
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

ANNA MARIA ZACCHEI, PIETRO PALATRONI, SALVATORE
RUSSO-CAIA

**Osservazioni istochimiche sulla anidraasi carbonica
nella retina dell'embrione di pollo**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 61 (1976), n.3-4, p.
300-305.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1976_8_61_3-4_300_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 anidrase carbonica nella retina dell'embrione di pollo.* Nota (*) di ANNA MARIA ZACCHEI (**), PIETRO PALATRONI (***) e SALVATORE RUSSO-CAIA (****), presentata dal Socio A. STEFANELLI.

SUMMARY. — Histochemical observations have been made, by the Hausler-Hansson method, on carbonic anhydrase activity in the embryonic retina of the chick, where the enzyme is localized in the pigmented epithelium and in the Müller cells. Whereas in Mammals (e.g. in the mouse) the adult-type distribution of the enzyme is reached only two weeks after birth, in the chick embryo the definitive localization is already reached at hatching. Carbonic anhydrase activity may indeed be considered a reliable biochemical index of Müller cell differentiation, possibly useful also in the study of retinal organization *in vitro*.

L'anidrase carbonica è un enzima che catalizza la idratazione del CO_2 e la deidratazione degli ioni bicarbonato, secondo la reazione $\text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2 \rightleftharpoons \text{H}_2\text{CO}_3$. Scoperto negli eritrociti, nei quali favorisce con questo meccanismo il trasporto dell'anidride carbonica dai capillari periferici alle superfici respiratorie, è stato successivamente trovato in molti altri tessuti animali, in alcune piante e nei batteri.

Nei Mammiferi esistono due isoenzimi dell'anidrase carbonica, uno ad elevata, l'altro a bassa attività, che differiscono per la composizione chimica e per le proprietà cinetiche e che non sono necessariamente associati nello stesso tessuto; negli altri animali (sia Vertebrati che Invertebrati) e nelle piante sembra invece presente solo la forma ad alta attività.

L'anidrase carbonica si trova in cellule che svolgono ruoli fisiologici assai diversi, ed è quindi difficile stabilire un rapporto tra la sua presenza ed una particolare specializzazione cellulare (Van Goor, 1948; Maren, 1967; Carter, 1972); va tuttavia ricordato che nei Vertebrati una delle più importanti localizzazioni si osserva negli epiteli attraverso i quali avviene un trasporto di ioni, per esempio nello stomaco, nel rene, nell'intestino crasso, nelle branchie.

Tra gli organi nei quali è presente un'attività carboanidrasica vi è l'occhio: l'enzima è stato dimostrato con metodi biochimici ed istochimici nella retina, nel cristallino, nell'iride e nel corpo ciliare; in quest'ultimo l'attività è stata naturalmente messa in rapporto alla secrezione dell'umore acqueo, mentre più incerto appare il suo significato funzionale nelle altre strutture

(*) Pervenuta all'Accademia il 19 ottobre 1976.

(**) Istituto di Anatomia Comparata, Facoltà di Scienze, Università di Roma.

(***) Istituto di Istologia ed Embriologia, Facoltà di Scienze, Università di Camerino.

(****) Istituto di Istologia ed Embriologia, Facoltà di Scienze, Università di Roma.

(Bakker, 1939; Wistrand, 1951; Gloster e Perkins, 1955; Ballantine e Maren, 1955; Korhonen e Korhonen, 1965; P. Bhattacharjee, 1971).

Per quanto riguarda in particolare la retina, considerandone la elevata attività respiratoria si attribuisce all'anidraasi carbonica in essa presente una grande importanza metabolica. Si ritiene infatti (Svaetichin e Coll., 1965) che la regolazione dell'equilibrio acido-basico e l'idratazione del CO_2 - processi nei quali l'enzima svolge un ruolo determinante - siano essenziali per mantenere un ambiente adatto alla ricezione e trasmissione degli stimoli luminosi, e le osservazioni istochimiche mostrano che l'enzima è localizzato nell'epitelio pigmentato e nelle cellule di Müller.

Scopo delle presenti ricerche è quello di studiare la localizzazione istochimica dell'anidraasi carbonica nella retina dell'embrione di pollo durante il suo sviluppo; l'argomento ci è sembrato interessante, in rapporto agli studi sul differenziamento della retina che si conducono in uno dei nostri Istituti (Stefanelli e Coll., 1966, 1967) anche perché sono stati recentemente pubblicati (J. Bhattacharjee, 1976) i risultati di analoghe osservazioni compiute nel topo in cui - a differenza che nel pulcino - la maturità funzionale della retina è raggiunta solo parecchio tempo dopo la nascita.

Le osservazioni sono state compiute su embrioni di pollo e su pulcini di razza « Golden Comet ». La retina è stata fissata per due ore a 4°C in una soluzione contenente lo 0,5 % di glutaraldeide e il 4 % di formaldeide in tampone di Millionig 0,1 M a pH 7,4; dopo un successivo lavaggio di due ore in tampone, sono state tagliate al criostato sezioni di 10-15 μ . Le sezioni, mantenute flottanti in tampone, sono state poi trasferite mediante filtri Millipore nel mezzo di incubazione, nel quale hanno soggiornato - sempre flottanti - per 10-15' a temperatura ambiente ($22-24^\circ$). Dopo un lavaggio in acqua distillata le sezioni sono state annerite con solfuro di ammonio all'1 % per 3', di nuovo lavate, quindi raccolte su coprioggetto e montate con glicerina.

Il mezzo di incubazione è quello di Hausler, modificato da Hansson (1967); esso contiene ioni cobalto, dai quali si forma carbonato di cobalto che precipita come complesso cobalto-fosfato e viene infine evidenziato, con l'annerimento, come solfuro di cobalto. I controlli sono stati eseguiti incubando le sezioni in un mezzo contenente acetazolamide (inibitore dell'enzima) alla concentrazione di $1 \times 10^{-5}\text{M}$; ulteriori dettagli su questo metodo e sulla sua specificità sono stati discussi da Lönnerholm (1974) e da uno di noi (Palatroni, 1974, 1975).

La struttura istologica della retina nei diversi stadi è stata studiata su preparati colorati - dopo inclusione in paraffina - con ematossilina-eosina, Mallory-Azan o con l'impregnazione argentea secondo Bodian.

Nella Tavola I sono riprodotte alcune immagini rappresentative degli aspetti osservati in momenti diversi dello sviluppo. L'istogenesi della retina del pollo si può dividere, seguendo Coulombre (1955), in tre fasi che vanno dal 3° all'8° giorno di incubazione, dall'8° al 15°, dal 15° alla schiusa; il passaggio dall'una all'altra fase è segnato da tre periodi « critici » o di transizione, situati rispettivamente al 4-5°, all'8-10° e al 15° giorno.

Nella retina del pulcino alla schiusa il differenziamento istologico è completo (Tav. I, fig. 1). L'attività carboanidrasica è presente (Tav. I, fig. 2) nell'epitelio pigmentato e, nella retina nervosa, a livello delle membrane limitanti esterna ed interna e in tutti gli strati (nucleare esterno ed interno, plessiforme esterno e interno) fra esse compresi. La distribuzione dell'enzima è perciò nel pulcino simile a quella descritta nella retina di altre specie, e corrisponde ad una sua localizzazione nel tappeto nero e nelle cellule di Müller che, con i loro prolungamenti laterali, si estendono in tutti gli strati.

Le osservazioni di Korhonen e Korhonen (1965) hanno infatti dimostrato, nel ratto e nel topo, che la carboanidrasa è assente dai neuroni, e presente solo nello strato pigmentato e nelle cellule gliali; anche la positività osservata a livello dei coni e bastoncelli viene spiegata con la presenza dei prolungamenti delle cellule di Müller. Queste ricerche sono state condotte su animali albinici; la forte positività della reazione (precipitati bruni) osservata nell'epitelio pigmentato è quindi certamente dovuta alla presenza dell'enzima.

Risultati simili sono stati ottenuti nel ratto da Leder (1966) e nel coniglio da P. Bhattacharjee (1971); anche questi Autori hanno lavorato su albinici ed hanno trovato che l'enzima è presente esclusivamente negli elementi gliali e nell'epitelio pigmentato, nel quale l'attività è particolarmente elevata.

Una definitiva conferma di questa localizzazione e la estensione ad altri Vertebrati sono venute dalle ricerche istochimiche (ottiche ed elettroniche) di Musser e Rosen (1973 a) che hanno studiato l'anidrasa carbonica nella retina di tre specie di Mammiferi (uomo, ratto, coniglio), di un rettile (*Pseudomys scripta*) e di un anfibio (*Bufo marinus*). Al microscopio elettronico il prodotto della reazione enzimatica appare come un precipitato finemente granulare, presente nel citoplasma delle cellule di Müller e nelle regioni basali e nelle villosità apicali delle cellule epiteliali del tappeto nero. Solo nell'uomo e nella scimmia *Rhesus* l'enzima è dimostrabile anche nei coni (Musser e Rosen, 1973 b).

Nell'embrione di 6 giorni l'anidrasa carbonica è già presente sia nello strato pigmentato che nella retina nervosa (Tav. I, fig. 3). Nell'epitelio pigmentato la reazione è positiva in entrambe le superfici, ma l'intensità della colorazione non è tale da coprire l'intero assetto cellulare come negli stadi successivi. Nella restante parte della retina sono nettamente positivi elementi cellulari (le cellule di Müller presuntive) posti a diversa altezza; l'enzima è presente soprattutto nel pericarion, ma tracce di attività si osservano anche in altre zone del citoplasma.

A 6 giorni la retina è costituita soprattutto da cellule indifferenziate, delle quali è difficile stabilire il destino in base all'aspetto morfologico. In questo periodo si ha una attiva proliferazione cellulare, con aumento di spessore della retina nervosa; compaiono gli assoni delle cellule gangliari e a partire dal 5° giorno i prolungamenti delle cellule di Müller cominciano a formare la membrana limitante interna. Nell'epitelio pigmentato l'attività

mitotica diminuisce, le cellule assumono una forma esagonale e compaiono i granuli di melanina. La localizzazione della carboanidrase in questo stadio riflette perciò il differenziamento dell'epitelio pigmentato e dimostra la estensione delle fibre di Müller.

Nell'embrione di 11 giorni (Tav. I, fig. 4) l'attività enzimatica è più intensa e diffusa in tutti gli strati della retina con l'eccezione della membrana limitante interna che appare, in confronto a quella del pulcino alla schiusa, assai meno positiva. Morfologicamente in questo periodo si organizzano gli strati plessiformi, le cellule gangliari si dispongono in unico strato, si differenzia il segmento interno dei fotorecettori; le cellule di Müller attraversano ora (a partire dal 9° giorno secondo Meller e Glees, 1965) tutto lo spessore della retina. Anche in questo caso la localizzazione dell'anidrase carbonica nella retina nervosa corrisponde allo stadio raggiunto nella istogenesi dalle cellule gliali.

Una conferma quantitativa di queste osservazioni istochimiche si trova nei risultati di Clark (1951), che con un metodo manometrico ha studiato l'attività carboanidrasica di omogenati di vari organi durante lo sviluppo embrionale del pollo; nella retina l'enzima compare precocemente, ha una attività elevata già al 6° giorno, e al 12° raggiunge il livello proprio dell'adulto.

È interessante il confronto tra le nostre osservazioni e quelle di J. Bhattacharjee (1976): nell'embrione di topo infatti un'attività carboanidrasica compare nella retina nervosa solo dopo il 16° giorno di sviluppo, e fino a questo momento l'enzima è presente esclusivamente nell'epitelio pigmentato. Alla nascita l'attività enzimatica è più forte ma non ancora diffusa, ed una distribuzione in tutti gli strati simile a quella dell'adulto si osserva al 16° giorno dello sviluppo post-natale. In accordo con i risultati istochimici, le osservazioni morfologiche compiute durante lo sviluppo del coniglio (Uga e Smelser, 1973), del ratto (Kuwabara e Weidman, 1974) e del topo (J. Bhattacharjee e Sanyal, 1975) mostrano che in questi Mammiferi il differenziamento istologico delle cellule di Müller è completato solo dopo la nascita.

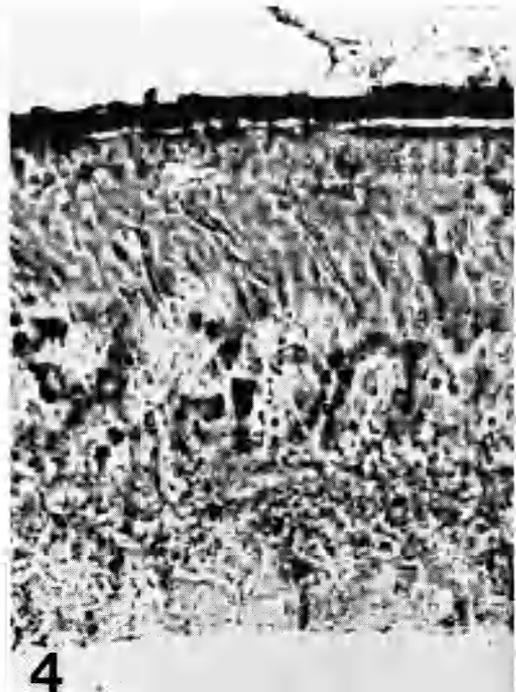
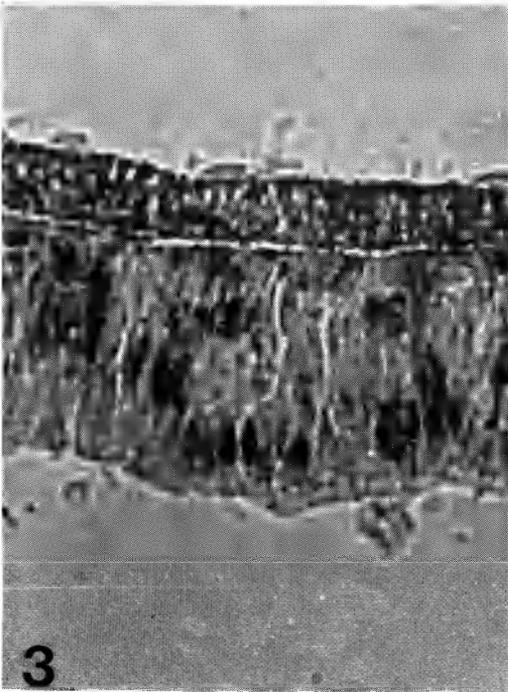
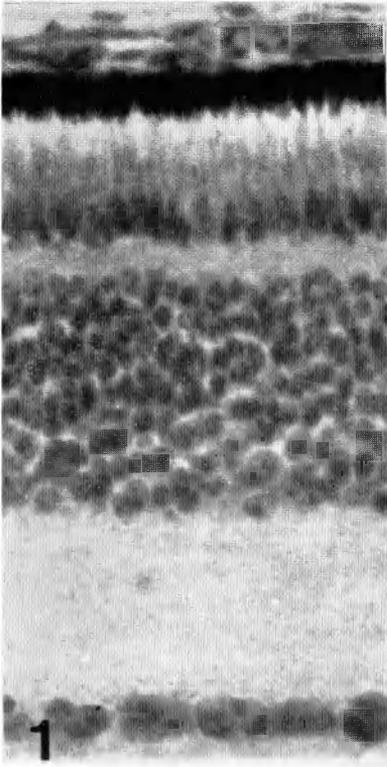
Sia durante lo sviluppo del pollo che del topo la localizzazione della anidrase carbonica rappresenta perciò un indice fedele del differenziamento dell'epitelio pigmentato e delle cellule di Müller, ed esiste di conseguenza un rapporto tra l'attività di questo enzima e la maturazione istologica e funzionale della retina; va ricordato a questo proposito che nel pollo ed in altre specie di Uccelli a sviluppo « precoce » lo studio del riflesso pupillare dimostra (Heaton e Harth, 1974) che il sistema visivo è funzionale già prima della schiusa.

Abbiamo già accennato alla importanza che si attribuisce all'anidrase carbonica per spiegare le interrelazioni metaboliche tra epitelio pigmentato, cellule di Müller ed elementi nervosi nella retina dell'adulto (Svaetichin e Coll., 1965). Lo studio istochimico dell'enzima nella retina embrionale del pollo dimostra, in accordo con le osservazioni morfologiche di Meller e Glees (1965), che queste interrelazioni si stabiliscono precocemente durante lo

sviluppo ed avvalora l'ipotesi che siano determinanti per il differenziamento della retina nervosa. Sulla base di questi risultati, stiamo conducendo ulteriori ricerche sulla carboanidraasi durante il differenziamento *in vitro* degli elementi retinici.

BIBLIOGRAFIA

- BAKKER A. (1939) - *Über Kohlensäurenanhydrase in normalen und kataraktösen Linsen*, « Arch. f. Ophth. », 140, 543.
- BALLANTINE E. J. e MAREN T. H. (1955) - *Carbonic anhydrase activity and the distribution of diamox in the rabbit eye*, « Amer. J. Ophth. », 40 (suppl.), 148.
- BHATTACHARJEE J. (1976) - *Developmental changes of carbonic anhydrase in the retina of the mouse: a histochemical study*, « Histochem. J. », 8, 63.
- BHATTACHARJEE J. e SANYAL S. (1975) - *Developmental origin and early differentiation of retinal Müller cells in mice*, « J. Anat. », 120, 367.
- BHATTACHARJEE P. (1971) - *Distribution of carbonic anhydrase in the rabbit eye as demonstrated histochemically*, « Exp. Eye Res. », 12, 356.
- CARTER M. J. (1972) - *Carbonic anhydrase: isoenzymes, properties, distribution, and functional significance*, « Biol. Rev. », 47, 465.
- CLARK A. M. (1951) - *Carbonic anhydrase activity during embryonic development*, « J. Exp. Biol. », 28, 332.
- COULOMBRE A. J. (1955) - *Correlations of structural and biochemical changes in the developing retina of the chick*, « Am. J. Anat. », 96, 153.
- GLOSTER J. e PERKINS E. S. (1955) - *Carbonic anhydrase in the lens and in the ciliary body and iris of albino rabbits*, « J. Physiol. », 130, 665.
- HANSSON H. P. J. (1967) - *Histochemical demonstration of carbonic anhydrase activity*, « Histochemie », 11, 112.
- HEATON M. B. e HARTH M. S. (1974) - *Developing visual function in the pigeon embryo with comparative reference to other avian species*, « J. Comp. Physiol. Psychol. », 86, 151.
- KORHONEN E. e KORHONEN L. K. (1965) - *Histochemical demonstration of carbonic anhydrase activity in the eyes of rat and mouse*, « Acta Ophth. », 43, 475.
- KUWABARA T. e WEIDMAN T. A. (1974) - *Development of the prenatal rat retina*, « Invest. Ophth. », 13, 725.
- LEDER O. (1966) - *Die Verteilung von Carboanhydrase im Rattenauge*, « Pflügers Arch. », 287, 351.
- LÖNNERHOLM G. (1974) - *Carbonic anhydrase histochemistry. A critical study of Hansson's cobalt-phosphate method*, « Acta Physiol. Scand. », suppl. 418.
- MAREN T. H. (1967) - *Carbonic anhydrase: chemistry, physiology and inhibition*, « Physiol. Rev. », 47, 593.
- MELLER K. e GLEES P. (1965) - *The differentiation of neuroglia-Müller-cells in the retina of the chick*, « Z. Zellforsch. », 66, 321.
- MUSSER G. L. e ROSEN S. (1973 a) - *Localization of carbonic anhydrase activity in the Vertebrate retina*, « Exp. Eye Res. », 15, 105.
- MUSSER G. L. e ROSEN S. (1973 b) - *Carbonic anhydrase activity in Primate photoreceptors*, « Exp. Eye Res. », 15, 467.
- PALATRONI P. (1974) - *Osservazioni istochimiche sull'anidraasi carbonica nello stomaco ghiandolare dell'embrione di pollo*, « Rend. Acc. Naz. Lincei », 56, 249.
- PALATRONI P. (1975) - *Osservazioni ultrastrutturali sulla localizzazione dell'anidraasi carbonica e sulla morfologia delle cellule parietali dello stomaco del topo*, « Rend. Acc. Naz. Lincei », 58, 797.
- STEFANELLI A., ZACCHEI A. M., CARAVITA S., CATALDI E. e IERADI L. (1966) - *Differenziamento in riaggregati di retina in vitro*, « Arch. Zool. Ital. », 51, 985.



- STEFANELLI A., ZACCHEI A. M., CARAVITA S., CATALDI E. e IERADI L. (1967) - *New-forming retinal synapses* in vitro, « *Experientia* », 23, 199.
- SVAETICHIN G., NEGISHI K., FATEHCHANT R., DRUJAN B. D. e SELVIN DE TESTA A. (1965) - *Nervous function based on interactions between neuronal and non-neuronal elements*, « *Progr. Brain Res.* », 15, 243.
- UGA S. e SMELSER G. K. (1973) - *Electron microscopic study of the development of retinal Müllerian cells*, « *Invest. Ophthalm.* », 12, 295.
- VAN GOOR H. (1948) - *Carbonic anhydrase. Its properties, distribution and significance for carbon dioxide transport*, « *Enzymologia* », 13, 73.
- WISTRAND P. J. (1951) - *Carbonic anhydrase in the anterior uvea of the rabbit*, « *Acta Physiol. Scand.* », 24, 144.

SPIEGAZIONE DELLA TAVOLA I

- Fig. 1. - Sezione di retina di pulcino alla schiusa; ematossilina-eosina; 600×.
- Fig. 2. - Localizzazione istochimica dell'anidraasi carbonica nella retina di pulcino alla schiusa; 600×.
- Fig. 3. - Localizzazione istochimica dell'anidraasi carbonica nella retina dell'embrione di 6 giorni; 800×.
- Fig. 4. - Localizzazione istochimica dell'anidraasi carbonica nella retina dell'embrione di 11 giorni; 600×.