

---

ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI  
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

# RENDICONTI

---

FRANCA GUIDALI MAZZALAI, PATRIZIA BERGAMO,  
GIANNI A. AMIRANTE

**Studi sulla sintesi di emoagglutinine da parte di  
colture di emociti di Insetti Blattoidei (Nauphoeta  
cinerea Oliv. e Leucophaea maderae Fabr.)**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,  
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 65 (1978), n.6, p. 338–341.*  
Accademia Nazionale dei Lincei

[http://www.bdim.eu/item?id=RLINA\\_1978\\_8\\_65\\_6\\_338\\_0](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1978_8_65_6_338_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/>

**Zoologia.** — *Studi sulla sintesi di emoagglutinine da parte di colture di emociti di Insetti Blattoidei* (*Nauphoeta cinerea* Oliv. e *Leucophaea maderae* Fabr.) (\*). Nota di FRANCA GUIDALI MAZZALAI, PATRIZIA BERGAMO e GIANNI A. AMIRANTE, presentata (\*\*) dal Socio S. RANZI.

SUMMARY. — In this work the possible correlations between hemocytes of the cockroaches *Nauphoeta cinerea* Oliv. and *Leucophaea maderae* Fabr. and hemoagglutinins synthesis were studied. After a preliminary study of the morphological characteristics of hemocytes, cultures of these cells extracted from *Nauphoeta* and *Leucophaea* hemolymph were treated with cycloheximide and then marked with fluorescinated antihemoagglutinin serum. The results of these observations and the possible immunological role of hemocytes are discussed.

Già da parecchi anni è conosciuto il ruolo assai interessante e importante giocato dagli emociti degli Insetti nelle reazioni di difesa contro corpi estranei presenti nell'animale o *in vitro*. Essi reagiscono contro batteri o contro particelle microscopiche mediante fagocitosi, ovvero, se i corpuscoli estranei sono più grossi (frammenti di tessuti eterologhi, corpi inerti, ecc.) intervengono più emociti assieme circondando il corpo stesso incapsulandolo ed eventualmente distruggendolo. Tale incapsulamento emocitario pare sia un fenomeno molto generale tra gli Insetti ed esistono infatti molti lavori a tal proposito (Matz, 1977; Sutherland, 1967; Flandre *et al.*, 1968; Carayon, 1977; Goetz *et al.*, 1977; Brehelin *et al.*, 1975; Ratcliffe, 1975).

In particolare Matz *et al.* (1971) e Pesson e Leyer (1977) lo hanno studiato su un gruppo di Insetti Blattoidei, assai interessanti per l'aspetto immunologico da un punto di vista filogenetico (*Leucophaea*, *Periplaneta*, *Blaberus*).

Amirante e Guidali (1978) dimostrarono recentemente che nel Blattoide *Leucophaea maderae* Fabr. esiste una stretta correlazione tra emociti e anticorpi circolanti presenti nell'emolinfa dell'animale (Amirante, 1976; Amirante *et al.*, 1976).

Con questo lavoro si è voluto studiare non solo la correlazione tra emociti ed emoagglutinine circolanti di *Nauphoeta* e *Leucophaea*, ma anche verificare se tali cellule fossero i luoghi di sintesi di queste sostanze.

*Culture in vitro.* Per ogni coltura vengono utilizzati circa 50 animali ♂♂ e ♀♀ di *Nauphoeta* e *Leucophaea* che prima del prelievo vengono disinfettati mediante passaggi in ipoclorito di sodio al 3%, acqua distillata e alcool etilico 70%. Quindi con una micropipetta si estrae dal vaso dorsale l'emolinfa che viene posta in tubi leighton, contenenti un coprioggetto al

(\*) Ricerche eseguite nell'Istituto di Zoologia dell'Università statale di Milano.

(\*\*) Nella seduta del 16 dicembre 1978.

quale aderiscono gli emociti e della soluzione fisiologica di Carlson in quantità sufficiente (ca 1,8 ml) a stendere un velo sul vetrino. La funzione di tale soluzione è di facilitare l'adesione degli emociti al vetrino e di impedire la coagulazione dell'emolinfa. Dopo circa 90', quando la maggior parte delle cellule hanno aderito al substrato, la soluzione viene rimossa e sostituita con terreno TC 199 (Difco) arricchito con siero di vitello al 30%, streptomina e penicillina; le colture così allestite vengono poste in termostato a 26,5 °C. Alcune di esse vengono, dopo 24 h, colorate secondo il metodo di Pappenheim e osservate al microscopio.

*Trattamento con Cicloeximide.* Alcune colture sono state trattate con Cicloeximide (CHI) in dose di 10 µg/ml per 3 h, tempo necessario affinché le cellule possano eliminare i metaboliti formati prima del blocco della sintesi. Alcune colture vengono riposte, dopo il trattamento con CHI, per 24 h in terreno di coltura.

*Produzione di anti-emoagglutinine.* L'emolinfa estratta da diversi animali adulti di *Nauphoeta* e *Leucophaea*, previa diluizione rispettivamente 1:80 e 1:20 in soluzione fisiologica, viene fatta reagire con una sospensione all'1% di globuli rossi di ratto (*Nauphoeta*) e di coniglio (*Leucophaea*) per 1 h a 37 °C e per una notte a 4 °C. L'agglutinato centrifugato e ripetutamente lavato viene emulsionato con pari volume di adiuvante completo di Freund e iniettato in conigli sottocute. Vengono fatte tre iniezioni a intervalli di 10 giorni e 15 giorni dopo l'ultima iniezione il coniglio viene salassato e il siero ottenuto viene conservato a -20 °C.

*Coniugazione del siero anti-emoagglutinine con β-isotiocianato di fluoresceina.* A una soluzione di immunoglobuline anti-emoagglutinine, purificata con ammonio solfato, in concentrazione di 25 mg/ml si aggiungono lentamente su agitatore 0,05 µg/ml di β-isotiocianato di fluoresceina (FITC). Si lascia per una notte a 4 °C su agitatore, si purifica e concentra su colonna di DEAE Sephadex A 25.

*Marcaggio delle colture con antisiero-FITC.* I controlli e le colture trattate con CHI vengono fissate prima con aria calda e metanolo, lavate con PBS per tre volte e quindi trattate per 45' a 37 °C. con antisiero antiemoagglutinine FITC che conferisce una fluorescenza verde al microscopio a fluorescenza (Leitz Dialux-Ploemopak 2.3).

Lo studio morfologico degli strisci degli emociti, colorati secondo il metodo di Pappenheim ha permesso di identificare quattro categorie di tali emociti che, seguendo il criterio di Arnold (1974) sono stati così classificati: *emociti granulari*, *plasmacociti*, *coagulociti* e *cellule a sferule*.

Gli *emociti granulari* sono cellule rotondeggianti od ovoidali, con nucleo relativamente piccolo e circondato da abbondante citoplasma contenente numerosi granuli. Tali cellule presentano le stesse caratteristiche morfologiche sia in *Nauphoeta* che in *Leucophaea*, ma risultano quantitativamente più numerose nella prima specie (59,1 %) (Tav. I, fig. 1).

I *plasmacociti* sono cellule di grandezza variabile, con forma tondeggianta o allungata, nucleo centrale e citoplasma finemente granulare. Il numero di tali cellule, che mostrano in entrambe le specie le stesse caratteristiche morfologiche, è molto variabile; in *Nauphoeta* costituiscono il 13,6% delle cellule totali (Tav. I, fig. 2).

I *coagulociti* sono cellule che raramente si presentano integre, con nucleo piuttosto grande e generalmente con residui citoplasmatici. Essi sarebbero implicati nel processo di coagulazione dell'emolinfa.

In *Leucophaea*, benché non siano state calcolate le percentuali esatte delle cellule, è stata riscontrata una quantità maggiore di tali emociti rispetto la *Nauphoeta* (27,3%). Questa diversa percentuale di coagulociti può essere

probabilmente messa in relazione con il fatto che l'emolinfa di *Nauphoeta* è più liquida di quella di *Leucophaea*.

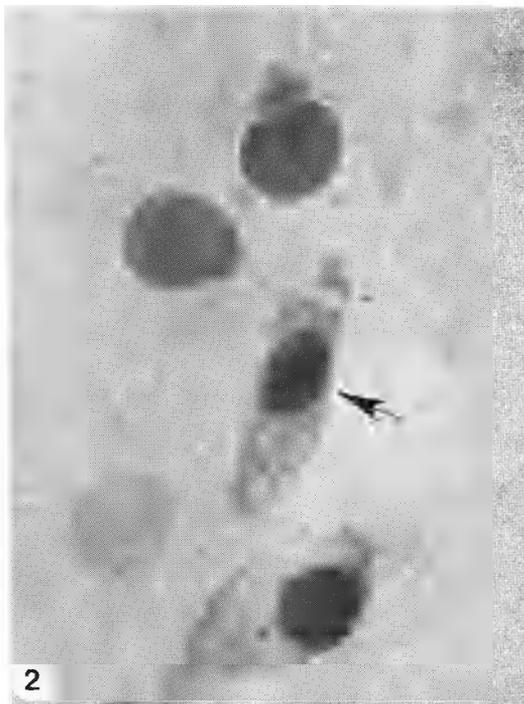
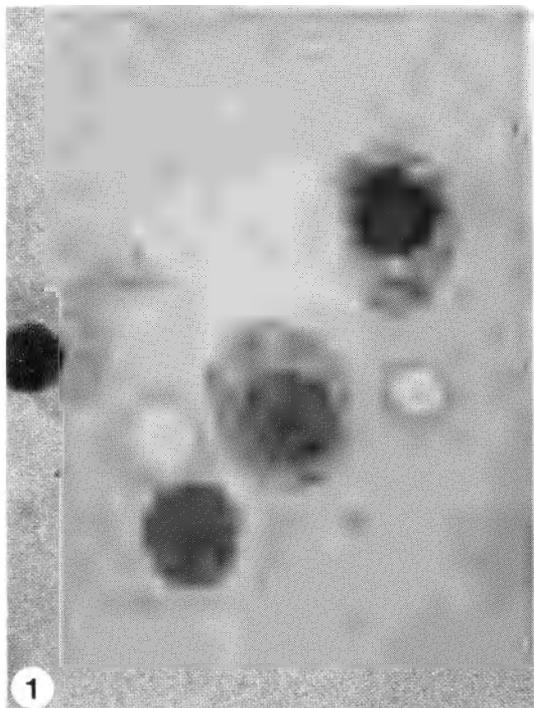
Le cellule a sferule sono emociti caratterizzati da inclusioni (sferule) che invadono il citoplasma e coprono il nucleo. In *Leucophaea* sono presenti in numero molto esiguo, mentre mancano del tutto in *Nauphoeta* (Tav. I, fig. 3).

Per quanto riguarda le emoagglutinine abbiamo riscontrato che esse reagiscono in maniera specifica contro i globuli rossi di ratto (*Nauphoeta*) e di coniglio (*Leucophaea*). Da un punto di vista immunochimico all'immunolettroforesi in entrambi i casi sono risultate essere proteine con mobilità elettroforetica  $\beta_1$ -globulinica e albuminica. Nel caso della *Leucophaea* si è isolata e purificata l'emoagglutinina albuminica trattando l'agglutinato (emolinfa-globuli rossi) a pH acido (2, 4). Non si sono ottenuti risultati positivi a questo proposito nel caso della *Nauphoeta*. Ciò indica l'esistenza di un legame più forte per le emoagglutinine di *Nauphoeta*.

L'osservazione al microscopio a fluorescenza di colture di emociti di entrambe le specie trattate con antisieri FITC anti-emoagglutinine ha mostrato una spiccata fluorescenza verde. Tale fluorescenza, localizzata sulla membrana o nel citoplasma (Tav. I, fig. 4), oltre a indicare con l'avvenuta reazione tra gli antisieri e le emoagglutinine la loro presenza in tali cellule, ne chiarisce anche la loro localizzazione. Per verificare se almeno gli emociti che presentano una fluorescenza citoplasmatica sono i responsabili della sintesi di tali emoagglutinine alcune colture sono state trattate con un inibitore della sintesi proteica (CHI). In effetti dopo tale trattamento la fluorescenza scompare completamente mentre ricompare se le colture così trattate vengono messe per 24 h in terreno TC 199. Tale fatto indica che almeno un gruppo di emociti sintetizzano e quindi liberano in circolo le emoagglutinine circolanti (fluorescenza citoplasmatica) dimostrando di essere i responsabili di tutte le reazioni immunitarie umorali immediate; al contrario quelli che presentano le emoagglutinine sulla loro membrana (fluorescenza di membrana) sono responsabili delle reazioni immunologiche cellulari come l'incapsulamento, il rigetto di trapianto, ecc.

#### LAVORI CITATI

- AMIRANTE G. A. (1976) - *Production of hemoagglutinins in hemocytes of Leucophaea maderae L.*, « *Experientia* », 32, 526.
- AMIRANTE G. A., LARIA DE BERNARDI F. and CHIERICI MAGNETTI P. (1976) - *Immunochemical studies on heteroagglutinins in the haemolymph of Cockroach Leucophaea maderae L. (Insecta, Dictyoptera)*, « *Boll. Zool.* », 43, 63.
- AMIRANTE G. A. e GUIDALI F. (1978) - *Localizzazione di due emoagglutinine in emociti di Leucophaea maderae L.*, « *Boll. Zool.* » (in stampa).
- AMIRANTE G. A. and GUIDALI MAZZALAI F. (1978) - *Synthesis and localization of hemoagglutinins in hemocytes of the Cockroach Leucophaea maderae L.*, « *Developm. Comp. Immunol.* », 2, 4.
- ARNOLD J. W. (1974) - *The hemocytes of Insects*. In « *The physiology of Insecta* », vol. 5, M. Rockstein ed., Acad. Press. New York, London pp. 201.





- BREHELIN M., HOFFMANN J. A., MATZ G. and PORTE A. (1975) - *Encapsulation of implanted foreign bodies by hemocytes in Locusta migratoria and Melolontha melolontha*, « Cell Tiss. Res. », 160, 283.
- CARAYON J. (1977) - *Les cellules capables de phagocytose chez les Insectes*, « Ann. Parasitol. », 52, 63.
- FLANDRE O., VAGO C., SECCHI J. et VEY A. (1968) - *Les réactions hemocytaires chez les Insectes*, « Rev. Pathol. Comp. », 5, 101.
- GOETZ P., ROETTGEN I. et LINGG W. (1977) - *Encapsulement humoral en tant que réaction de défense chez les Diptères*, « Ann. Parasitol. », 52, 95.
- MATZ G. (1977) - *Réactions d'immunité cellulaire après implantation de cellophane et dans la tumorigénese chez les Insectes*, « Ann. Parasitol. », 52, 68.
- MATZ G., MONIER Y. et VAGO C. (1971) - *Une réaction de défense cellulaire chez les Insectes: l'enkystemant épithélial*, « Bull. Soc. Zool. Fr. », 96, 209.
- PESSON B. et LEYER N. (1977) - *La destinée d'Hymanolepis nana var. fraterna (Cestode) chez un hôte inhabituel: Leucophaea maderae (Diptère)*, « Ann. Parasitol. », 52, 78.
- RATCLIFFE N. A. (1975) - *Spherule cell-test particle interactions in monolayer cultures of Pieris brassicae hemocytes*, « J. Insect. Pathol. », 26, 217.
- SUTHERLAND D. J. (1967) - *The development of salivary tumours in Periplaneta americana L. as induced by duct ligation*, « J. Insect. Physiol. », 13, 137.

#### SPIEGAZIONE DELLA TAVOLA I

- Fig. 1. - Colture in vitro di emociti di *Nauphoeta*. Sono riconoscibili degli emociti granulari. Colorazione secondo Pappenheim (Ingrandimento  $\times 340$  ca).
- Fig. 2. - Colture in vitro di emociti di *Nauphoeta*. È visibile un plasmotocita (freccia) e due nuclei di coagulociti. Colorazione secondo Pappenheim (Ingrandimento  $\times 340$  ca).
- Fig. 3. - Coltura in vitro di emociti di *Leucophaea*. È visibile una cellula a sferule. Colorazione Pappenheim (Ingrandimento  $\times 1200$  ca).
- Fig. 4. - Coltura di emociti di controllo di *Nauphoeta* trattati con siero anti-emoglobuline FITC. È visibile un emocita granulare con fluorescenza citoplasmatica e due plasmotociti con fluorescenza di membrana (Ingrandimento  $\times 200$  ca).