



V. B. WIGGLESWORTH
Dipartimento di Zoologia - Università di Cambridge

Modo d'azione degli ormoni della crescita in *Rhodnius prolixus* Stal

Le parti meglio conosciute del sistema endocrino in *Rhodnius* sono le cellule neurosecretrici della regione dorsale del cervello, il corpo allato, e le ghiandole toraciche. Il prodotto delle cellule neurosecretrici passa attraverso gli assoni e si accumula nel corpo cardiaco. Sotto lo stimolo dovuto alla distensione dell'addome in seguito al pasto, tale secrezione viene scaricata nel sangue e attiva la ghiandola toracica, la quale allora secreta l'ormone della crescita e della muta.

Durante gli stadi larvali il *corpus allatum* secreta l'ormone giovanile, che determina la conservazione dei caratteri larvali. Nel 5° stadio larvale s'arresta la produzione dell'ormone giovanile e avviene la metamorfosi. La metamorfosi è subito seguita dalla distruzione delle ghiandole toraciche (distruzione che è controllata da qualche meccanismo umorale tutt'ora sconosciuto), cosicchè non possono avvenire ulteriori mute.

Alcune di queste relazioni vennero messe in evidenza per la prima volta in *Rhodnius*, altre vennero stabilite da altri AA. in vari gruppi d'insetti. La scoperta fondamentale che il cervello è l'organo endocrino primario, è dovuta a КОПЕЦ, con i suoi studi sui Lepidotteri, quantunque questa secrezione sia stata per la prima volta riferita in *Rhodnius* alle cellule neurosecretrici. Il trasporto di questa secrezione al corpo cardiaco è stato dimostrato da HANSTRÖM e da BERTA SCHARRER. Che le ghiandole toraciche siano la sorgente immediata dell'ormone della muta, è stato sperimentalmente dimostrato per la prima volta da FUKUDA nel baco da seta; e il fatto che questa ghiandola è attivata dal fattore d'origine cerebrale è stato stabilito da CARROLL WILLIAMS in *Platysamia*. L'importanza fondamentale del *corpus allatum* nel controllo della metamorfosi è stato per la

prima volta dimostrato in *Rhodnius* ed è stato ripetutamente confermato in altri Insetti. Lo scopo del presente contributo è la discussione del modo d'azione di questi ormoni (1).

Il fattore del cervello — Ben poco si sa circa la natura e il modo d'azione dell'ormone del cervello. Vedremo più innanzi che l'ormone delle ghiandole toraciche diventa attivo in *Rhodnius* entro una o due ore dopo il pasto. In realtà risulta evidente che esso dimostra qualche attività anche se l'insetto è decapitato entro pochi minuti dopo il pasto. Ciò fa pensare che un po' del fattore del cervello è liberato anche durante il pasto.

Ma la larva del 4° stadio di *Rhodnius* può essere decapitata al più tardi entro tre giorni dopo il pasto e ancora la muta è impedita. Ciò significa che il fattore del cervello non ha propriamente l'effetto di un impulso istantaneo sulle ghiandole toraciche, ma è necessario che la sua azione sia continuata. Forse essa provvede ad alcune sostanze necessarie alla produzione dell'ormone della muta da parte della ghiandola toracica.

I fagociti del sangue, i cosiddetti amebociti, sembrano intervenire in qualche modo in questo processo. La larva normale del 4° stadio muta circa 14 giorni dopo il pasto. Se essa è iniettata con inchiostro di China o con saccarato di ferro un giorno dopo il pasto, la muta può essere ritardata di due o tre settimane. La stessa cosa avviene se l'inoculazione è fatta 2-3 giorni dopo il pasto. Ma al 4° giorno o più tardi, quando l'attivazione della ghiandola toracica è completa, le iniezioni non hanno più effetto.

Il significato di questo risultato non è oggi noto. Può essere che gli amebociti siano normalmente produttori di qualche sostanza necessaria alle ghiandole toraciche per la produzione dell'ormone, produzione che non avverrebbe quando essi sono occupati nella fagocitosi delle sostanze estranee iniettate. O può anche avvenire che, durante la fagocitosi delle sostanze estranee iniettate, venga inattivato il fattore del cervello che si trova nel sangue.

Nulla si sa ancora intorno alla natura del fattore del cervello.

(1) Una più dettagliata relazione su questo argomento, con illustrazioni e riferimenti alla letteratura, è in corso di pubblicazione nel « *Symposia of the Society for Experimental Biology*, Vol. 10, 1957.

L'ORMONE DELLA GHIANDOLA TORACICA (ECDISONE)

Si conosce molto di più sull'ormone della ghiandola toracica. Il principio attivo o *ecdisione*, è stato isolato dalle crisalidi del baco da seta nella forma cristallina da BUTENANDT e KARLSON. Il dottor KARLSON mi ha generosamente fornito piccole quantità di questo ormone, e ciò ha facilitato grandemente il suo studio.

Ma esso è ancora lontano dall'essere completo. Posso comunicare soltanto alcune osservazioni preliminari, e precisamente mi propongo d'illustrare i risultati che si riferiscono a tre tessuti: il corpo grasso, i muscoli ventrali addominali e l'epidermide dell'addome.

Il corpo grasso è impegnato attivamente in tutte le sorta di sintesi durante il ciclo della muta. Particolarmente durante l'ultimo stadio larvale esso accumula larghe quantità di grasso, glicogene e proteine per trasferirle ai tessuti in crescita. Nell'insetto in riposo o che ha appena mangiato, i nuclei del corpo grasso hanno nucleoli relativamente piccoli, e i mitocondri sono per la maggior parte a forma di cocchi od ovali; mentre pochi hanno forma di brevi bastoncini.

Entro 6 ore dopo il pasto vi è un rilevante aumento di acido ribonucleico attorno ai nuclei di queste cellule. Entro 24 ore dal pasto i nucleoli sono assai aumentati di dimensioni e lobulati; molto acido nucleico è accumulato; i mitocondri appaiono aumentati di numero; vi sono molte formazioni filamentose che sembrano irradiarsi dal nucleo e molte di esse sono ramificate. Successivamente, allorché acido nucleico e proteine sono accumulate nel citoplasma, i mitocondri tendono ad essere meno visibili.

Il secondo tessuto studiato è il gruppo ventrale addominale di muscoli che in *Rhodnius* vanno soggetti a un notevole ciclo durante ogni periodo di muta. Essi sono completamente formati soltanto al tempo della muta. Al terzo giorno dopo la muta, se esaminati a luce polarizzata, essi possono essere veduti soltanto come ombre che passano da un segmento all'altro.

Al 5° giorno dopo la muta, le fibrille birifrangenti sono scomparse completamente. Null'altro rimane che la membrana del muscolo contenente i nuclei e una quantità veramente esigua di citoplasma con sottili mitocondri.

Entro sei ore dopo l'iniezione di ecdisione, i nuclei si sono ingranditi e l'acido ribonucleico è aumentato nel citoplasma. Alla 24^a

ora questi cambiamenti sono molto progrediti, e i mitocondri sono rigonfiati e aumentati di numero. Al terzo giorno dopo il pasto e dopo l'iniezione dell'ormone, i nucleoli si sono molto ingranditi; i mitocondri sono di nuovo veramente numerosi, e molti di essi sono longitudinalmente allungati fra le fibrille muscolari, le quali in un primo tempo ritornano ad essere visibili nel citoplasma.

L'epidermide denota cambiamenti molto simili. Nell'insetto decapitato immediatamente dopo il pasto e iniettato con la soluzione di RINGER, i muscoli sono piccoli, i mitocondri per lo più in forma di granuli o di filamenti sottili. In un insetto decapitato come il precedente, ma 24 ore dopo l'iniezione di ecdisone, i nucleoli si sono ingranditi e i mitocondri sono per la maggior parte contratti e rigonfiati formando corpi ovali o rotondi. L'acido ribonucleico è notevolmente aumentato nel citoplasma. Questi cambiamenti sono già evidenti entro 6 ore dall'iniezione di ecdisone. Le misure dei mitocondri in sezioni sottili esaminate al microscopio elettronico, mostrano che essi hanno uno spessore medio di 0,15 μ allo stato di riposo; di 0,28 μ sei ore dopo l'iniezione di ecdisone.

Due giorni dopo il pasto, i nucleoli si sono ulteriormente ingranditi, e i mitocondri sono aumentati di numero. Le cellule sono nuovamente ispessite. Quattro giorni dopo il pasto le cellule epidermiche formano un epitelio cubico; esse sono cariche di proteine ed acido nucleico, e i mitocondri non sono visibili. Nuclei e nucleoli sono fortemente ingrossati; la mitosi è cominciata.

LA RESPIRAZIONE DURANTE LA MUTA

Come è ben noto, la respirazione nella pupa degli Insetti segue più o meno una curva ad U; e si sono fatte molte speculazioni sul significato di tali curve. K. ZWICKY ed io abbiamo recentemente seguito in *Rhodnius* il consumo di ossigeno durante la muta. Esso è molto basso nell'insetto digiuno. Dopo il pasto esso aumenta costantemente per circa 5 giorni e poi rimane più o meno stabile fino a che esso di solito si eleva a un massimo al tempo della muta. Durante i 5 o 6 giorni seguenti, la respirazione cade gradualmente fino a un livello di nuovo basso. Così il consumo di ossigeno si eleva ad un massimo ad ogni muta o, se si considera il periodo che va da una muta

alla successiva, esso segue qualcosa di simile ad una curva a forma di U.

Noi interpretiamo tale curva come essenzialmente una curva di sintesi di proteine. In tutti i tessuti, come noi abbiamo veduto, la sintesi delle proteine comincia entro poche ore dopo il pasto, e procede con aumentata velocità mentre le cellule s'ingrandiscono e si dividono. Nei muscoli ventrali dell'addome cominciano ad apparire nuove fibrille entro i tre giorni successivi al pasto, e continuano ad aumentare fino al giorno che precede la muta. Le cellule epidermiche costruiscono il loro citoplasma dall'inizio, ed esse cominciano subito a sintetizzare proteine e chitina che aggiungono alla vecchia cuticola. Quando esse si separano, si stendono al di sotto della nuova cuticola e digeriscono la vecchia. Soltanto la metà circa della cuticola è formata durante la muta; la rimanente è sintetizzata con velocità che diminuisce nei pochi giorni successivi. Questo processo si completa 5 giorni circa dopo la muta.

Così l'intensità della sintesi delle proteine decorre più o meno parallelamente con il tasso del consumo di ossigeno.

Io suggerirei l'ipotesi che la caratteristica deficienza negli insetti in diapausa, quando non viene secreto l'ormone della muta, è la mancata sintesi delle proteine. Il meccanismo di sintesi delle proteine non è conosciuto completamente, ma sappiamo che esso non è un semplice processo reversibile dell'idrolisi dei peptidi, ma un processo endotermico che richiede energia.

Vi sono due modi coi quali l'ormone della muta può essere immaginato attivo nel rimediare a questa deficienza. In primo luogo esso potrebbe provvedere alcune sostanze necessarie a qualche passaggio nel processo di sintesi delle proteine entro le cellule. L'ormone ha certamente un'azione quantitativa: 0,25 μ g di esso causano soltanto una piccola sintesi delle proteine; 0,5 μ g un pochino di più; 0,75 μ g fino a 1 μ g sono necessari per una muta completa nella larva di 4° stadio.

Oppure l'ormone può agire aumentando la permeabilità entro le cellule, cosicché per tale azione gli enzimi nei nuclei, mitocondri, ecc., hanno accesso ai loro substrati. E' generalmente ammesso che l'insulina agisca principalmente in questo modo; e l'insulina inoltre ha pure un'azione quantitativa.

Io sono attratto dall'idea che l'ormone della muta sia attivo in quanto agisce sulla permeabilità. Penso che la sua azione porti alla liberazione di enzimi, così come può aver luogo durante una moderata autolisi entro le cellule. Se cellule epidermiche vengono tagliate col coltello, ciò può essere causa di una locale autolisi; ed essa ha lo stesso effetto locale di quello che l'ormone della muta produce in tutto il corpo.

Nell'adulto di *Rhodnius* le cellule epidermiche sono permanentemente in riposo, con piccoli nucleoli e mitocondri relativamente piccoli e sottili. Se viene effettuata una piccola incisione nella cuticola, in modo da ledere le cellule epidermiche sottostanti, allora entro 24 ore le cellule circostanti la lesione fino ad una distanza di 250 μ , mostrano numerosi mitocondri rigonfi, e il citoplasma si riempie di ribonucleina. Rimane da vedere se vi è una connessione fra i prodotti dell'autolisi delle cellule lese che provocano questa reazione da ferita, e l'ormone delle mute, che provoca una reazione generale molto simile in tutto il corpo.

IL MODO D'AZIONE DELL'ORMONE DEL CORPUS ALLATUM (NEOTENINA)

Torno nuovamente all'altro ormone di capitale importanza, all'ormone giovanile (neotenina). Venti anni or sono io ho tentato di descrivere il controllo della metamorfosi in *Rhodnius* nei termini della teoria di GOLDSCHMIDT, teoria delle velocità differenziali in due processi di sviluppo concorrenti.

Nel ciclo della muta ci sono due processi in atto: la crescita esagerata di certe parti dell'epidermide, che conduce ad un cambiamento nella forma del successivo stadio larvale, e la deposizione della nuova cuticola che termina all'atto della muta. Una nuova crescita nell'epidermide è possibile soltanto durante la prima fase del ciclo della muta, quando le cellule sono staccate dalla cuticola. Dal momento in cui comincia la deposizione di una nuova cuticola, un'ulteriore crescita è impossibile. Io quindi pensavo che l'ormone del *corpus allatum*, che io a quel tempo chiamavo *ormone inibitorio*, inibisse la differenziazione verso la forma adulta, accelerando quel processo che conduce alla deposizione della cuticola.

Si supponeva che ad ogni stadio larvale s'iniziasse una diffe-

renziamento verso la forma adulta, ma essa sarebbe stata troncata dalla deposizione della cuticola prima che la differenziazione si spingesse troppo lontano. Ciò si sarebbe verificato fino all'ultima muta, allorchè, in assenza dell'ormone del *corpus allatum*, avviene la completa differenziazione.

Questa stessa idea è implicita negli scritti di altri AA. Così SCHARRER chiama « ormone della crescita e della differenziazione » l'ormone della muta, intendendo dire che esso stimola la differenziazione dell'adulto. E WILLIAMS ha talvolta chiamato « status quo hormone » l'ormone del *corpus allatum*, intendendo dire, allo stesso modo del termine « ormone inibitorio », che esso inibisce la differenziazione verso l'adulto.

Vi sono molte osservazioni che si accordano bene con questa interpretazione. L'ormone della muta è certamente secreto prima dell'ormone giovanile; nella primissima pubblicazione sugli ormoni di *Rhodnius* è stato dimostrato che la decapitazione dopo che l'ormone della muta era secreto, ma prima che lo fosse l'ormone giovanile, portava ad una metamorfosi precoce.

L'esperimento seguente è pure sorprendente. Se a una larva A di 4° stadio si unisce un'altra larva B di 4° stadio, e tutte due sono della stessa età a partire dal pasto, A si sviluppa in una larva normale di 5° stadio. Ma se A si trova a 24 ore dal pasto, e B a 7 giorni dal pasto (cosicchè esso contiene già l'ormone giovanile e perciò A riceve questo ormone troppo presto nel processo della muta), la differenziazione verso l'adulto non può spingersi avanti come di solito, e l'insetto A si sviluppa con caratteri intermedi fra il 4° e il 5° stadio.

Un simile esperimento è stato eseguito molti anni or sono su *Cimex*. Nella larva maschile di 5° stadio di *Cimex* si possono vedere i rudimenti di ambedue le appendici laterali; quello del lato sinistro essendo leggermente più largo. Durante la muta finale i rudimenti epidermici di ambedue le appendici laterali si sviluppano per un certo tempo sotto la cuticola, e in seguito l'appendice destra si atrofizza e scompare, e soltanto quella sinistra rimane fino a quando la nuova cuticola è deposta.

Se dosi graduate dell'ormone giovanile di *Rhodnius* sono date a *Cimex* del 5° stadio larvale, si ottiene una serie graduata di forme intermedie, con genitalia che riproducono esattamente gli stadi intermedi mostrati dai rudimenti epidermici.

Riesce difficile evitare l'impressione che l'ormone giovanile abbia obbligato questi insetti a deporre precocemente la nuova cuticola.

Ma quando vengono studiati più profondamente i processi di crescita durante la metamorfosi, diventa insostenibile l'ipotesi che l'ormone giovanile abbia soltanto un'azione inibitrice sulla differenziazione verso l'adulto.

Il più evidente cambiamento durante la metamorfosi, è la crescita esagerata di taluni organi, come i lobi alari e i genitali. Così la cuticola del dorso dell'addome nell'adulto di *Rhodnius* è relativamente sottile, con pieghe trasversali e poche setole. La cuticola larvale è di gran lunga più spessa ed è adatta all'estensione; l'epicuticola s'introflette in profonde pieghe a stella e le numerose setole sono circondate da placche lisce.

Per permettere la grande distensione dell'addome che si verifica durante il pasto, la superficie della cuticola larvale non è soltanto molto pieghettata, ma è di gran lunga maggiore che nell'adulto il numero delle cellule epidermiche per unità di superficie. Di conseguenza i cambiamenti istologici durante le mute sono differenti fin dall'inizio, a seconda che si debba formare una cuticola larvale o una cuticola di adulto; le mitosi sono di gran lunga più attive allorché deve essere deposta una cuticola larvale.

Non è possibile considerare tali differenze come se fossero dovute a un'inibizione dello sviluppo delle strutture adulte. L'ormone giovanile è sicuramente attivo e positivo nel determinare una crescita differenziata di tipo larvale.

La stessa cosa si osserva in modo più evidente nella parziale reversione della metamorfosi. L'adulto di *Rhodnius* può essere indotto a formare una nuova cuticola se esposto sperimentalmente all'ormone della muta; e questa cuticola è ancora di tipo adulto.

Ma se nello stesso tempo gli si somministra ormone giovanile, la nuova cuticola che ricopre la superficie dell'addome, mostra un parziale ritorno al tipo larvale, con pieghe stellate e un tentativo di formazione di placche. Inoltre in questi insetti è grandemente aumentato il numero delle cellule epidermiche per unità di area.

Da queste osservazioni si può concludere che le cellule epidermiche di *Rhodnius* contengono il complesso di geni e gli enzimi allo stato potenziale capaci di produrre l'una o l'altra delle strutture, lar-

vale o adulta; e che il sistema larvale persiste in almeno qualcuna delle cellule, anche dopo che ha avuto luogo la metamorfosi.

Nelle larve sviluppate, tutte le cellule hanno doppia potenzialità. Quale di queste potenzialità viene realizzata, quale sistema di enzimi diventa funzionante, è determinato dalla presenza o assenza di ciò che deve essere una sostanza chimica relativamente semplice: l'ormone giovanile.

Questo fenomeno per cui una singola cellula possiede potenzialità multiple, è senz'altro un fatto comune nello sviluppo di tutti gli organismi viventi. Interi organismi esistono in forme dimorfe o polimorfe: differenze stagionali, differenze sessuali, o differenze di casta appaiono in differenti individui. Strutture vegetative o floreali si sviluppano in stagioni differenti o in differenti parti della pianta. In effetto, la differenziazione di un singolo animale, con tutte le sue varie parti, consiste nella realizzazione in specifiche regioni, di potenzialità che sono tutte latenti nell'uovo fecondato.

Si sono accumulate le prove che il manifestarsi di particolari forme negli organismi polimorfi, o il realizzarsi di particolari fenotipi in certi ceppi genetici, dipendono dalla somministrazione di sostanze chimiche relativamente semplici.

In relazione al punto di vista che io propongo, la larva, la pupa, l'adulto di un insetto rappresentano differenti forme di un organismo polimorfo, la realizzazione del quale è controllata dal momento in cui avviene la secrezione dell'ormone giovanile e dalla sua quantità.

Il manifestarsi di queste forme dipende dall'attività sintetica delle cellule epidermiche. L'ormone giovanile deve reagire in tal modo con il sistema enzimatico di queste cellule, controllato dai geni, da deflettere la morfogenesi, per mezzo della sua influenza su sintesi particolari.

Cellule attivate solamente con l'ormone della muta sviluppano i loro caratteri adulti; se una piccola quantità di ormone giovanile è presente, appaiono i caratteri pupali; e se una grande quantità di ormone giovanile è presente, si sviluppano i caratteri larvali.

Noi abbiamo già considerata la natura dell'azione dell'ormone della muta; io ho emesso l'opinione che esso faciliti l'accesso ai loro substrati di quegli enzimi che funzionano nella sintesi delle proteine.

Per ciò che riguarda l'ormone giovanile, in passato io propen-

devo a considerarlo come una specie di coenzima, che avrebbe favorito l'attività di quegli enzimi che operano nella realizzazione dei caratteri larvali. Ma è anche possibile di concepirlo come funzionante nel regolare le relazioni di permeabilità entro le cellule, in modo tale che il sistema enzimatico controllato dai geni che è responsabile dei caratteri larvali, è portato ad aumentare la propria attività quando l'ormone giovanile è presente.

SOMMARIO

Modo d'azione dell'ormone della muta (ecdisione).

In una comunicazione preliminare di un lavoro non pubblicato, si è affermato che c'è che manca in modo caratteristico nei tessuti di un insetto in riposo o dormiente, in cui non è secreto l'ormone della crescita e della muta, è la sintesi delle proteine. In presenza dell'ormone è evidente entro poche ore un'attiva sintesi di proteine e di acido nucleico. Assieme con questa rinnovata attività vi è un forte ingrandimento dei nucleoli e i mitocondri cambiano forma e tosto incominciano a crescere di numero.

La caratteristica forma ad U della curva della respirazione durante il ciclo della muta dell'insetto, è interpretata come una curva di sintesi delle proteine. Dalla comparazione con effetti molto simili dovuti a lesioni locali, si giunge all'ipotesi che l'effetto principale prodotto dall'ecdisione può essere l'aumento della permeabilità intracellulare, cosicchè gli enzimi necessari per l'assimilazione di aminoacidi, ecc. possono venire a contatto coi loro substrati.

Modo d'azione dell'ormone giovanile (neotenia).

L'ipotesi che durante la crescita dell'insetto l'ormone giovanile inibisca la differenziazione verso la forma adulta, malgrado sia seducente superficialmente, è insostenibile allorchè sono attentamente osservati i cambiamenti che avvengono nei tessuti. Viene dato un breve sommario sull'argomento trattato altrove in modo completo, in cui si sostiene l'idea che larva, pupa e adulto devono essere considerati come le differenti forme di un organismo polimorfo. Il manifestarsi di queste forme dipende dall'attività sintetica delle cellule epidermiche. Si esprime l'opinione che l'ormone giovanile reagisca col sistema enzimatico controllato dai geni di queste cellule, in modo tale che la quantità e il momento della secrezione dell'ormone controllino la realizzazione dei vari aspetti morfologici.

SUMMARY

Mode of action of the moulting hormone (ecdysone) - In a preliminary account of unpublished work it is claimed that the characteristic defect in the resting or dormant insect, in which no growth and moulting hormone is being secreted, is a failure of protein synthesis. In the presence of the hormone active synthesis of protein and nucleic acid is evident within a few hours. Associated with this renewed activity there is a great enlargement of the nucleolus, and the mitochondria undergo changes in form and soon begin to increase in number. The characteristic U-shaped curve of respiration during the moulting cycle of the insect is interpreted as a curve of protein synthesis. It is suggested by comparison with the very similar effect of local injury, that the primary effect of ecdysone may be to increase intracellular permeability so that enzymes necessary for the assimilation of amino acids, etc., may have access to their substrates.

Mode of action of the juvenile hormone (neotenia) - The hypothesis that in the growing insect the juvenile hormone inhibits differentiation towards the adult form, though superficially attractive, is untenable when the changes in the tissues are closely observed. A brief summary is given of the argument developed in full elsewhere, which supports the view that the larva, pupa and adult are to be regarded as different forms of a polymorphic organism. The manifestation of these forms is dependent upon the synthetic activity of the epidermal cells. It is suggested that the juvenile hormone reacts with the gene-controlled enzyme system of these cells in such a way that the amount and timing of hormone secretion controls the realization of these alternative morphological forms.