
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

SALVATORE METAFORA

Effetti dell'acqua di uova sul metabolismo degli spermi *Ciona intestinalis* (Ascidie)

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 40 (1966), n.2, p. 290–295.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1966_8_40_2_290_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/>

Embriologia sperimentale. — *Effetti dell'acqua di uova sul metabolismo degli spermatozoi di Ciona intestinalis (Ascidie)*. Nota di SALVATORE METAFORA (*), presentata (**) dal Corrisp. P. PASQUINI.

SUMMARY. — A strong activating effect on oxygen uptake and on glycogenolysis of the spermatozoa has been shown by the egg water of *Ciona intestinalis*. Investigations have also been carried out on the probable mechanisms of these effects.

Precedenti ricerche [1-4] hanno dimostrato che l'acqua di uova di Ascidie (*Ciona intestinalis*) attiva vivamente il movimento degli spermatozoi. La sostanza responsabile di questo effetto è termostabile, dializzabile, non distillabile a 100°C, non precipitabile con solfato di ammonio a saturazione, non attaccabile dagli enzimi proteolitici, resistente alle radiazioni UV di media lunghezza d'onda, adsorbibile su carbone attivato.

Nel presente lavoro si mette in evidenza che l'acqua di uova di *Ciona intestinalis* ha un effetto attivante sulla respirazione e sulla glicogenolisi degli spermatozoi omospecifici; è stato, poi, indagato sul possibile meccanismo d'azione nel determinismo di questi effetti.

RISULTATI.

1) L'aggiunta di acqua di uova agli spermatozoi produce sempre un notevole incremento della loro attività respiratoria. I dati relativi sono esposti nella Tabella I: come si vede l'attività respiratoria viene incrementata, nei primi 30 min., in media del 79,5%.

Il diffusato di 6 ore dell'acqua di uova (dialisi in tubi Visking 18/32 contro acqua di mare) produce gli stessi effetti.

Il cianuro di sodio, alla concentrazione finale di $2,58 \times 10^{-4}M$, blocca la respirazione.

L'azide sodico, alla concentrazione finale di $2,58 \times 10^{-4}M$, inibisce la respirazione solo del 16,8%, mentre a quella di $3,2 \times 10^{-1}M$ provoca una inibizione del 94,4%.

La fig. 1 mostra gli effetti di queste due sostanze.

Negli esperimenti con NaCN furono osservate le precauzioni suggerite da Krebs [6]; il pH delle soluzioni di NaCN o di azide in acqua di uova veniva aggiustato con HCl intorno ad un valore medio di 7,5.

(*) Ricercatore presso il Gruppo di Ricerca per l'Embriologia del C.N.R. c/o Istituto di Zoologia dell'Università di Palermo.

(**) Nella seduta del 12 febbraio 1966.

TABELLA I.

Effetto dell'acqua di uova sull'attività respiratoria degli spermatozoi di Ciona.

Esperimento	QO ₂ in acqua di mare	QO ₂ in acqua di uova	% Attivazione
1	20,4	174,0	753,0
2	20,4	209,0	924,5
3	24,5	209,0	753,0
4	25,9	220,0	749,5
Media	22,8	203,0	795,0
Errore standard.	± 1,4	± 10	

L'acqua di uova veniva preparata lasciando soggiornare le uova in 20-30 volumi di acqua di mare; le uova erano poi allontanate mediante centrifugazione: il pH medio dell'acqua di uova così ottenuta era di 7,75. Gli spermatozoi, prelevati direttamente dallo spermidotto, venivano lavati con acqua di mare fredda e, infine, sospesi in un volume di acqua di mare tale da ottenere sospensioni contenenti in media 0,765 mg di azoto totale spermatico per ml. L'N totale era determinato colorimetricamente dopo combustione microkjeldahl e nesslerizzazione diretta.

Il consumo di O₂ veniva misurato con il metodo diretto di WARBURG [5] usando come fase gassosa l'aria e una temperatura di 25°C. L'acqua di uova veniva versata dal braccio laterale al 30° minuto dal tempo zero. QO₂ = µl O₂/hr/mg N totale spermatico. Nel corso della sperimentazione non furono mai notati né fenomeni di autossidazione, né « effetto diluizione », né variazioni significative di pH.

2) L'aumento dei valori della respirazione si accompagna con una diminuzione del quantitativo di glicogeno. I dati relativi sono esposti in Tabella II. Nella fig. 2 si può seguire l'andamento della glicogenolisi in uno degli esperimenti eseguiti; già dopo 5 min. il consumo di glicogeno è pari al 50% circa mentre nel controllo, nello stesso tempo, si realizza solo il modesto valore di circa il 5%.

3) Allo scopo di chiarire le cause responsabili dell'aumento respiratorio si è esaminata l'azione dell'acqua di uova sull'attività citocromossidasi di mitocondri isolati dall'ovario. La tecnica adoperata per l'isolamento della frazione mitocondriale fu descritta in un precedente lavoro [9]. I risultati dimostrano che l'acqua di uova non ha effetto significativo sull'attività di questo enzima (Tabella III).

DISCUSSIONE.

La forte stimolazione motoria e respiratoria prodotta negli spermatozoi dall'acqua di uova dimostra chiaramente che il sistema fornitore di energia è fondamentalmente di tipo aerobio: convergono con ciò i risultati ottenuti col trattamento con cianuro ed azide.

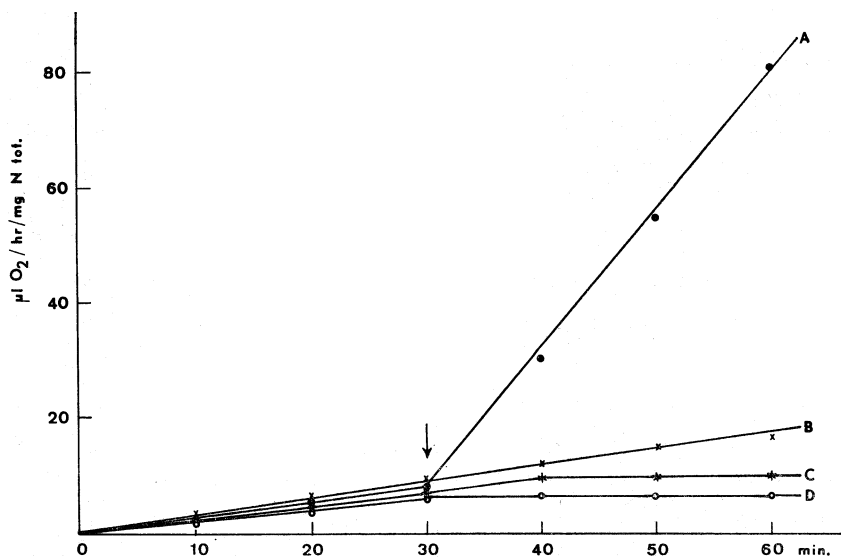


Fig. 1. - Attività respiratoria di spermatozoi di *Ciona intestinalis* in presenza di acqua di uova o di cianuro ed azide in acqua di uova.

Abbreviazioni: A, spermatozoi in acqua di uova; B, spermatozoi in acqua di mare (controllo); C, spermatozoi in acqua di uova + Azide sodico ($3,2 \times 10^{-1}$ M c.f.); D, spermatozoi in acqua di uova + Cianuro sodico ($2,58 \times 10^{-4}$ M c.f.). L'aggiunta delle soluzioni sperimentali è stata eseguita al 30° minuto.

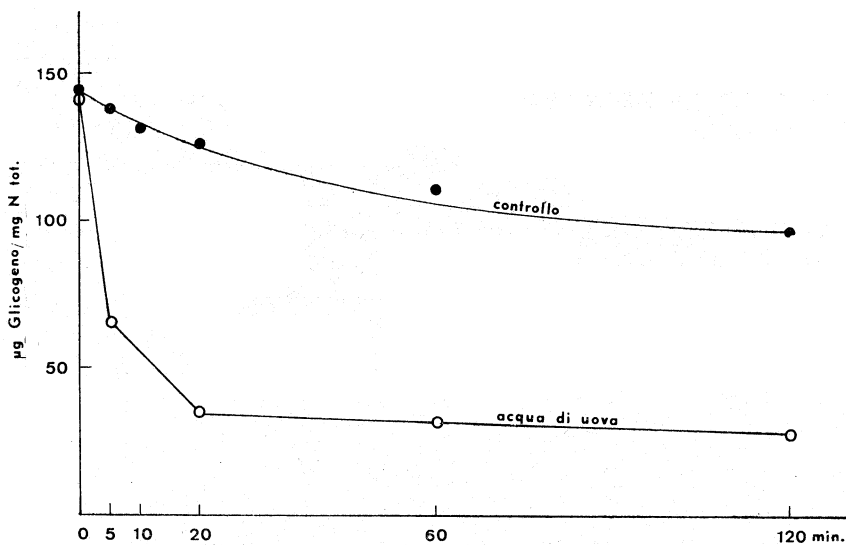


Fig. 2. - Andamento della glicogenolisi spermatica in acqua di mare (controllo) o in acqua di uova.

TABELLA II.

Consumo in % del glicogeno contenuto negli spermatozoi di *Ciona* sospesi in acqua di mare o in acqua di uova della stessa specie (*).

Tempo	Consumo in % del glicogeno di spermatozoi in acqua di mare	Consumo in % del glicogeno di spermatozoi in acqua di uova
0	0	0
5'	4,6 ± 1,2	44,4 ± 6,7
10'	9,3 ± 2,5	57,3 ± 3,0
1 h	20,1 ± 2,1	73,5 ± 2,7
3 h	38,4 ± 2,4	80,0 ± 1,2
6 h	57,5 ± 3,0	81,0 ± 2,3
20 h	81,6 ± 2,2	83,0 ± 2,6

(*) I dati riportati rappresentano la media di 4 esperimenti. Il quantitativo di glicogeno presente nei vari campioni è stato calcolato in $\mu\text{g}/\text{mg}$ N totale spermatico e il suo consumo nel tempo espresso in %. Il glicogeno, estratto dagli spermatozoi mediante il metodo di Pflüger modificato da Good et al. [7], è stato determinato colorimetricamente con il metodo dell'antrone usando come standard il glucosio e come fattore di conversione glucosio-glicogeno il valore di 1 : 1,11 [8]. La temperatura di incubazione era di 25°C.

TABELLA III.

Effetto dell'acqua di uova sull'attività citocromossidasi di mitocondri isolati da ovari di *Ciona* (*).

	N° esperimenti	Medie ± Errore Standard	t	P
Mitocondri + buffer S.P.V. . . .	4	53,7 ± 1,6	}	2,68 < 0,05
Mitocondri + acqua di mare . . .	4	58,4 ± 0,7		1,17 > 0,20
Mitocondri + acqua di uova . . .	4	55,6 ± 1,0		2,30 < 0,10

(*) Il sedimento finale di mitocondri, ottenuti con la tecnica indicata nel testo, veniva sospeso in S.P.V. (Saccaroso-Fosfato-Versene): 0,25 M; 0,04 M; 10^{-3} M c.f. a pH 7,4) ed utilizzato per il saggio enzimatico. L'attività della citocromossidasi era determinata a 25°C con il metodo gasometrico nei respirometri Warburg, adoperando 0,5 ml di substrato (Citocromo c + Parafenilendiamina $2,5 \times 10^{-4}$ M e 0,03 M c.f.) posto nel braccio laterale e 0,3 ml di sospensione mitocondriale + 0,2 ml di S.P.V. (Bianco), 0 di acqua di mare o di acqua di uova nelle vaschette; 0,1 ml di KOH 15% era messo nel pozzetto centrale. Dopo 5' per equilibrare la temperatura, l'enzima e il substrato erano mescolati e la reazione seguita per 1 ora prendendo letture ogni 6'. Fase gassosa: aria. L'attività specifica è espressa in $\mu\text{l O}_2/\text{hr}/\text{mg}$ di proteine mitocondriali.

L'assenza di un effetto diretto dell'acqua di uova sull'attività citocromosidasi dei mitocondri porta a considerare come probabile l'esistenza di un meccanismo indiretto nel determinismo dell'effetto respiratorio. Appare molto verosimile una attivazione respiratoria conseguente alla attivazione motoria. In tale caso, allora, il meccanismo con cui le sostanze attive dializzabili dell'acqua di uova agirebbero nel determinare l'incremento motorio e respiratorio potrebbe essere il seguente: esse molto probabilmente hanno la capacità di interferire con il meccanismo regolatore del battito flagellare producendo o il blocco di un eventuale sistema inibitore o la semplice attivazione del sistema capace di dare il via all'onda flagellare [10]. L'energia indispensabile per l'aumentata attività flagellare verrebbe fornita, con tutta probabilità, dalla scissione dell'ATP ad opera dell'ATP-asi flagellare [11, 12]. L'accumulo di ADP che così si verrebbe a determinare sarebbe poi direttamente responsabile dell'incremento respiratorio osservato [13, 14].

Che l'acqua di uova sia capace di stimolare la respirazione spermatica è stato anche dimostrato in molte specie di Echinodermi [15-19] e in *Megathura* [20, 21]. Non mancano d'altronde dati affermantici assenza di effetti o addirittura effetti depressivi dell'acqua di uova sugli spermatozoi omologhi [22]: risultati contrastanti dovuti molto probabilmente a differenze del materiale o delle tecniche adoperate. Importante fra l'altro è il controllo del pH nel corso della sperimentazione: in questi esperimenti il costante controllo del pH ci permette di escludere che la variazione di esso sia responsabile degli effetti respiratori riscontrati. Anche l'« effetto diluizione » e i fenomeni di auto-ossidazione sono da escludere.

Il notevole grado di glicogenolisi notato in contemporaneità con la stimolazione respiratoria e motoria, ci induce inoltre a ritenere che il glicogeno sia il substrato fondamentale utilizzato dagli spermatozoi per fare fronte alla brusca richiesta di energia indotta dalla stimolazione con acqua di uova. Con ciò convengono non solo precedenti ricerche [23, 24] sul significato del glicogeno nello spermio di *Ciona*, ma anche gli esperimenti dimostranti la incapacità degli spermatozoi a rispondere ulteriormente all'acqua di uova quando sono stati in precedenza depauperati del loro carico glicogenico mediante trattamento con acqua di uova. A questo riguardo infatti è stato osservato che sperma pretrattato con acqua di uova (nei rapporti volumetrici da 1 : 0,5 a 1 : 100) per tempi variabili da 2 a 6 ore, oltre a mostrare i singoli elementi molto alterati morfologicamente (leggero rigonfiamento della testa, variazione della rifrangibilità, comparsa di protuberanze laterali lungo il flagello, apparente spostamento laterale del pezzo intermedio), non è più capace di reagire a fresca, ulteriore addizione di acqua di uova; il controllo non pretrattato, invece, anche dopo 6 ore di permanenza a temperatura ambiente, risponde ancora normalmente allo stimolo da acqua di uova.

BIBLIOGRAFIA.

- [1] A. MINGANTI, «Pubbl. Staz. Zool. Napoli», 22, 293 (1950).
[2] A. MINGANTI, «Pubbl. Staz. Zool. Napoli», 23, 58 (1951).
[3] S. METAFORA e F. RESTIVO, «Rend. Acc. Naz. Lincei», 34, 439 (1963).
[4] S. METAFORA e F. RESTIVO, «Ric. Sci.», 34 (II-B), 5 (1964).
[5] W. W. UMBREIT, R. H. BURRIS, e J. F. STAUFFER, *Manometric techniques*, Burgess Publ. Co. Minneapolis, p. 1 (1964).
[6] A. H. KREBS, «Biochem. J.», 29, 1620 (1935).
[7] W. Z. HASSID e S. ABRAHAM, «Methods in Enzymology», S.D. Colowick & N.O. Kaplan, 3, 34 (1957). Acad. Press. New York.
[8] D. L. MORRIS, «Science», 107, 254 (1948).
[9] S. METAFORA e T. D'ANNA, «Rend. Acc. Naz. Lincei», 38, 403 (1965).
[10] D. W. BISHOP, *Spermatozoon motility*, Ed. D. W. Bishop, N. 72, p. 293. A.A.A.S., Washington D.C. (1962).
[11] L. NELSON, «Biol. Bull.», 109, 295 (1955).
[12] D. W. BISHOP, *Spermatozoon motility*, D. W. Bishop Ed., Publ. N° 72, A.A.A.S., Washington D.C. (1962).
[13] B. CHANCE e G. R. WILLIAMS, «Adv. Enzymol.», 17, 65 (1956).
[14] A. L. LEHNINGER, *Mitochondrion*, W. A. Benjamin ed., p. 132. Inc. New York (1964).
[15] J. GRAY, «Brit. J. Exp. Biol.», 5, 362 (1928).
[16] G. S. CARTER, «J. Exp. Biol.», 8, 176 (1931).
[17] E. VASSEUR, «Ark. Kemi», 1, 393 (1949).
[18] S. LYBING e B. E. HAGSTRÖM, «Exptl. Cell Res.», 13, 60 (1957).
[19] R. R. HATHAWAY, «Biol. Bull.», 125, 486 (1963).
[20] A. TYLER, «Physiol. Rev.», 28, 180 (1948).
[21] M. KRAUSS, «J. Exp. Zool.», 114, 239 (1950).
[22] C. B. METZ, in *Beginning of embryonic development*, A. Tyler, R. C. von Borstel, C. B. Metz, eds., pp. 23-69. A.A.A.S. Publ. N° 48, Washington D.C. (1957).
[23] F. RESTIVO e G. REVERBERI, «Acta Embryol. Morphol. Exper.», 1, 164 (1957).
[24] R. LENTINI, «Rend. Acc. Naz. Lincei», 27, 138 (1959).