
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

ANTONIO MINGANTI, CARLA FALUGI, M. RAINERI

**Determinazioni quantitative di colinesterasi in
embrioni di Cirripedi (Crostacei)**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 63 (1977), n.6, p. 598–603.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1977_8_63_6_598_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. — *Determinazioni quantitative di colinesterasi in embrioni di Cirripedi (Crostacei)* (*). Nota di ANTONIO MINGANTI, CARLA FALUGI e M. RAINERI, presentata (**) dal Corrisp. G. REVERBERI.

SUMMARY. — *Balanus amphitrite* unsegmented eggs demonstrate a cholinesterase activity which does not change significantly during cleavage. Between stage 5 (early gastrula) and stage 12 (unhatched nauplius) the enzyme activity increases gradually about 15 times; a further increase, at a lower rate, takes place before hatching. 10^{-5} M Eserine causes a cholinesterase inhibition decreasing from approximately 75% at the early stages to 45% in the unhatched nauplius. Conversely, DFP inhibits cholinesterase increasingly from 8% to 30% (Table II). No effects are obtained with iso-OMPA.

The results are discussed with regard to the function and specificity of cholinesterases in embryos of *Balanus*.

INTRODUZIONE

La presenza di colinesterasi nel sistema nervoso dei Crostacei è stata studiata soprattutto nei Decapodi (Wiersma, 1961; Horridge, 1965; Treherne, 1966; Futamachi, 1972; Spielholz *et al.*, 1973). Per altri ordini di Crostacei ci sono poche nozioni frammentarie, e di quanto riguarda lo sviluppo embrionale e gli stadi larvali poco o nulla si conosce (cfr. Green, 1971).

Allo scopo di portare un contributo alla conoscenza dell'embriologia chimica dei Crostacei ed in particolare del sistema nervoso, abbiamo fatto ricerche sull'attività di colinesterasi in embrioni e larve di Cirripedi e di Fillopodidi. La presente Nota riporta i risultati di determinazioni quantitative di attività colinesterasica in omogenati di uova, embrioni a vari stadi di sviluppo e naupli di *Balanus*.

Dati istochimici ed elettroforetici sono stati riferiti in precedenza, come pure indicazioni sulla specificità di queste attività enzimatiche (Minganti, Falugi e Raineri, 1973; Falugi e Raineri, 1977).

MATERIALI E METODI

Da esemplari maturi di *Balanus amphitrite*, raccolti nel Golfo di Genova nei mesi da Aprile a Novembre, sono state prelevate dalla cavità del mantello le piastre ovigere, costituite da uova incapsulate e tenute insieme da

(*) Ricerca eseguita nell'Istituto di Anatomia Comparata dell'Università di Genova.

(**) Nella seduta del 10 dicembre 1977.

sostanze cementanti. Una piccola parte del materiale è stata colorata *in toto* con rosso neutro per accertare lo stadio di sviluppo, che è risultato all'incirca lo stesso per le uova di un medesimo individuo; il rimanente è stato usato per le determinazioni, immediatamente o dopo un breve periodo di conservazione a -30°C . Le determinazioni sul materiale conservato hanno dato risultati non significativamente diversi da quelli ottenuti con materiale fresco.

Il materiale è stato adoperato in 13 stadi consecutivi, dall'uovo insegmentato (stadio 1) al nauplio appena schiuso (stadio 13), secondo le suddivisioni suggerite da Crisp (1954), sulla base di quelle originali di Groom (1894).

Embrioni dello stesso stadio, provenienti da più individui, sono stati omogenati con omogenizzatore di tipo Potter-Elvehjem con acqua di mare pari a 2-3 volte il loro volume. Gli involucri ovulari non sono stati rimossi, essendo stato accertato, dal confronto fra i risultati ottenuti con naupli subito prima e dopo la schiusa, che essi non interferiscono in modo significativo sui risultati.

Per le determinazioni quantitative di attività colinesterasiche è stato impiegato il metodo colorimetrico di Rappaport *et al.* (1959) modificato dalla Sigma Chem. Co. (Techn. Bull. No., 420, 1969). L'omogenato è stato incubato a 25°C per 30 minuti, con cloruro di acetilcolina come substrato e con *m*-nitrofenolo come indicatore, in tampone fosfato a pH 7,8. La quantità di acetato liberato per idrolisi in presenza dell'indicatore è stata determinata allo Spectronic 20 Bausch & Lomb, a 440 nm, con riferimento ad uno standard di acido acetico. L'attività enzimatica è stata espressa in Unità Rappaport (1 UR = 1 micromole di acetilcolina idrolizzata nelle condizioni indicate) e riferita all'azoto proteico, determinato su parte dello stesso omogenato mediante la reazione xantoproteica.

Alcune determinazioni sono state fatte con l'aggiunta al mezzo d'incubazione di uno dei seguenti inibitori di colinesterasi: eserina, DFP (diisopropilfluorofosfato), iso-OMPA (tetraisopropilpirofosforamide), nella concentrazione finale da 10^{-4}M a 10^{-5}M .

RISULTATI

I dati sono riportati nella Tabella I ed in grafico nella fig. 1. La stima della significatività della differenza dei valori iniziali da zero e delle variazioni tra uno stadio ed il successivo è stata ottenuta con la statistica *t* di Student.

Una attività colinesterasica è presente già all'inizio dello sviluppo: i valori ottenuti sono superiori a zero in modo significativo a partire almeno dallo stadio di 2 blastomeri (per l'uovo insegmentato $0,1 > P > 0,2$). Questa attività non varia in modo significativo fino allo stadio 5. Dallo stadio 5 (tuorlo diviso in 2 macromeri) fino agli stadi 10-11 (embrione con occhio pigmentato) vi è un rapido e piuttosto costante aumento dell'attività, che arriva ad un valore (150 UR) circa 15 volte maggiore di quello iniziale.

TABELLA I
Attività colinesterasica
in UR/mg N proteico (*)

Stadio		Medie \pm e.s.	
1	(uovo non segm.)	(4)	3,5 \pm 1,7
2-3	(2-31 micromeri)	(4)	15 \pm 2
4	(macromero indiviso)	(2)	7,5
5	(2 macromeri)	(8)	16,5 \pm 3
6	(3-5 macromeri)	(6)	25 \pm 6
7	(ispessimento mesoblasto)	(12)	47 \pm 5
8	(abbozzi appendici)	(15)	76 \pm 5
9	(appendici bifide)	(20)	120 \pm 4
10	(setole, occhio pigm. rosso)	(15)	152 \pm 5
11	(occhio pigm. bruno)	(12)	154 \pm 2
12	(occhio pigm. nero)	(12)	189 \pm 11
13	(inizio schiusa)	(13)	224 \pm 9

(*) Le cifre fra parentesi indicano il numero di determinazioni.

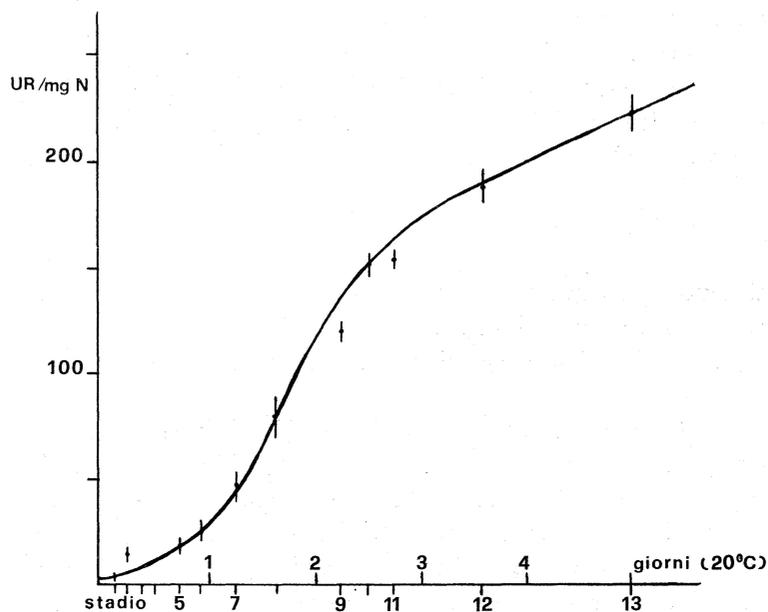


Fig. 1.

Il leggero aumento tra gli stadi 10 ed 11 appare significativo ($P = 0,001$). L'aumento riprende con velocità inferiore alla precedente dallo stadio 12 fino alla schiusa, con ulteriore aumento del 50 %, raggiungendo all'incirca 220 UR.

Gli inibitori sono stati usati in poche determinazioni, riguardanti alcuni stadi; perciò i risultati ottenuti non sono stati sottoposti ad elaborazione statistica e devono esser considerati come indicativi. Essi sono riassunti nella Tabella II, dove vengono riportate le percentuali approssimative dell'inibizione dell'attività rispetto ai controlli. Come si vede nella Tabella II, l'eserina 10^{-5} M (concentrazione finale) ha prodotto una inibizione del 75 % allo stadio 2-3, del 70 % allo stadio 8; negli stadi successivi il suo effetto inibitore diminuisce gradualmente fino al 45 % negli stadi 12 e 13. Al contrario, l'effetto inibitore del DFP 10^{-5} M aumenta gradualmente dall'8 % dello stadio 2-3 fino a circa il 30 % dello stadio 9 e successivi. Nessun effetto è stato mostrato dall'iso-OMPA, provato a varie concentrazioni, da 10^{-5} M fino a $3 \cdot 10^{-5}$ M, dallo stadio 8 al 13.

TABELLA II

Inibizione percentuale dell'attività colinesterasica ()*

Stadi	Eserina 10^{-5} M	DFP 10^{-5} M	iso-OMPA $3 \cdot 10^{-3}$ M
I	—	—	—
2-3	75%	8%	—
4-7	—	—	—
8	70%	15%	o
9	65%	27%	o
10	60%	32%	o
11	62%	24%	o
12	45%	29%	o
13	45%	27%	o

(*) — = determinazione non effettuata;
o = nessuna inibizione.

DISCUSSIONE

L'attività colinesterasica che ha già raggiunto un certo livello allo stadio 8 e che aumenta rapidamente in quelli successivi può esser messa in relazione con il differenziamento morfologico e funzionale del sistema nervoso.

Di fatto, allo stadio 9 gli abbozzi dei vari gangli nervosi presentano una evidente reazione positiva con le tecniche istochimiche per la colinesterasi (Falugi, in pubbl.).

Per gli stadi più precoci sono possibili altre spiegazioni. Ricerche di Buznikov *et al.* (1968) e di Gustafson e Toneby (1970) hanno indicato l'acetilcolina come « messaggero chimico » tra le cellule degli embrioni precoci di riccio di mare per determinati processi, quali la duplicazione del DNA. Se così fosse, si potrebbe supporre anche un ruolo dell'acetilcolinesterasi nella regolazione di questi messaggi.

Attività di acetilcolinesterasi è stata accertata anche in cellule interessate ai movimenti morfogenetici di Invertebrati e Vertebrati; all'enzima è stata attribuita una funzione regolatrice dei movimenti cellulari durante lo sviluppo (Drews, 1975). Com'è noto, il sistema nervoso dei Crostacei si forma appunto per immigrazione di cellule dell'ectoderma.

Quanto al tipo delle colinesterasi rilevate negli embrioni di *Balanus*, l'uso degli inibitori non ha dato le stesse risposte che questi danno nei Vertebrati, dove ogni colinesterasi è inibita dall' eserina, e solo la pseudocolinesterasi è inibita sia da DFP sia da *iso*-OMPA. Comunque, pare che siano presenti due enzimi: uno più sensibile all' eserina, predominante in tutto lo sviluppo, e maggiormente nei primi stadi; l'altro più sensibile al DFP (ma non all'*iso*-OMPA), e con un incremento di attività proporzionalmente maggiore fino allo stadio 9. Il primo enzima dovrebbe essere acetilcolinesterasi e l'altro una pseudocolinesterasi; comunque, la neurochimica del sistema nervoso degli embrioni e larve di *Balanus* presenta, rispetto a quella dei Vertebrati, delle sensibili differenze, che possono essere accertate con altri metodi, quali l'analisi elettroforetica.

BIBLIOGRAFIA

- BUZNIKOV G. A., CHUKADOVA I. V., BERDISCHEVA L. V. e VYAZMINA N. M. (1968) - *The role of neurohumours in early embryogenesis. II: Acetylcholine and catecholamine content in developing embryos of sea urchin*, « J. Embr. Exp. Morphol. », 20, 119-128.
- CRISP D. J. (1954) - *The breeding of Balanus porcatus (Da Costa) in the Irish sea*, « J. Mar. Biol. Ass. U.K. », 33, 473-496.
- DREWS U. (1975) - *Cholinesterase in embryonic development*. G. Fischer Verlag. Stuttgart.
- FALUGI C. e RAINERI M. (1977) - *Colinesterasi nello sviluppo di Crostacei*, « Boll. Zool. » (in pubblicazione).
- FUTAMACHI K. J. (1972) - *Acetylcholine: possible neuromuscular transmitter in Crustacea*, « Science », 175, 1373.
- GREEN J. (1971) - *Crustaceans*. In: *Experimental embryology of marine and fresh-water Invertebrates*, G. Reverberi Ed., pp. 312-362. North Holland Publ. Co.
- GROOM T. T. (1894) - *On the early development of Cirripedia*, « Phil. Trans. Roy. Soc. London », B, 185, 119-232.
- GUSTAFSON T. e TONEBY M. (1970) - *On the role of serotonin and acetylcholine in sea urchin morphogenesis*, « Exp. Cell Res. », 62, 102-117.

- HORRIDGE G. A. (1965) - *Arthropoda*. In: Structure and function in the nervous system of Invertebrates, Bullock T. H. and Horridge G. A. Eds., II, 801-1270, Freeman and Co.
- MINGANTI A., FALUGI C. e RAINERI M. (1973) - *Colinesterasi in embrioni di Cirripedi*, «Acta Embryol. Exper.», 234.
- PATEL B. e CRISP D. J. (1960) - *Rates of development of the embryos of several species of Barnacles*, «Physiol. Zool.», 33, 104-119.
- RAPPAPORT F., FISCHEL J. e PINTO N. (1959) - *An improved method for the estimation of cholinesterase in serum*, «Clin. Chim. Acta», 4, 227.
- SPIELHOLZ N. I. e VAN DER KLOOT W. G. (1973) - *Localization and properties of the cholinesterase in crustacean muscle*, «J. Cell Biol.», 59, 407-420.
- TREHERNE J. E. (1966) - *The neurochemistry of Arthropods*. Cambridge Univ. Press.
- WIERSMA C. A. G. (1961) - *The neuromuscular system*. In: The physiology of Crustacea, II, 191-240, Waterman T. H. Ed., Acad. Press.