di *A. malaca* dopo il trattamento con la benzidina: notare le grosse cellule in fila (nessuna reazione nelle cellule mesenchimali situate alla base della coda) ($\times 750$).

TAVOLA III.

- Fig. *a* - Larva natante di Phallusia trattata con il Nadi reattivo maturato (bleu di indofenolo): da notare la colorazione delle cellule che formano la doppia bottoniera (intensamente colorati anche i palpi): la colorazione è unita ($\times 375$).
- Fig. *b* - Larva di Phallusia all'inizio della metamorfosi trattata con il Nadi reattivo: le cellule della bottoniera non sono più nella tipica disposizione a fila ma raggruppate disordinatamente ($\times 375$).
- Fig. *c* - Larva di *A. malaca* in metamorfosi trattata con la benzidina: notare le cellule a perossidasi situate nella tunica ($\times 750$).

TAVOLA IV.

- Figg. *a, b* - Larva di Phallusia esaminata al contrasto di fase; (*a*) a piccolo ingrandimento ($\times 750$); (*b*) a ingrandimento maggiore ($\times 1500$): le cellule del Ries sono evidentissime.







