
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

MARIA DURANTE, EGIDIO PUCCIA

**Ricerche preliminari sulla natura chimica della
sostanza inibitrice dell'opercolo funzionale di
Hydroides norvegica**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 48 (1970), n.6, p. 683–689.*
Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1970_8_48_6_683_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/>

SEZIONE III

(Botanica, zoologia, fisiologia e patologia)

Zoologia. — *Ricerche preliminari sulla natura chimica della sostanza inibitrice dell'opercolo funzionale di Hydroides norvegica* (*).
Nota di MARIA DURANTE e EGIDIO PUCCIA, presentata (**) dal Corrisp.
P. PASQUINI.

SUMMARY. — In this research we have found that the compensatory regeneration of the operculum of *Hydroides norvegica* is regulated by an inhibitor factor which is distributed all over the body of the animal.

Preliminary physico-chemical investigations suggest that this substance is soluble in (acid, neutral, basic) aqueous solutions; thermostabile of low molecular weight and of aromatic nature.

Come è noto l'*Hydroides norvegica* è un polichete sedentario che presenta nella regione cefalica, oltre una corona di filamenti branchiali disposti in due ciuffi, due opercoli. Questi due opercoli sono diversamente sviluppati: uno, quello funzionale, serve a chiudere l'apertura del tubo nel quale l'animale si ritira, ed è costituito da un lungo peduncolo sormontato da due verticilli margheritiformi sovrapposti; l'altro, quello non funzionale, è rudimentale (1/10 del primo) ed è costituito da un corto peduncolo clavato distalmente. Arreca sorpresa il fatto che la recisione dell'opercolo funzionale (che può trovarsi indifferentemente a destra o a sinistra) non è seguita da rigenerazione, ma, invece, dallo sviluppo dell'opercolo rudimentale. L'opercolo neo-formato può essere, a sua volta, reciso: segue lo sviluppo di quello rudimentale.

Questa situazione che può essere sperimentalmente riprodotta per un numero forse illimitato di volte, è stata rilevata per la prima volta da Zeleny [1] ed è conosciuta con la denominazione di «rigenerazione compensatrice». Il fenomeno non ha finora ricevuto adeguata spiegazione: gli Autori che però si sono occupati di esso hanno ipoteticamente ammesso che nell'opercolo funzionale siano presenti delle sostanze, non meglio qualificate, che *inibiscono* lo sviluppo dell'opercolo rudimentale (cfr. 2).

L'esistenza di queste sostanze inibitrici è stata dimostrata da Ludwig [3] che ha impedito lo sviluppo dell'opercolo rudimentale dopo remozione di quello funzionale, mettendo l'animale operato in acqua addizionata di estratto di opercolo funzionale.

Secondo lo stesso Autore il fattore attivo dell'opercolo funzionale destro agirebbe selettivamente sull'abbozzo opercolare sinistro: viceversa il fattore

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

(**) Nella seduta del 13 giugno 1970.

attivo dell'opercolo funzionale sinistro agirebbe esclusivamente in quello destro. Questo comportamento ci è sembrato inesplicabile e perciò abbiamo ripreso la questione con tecnica più rammodernata anche con lo scopo di determinare possibilmente la natura chimica del principio inibente.

MATERIALE E METODI.

Gli animali venivano operati appena prelevati dal mare; dopo asportazione dell'opercolo funzionale, venivano messi in acqua di mare pastorizzata addizionata di cloromicetina (100 μ g/ml) e estratto opercolare. Lo sviluppo dell'opercolo rudimentale veniva seguito giorno per giorno (a 21 C in un volume di 1 ml cambiato ogni tre giorni).

A) L'estratto di opercolo fu ottenuto mediante trattamento con microomogenizzatore « Sorvall » a 40.000 RPM per 10 min.; dopo centrifugazione a 18.000 \times g il supernatante fu diluito in modo che esso raggiungesse la concentrazione 11 opercoli/ml. Gli estratti di branchie o di addome (quest'ultimo ora previamente privato dell'intestino e dei prodotti genitali) furono ottenuti nello stesso modo: la loro concentrazione fu fatta equivalente a quella dell'estratto opercolare (riferimento al peso secco del supernatante).

Per ciò che riguarda il sangue l'equivalenza rispetto all'estratto opercolare fu raggiunta servendosi dall'assorbanza a 600 m μ , che costituisce il picco per il sangue di Hydroides.

B) L'estratto opercolare venne frazionato seguendo diversi procedimenti:

a) trattamento a 80 C per 10 min.; il precipitato venne successivamente eliminato per centrifugazione;

b) dialisi con tubi a pori del diametro di 48 Å;

c) trattamento con acido perclorico al 4 %; la frazione solubile venne ripartita in due aliquote: la prima, previa neutralizzazione con KOH e rimozione del perclorato mediante centrifugazione, venne essiccata ed infine risospesa in acqua di mare (con cloromicetina) (frazione acido solubile); la seconda venne adsorbita su carbone attivo (con agitazione meccanica per quattro ore a 20 C): il carbone fu quindi rimosso per centrifugazione, neutralizzato e preparato come sopra (frazione effluato);

d) il pellet di carbone ottenuto da questa seconda aliquota, dopo lavaggio con acqua distillata fino a neutralizzazione, venne trattato con una soluzione eluente (Etanolo 95 %, ammonio idrato 32 % e acqua distillata - 2 : 1 : 2) e agitato meccanicamente per sei ore a temperatura ambiente. Dopo rimozione del carbone per centrifugazione, il supernatante venne concentrato ed infine la sostanza secca sospesa in acqua di mare con cloromicetina (frazione eluato).

Tutte le manipolazioni tecniche furono condotte a 4 C, salvo specifica indicazione.

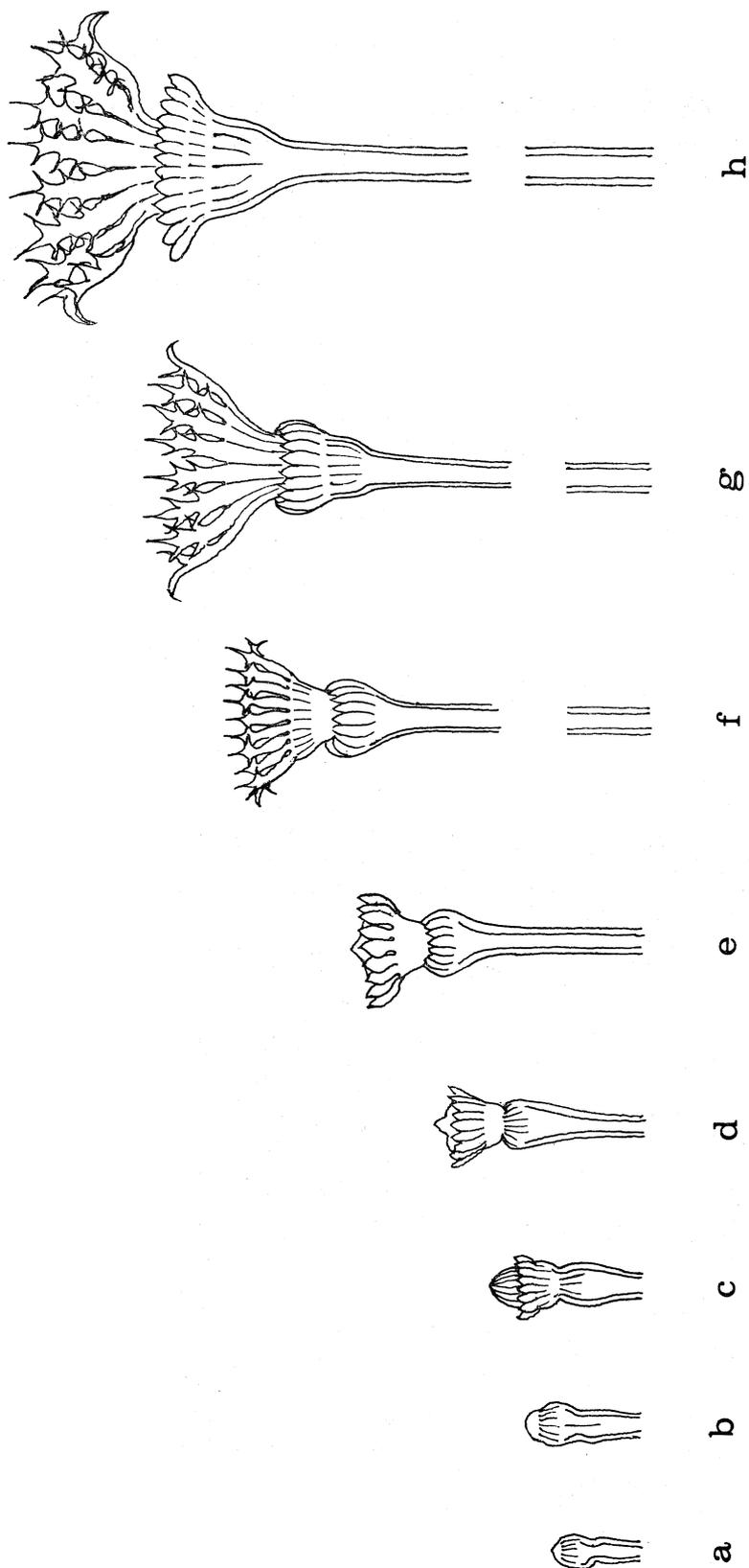


Fig. 1 - Fasi di sviluppo dell'opercolo.

RISULTATI.

A) Lo sviluppo dell'opercolo rudimentale a seguito della asportazione di quello funzionale è stato seriato in otto arbitrarie fasi (A-H), come segue:

a) l'abbozzo opercolare è costituito da un corto peduncolo;
 b) il peduncolo presenta all'apice un lieve ingrossamento;
 c) l'ingrossamento apicale è lievemente strozzato alla base e crenolato;
 d) la strozzatura è ben evidente e prelude la formazione dei due verticilli margheritiformi;

e) il primo verticillo è abbozzato in forma di elementi petaloidi semplici; il secondo verticillo sotto forma di un rigonfiamento fortemente crenolato;

f) il primo verticillo è evidente, ogni elemento petaloide presenta una spina terminale e due laterali; il secondo si è ingrossato a coppa con bordi appena frastagliati;

g) ciascun petalo del primo verticillo ha cinque spine: gli elementi petaloidi del secondo sono ben differenziati ma ancora corti;

h) l'opercolo è costituito da un lungo stelo sormontato da due verticilli margheritiformi: il primo con petali a sette spine ciascuno, il secondo come una grossa coppa con elementi petaloidi semplici ben divaricati all'esterno.

Tali fasi per semplicità di esposizione, sono state riunite in tre gruppi e cioè:

Gruppo I: fasi A, B, C; gruppo II: fasi D, E; gruppo III: fasi F, G, H.

TABELLA I.

Valori di inibizione dell'opercolo esercitata in presenza di estratti di varie parti del corpo.

	N. esper.	Stadio			Lunghezza operc. rigen. in mm.	% di Inibiz.*
		I (A—C)	II (D—E)	III (F—H)		
Controlli	91	10	15	66	1.50 ± 0.14	
Estratto opercoli	40	32	8	0	0.63 ± 0.09	58%
Estratto branchie	46	30	14	2	0.94 ± 0.08	38%
Estratto addome	38	30	8	0	0.91 ± 0.07	39%
Sangue	30	26	2	2	0.62 ± 0.07	57%

* Valore calcolato dalla differenza delle medie.

B) Nella Tabella I sono riportati i risultati ottenuti. Dalla tavola può constatarsi: a) lo sviluppo completo dell'opercolo rudimentale nei controlli non si ha nel 100 % degli individui: nel 34 % di essi lo sviluppo si arrestò più

TABELLA II.

Valori di inibizione dell'opercolo esercitata dalle diverse frazioni dell'estratto opercolare.

	N. anim.	Stadio			lunghezza in mm.	% di Inibiz. *
		I (A—C)	II (D—E)	III (F—H)		
Controlli	98	10	26	62	1.49 ± 0.11	
Frazione termostabile	54	40	12	2	0.69 ± 0.08	53%
Frazione acido solubile	30	24	6	0	0.76 ± 0.09	49%
Eluato	32	24	6	2	0.73 ± 0.04	51%

* = Valore calcolato dalla differenza delle medie.

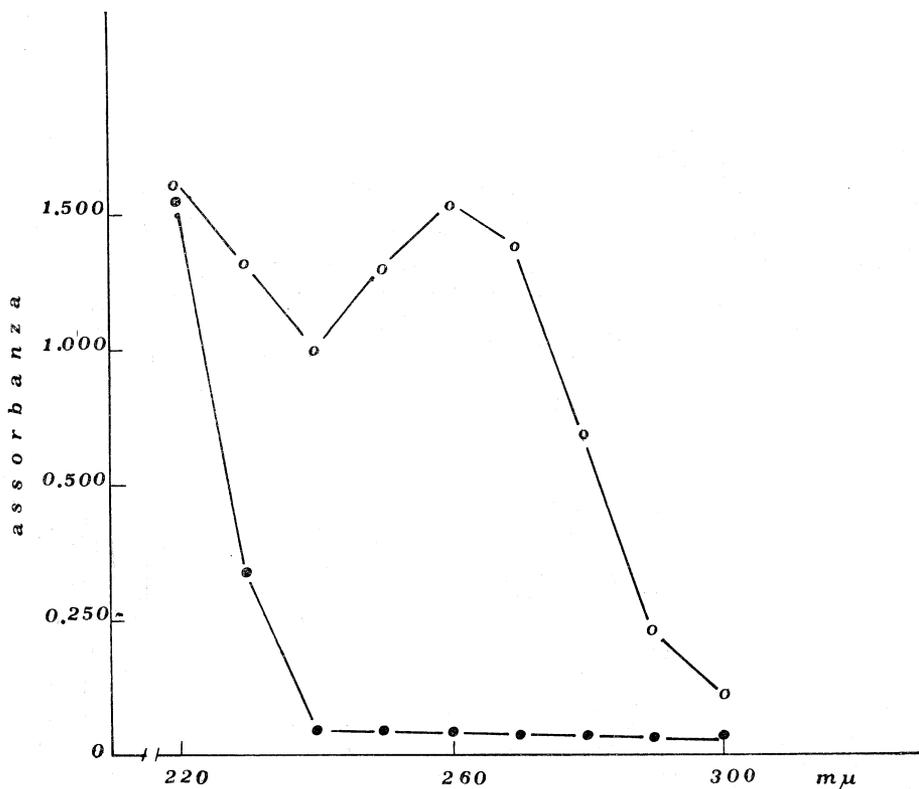


Fig. 2 - Spettri di assorbanza delle frazioni acido-solubile e dell'effluato.

o meno precocemente. *b)* L'addizione dell'estratto *opercolare* determina arresto di sviluppo dell'opercolo rudimentale in gran parte alle fasi A, B, C: in nessun caso l'opercolo rudimentale si sviluppa completamente. *c)* L'addizione di estratto *branchiale* produce più o meno gli stessi effetti, sebbene alcuni esemplari abbiano raggiunto le fasi D, E e due esemplari anche le fasi G, H. *d)* L'addizione di estratto di *addome* produce gli stessi effetti di quello delle branchie. *e)* L'inibizione prodotta dall'addizione di sangue è quantitativamente uguale a quella esercitata dall'estratto opercolare.

C) Nella Tabella II sono riportati i valori di inibizione esercitata dalle diverse frazioni dell'estratto opercolare (frazione termostabile, frazione acido-solubile, eluato). Non hanno presentato proprietà inibenti l'effluato e il dializzato.

D) Nella figura 2 sono riportati gli spettri di assorbanza della frazione acido-solubile e dell'effluato. La frazione acido-solubile presenta un picco di assorbanza massimo a 260 m μ che non è invece presente nell'effluato; l'eluato (che però non è rappresentato nel diagramma) ha il picco di assorbanza a 260 m μ .

DISCUSSIONE.

1) Ludwig [3], a seguito dei suoi esperimenti, ha concluso che gli estratti di opercolo funzionale inibiscono lo sviluppo di quello rudimentale; la stessa azione inibitrice sarebbe esercitata anche dagli estratti branchiali, però in questo caso non si tratterebbe di un'azione specifica ma di un'azione tossica. Va rilevato, al riguardo, che la metodica del processo estrattivo seguita da Ludwig non ha permesso di allevare gli animali in esperimento per un tempo superiore ai tre giorni. Con la nostra tecnica noi abbiamo potuto seguire, invece, gli animali almeno per 9 giorni, e cioè per il tempo adoperato dai controlli per la rigenerazione completa. A seguito di questa tecnica migliorata noi abbiamo potuto precisare che l'estratto branchiale esercita la stessa inibizione dell'estratto opercolare, non a causa di tossicità da esso determinata, ma a causa del fatto che anch'esso possiede il principio inibitore. Ciò non reca sorpresa perché in fondo l'opercolo non è altro che una modificazione di una appendice branchiale [4-6]. Al riguardo è da rilevare che l'asportazione delle branchie è talora seguita dallo sviluppo dell'opercolo rudimentale [7].

Oltre che gli estratti branchiali inibiscono lo sviluppo del rudimento opercolare anche gli estratti del torace e dell'addome. Ciò significa che il principio inibitore è diffuso in tutto il corpo dell'animale. Lo sviluppo dell'opercolo rudimentale a seguito dell'asportazione di quello funzionale sarebbe, insomma, regolato da un meccanismo di «soglia». Per una determinata concentrazione del principio inibitore l'opercolo rudimentale non si sviluppa; l'abbassamento al di sotto di tale soglia (ad esempio, remozione o caduta spontanea dell'opercolo funzionale; remozione delle branchie) l'opercolo prende a svilupparsi. La quantità maggiore del principio inibitore deve essere

localizzata nell'opercolo funzionale che forse è l'organo specifico di produzione: in quantità minore è nelle branchie come è dimostrato dal fatto che lo sviluppo dell'opercolo rudimentale a seguito della remozione delle branchie non è costante.

Va aggiunto anche che la sola ablazione della margherita distale dell'opercolo funzionale è sufficiente a promuovere lo sviluppo dell'opercolo rudimentale.

2) L'esistenza di principi inibitori nei processi rigenerativi è, oggi, largamente documentata. Nei Nemertini (Lineus): Tüker [8] ha messo in evidenza che estratti cefalici e caudali inibiscono rispettivamente la rigenerazione della testa e della coda. Nei Celenterati (Tubularia) Tardent & Eymann [9] hanno ottenuto la inibizione della rigenerazione mediante estratti di idranti. Nei Platelmini (Planaria) Wolff *et al.* [10] hanno constatato che gli estratti cefalici impediscono la rigenerazione del cervello, e quelli della regione faringea la rigenerazione del faringe.

3) Per quanto riguarda la natura chimica dell'inibitore qui studiato vanno rilevati i seguenti dati: a) il trattamento col calore non annulla la sua capacità inibitrice; b) la sostanza deve avere un basso peso molecolare poiché dializza: il diametro della sua molecola non dovrebbe superare i 48 Å con un peso inferiore a 12.000; c) non è una nucleo proteina data la sua solubilità in acido perclorico (4 %): d'altra parte il picco di assorbanza nell'ultravioletto cade nella regione dei composti a doppio legame; d) poiché nelle condizioni sperimentali il carbone adsorbe preferenzialmente i composti aromatici [11, 12] possiamo ritenere che essa sia di natura aromatica.

BIBLIOGRAFIA.

- [1] C. ZELENY, « Arch. Entwicklungsmechan. Organ. », 13, 597 (1902).
- [2] T. H. MORGAN, *Experimental Embryology*, p. 251. Columbia Univ. Press, New York 1927.
- [3] H. W. LUDWIG, « Arch. Entwicklungsmechan. Organ. », 149, 602 (1957).
- [4] E. ÖRLEY, « Mitth. Zool. Stat. Neapel », 5, 197 (1884).
- [5] E. MEYER, « Mitth. Zool. Stat. Neapel », 8, 462 (1888).
- [6] W. LUDWIG e H. W. LUDWIG, « Arch. Entwicklungsmechan. Organ. », 147, 259 (1954).
- [7] M. LA GRECA, « Boll. Zool. », 16, 101 (1949).
- [8] M. TUCKER, « J. Morphol. », 105, 569 (1959).
- [9] P. TARDENT e H. EYMANN, « Arch. Entwicklungsmechan. Organ. », 151, 1 (1959).
- [10] E. WOLFF, T. LENDER & C. ZILLER-SENGEL, « Rev. Suisse Zool. », 71, 75 (1964).
- [11] C. I. O. R. MORRIS e P. MORRIS, *Separation methods in Biochemistry*, p. 117. I. Pitman & Sons Eds. - London 1964.
- [12] A. H. WARNER e F. J. FINAMORE, « Comp. Biochem. Physiol. », 5, 233-240 (1962).