

---

ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI  
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI  
**RENDICONTI**

---

SALVATORE RUSSO-CAIA, PIETRO PALATRONI

**Osservazioni istochimiche sulla  $\beta$ -glucuronidasi 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. 51 (1971), n.5, p. 434-439.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<[http://www.bdim.eu/item?id=RLINA\\_1971\\_8\\_51\\_5\\_434\\_0](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1971_8_51_5_434_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  $\beta$ -glucuronidasi nel mesonefro in regressione dell'embrione di pollo* (\*). Nota di SALVATORE RUSSO-CAIA e PIETRO PALATRONI, presentata (\*\*) dal Socio A. STEFANELLI.

SUMMARY. — Histochemical observations have been made by the Hayashi simultaneous coupling method (naphtol AS—BI glucuronide—hexazonium pararosanilin) on the localization of  $\beta$ -glucuronidase in the growing and regressing chick embryo mesonephros.

The observed aspects of cellular degeneration are the formation of cytolysosomes and of masses due to their aggregation; in more advanced stages, and particularly in the residual tubules which persist even after hatching, the enzyme is localized in still larger masses; in the connective tissue the reaction is strongly positive in the phagocytic cells.

These aspects, similar to those previously observed for the acid phosphatase, demonstrate the direct intervention of lysosomal  $\beta$ -glucuronidase in the auto and heterolytic processes which occur in the involution of the intermediate kidney.

Considering the dual localization of the enzyme (in lysosomes and in endoplasmic reticulum), we are now working on the same material—with different histochemical methods—to elucidate the relationship between the two different activities in the growth and regression.

Si può considerare dimostrato l'intervento delle idrolasi acide a localizzazione lisosomale nella regressione del mesonefro che fisiologicamente si verifica, durante lo sviluppo embrionale del pollo, a partire dal 14° giorno.

A questa conclusione hanno condotto una serie di ricerche (Russo-Caia, 1964, 1966; Russo-Caia e Hassan, 1965 a) dalle quali è risultato che alla involuzione del rene intermedio corrisponde una solubilizzazione delle fosfatasi acide; si dimostra cioè con la centrifugazione frazionata che mentre nell'organo funzionante la quota maggiore di queste attività enzimatiche è sedimentabile, nel mesonefro in piena regressione — al momento della schiusa — la più forte attività è presente nel sopranatante privo di particelle.

Lo stesso fatto si osserva studiando le caratteristiche di sedimentabilità e attivabilità con Triton di altri due enzimi a localizzazione tipicamente lisosomale, la proteinasi e la ribonucleasi (Russo-Caia e Cecere, 1966); anche in questo caso la involuzione del mesonefro comporta una progressiva solubilizzazione delle idrolasi acide ed una minore resistenza alla omogenizzazione degli organuli che le contengono.

A questi dati biochimici corrisponde, a livello morfologico, un diverso quadro istochimico della localizzazione della fosfatasi acida (Russo-Caia

(\*) Dall'Istituto di Istologia ed Embriologia, Facoltà di Scienze M.F.N., dell'Università di Camerino.

(\*\*) Nella seduta del 13 novembre 1971.

e Hassan, 1965 b): nel mesonefro in regressione infatti la reazione di Gomori-Holt è in complesso molto più positiva, con diffusione dell'enzima nel citoplasma, e si osserva la formazione di citolisomi e di masse dovute alla loro apparente fusione.

Nei residui di mesonefro che persistono dopo la schiusa una forte attività fosfatasica hanno i numerosi macrofagi presenti nel connettivo che, proliferando, invade ed occupa lo spazio fra i tubuli variamente degenerati o trasformati (Russo-Caia, 1966). Nelle fasi terminali della regressione intervengono perciò, oltre alla autolisi ed alla autofagia, anche fenomeni di eterolisi da parte di elementi fagocitari.

Al microscopio elettronico uno degli aspetti più tipici è la presenza, soprattutto nelle cellule del tubulo convoluto prossimale, di grossi vacuoli autofagici; aspetto questo già descritto da Tilney (1964) nel suo ampio studio sulla ultrastruttura del mesonefro in regressione.

Questi risultati hanno trovato piena conferma in osservazioni successivamente compiute da altri Autori, in particolare da Salzgeber e Weber (1966) e da Patel (1967, 1970).

Il loro significato generale, in rapporto ai fenomeni « fisiologici » di regressione che si osservano durante lo sviluppo ed al meccanismo con il quale avviene la lisi cellulare ad opera degli enzimi contenuti nei lisosomi, è stato ampiamente discusso nei precedenti lavori: in essi è stato sottolineato come l'intervento delle idrolasi acide possa attuarsi con modalità diverse (autolisi, autofagia, eterolisi) che solo la indagine morfologica - al microscopio elettronico o con tecniche istochimiche specifiche - permette di discriminare.

Stiamo perciò conducendo una serie di ricerche sulla localizzazione di altre tipiche idrolasi acide, ed in questa Nota esponiamo i primi risultati ottenuti dallo studio della  $\beta$ -glucuronidasi. Le osservazioni sono state compiute con il metodo di Hayashi e Coll. (1964, 1968) su sezioni al criostato <sup>(1)</sup> di meso e metanefro di embrioni di razza « Golden Comet », fissati in formolocalcio al 4%; il tempo di incubazione nel substrato è stato, nella maggior parte dei casi, di 120' a pH 5,2. La specificità della reazione è stata controllata su sezioni incubate in un mezzo contenente saccaro-1,4-lattone 0,25 mM.

Sono stati studiati embrioni di sesso maschile e femminile, in quanto diverso è il destino del rene intermedio; nei maschi infatti alcuni tubuli della parte anteriore del mesonefro si trasformano nell'epididimo, mentre quelli della parte posteriore degenerano e ne residua una struttura rudimentale, il paradidimo. Nella femmina invece la regressione è totale, nel senso che sia dalla parte anteriore che posteriore del mesonefro derivano strutture rudimentali non funzionanti, rispettivamente l'*epoöphoron* e il *paroöphoron*. È infatti nostra intenzione, ovviamente basandoci su diversi enzimi, studiare comparativamente le modificazioni istochimiche delle idrolasi lisosomali nel mesonefro in involuzione dei due sessi.

(1) Ringraziamo il sig. Pierpaolo Gaggi per l'aiuto tecnico.

Nella Tav. I sono riprodotte alcune immagini, rappresentative degli aspetti osservati in vari momenti dello sviluppo embrionale. Nel mesonefro al 13° giorno, quando cioè l'organo è funzionante (Tav. I, fig. 1) la  $\beta$ -glucuronidasi è presente quasi esclusivamente nei tubuli prossimali (« segmenti principali », secondo la nomenclatura di Stampfli, 1950); l'enzima appare in essi nettamente localizzato in granuli piuttosto piccoli e ben definiti, abbondanti soprattutto nella parte basale del citoplasma. Assai raramente si osservano granuli negli altri segmenti tubulari del nefrone, e solo eccezionalmente una traccia di attività è presente nei glomeruli.

Questo tipo di distribuzione, che si osserva anche nel rene definitivo (Tav. I, fig. 2, metanefro al 20° giorno), è simile - a parte la diversa organizzazione strutturale del nefrone degli Uccelli - a quella tipicamente descritta nel rene dei Mammiferi.

Volendo fare una comparazione con la fosfatasi acida, si osserva che comune ai due enzimi è la prevalente localizzazione nel tubulo prossimale; alquanto diversa sembra invece la topografia intracellulare dei granuli, che nel caso della fosfatasi sono mediamente più abbondanti nella zona soprannucleare, rivolta verso il lume. Questo fatto, che naturalmente richiede più dettagliata conferma dallo studio di altri enzimi, può essere spiegato con la eterogeneità funzionale dei lisosomi indicata da numerose ricerche (si vedano riferimenti in Straus, 1967; Maunsbach, 1969; Tappel, 1969; Beck e Lloyd, 1969).

Nel mesonefro in regressione, al 18° giorno (Tav. I, figg. 3 e 4) l'attività della  $\beta$ -glucuronidasi è nettamente più forte; essa resta localizzata prevalentemente nei tubuli prossimali, ma granuli intensamente positivi si osservano con maggiore frequenza anche negli altri segmenti del nefrone, compresi i glomeruli. I granuli non hanno più nelle cellule una localizzazione prevalentemente basale, ma tendono ad essere presenti in tutto il citoplasma e - soprattutto - sono mediamente più grandi; l'attività enzimatica appare comunque sempre localizzata e non si osservano aspetti di diffusione.

Molto dimostrativo è il quadro istochimico che si osserva nei residui di mesonefro che persistono dopo la schiusa, ad esempio nel pulcino di 7 giorni (Tav. I, figg. 5 e 6). La struttura istologica del rene intermedio è qui completamente alterata, ed i tubuli riconoscibili sono profondamente modificati (il lume per esempio è fortemente ridotto o addirittura obliterato) e circondati da connettivo ricco di elementi fagocitari. Sia nei tubuli che nei macrofagi la  $\beta$ -glucuronidasi appare in questo stadio localizzata in granuli per lo più molto voluminosi, spesso così grandi da occupare tutta la cellula, che possono essere considerati citolisomi; anche se questa dizione è rigorosa solo per osservazioni compiute al microscopio elettronico.

Da queste osservazioni appare con evidenza che la involuzione del mesonefro comporta una modificazione delle strutture contenenti la  $\beta$ -glucuronidasi, chiaramente indicativa dell'intervento di questo enzima nei fenomeni di lisi cellulare; il suo comportamento istochimico è infatti per molti versi simile a quello precedentemente descritto per la fosfatasi acida, generalmente considerata il tipico « marker » lisosomiale.

I più importanti substrati naturali che la  $\beta$ -glucuronidasi può idrolizzare sono i polisaccaridi, i mucopolisaccaridi e i glucuronidi degli steroidi e di altri composti presenti nell'organismo o assorbiti dall'esterno (Tappel, 1969; Barrett, 1969); su questa base la si può quindi considerare come uno degli enzimi che assicurano ai lisosomi la possibilità di scindere praticamente tutti i costituenti citoplasmatici.

A differenza delle altre idrolasi acide lisosomali, una notevole quantità di  $\beta$ -glucuronidasi è stata però trovata, fin dalle prime esperienze di centrifugazione, nella frazione « microsomale » cioè - con terminologia più moderna - nel reticolo endoplasmico. La percentuale di attività legata agli elementi del reticolo è addirittura, nelle osservazioni sul fegato di ratto di De Duve e Coll. (1955), del 40%, rispetto al 20% presente nella frazione lisosomale (si veda De Duve, 1969).

Nel fegato del ratto la localizzazione endocellulare della glucuronidasi sarebbe sotto il controllo di geni diversi; Ganschow e Paigen (1967) hanno infatti studiato un ceppo mutante in cui l'enzima è solo lisosomale. Si è visto inoltre che esistono numerosi (nove o più) isoenzimi.

Probabilmente nel rene l'attività legata al reticolo è minore (Price e Dance, 1967); tuttavia ne rappresenta ugualmente una quota elevata.

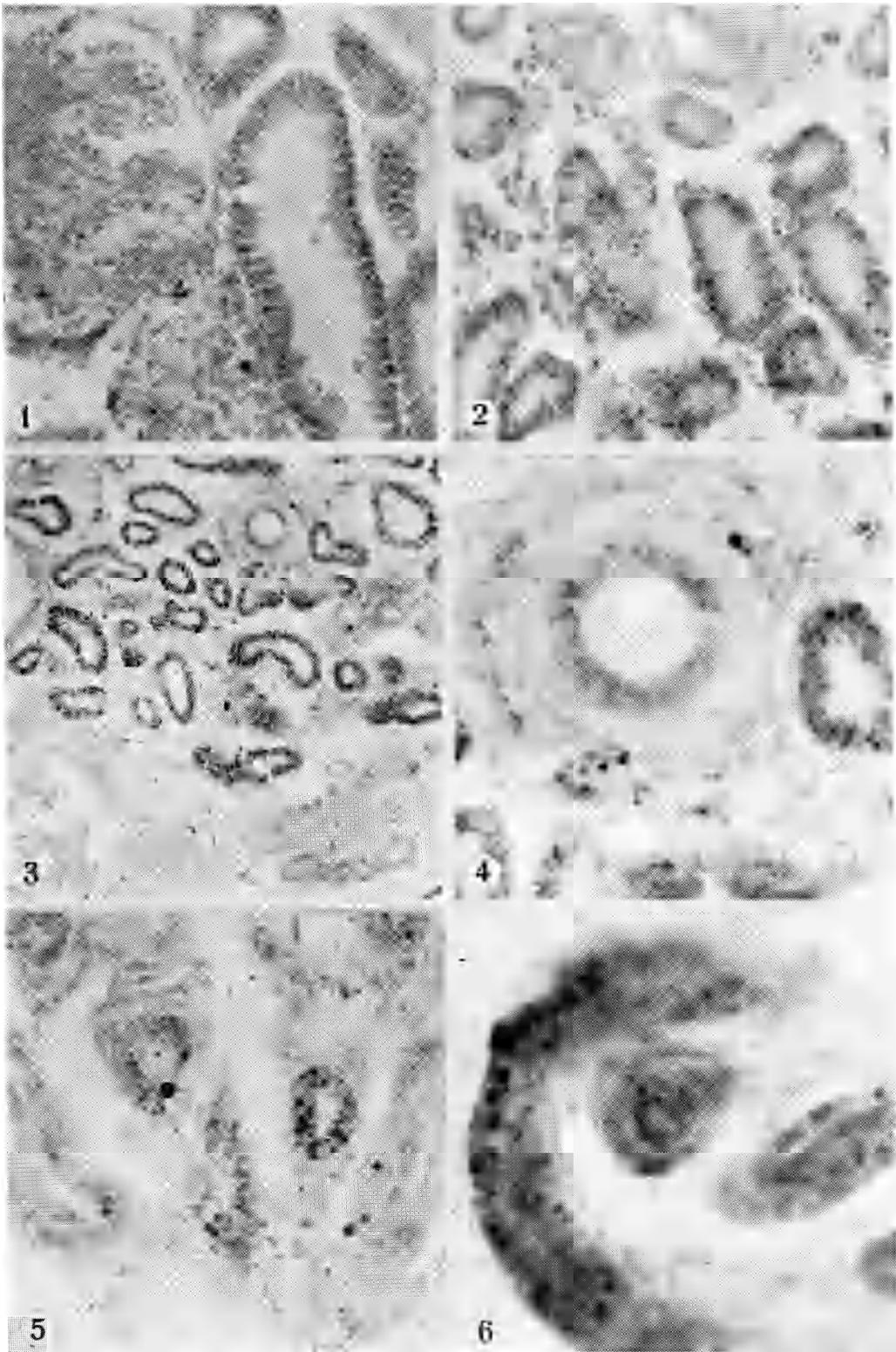
Il problema posto da questa doppia localizzazione e dalla conseguente impossibilità di considerare l'attività della  $\beta$ -glucuronidasi in funzione esclusivamente litica è stato affrontato in un considerevole numero di ricerche - che qui è impossibile ricordare - soprattutto ad opera di Fishman e Coll. (1967, 1969 a, 1969 b). Problema reso ancora più interessante dalle osservazioni che dimostrano un aumento di attività dell'enzima « non lisosomale » in condizioni di attiva proliferazione cellulare.

Ne è tra l'altro derivata la ricerca di tecniche istochimiche che consentano « in situ » una precisa discriminazione tra le due attività, che hanno il loro optimum a pH diversi; la copulazione con i sali di diazonio, comune a tutte queste tecniche, può quindi essere fatta avvenire simultaneamente o successivamente alla azione sul substrato.

I risultati qui esposti sono stati ottenuti con il metodo di Hayashi, che utilizza la copulazione simultanea con pararosnilina a pH 5,2 e rivela l'attività legata ai lisosomi; essi dimostrano in modo a nostro parere inequivocabile che la  $\beta$ -glucuronidasi interviene nei fenomeni litici che si verificano durante la regressione del mesonefro con il meccanismo tipico, comune alle altre idrolasi lisosomali. Questo ci sembra un dato essenziale per le ricerche che stiamo attualmente conducendo, con diverse tecniche, sulla attività legata al reticolo e sulle sue modificazioni nello sviluppo e nella regressione del mesonefro. Ricerche mediante le quali speriamo di portare un contributo anche alla conoscenza del rapporto, probabilmente assai complesso, che esiste tra le due localizzazioni e quindi della funzione di questo « difficile » enzima.

## BIBLIOGRAFIA

- BARRETT A. J., *Properties of lysosomal enzymes*, in «Lysosomes in Biology and Pathology» (Eds. J. T. Dingle & H. B. Fell), 2, cap. 10; North-Holland, Amsterdam (1969).
- BECK F. e LLOYD J. B., *Histochemistry and electron microscopy of lysosomes*, in «Lysosomes in Biology and Pathology» (Eds. J. T. Dingle & H. B. Fell), 2, cap. 21; North-Holland, Amsterdam (1969).
- DE DUVE C., *The lysosome in retrospect*, in «Lysosomes in Biology and Pathology» (Eds. J. T. Dingle & H. B. Fell), 1, cap. 1; North-Holland, Amsterdam (1969).
- FISHMAN W. H., GOLDMAN S. S. e DELELLIS R., *Dual localization of  $\beta$ -glucuronidase in endoplasmic reticulum and in lysosomes*, «Nature», 213, 457 (1967).
- FISHMAN W. H., IDE H. e RUFO R., *Dual localisation of acid hydrolases in endoplasmic reticulum and in lysosomes. I.  $\beta$ -glucuronidase staining reactions and cytochemical studies on kidney in androgen-stimulated mice*, «Histochemie», 20, 287 (1969 a).
- GANSCHOW R. e PAIGEN K., *Separate genes determining the structure and intracellular location of hepatic glucuronidase*, «Proc. Natl. Acad. Sci.», 58, 938 (1967).
- HAYASHI M., *Distribution of  $\beta$ -glucuronidase activity in rat tissues employing the naphthol AS-BI glucuronide hexazonium pararosanilin method*, «J. Histochem. & Cytochem.», 12, 659 (1964).
- HAYASHI M., NAKAJIMA Y. e FISHMAN W. H., *The cytologic demonstration of  $\beta$ -glucuronidase employing naphthol AS-BI glucuronide and hexazonium pararosanilin; a preliminary report*, «J. Histochem. & Cytochem.», 12, 293 (1964).
- HAYASHI M., SHIRAHAMA T. e COHEN A. S., *Combined cytochemical and electron microscopic demonstration of  $\beta$ -glucuronidase activity in rat liver with the use of a simultaneous coupling azo dye technique*, «J. Cell Biol.», 36, 289 (1968).
- IDE H. e FISHMAN W. H., *Dual localisation of  $\beta$ -glucuronidase and acid phosphatase in lysosomes and in microsomes. II. Membrane-associated enzymes*, «Histochemie», 20, 300 (1969 b).
- MAUNSBACH A. B., *Functions of lysosomes in kidney cells*, in «Lysosomes in Biology and Pathology» (Eds. J. T. Dingle & H. B. Fell), 1, cap. 4; North-Holland, Amsterdam (1969).
- PATEL V. B., *Some aspects of the hydrolysis of phosphomonoesters by homogenates of growing and regressing mesonephroi in chick embryos*, «Experientia», 23, 801 (1967).
- PATEL V. B., *Acid hydrolases and their relationship to lysosomes in the mesonephros of the chick embryo*, «J. Exp. Zool.», 175, 429 (1970).
- PRICE R. G. e DANCE N., *The cellular distribution of some rat-kidney glycosidases*, «Biochem. J.», 105, 877 (1967).
- RUSSO-CAIA S., *Attività enzimatiche nel meso e metanefro dell'embrione di pollo*, «Boll. Zool.», 31, 875 (1964).
- RUSSO-CAIA S., *Studi sul mesonefro e metanefro dell'embrione di pollo*, «Acta Med. Rom.», 4, 469 (1966).
- RUSSO-CAIA S. e HASSAN G., *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 a).
- RUSSO-CAIA S. e HASSAN G., *Osservazioni istochimiche sulla glicerosfosfatasi acida nel mesonefro in regressione dell'embrione di pollo*, «Rend. Acc. Naz. Lincei», 39, 563 (1965 b).
- RUSSO-CAIA S. e CECERE F., *Solubilizzazione di enzimi lisosomiali (proteinasi e ribonucleasi acide) durante la regressione del mesonefro dell'embrione di pollo*, «Ric. Scient.», 36, 1047 (1966).
- SALZGEBER B. e WEBER R., *La régression du mésonéphros chez l'embryon de poulet. Étude des activités de la phosphatase acide et des cathepsines: analyse biochimique, histochemique et observations au microscope électronique*, «J. Embryol. Exp. Morphol.», 15, 397 (1966).





- STAMPFLI H. R., *Histologische Studien am Wolff'schen Körper (Mesonephros) der Vögel und über seinen Umbau zu Nebenhoden und Nebenovar*, « Rev. Suisse Zool. », 57, 237 (1950).
- STRAUS W., *Lysosomes, phagosomes and related particles*, in « Enzyme Cytology » (Ed. D. B. Roodyn), cap. 5; Acad. Press, N.Y. (1967).
- TAPPEL A. L., *Lysosomal enzymes and other components*, in « Lysosomes in Biology and Pathology » (Eds. J. T. Dingle & H. B. Fell), 2, cap. 9; North-Holland, Amsterdam (1969).

## SPIEGAZIONE DELLA TAVOLA I

*Sezioni al criostato di meso e metanefro di embrioni di pollo fissati in formolo-calcio al 4%; attività  $\beta$ -glucuronidasi rivelata con il metodo di Hayashi e Coll. (naftol AS—BI glucuronide-pararosanilina) a pH 5,2. Altre spiegazioni nel testo.*

- Fig. 1. — Mesonefro di embrione ♂ al 13° giorno; tempo di incubazione 180'; 250×.
- Fig. 2. — Metanefro di embrione ♂ al 20° giorno; tempo di incubazione 180'; 400×.
- Fig. 3. — Mesonefro di embrione ♀ al 18° giorno; tempo di incubazione 120'; 160×.
- Fig. 4. — Mesonefro di embrione ♀ al 18° giorno; tempo di incubazione 120'; 630×.
- Fig. 5. — Mesonefro di pulcino ♂, 7 giorni dopo la schiusa; tempo di incubazione 180'; 400×.
- Fig. 6. — Mesonefro di pulcino ♀, 7 giorni dopo la schiusa; tempo di incubazione 120'; 630×.