
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

VIRGILIO BOTTE, CARLO BASILE

**Le esterasi aspecifiche del rene e dell'interrenale di
alcune specie di anfiabi e loro comportamento
elettroforetico nei due sessi**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 54 (1973), n.4, p. 653–659.*
Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1973_8_54_4_653_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/>

Endocrinologia. — *Le esterasi aspecifiche del rene e dell'interrenale di alcune specie di anfibi e loro comportamento elettroforetico nei due sessi* (*). Nota di VIRGILIO BOTTE e CARLO BASILE, presentata (**)
dal Socio G. MONTALENTI.

SUMMARY. — The electrophoretic (starch gel) behaviour of non-specific esterases of the kidney and interrenal of some anurans and urodeles has been investigated.

The enzymes show a molecular heterogeneity in the species studied, in the two sexes; those differences are mainly shown in a different activity of some isoenzymes (as in *Rana esculenta* and *Bufo viridis*), or sometimes also in the number of isoenzymes (as in urodeles). In some species, however, like *Hyla arborea*, *Bufo vulgaris* and *Bombina bombina*, the patterns are very similar in the two sexes.

The results have also been discussed in the light of other relevant researches on mammalian kidney.

In alcuni mammiferi le esterasi aspecifiche del fegato, del rene, dell'epididimo e del plasma hanno caratteristiche differenti nei due sessi. Queste consistono, in genere, nella risoluzione dell'enzima all'elettroforesi in un numero diverso di isoenzimi o in un'attività relativa variabile di alcuni di questi in uno dei due sessi (Allen e Slater, 1957; Allen e Hunter, 1960; Schwark e Ecobichon, 1967; Allen e Moore, 1966; Augustinsson e Henricson, 1965; Ruddle, 1965; Shaw e Koen, 1963; Li *et al.*, 1969). È stato anche dimostrato che la castrazione o la somministrazione di ormoni sessuali modificano nel topo e nel criceto le caratteristiche delle esterasi aspecifiche del rene (Allen e Hunter, 1960; Li *et al.*, 1969).

Questo tipo di ricerche può acquistare interesse particolare negli anfibi dove, com'è noto, la gonade assume nel maschio dei rapporti molto stretti con alcuni tubuli mesonefrici utilizzati per il trasporto dello sperma nel condotto di Wolff. Il rene presenta, di conseguenza, aspetti morfologici differenti nel maschio e nella femmina; nel maschio degli Urodeli, ad esempio, la parte più craniale del rene si differenzia esclusivamente come rene genitale (cfr. Peyrot e Massimello, 1961).

In questa Nota descriviamo il comportamento elettroforetico delle esterasi aspecifiche del rene e dell'interrenale di alcune specie di Anfibi anuri ed urodeli. I due organi sono stati considerati insieme perché sono difficili da separare completamente con mezzi chirurgici; l'interrenale possiede, poi,

(*) Lavoro eseguito presso la II Cattedra di Anatomia Comparata, Facoltà di Scienze dell'Università di Napoli con un contributo del Consiglio Nazionale delle Ricerche. Gli Autori ringraziano il sig. Dario Spiteri per la sua preziosa collaborazione.

(**) Nella seduta del 14 aprile 1973.

una discreta attività esterasica, istochimicamente dimostrabile (osservazioni non pubblicate). Questi aspetti rendono difficile attribuire esclusivamente ad uno dei due organi l'attività esterasica dosata biochimicamente. Mancano, infine, per quanto sappiamo, osservazioni su eventuali differenze morfologiche nell'interrenale nei due sessi degli Anfibi.

MATERIALE E METODO

Abbiamo esaminato esemplari adulti maschi e femmine dei seguenti Anfibi, ottenuti dalle campagne dei dintorni di Napoli:

Anuri: *Rana esculenta* (catturata a maggio); *Hyla arborea* (luglio-agosto); *Bufo vulgaris* (gennaio); *Bufo viridis* (gennaio); *Bombina bombina* (dicembre).

Urodeli: *Triturus cristatus* (maggio e febbraio); *Triturus vulgaris* (gennaio); *Triturus italicus* (gennaio).

Subito dopo il prelievo i reni con l'interrenale erano omogeneizzati a freddo in acqua distillata (100 mg di tessuto/ml). L'omogenato era centrifugato per 30' a 4 °C a 19.000×g; il sopranatante era congelato e scongelato per tre volte e quindi ricentrifugato ed utilizzato direttamente per la corsa elettroforetica. Questa era condotta su gel di amido secondo la tecnica di Smithies (1955, 1959) in un sistema continuo di buffer. Le piastre elettroforetiche erano preparate con amido idrolizzato (Connaught) ad una concentrazione del 13 % in buffer borato 0,03M, pH 8,6. Il buffer nelle camere degli elettrodi era 0,3M allo stesso pH. L'elettroforesi, nel sistema verticale, correva per 18 ore a 4 °C utilizzando una corrente continua di 4,5 V/cm. Si esaminavano contemporaneamente 10 campioni, cinque di maschi e cinque di femmine, avendo cura che la concentrazione proteica fosse il più possibile costante in tutti i campioni.

L'attività enzimatica era dimostrata direttamente sulle piastre elettroforetiche utilizzando il metodo di Li e coll. (1969) e l' α -naftile-acetato come substrato. Le piastre erano poi chiarificate in glicerina a caldo ed esaminate per una valutazione quantitativa del colore delle bande sul densitometro automatico Cellomatic CGA.

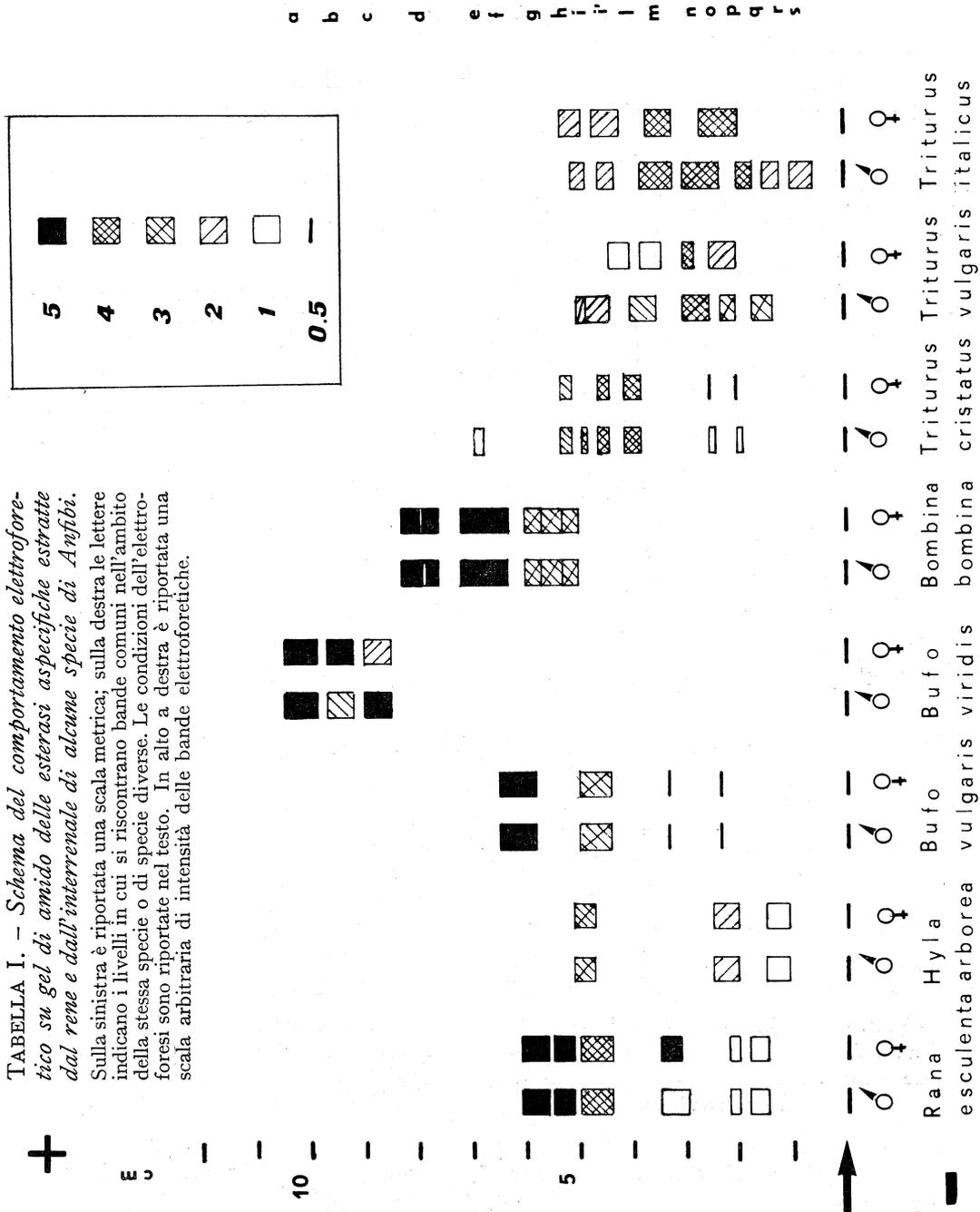
Per tutte le specie si potevano effettuare analisi individuali; nel caso di *Triturus vulgaris* e *T. italicus* era necessario riunire i tessuti di almeno cinque animali per ciascun analisi.

RISULTATI

La Tabella I è uno schema che riporta la migrazione elettroforetica delle esterasi nel maschio e nella femmina delle specie di anfibi esaminati. Sulla sinistra è riportata una scala metrica; sulla destra le lettere dell'alfabeto sono disposte a livello di bande migrate ad altezza molto simile.

TABELLA I. - Schema del comportamento elettroforetico su gel di amido delle esterasi aspecifiche estratte dal rene e dall'interrenale di alcune specie di Anfibii.

Sulla sinistra è riportata una scala metrica; sulla destra le lettere indicano i livelli in cui si riscontrano bande comuni nell'ambito della stessa specie o di specie diverse. Le condizioni dell'elettroforesi sono riportate nel testo. In alto a destra è riportata una scala arbitraria di intensità delle bande elettroforetiche.



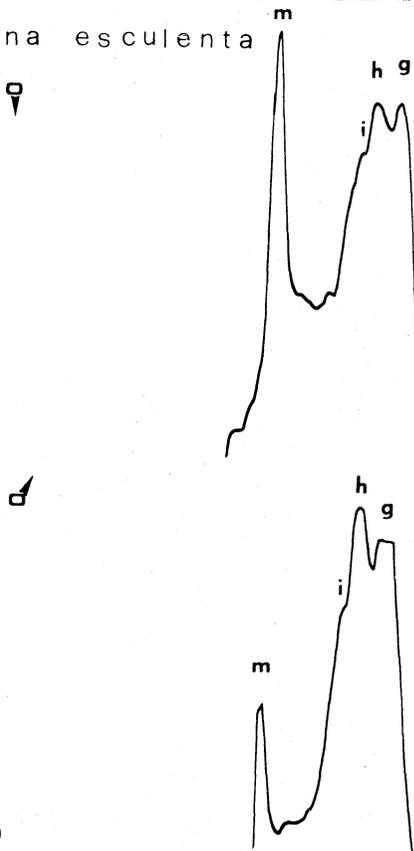
I risultati ottenuti possono essere così riassunti:

1) *Rana esculenta*. Si distinguono quattro bande principali sia nel maschio che nella femmina (*g*, *h*, *i*, *m*). La banda *m* è costantemente più intensa nella femmina (fig. 1).

2) *Hyla arborea*. Si identificano due bande di debole intensità (*i*, *p*) ed una terza (*r*) appena visibile.



Rana esculenta

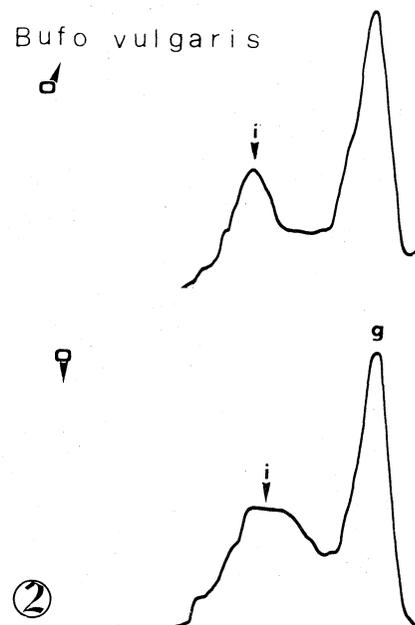


①

Fig. 1. - Traccati elettroforetici e relative curve fotodensimetriche delle esterasi aspecifiche tratte dal rene e dall'interrenale di *Rana esculenta*.



Bufo vulgaris



②

Fig. 2. - Tracciato elettroforetico e relative curve fotodensimetriche delle esterasi aspecifiche estratte dal rene e dall'interrenale di *Bufo vulgaris*.

3) *Bufo vulgaris*. Sono presenti due bande principali (*g*, *i*) di intensità praticamente equivalente nei due sessi. A mala pena evidenti altre due frazioni (*m*, *p*) (fig. 2).

4) *Bufo viridis*. Sia nel maschio che nella femmina si osservano tre bande (*a*, *b*, *c*). La *b* è più intensa nella femmina, la *c* nel maschio (fig. 3).

5) *Bombina bombina*. In entrambi i sessi si separano tre bande (*d*, *e*, *g-h*). Ciascuna di queste, però, si risolve in due bande migranti molto vicine. Non sono evidenti differenze tra maschio e femmina (fig. 4).

6) *Triturus cristastus carnifex*. Nel maschio si osservano 7 bande (*e*, *h*, *i*, *i'*, *l*, *o*, *p*). Le bande *e*, *o*, *p*, sono poco intense. Nella femmina la banda *i-i'* potrebbe corrispondere alle *i* e *i'* del maschio. Sono evidenti anche in questa le bande *l*, *o*, *p*, manca, invece, la banda *e*.

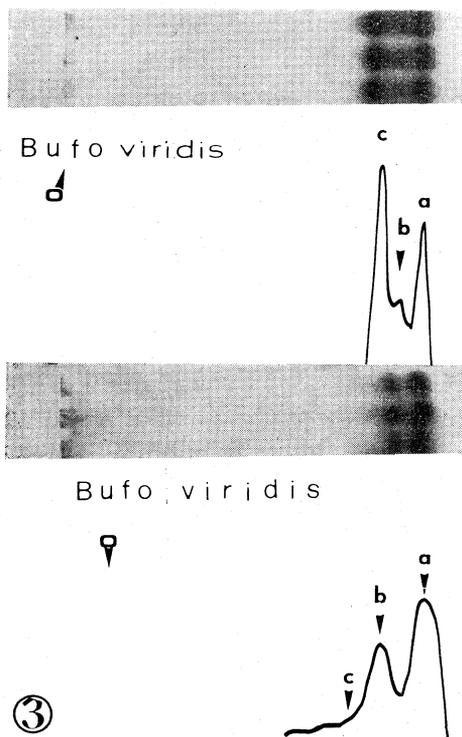


Fig. 3. - Tracciati elettroforetici e relative curve fotodensimetriche delle esterasi aspecifiche ottenute dal rene e dall'interrenale di *Bufo viridis*.

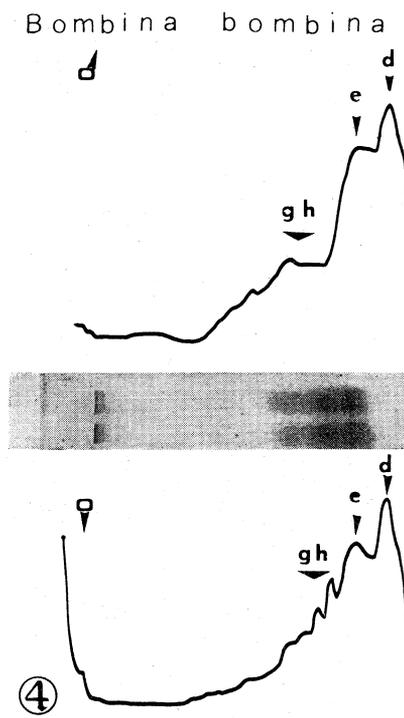
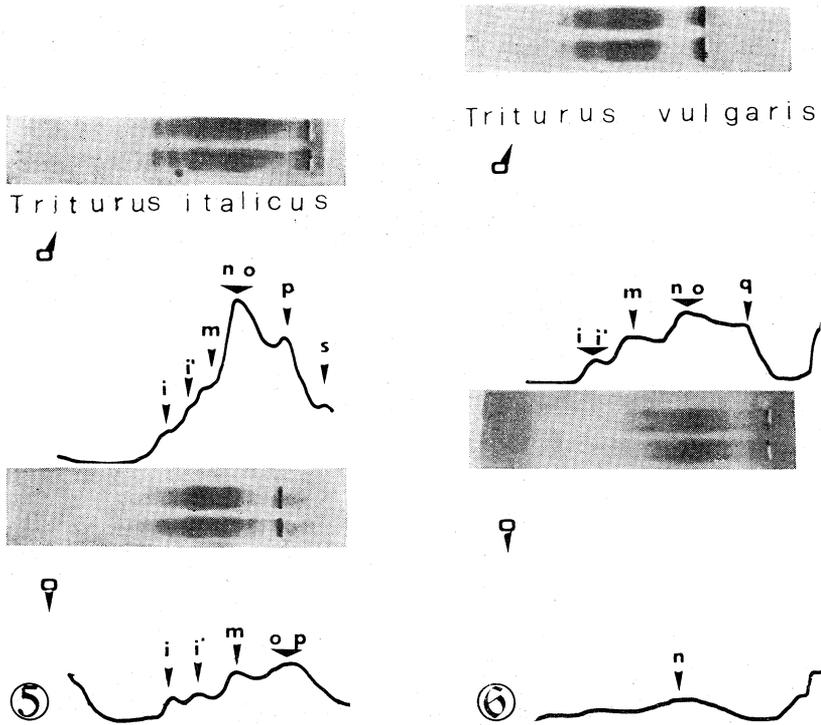


Fig. 4. - Tracciati elettroforetici e relative curve fotodensimetriche delle esterasi aspecifiche estratte dal rene e dall'interrenale di *Bombina bombina*.

7) *Triturus italicus*. Nel maschio si individuano 7 bande (*i*, *i'*, *m*, *n-o*, *p*, *r*, *s*); nella femmina *i*, *i'*, *m* e una banda *o-p*; mancano *r* ed *s*. La banda *o-p* della femmina potrebbe corrispondere a *n-o* e *p* del maschio (fig. 5).

8) *Triturus vulgaris*. Nel maschio si separano 5 bande (*i-i'*, *m*, *n-o*, *p*, *q*); nella femmina una banda *l*, che non trova la corrispondente nel maschio, e le bande *m*, *n*, *p*. Mancano le bande *i* e *q*. La intensità delle bande nella femmina è più bassa che non nel maschio.



Figg. 5 e 6. - Traccati elettroforetici e relative curve fotodensimetriche delle esterasi aspecifiche estratte dal rene e dall'interrenale di *Triturus italicus* (fig. 5) e *T. vulgaris* (fig. 6). In queste due figure il punto di semina è a destra.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Le esterasi aspecifiche del rene e dell'interrenale degli Anfibi hanno una costituzione complessa. Come indicano i nostri risultati l'enzima si risolve all'elettroforesi in differenti forme molecolari che presentano caratteristiche particolari nelle varie specie esaminate.

Nell'ambito della stessa specie delle diversità sono spesso riscontrabili nei due sessi e queste consistono talvolta in una differente attività di uno o più isoenzimi, come in *Rana esculenta* e *Bufo viridis*, talvolta in un differente numero di frazioni, come in tutti gli urodeli esaminati. In altre specie infine, quali *Hyla arborea*, *Bufo vulgaris* e *Bombina bombina*, l'enzima è formato di diversi isoenzimi ma non sono evidenti differenze tra i due sessi.

È impossibile stabilire quali delle frazioni enzimatiche vanno attribuite al rene e quali all'interrenale, poiché per le difficoltà incontrate nella loro separazione, questi due organi sono stati studiati nel loro complesso. La maggiore ricchezza in isoenzimi nei preparati ottenuti dal maschio degli Urodela, dove si differenzia un *rene genitale* in connessione esclusivamente con la gonade, lascia pensare che alcuni isoenzimi possano essere di pertinenza esclusiva di

tale parte del rene. Solo delle ricerche sperimentali, quali la castrazione e le somministrazioni ormonali, potranno in parte chiarire questo punto. Un'analisi sperimentale potrà portare, inoltre, nuova luce anche sulle differenze di attività dei vari isoenzimi nelle specie di Anuri che le presentano.

Poco si conosce sulla funzione delle esterasi aspecifiche. Nei mammiferi è stato ipotizzato che le frazioni enzimatiche che si modificano in seguito alla gonadectomia o al trattamento ormonale, siano in qualche modo correlate alla ricchezza in colesteridi o altri lipidi presenti nei tessuti (Augustinsson e Henricson, 1965), mentre le altre frazioni sono legate al metabolismo basale degli organi. Una funzione simile si potrebbe prospettare per il rene e l'interrenale degli Anfibi, quest'ultimo essendo particolarmente ricco in colesteridi e altri lipidi.

Nessun rapporto, infine, sembra esistere tra la possibile posizione sistematica delle specie esaminate ed il tipo di frazionamento delle esterasi. Ad analoghe conclusioni hanno portato delle analisi sistematiche sulle esterasi aspecifiche condotte nell'ambito dei Mammiferi (Coutinho *et al.*, 1965).

BIBLIOGRAFIA

- ALLEN J.M. e HUNTER R.L., « J. Histochem. Cytochem. », 8, 50 (1960).
ALLEN R.C. e MOORE D.J., « Endocrinology », 78, 655 (1966).
ALLEN J.M. e SLATER J.J., « Anat. Rec. », 129, 255 (1957).
AUGUSTINSSON K.B. e HENRICSON B., « Acta Physiol. Scand. », 64, 418 (1965).
COUTINHO H.B., PADÍLHA M.C.S., GOMES J.M. e ALMEINDA ALVES J.J., « J. Histochem. Cytochem. », 13, 339 (1965).
LI J.J., KIRKMAN H. e HUNTER R.L., « J. Histochem. Cytochem. », 17, 386 (1969).
PEYROT A. e MASSIMELLO G., « Zeit. Zell. », 54, 764 (1961).
RUDDLE F.H., « J. Histochem. Cytochem. », 14, 25 (1966).
SCHWARK W.S. e ECOBICHON D.J., « Can. J. Biochem. », 45, 451 (1967).
SHAW C.R. e KOEN A.L., « Science », 140, 70 (1963).
SMITHIES O., « Biochem. J. », 61, 629 (1955).
SMITHIES O., « Biochem. J. », 71, 585 (1959).