
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

SALVATORE RUSSO-CAIA, PIETRO PALATRONI

**Aspetti istochimici della istolisi dei muscoli larvali
nella metamorfosi di *Musca domestica* L. Attività e
localizzazione della β -glucuronidasi**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 52 (1972), n.2, p. 233–238.*
Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1972_8_52_2_233_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. — *Aspetti istochimici della istolisi dei muscoli larvali nella metamorfosi di Musca domestica L. Attività e localizzazione della β -glucuronidasi* (*). Nota di SALVATORE RUSSO-CAIA e PIETRO PALATRONI, presentata (**) dal Socio A. STEFANELLI.

SUMMARY. — Hayashi simultaneous coupling method for the localization of lysosomal β -glucuronidase activity has been employed to study some histochemical aspects, mainly concerning the larval muscles histolysis, in metamorphosing *Musca domestica*.

Contrary to the degeneration of midgut, which represents a typical autolytic process with the direct intervention of intracellular lysosomal enzymes, in the larval muscles histolysis β -glucuronidase is carried only by phagocytic cells. In no moment of pupal life is it in fact possible to detect an enzymatic activity in muscle fibers, whose fragmentation precedes phagocyte invasion. In these elements granular β -glucuronidase activity is present from the first stages and increases during the pupal life; in many cases haemocyte cytoplasm is at the end completely filled with large red masses.

These findings are similar to those described in previous observations on the localization of acid glycerophosphatase and confirm—owing the particularly good specificity and accuracy of histochemical aspects—that in muscular histolysis there is not an activation of lysosomal hydrolases already present in muscle fibers.

Esiste una categoria di processi ontogenetici nei quali la morte cellulare — quella che alcuni Autori anglosassoni hanno di recente definito « morte cellulare programmata » — rappresenta un elemento normale, spesso addirittura il più caratteristico, dello sviluppo.

Di questi processi si trovano esempi numerosi nello sviluppo embrionale ed in quello post-embriionale, tanto fra gli Invertebrati che fra i Vertebrati. Al loro studio ci interessiamo da tempo, soprattutto per quanto riguarda due casi particolarmente interessanti: la regressione del mesonefro durante lo sviluppo embrionale degli Uccelli (Russo-Caia, 1964, 1966; Russo-Caia e Hassan, 1965 a, 1965 b; Russo-Caia e Cecere, 1966; Russo-Caia e Palatroni, 1971) e la istolisi delle strutture larvali durante la metamorfosi dei Ditteri (Russo-Caia, 1960, 1965, 1967 a, 1967 b).

Le nostre ricerche tendono fondamentalmente a chiarire il meccanismo con il quale si verificano questi fenomeni involutivi ed a precisare il ruolo che in essi svolgono gli enzimi litici con prevalente localizzazione nei lisosomi; la identificazione biochimica e citologica di questi organuli, avvenuta circa quindici anni fa ad opera di De Duve e Novikoff, ha infatti tra l'altro permesso di riesaminare su basi nuove il problema della lisi cellulare in condizioni normali e patologiche.

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

(**) Nella seduta del 12 febbraio 1972.

Le ricerche sui lisosomi sono tanto più significative quanto più è possibile condurle contemporaneamente a livello biochimico e morfologico, studiando cioè sia la solubilizzazione delle idrolasi acide che le modificazioni delle strutture nelle quali sono più o meno tipicamente contenute.

Per quanto riguarda in particolare la istolisi larvale degli Insetti olometaboli, il criterio morfologico è certamente il più valido per due motivi: il primo è che la determinazione biochimica della sedimentabilità e attivabilità delle idrolasi acide può essere fatta sull'animale intero e solo eccezionalmente su alcuni organi larvali che è possibile isolare, mentre la regressione di ciascuna delle strutture destinate a scomparire ha un suo proprio svolgimento nel tempo ed una sua particolare fisionomia. Il secondo è che nella metamorfosi più che mai coesistono ed operano con diversa importanza nei diversi tessuti ed organi i due meccanismi fondamentali (auto ed eterolisi) con i quali agiscono gli enzimi lisosomiali; meccanismi che solo a livello morfologico è possibile valutare.

Esistono fortunatamente per numerose idrolasi acide tecniche istochimiche specifiche che permettono di determinarne la localizzazione e le modificazioni con sufficiente precisione anche a livello di microscopia ottica. Su questa linea stiamo perciò conducendo una serie di ricerche; nella presente Nota vengono riferiti i risultati riguardanti le modificazioni istochimiche della β -glucuronidasi durante la istolisi dei muscoli larvali.

Le osservazioni sono state compiute con il metodo di Hayashi e Coll. (1964, 1968) su sezioni al criostato ⁽¹⁾ di larve e pupe in vari stadi della metamorfosi, fissate in formolo-calcio al 4%; per ottenere la massima evidenza delle strutture contenenti l'enzima si è scelto, naturalmente con una serie di prove preliminari, un tempo di incubazione nel substrato (a pH 5,2) di quattro ore. La positività della reazione si ha anche con tempi più brevi, per esempio di 60', e ciò che cambia è solo la intensità della colorazione; in ogni caso la specificità della reazione è stata controllata su sezioni incubate in un mezzo contenente come inibitore saccaro-1,4-lattone in concentrazione 0,25 mM. Una colorazione di contrasto, utile soprattutto per evidenziare i nuclei, è stata ottenuta con verde di metile tamponato a pH 4,0.

Nelle Tavole I-III sono riprodotti alcuni aspetti della istolisi dei muscoli larvali, a vari tempi dalla formazione del pupario; nella Tav. IV è invece rappresentato, per confronto, il quadro istochimico della involuzione dello intestino medio.

Nella pupa di 4 ore (Tav. I, figg. 1-4) lo stato di conservazione delle fibre nei diversi muscoli è piuttosto variabile: si osservano infatti elementi nei quali la tipica striatura appare ben conservata (fig. 2) ed altri, più numerosi, nei quali la struttura appare più o meno profondamente alterata. In alcuni muscoli (fig. 4) sono già presenti i segni della frammentazione che in tempi successivi rappresenterà uno degli aspetti più caratteristici della istolisi.

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

Le osservazioni compiute sui Ditteri da altri Autori, a partire da quelle classiche di Perez (1910) in *Calliphora* fino alle più recenti di Whitten (1964, 1968) in *Sarcophaga* e *Drosophila* e di Crossley (1964, 1965, 1968) sempre in *Calliphora*, non sono a questo proposito conclusive; mentre infatti esiste una concordanza sul fatto che il muscolo appare sempre citologicamente alterato, non è chiaro se la frammentazione spontanea rappresenta o no una condizione necessaria per la successiva invasione fagocitaria.

Gli aspetti da noi osservati, naturalmente nei limiti consentiti dalla microscopia ottica, si accordano con le osservazioni al microscopio elettronico di Crossley, secondo il quale non è necessaria una preventiva dissoluzione della lamina basale perché gli emociti possano penetrare nel muscolo.

Quattro ore dopo la formazione del pupario i muscoli appaiono comunque circondati da elementi fagocitari che si mantengono ad una maggiore o minore distanza, e si ha la netta impressione che il numero di emociti presenti sia in diretto rapporto con il grado di degenerazione delle fibre. Quasi tutti gli emociti presentano una evidente attività β -glucuronidasi lisosomale (il citoplasma contiene numerosi granuli rossi nettamente delimitati), mentre non si osserva alcun segno di attività enzimatica nelle fibre muscolari, anche con tempi di incubazione intenzionalmente prolungati.

Nelle pupe di 10 ore (Tav. II, figg. 1-4) il quadro è più uniforme, in quanto gran parte dei muscoli sono frammentati e in degenerazione. Anche in questo caso gli elementi contrattili non presentano nessun segno di una attività β -glucuronidasi che è invece fortemente positiva, sempre con localizzazione granulosa, negli emociti. Questi sono ormai quasi tutti presenti negli interstizi dei muscoli frammentati, o comunque a diretto contatto con essi (figg. 2 e 4); anche le fibre che mantengono una certa integrità (fig. 1) ne sono completamente infiltrate. Si osservano i caratteristici aspetti di fagocitosi di frammenti muscolari (sarcoliti) da parte di sincizi formati da più elementi nel cui citoplasma l'attività β -glucuronidasi è particolarmente intensa (fig. 3).

Gli stadi ancora più avanzati (Tav. III) permettono di osservare i quadri morfologici classici della istolisi muscolare. Si nota tra l'altro la persistenza di gruppi di fibre non invase da emociti pur essendo circondate da elementi in piena attività fagocitaria; la fig. 1 (pupa di 24 ore) ne dà un esempio. Dal punto di vista istochimico due sono gli aspetti interessanti: la assoluta assenza di attività β -glucuronidasi nelle fibre muscolari (figg. 2, 3; pupe di 48 ore) e la ancor più forte attività enzimatica - molto spesso diffusa a tutto il citoplasma - negli emociti (fig. 4, pupa di 72 ore).

Nella Tav. IV è infine rappresentata la localizzazione della β -glucuronidasi nell'intestino medio della pupa di 4 ore (figg. 1 e 2) e di 48 ore (figg. 3 e 4). Le immagini mostrano, in evidente contrasto con quelle riguardanti la istolisi muscolare, il comportamento istochimico dell'enzima in un tipico fenomeno di autolisi. La degenerazione dell'intestino larvale si verifica infatti con il progressivo distacco e la involuzione dell'epitelio che viene rigettato nel lume; fase terminale di questo processo è la formazione del

« corpo giallo » (figg. 3 e 4) che persiste durante tutta la vita pupale. In tutti gli stadi la positività della reazione per la β -glucuronidasi è talmente forte che nei preparati la sezione dell'intestino medio è riconoscibile ad occhio nudo come un puntino rosso.

È a questo punto opportuno un paragone con le precedenti osservazioni sulla fosfatasi acida (Russo-Caia, 1967 a) che ugualmente hanno mostrato un massiccio intervento di questa idrolasi nella autolisi dell'intestino medio ed una partecipazione indiretta (mediata cioè dai fagociti) alla istolisi della muscolatura. Gli aspetti descritti in questa Nota confermano perciò i precedenti risultati; il punto interessante è che le presenti osservazioni sulla β -glucuronidasi permettono, per la particolare intensità e precisione della localizzazione istochimica, di escludere con sicurezza ancora maggiore che nella istolisi si verifichi anche una attivazione di enzimi idrolitici presenti nel tessuto muscolare.

Dato questo di particolare valore in quanto Lockshin e Williams (1965 a, 1965 b, 1969 a, 1969 b) hanno riferito la presenza di lisosomi nei muscoli intersegmentali di alcuni Lepidotteri ed hanno ritenuto di poter attribuire alla « attivazione » degli enzimi in essi contenuti anche i fenomeni iniziali della istolisi muscolare. Le nostre osservazioni, che si accordano tra l'altro con quelle di Crossley, portano ad escludere questo meccanismo di autolisi, che opera invece con evidente chiarezza fin dalle prime ore della vita pupale nell'intestino medio (vedi Tav. IV) ed in altre strutture larvali (Russo-Caia e Palatroni, osservazioni non pubblicate).

I limiti di questa Nota, essenzialmente descrittiva, non consentono di approfondire la discussione sulla istolisi dei muscoli larvali, nè tanto meno di allargare il discorso agli altri organi che subiscono una più o meno completa dissoluzione nella metamorfosi; questo verrà fatto in successivi lavori, nei quali naturalmente si terrà conto anche dei risultati di altre ricerche in corso.

Altrettanto vale per uno specifico esame del ruolo che - tra tutte le idrolasi acide - ha la β -glucuronidasi, di cui è tipica la doppia localizzazione nei lisosomi e nelle membrane del reticolo endoplasmico; al riguardo vanno comunque ricordate alcune osservazioni biochimiche (Hérin, 1966; Hegdekar e Smallman, 1969; Varute e Sawant, 1971) su omogenati totali di Ditteri, dalle quali risulta un aumento ed una progressiva solubilizzazione di questo enzima durante la vita pupale.

In conclusione, le presenti osservazioni istochimiche dimostrano a livello citologico le modalità con le quali la β -glucuronidasi lisosomale interviene nei fenomeni di istolisi della metamorfosi di *Musca domestica*; questo intervento è diretto nella massiccia autolisi dell'intestino medio, indiretto - mediato cioè dagli emociti con funzione fagocitica - nella lisi dei muscoli larvali. In nessun momento della vita pupale si osserva una attività enzimatica nelle fibre muscolari, la cui iniziale degenerazione e frammentazione precede la invasione fagocitaria e appare non dipendente dalla attività di idrolasi lisosomali.

BIBLIOGRAFIA

- 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).
- CROSSLEY A. C. S., *The fine structure and mechanism of breakdown of larval intersegmental muscles in the blow-fly Calliphora erythrocephala*, « J. Ins. Physiol. », 14, 1389 (1968).
- HAYASHI M., *Distribution of β -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 β -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 β -glucuronidase activity in rat liver with the use of a simultaneous coupling azo dye technique*, « J. Cell. Biol. », 36, 289 (1968).
- HEGDEKAR B. M. e SMALLMAN B. N., *Intracellular distribution of β -glucuronidase activity during metamorphosis of the housefly, Musca domestica L.*, « Canad. J. Zool. », 47, 45 (1969).
- HERIN C., *Étude de hydrolases acides lysosomiales des pupes du diptère Calliphora erythrocephala*, « Arch. Intern. Physiol. Bioch. », 74, 315 (1966).
- LOCKSHIN R. A., *Lysosomes in insects*, in « Lysosomes in Biology and Pathology » (Eds. J. T. Dingle & H. B. Fell), vol. 1, cap. 13; North-Holland, Amsterdam (1969 a).
- LOCKSHIN R. A., *Programmed cell death. Activation of lysis by a mechanism involving the synthesis of protein*, « J. Ins. Physiol. », 15, 1505 (1969 b).
- LOCKSHIN R. A. e WILLIAMS C. M., *Programmed cell death. I. Cytology of degeneration in the intersegmental muscles of the pernyi silkworm*, « J. Ins. Physiol. », 11, 123 (1965 a).
- LOCKSHIN R. A. e WILLIAMS C. M., *Programmed cell death. V. Cytolytic enzymes in relation to the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms*, « J. Ins. Physiol. », 11, 831 (1965 b).
- PEREZ C., *Recherches histologiques sur la métamorphose des Muscides; Calliphora erythrocephala Mg.*, « Arch. Zool. Exp. Gén. », 4, 1 (1910).
- RUSSO-CAIA S., *Aspetti biochimici della metamorfosi degli Insetti. Osservazioni in Musca domestica L.*, « Ric. Scient. », 30, 1861 (1960).
- RUSSO-CAIA S., *Attività enzimatiche nel meso e metanefro dell'embrione di pollo*, « Boll. Zool. », 31, 875 (1964).
- 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).
- RUSSO-CAIA S., *Studi sul meso e metanefro dell'embrione di pollo*, « Acta Med. Rom. », 4, 469 (1966).
- RUSSO-CAIA S., *Osservazioni istochimiche sulla localizzazione della fosfatasi acida durante la metamorfosi di Musca domestica*, « Rend. Acc. Naz. Lincei », 43, 129 (1967 a).
- RUSSO-CAIA S., *Osservazioni istochimiche sulla metamorfosi degli Insetti*, « Boll. Zool. », 34, 168 (1967 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).

- 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 glicerofosfatasi acida nel mesonefro in regressione dell'embrione di pollo*, « Rend. Acc. Naz. Lincei », 39, 563 (1965 b).
- RUSSO-CAIA S. e PALATRONI P., *Osservazioni istochimiche sulla β -glucuronidasi nel mesonefro in regressione dell'embrione di pollo*, « Rend. Acc. Naz. Lincei », in stampa (1971).
- WHITTEN J. M., *Haemocytes and the metamorphosing tissues in Sarcophaga bullata, Drosophila melanogaster, and other Cyclorrhaphous Diptera*, « J. Ins. Physiol. », 10, 447 (1964).
- WHITTEN J. M., *Metamorphic changes in insects*, in « Metamorphosis. A problem in Developmental Biology » (Eds. W. Etkin & L. I. Gilbert), cap. 2; North-Holland, Amsterdam (1968).

SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE I-IV

Sezioni al criostato di pupae fissate in formolo-calcio al 4% a vari tempi dalla formazione del pupario; attività β -glucuronidasica rivelata con il metodo di Hayashi e Coll. (naftol AS-BI glucuronide-pararosanilina) a pH 5,2; tempo di incubazione 4 ore; colorazione di contrasto con verde metile tamponato a pH 4,0. Altre spiegazioni nel testo.

TAVOLA I. - *Istolisi muscolare.*

Fig. 1. - Pupa di 4 ore; 630 \times .
Fig. 2. - Pupa di 4 ore; 250 \times .

Fig. 3. - Pupa di 4 ore; 250 \times .
Fig. 4. - Pupa di 4 ore; 250 \times .

TAVOLA II. - *Istolisi muscolare.*

Fig. 1. - Pupa di 10 ore; 400 \times .
Fig. 2. - Pupa di 10 ore; 400 \times .

Fig. 3. - Pupa di 10 ore; 630 \times .
Fig. 4. - Pupa di 10 ore; 250 \times .

TAVOLA III. - *Istolisi muscolare.*

Fig. 1. - Pupa di 24 ore; 400 \times .
Fig. 2. - Pupa di 48 ore; 250 \times .

Fig. 3. - Pupa di 48 ore; 160 \times .
Fig. 4. - Pupa di 72 ore; 400 \times .

TAVOLA IV. - *Istolisi dell'intestino medio.*

Fig. 1. - Pupa di 4 ore; 100 \times .
Fig. 2. - Pupa di 4 ore; 160 \times .

Fig. 3. - Pupa di 48 ore; 63 \times .
Fig. 4. - Pupa di 48 ore; 160 \times .







