

41. Felice VEROLINI. — Azione del DDT sull'epitelio intestinale di larve di Culicine.

Riassunto. — Studiando l'intestino medio di larve di *Culex* sottoposte a trattamento con DDT, l'Autore distingue due regioni: una anteriore o cefalica, costituita da cellule che rimangono indifferenti conservando gli stessi caratteri di quelle normali, e l'altra, posteriore o caudale in cui l'epitelio offre un aspetto nettamente diverso da quello normale, caratterizzato da una notevole deformazione ed allungamento delle singole cellule e dalla loro completa dissoluzione nel lume intestinale, aspetti che hanno il significato di una reazione esagerata e patologica di fronte ad una sostanza tossica che lede il protoplasma.

Résumé. — Ce travail a pour objet l'étude histologique de l'épithélium intestinal des larves de Culicidés traitées par le DDT. Des recherches préliminaires avaient effectivement permis d'établir que les propriétés larvicides du DDT ne se rattachent pas seulement à son action de contact, mais sont dues aussi à une action exercée par la substance toxique lorsqu'elle est introduite dans l'intestin.

L'A. fait d'abord la description de l'épithélium de la larve normale. Dans l'intestin d'une larve de *Culex* on peut distinguer trois régions, antérieure, moyenne et postérieure, et de ces trois régions la moyenne est la plus importante au point de vue physiologique.

Considérant la morphologie des éléments épithéliaux, cette région moyenne peut être divisée en deux segments: l'antérieur, constitué par des cellules cubiques, assez volumineuses, avec un gros noyau rond, et qui ne présentent ni granules, ni vacuoles, ni d'autres signes d'activité sécrétoire, et le segment postérieur constitué par des éléments épithéliaux plus petits, cylindriques, avec un petit noyau, avec un cytoplasme riche en vacuoles et en granules de sécrétion, doué d'une activité sécrétoire mérocrine, les sécrétions élaborées par ces éléments abandonnant la cellule sous forme d'extroversions ou d'appendices, qui se détachent ensuite et se portent librement dans la cavité intestinale.

L'A. met particulièrement en évidence l'existence d'une formation de l'intestin moyen, qui est la membrane péritrophique. Cette membrane, très mince, s'étendant sur toute la longueur de l'intestin moyen, est constituée par des substances chitineuses lipoides et protéiques, correspondant donc essentiellement à la constitution de la cuticule extérieure; sa teneur en lipoides assure le passage du DDT et son contact avec les épithéliums.

Dans les larves traitées par le DDT, la présence de la substance toxique produit des lésions dans l'épithélium intestinal, qui sont locali-

sées au seul segment postérieur de l'intestin moyen, tandis que les cellules du segment antérieur restent indifférentes à l'action du DDT.

Ces altérations consistent d'une part dans une exagération des phénomènes de sécrétion, avec une production excessive de granules et de vacuoles, qui gonflent la cellule, et, d'autre part, dans une profonde déformation de l'élément cellulaire, qui s'allonge, s'avance excessivement dans l'intérieur de l'intestin, se gonfle dans sa partie saillante, qui contient tout le cytoplasme, y compris le noyau, réduit sa base à un mince collet et enfin se détache entièrement et se désagrège dans l'intestin. Ces modifications ont une signification strictement pathologique et révèlent l'existence d'une action toxique, vis-à-vis de laquelle l'élément réagit par des mécanismes violents de réaction, qui amènent sa destruction.

Summary. — In this paper a histological study is reported of the intestinal epithelium of larvae of Culicidae subjected to a DDT treatment. Previous investigations, in fact, had demonstrated that the larvicidal properties of DDT do not depend on its contact action only, but also on an action which this toxic substance exerts when it is introduced into the intestine.

The A. gives first a description of the epithelium of a normal larva. In the intestine of the larvae of Culicidae three sections, namely, the anterior, the middle and the posterior portions, can be distinguished, of which the middle section is the most important from a physiological viewpoint.

Considering the morphology of the epithelial elements, the middle portion can be divided into two segments: the anterior one, consisting of cubic rather voluminous cells, with a large round nucleus, having no granules, nor vacuoles, nor any other sign of secretory activity, and the posterior segment, constituted by smaller, cylindrical epithelial elements with a small nucleus, with a cytoplasm rich in secretory vacuoles and granules, having a secretory activity of the merocrine type, the secreta elaborated by these elements leaving the cell in the form of extroversions and appendages, which are soon detached and become free in the intestinal passage.

The A. points out more particularly the existence of a formation in the middle intestine, namely, the peritrophic membrane. This very thin membrane, extending over the whole length of the middle intestine, is formed by chitinous lipoid and proteinic substances, therefore corresponding essentially to the constitution of the external cuticle; its lipoid content ensures the passage of DDT and its contact with the epitheliums.

In larvae treated with DDT, the presence of this toxic substance causes lesions in the intestinal epithelium, which are localized only in the back segment of the middle intestine, whilst the cells of the first segment remain unaffected.

These changes consist, on the one hand, in an exaggeration of the secretory phenomena, with an excessive production of granules and vacuoles whereby the cell is swelled up, and, on the other hand, in a profound deformation of the cellular element, which becomes lengthened, protrudes excessively into the intestinal passage, swells up in the portion so protruding, which contains the whole cytoplasm, including the nucleus, reduces its basal portion to the form of a thin neck, and finally becomes detached and disperses in the intestine. These modifications have a strict pathological significance and reveal the existence of a toxic action, against which the cellular element reacts by such violent mechanisms as to bring about its destruction.

Zusammenfassung. — Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die histologische Beobachtung des Epithels der Culex Larven, die der DDT-Behandlung unterzogen wurden. Mit vorangehenden Untersuchungen wurde tatsächlich festgestellt, dass die larventötende Wirkung des DDT nicht nur von einer Kontaktwirkung, sondern auch von der Wirkung, die die toxische Substanz ausübt, wenn sie in den Darm eingeführt wird, abhängt.

Der V. lässt die Beschreibung des normalen Larvenepithels vorangehen. Der Darm der Culex Larven kann in drei Teile, den vorderen, den mittleren und den hinteren, unterschieden werden, wovon der physiologisch wichtigste Teil der mittlere ist.

Wenn man die Morphologie der Epithelialelemente berücksichtigt, kann man diesen Teil in zwei Segmente teilen. Das vordere, welches aus kubischen, ziemlich voluminösen Zellen, mit grossem rundem Kern, besteht, granulafrei und frei von Vakuolen und anderen Anzeichen der Sekretionstätigkeit ist, und das hintere Segment, welches aus kleineren cylindrischen Epithelialelementen besteht, mit kleinem Kern, mit vakuolenreichem Cytoplasma und vielen Sekretionsgranula und mit Sekretionsaktivität von merocrinem Typus versehen ist.

Die von diesen Elementen ausgearbeiteten Sekrete verlassen die Zelle in Form von Extroversionen und Anhängseln, welche sich loslösen und im Darmlumen befreien.

Der V. weist besonders auf das Vorhandensein des Mitteldarms hin, das heisst auf die peritrophische Membrane.

Diese sehr dünne Membrane, die sich über die ganze Länge des Mitteldarms erstreckt, ist aus chitinös-lipoidischen und proteischen Substanzen gebildet und entspricht somit wesentlich der Konstitution der

ausseren Kutikula. Sein Gehalt an Lipoiden sichert das Durchdringen des DDT und den Kontakt mit den Epithelien.

Bei den mit DDT behandelten Larven, ruft die Anwesenheit der toxischen Substanzen Verletzungen des Darmepithels hervor, die nur im vorderen Segment des Mitteldarms lokalisiert sind, während die Zellen des ersten Teiles indifferent bleiben.

Diese Veränderungen bestehen einerseits in einer Uebertreibung der sekretorischen Erscheinungen, mit übermässiger Bildung von Granula und Vakuolen, die das Schwellen der Zelle verursachen, und andererseits in einer eingreifenden Deformation des Zellelementes, welches sich verlängert, überaus tief in das Darmlumen eindringt, im hervorragenden Teil anschwillt, welcher das ganze Cytoplasma enthält, der Kern inbegriffen, seinen Basalteil zu einem dünnen Hals verringert, und sich zum Schluss gänzlich löst und im Darm auflöst. Diese Veränderungen haben eine genaue pathologische Bedeutung, und weisen auf die Bestehung einer toxischen Wirkung hin, auf die das Element mit heftigen Mechanismen reagiert, die zu seiner Vernichtung führen.

In ricerche precedenti, condotte allo scopo di definire con quale meccanismo il DDT esplichi la sua azione tossica nelle larve di Culicine, si era potuto stabilire che questa sostanza non agisce su di esse soltanto come insetticida di contatto, ma anche per ingestione.

Infatti le larve suddette si alimentano, come è noto, vorticando le particelle di svariata natura sospese nell'acqua in cui si sviluppano, senza esercitare apparentemente una selezione del cibo e finiscono perciò con l'ingerire inevitabilmente l'insetticida in discreta quantità.

Gli esperimenti ricordati, basati su una tecnica che permetteva di realizzare separatamente l'intossicazione per contatto da una parte e l'intossicazione per ingestione dall'altra, avevano condotto alla conclusione che questa ultima produceva un effetto superiore a quello derivante dall'assorbimento della sostanza tossica attraverso la cuticola larvale.

E' evidente dunque che studiando il meccanismo di azione del DDT usato come larvicida bisogna tener presente non solo la sua diffusibilità attraverso la cuticola chitinoso e le fibre nervose del sistema periferico cutaneo, ma anche l'azione esercitata dalla sostanza tossica sull'epitelio intestinale.

Non è facile stabilire esattamente nella sua essenza quest'ultima azione; nondimeno le modificazioni dell'aspetto morfologico dell'epitelio intestinale, le deviazioni dalla norma dei regolari processi secretori e di assorbimento, quali si possono dedurre dall'esame istologico, possono fornire elementi tali da permettere di stabilire l'esistenza e l'intensità dell'azione tossica che il DDT esercita a livello dell'intestino.

A tale scopo si sono condotte parallelamente osservazioni istologiche sull'intestino di larve mantenute in acqua con solo DDT e morte in seguito a tale trattamento, e d'altra parte sull'intestino di larve allevate in ambiente normale e quindi sorprese nel loro normale processo digestivo; ciò per evitare di attribuire un significato patologico ad aspetti che invece non rappresentano che l'espressione di una normale attività fisiologica.

Il confronto di questi due quadri istologici mette in evidenza alcuni aspetti caratteristici, riferibili esclusivamente alla sostanza tossica e che sono da interpretare come i segni di sofferenza e di reazione degli elementi dell'epitelio intestinale di fronte ad essa.

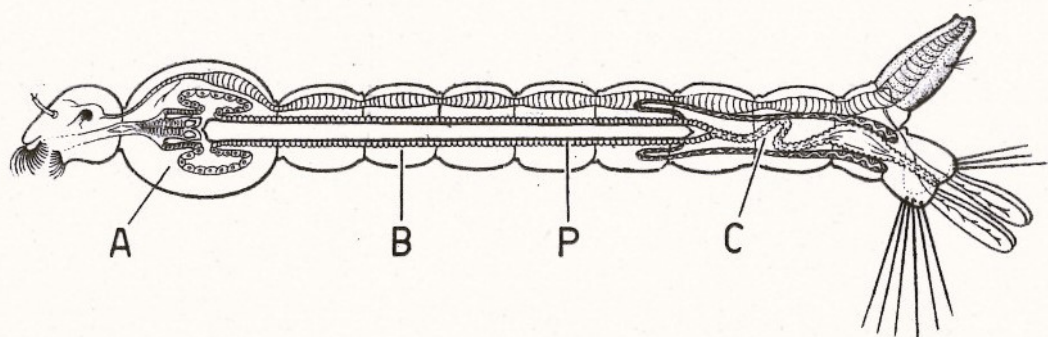


FIG. 1. — Larva di Culex - Sezione schematica.

A) Intestino anter., B) Intestino medio, C) Intestino poster., P) Membrana peritrofica.

Per meglio comprenderne il significato è utile premettere alla descrizione dei reperti istologici riscontrati nelle larve trattate con DDT, alcuni cenni morfologici dell'intestino della larva di Culex e le modificazioni normali delle varie fasi del processo digestivo.

Come nell'adulto così nella larva il canale digerente si può dividere in tre segmenti; intestino anteriore, intestino medio ed intestino posteriore (fig. 1).

Delle tre parti, l'intestino medio, cioè il segmento compreso tra la valvola cardiaca e la valvola pilorica, rappresenta la vera regione ghiandolare dell'intestino in cui si svolgono i processi della digestione. Esso è nella larva rappresentato da un tubo cilindrico, di calibro uniforme, che si estende fino al 4 o 5 segmento addominale, in corrispondenza dell'inserzione dei tubuli di Malpighi.

La parete dell'intestino medio è costituita da vari strati, che procedendo dall'interno verso il lume intestinale sono rappresentati dallo strato muscolare, la membrana propria o basale e lo strato epiteliale; in questo segmento manca una cuticola chitinoso o intima, come si trova nell'intestino anteriore e posteriore, aderente alla superficie libera dell'epitelio; al posto di questa cuticola si trova un'altra formazione che

assume una parte importante nelle funzioni dell'organo: è la membrana peritrofica.

Questa membranella anista, composta chimicamente da sostanze chitinose e proteiche, si inizia dalla valvola cardiaca, probabilmente elaborata da alcune speciali cellule del mesenteron, o intestino medio, addossate al cardias, venendo a formare una specie di manicotto che avvolge il cibo accompagnandolo per tutto l'intestino medio e posteriore fino al retto ed impedendone quindi il contatto diretto con la delicata struttura rappresentata dallo epitelio intestinale.

La membrana peritrofica è liberamente permeabile ai succhi digestivi ed alla maggior parte dei prodotti della digestione e, permettendo ai soli materiali elaborati il contatto con l'epitelio, può paragonarsi ad un filtro che selezioni tra le varie sostanze solamente quelle che hanno subito una scissione completa o parziale.

Tra epitelio e membrana peritrofica esiste uno spazio occupato da materiale avviato a successive trasformazioni ed all'assorbimento.

La costituzione chimica della membrana peritrofica corrisponde essenzialmente a quella della cuticola esterna dell'insetto, prevalendo in essa sostanze chitinose, lipoidi e proteiche.

Il contenuto in lipoidi della membrana peritrofica ci spiega come, data la liposolubilità del DDT, non funzioni più come un filtro di protezione nei riguardi di tale sostanza tossica, ma ne assicuri invece un facile passaggio fino a raggiungere le cellule dell'epitelio intestinale.

La funzione secernente nell'intestino delle larve di Culicine è compiuta dai singoli elementi epiteliali e non da strutture ghiandolari differenziate come entità anatomiche.

La secrezione da parte di tali elementi epiteliali è del tipo mero-crino, caratterizzata cioè dal fatto che l'elemento cellulare per l'elaborazione del secreto utilizza una parte del suo citoplasma, appartenente alla regione distale, che riversa poi all'esterno, mentre la regione basale con il nucleo rimane integra ed assicura la restitutio ad integrum della cellula.

A causa di questa funzione ghiandolare diffusa e del tipo particolare di secrezione, l'epitelio intestinale della larva offre un aspetto polimorfo variabile con le singole fasi della sua attività.

Si può porre una prima distinzione principale fra due tipi di cellule intestinali della larva: le cellule secretive e le cellule rigenerative.

Le cellule secretive sono deputate alla secrezione ed all'assorbimento; rappresentano la maggioranza degli elementi epiteliali; sono di forma cubica o cilindrica, poggiano su una membrana basale e presentano alla superficie libera un orletto a spazzola caratteristico.

Accanto alle cellule secernenti si trovano le cellule rigenerative, destinate a sostituire le prime man mano che si esauriscono in seguito alla secrezione; sono elementi più piccoli dei precedenti, a scarso citoplasma, nucleo piccolo, intensamente colorato, situati negli interstizi fra le cellule secretive, verso la regione basale, addossate alla membrana propria.

Nell'intestino di larve di Culicine queste cellule rigenerative non si raccolgono in gruppi o nidi ben differenziati ma si trovano distribuite isolatamente o riunite in due o tre elementi (fig. 2).

Riguardo alle cellule secernenti esistono differenze di aspetto tra la regione anteriore e quella posteriore dell'intestino medio.

Le cellule della regione anteriore sono rappresentate da elementi piuttosto voluminosi, di forma cubica. Il nucleo, grande, rotondo, situato nella regione basale, ha un reticolo cromatinico a larghe maglie. Il citoplasma di questi elementi è chiaro e può distinguersi in due zone: la zona distale, verso la superficie libera, appare finemente granulosa, mentre la regione basale mostra una striatura appena percepibile. Queste cellule non contengono vacuoli nè granuli di pigmento. La superficie libera è provvista di fini ciglia vibratili, agglutinate da una sostanza cementante interstiziale, che costituiscono l'orletto a spazzola caratteristico e che si segue in tutta la superficie dell'epitelio intestinale (fig. 2).

Si ammette che la funzione di questi elementi chiari consista nell'assorbimento di acqua dal materiale alimentare appena introdotto nell'intestino per evitare una eccessiva diluizione degli enzimi digestivi nei segmenti successivi. Confermerebbe questa ipotesi la completa assenza di vacuoli e di granuli di secrezione e l'aspetto come rigonfiato che offrono queste cellule.

La morfologia degli elementi epiteliali cambia nettamente avvicinandosi alla regione posteriore dell'intestino medio, dove le varie funzioni legate all'attività digestiva imprimono alla cellula una fisionomia affatto caratteristica.

In questa regione intestinale l'epitelio è composto di elementi cubici o cilindrici, meno voluminosi delle cellule anteriori; il nucleo rotondeggiante è più ricco di cromatina. Il citoplasma non è chiaro ma più intensamente colorato e ciò per la presenza di finissimi granuli fittamente stipati soprattutto nella regione perinucleare e distale. Oltre ai granuli è caratteristica la presenza di vacuoli; vacuoli di varia grandezza, che cominciano a notarsi nella regione mediana sotto forma di piccolissime areole appena percepibili e che divengono più evidenti e più voluminose nella regione distale fino a che la cellula assume un aspetto più o meno fittamente areolato. Per la presenza dei granuli e dei vacuoli il nucleo è in alcuni elementi spostato nella parte più basale della cellula.

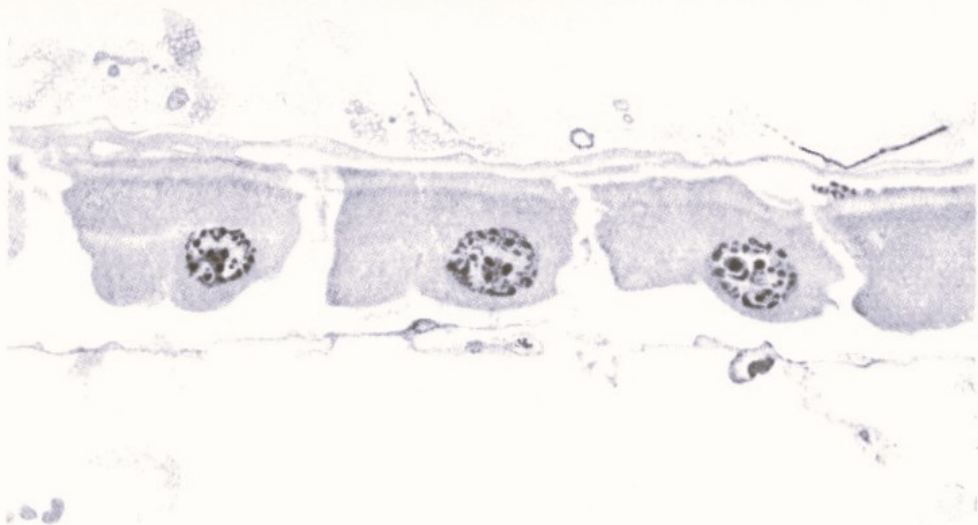


Fig. 2. — Larva di *Culex* normale. - Epitelio della regione anteriore dell'intestino medio (X 280).

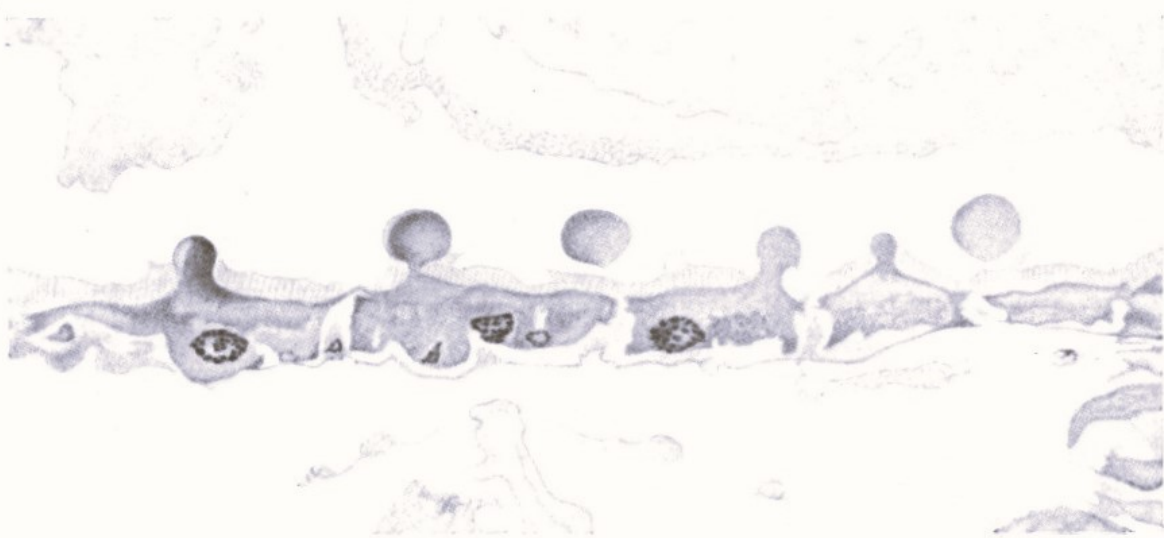


Fig. 3. — Larva di *Culex* normale. - Epitelio della regione posteriore dell'intestino medio. Le secrezioni abbandonano la cellula sotto forma di estroflessioni ed appendici. La forma degli elementi epiteliali rimane inalterata (X 280).

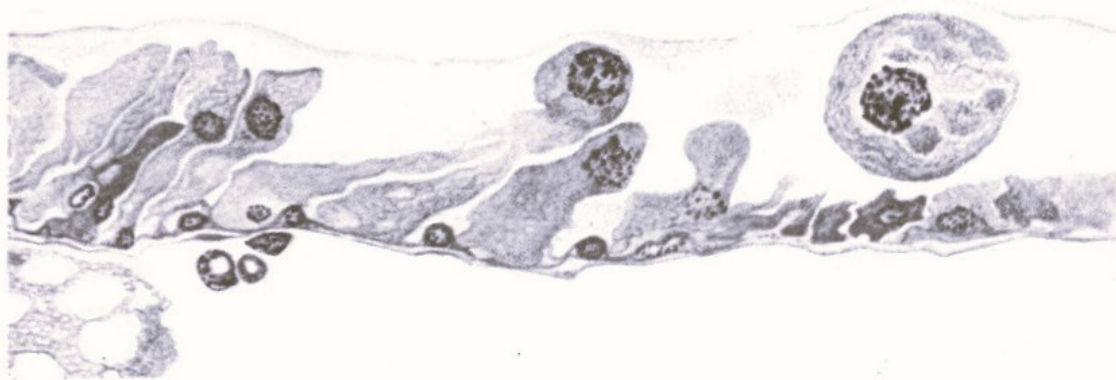


Fig. 4. — Larva di *Culex* trattata con DDT. - Epitelio della regione posteriore dell'intestino medio. Le cellule sono allungate; il citoplasma ed il nucleo si raccolgono nella regione distale dell'elemento, mentre la regione basale si riduce ad un esile peduncolo. In una fase successiva l'estremità ingrossata si distacca definitivamente dall'elemento originario (X 280).

Granuli e vacuoli sono l'espressione morfologica della funzione secretoria di questi elementi; dapprima scarsi e minuti divengono successivamente più abbondanti e confluiscono in formazioni più voluminose man mano che la cellula aumenta la sua attività, fino a che vengono riversati nel lume intestinale.

Le modalità con cui questi materiali enzimatici abbandonano la cellula sono variabili: o può determinarsi il distacco completo di tutta la regione distale della cellula che viene così espulsa massivamente, o invece, il materiale granulare e vacuolare, facendosi strada fra le ciglia dell'orletto a spazzola, raggiunge la superficie libera sotto forma di estroflessioni a tipo di clava, estroflessioni che aumentano progressivamente di volume fino a che si distaccano definitivamente liberandosi nel lume intestinale (fig. 3).

Queste diverse possibilità possono alternarsi o esistere contemporaneamente.

Passiamo ora a descrivere l'epitelio intestinale di larve di *Culex* sottoposte a trattamento con DDT e fissate subito dopo la morte per evitare alterazioni post-mortali.

Per seguire i fenomeni con completezza si sono studiate le cellule in sezioni seriate. Le sezioni sono state colorate con ematossilina ed eosina.

La differenza istologica fra cellule del tratto anteriore e cellule del tratto posteriore dell'intestino medio appare ancora più evidente, in quanto mentre gli elementi del primo tratto hanno conservato gli stessi caratteri già descritti in quelle normali, le cellule del secondo tratto si presentano notevolmente modificate.

Gli elementi epiteliali anteriori, chiari, voluminosi, privi di granuli, con nucleo grosso e rotondo sono rimasti indifferenti di fronte ad una sostanza che mostra invece un'azione dannosa per il protoplasma, come documentano le modificazioni indotte sull'epitelio posteriore.

Questo fatto potrebbe confermare l'ipotesi che la funzione delle cellule anteriori consista nell'assorbimento dell'acqua mentre gli altri materiali alimentar vengono elaborati dalle cellule più distali.

Alterazioni si riscontrano, al contrario, nella regione posteriore del mesenteron.

La funzione secernente è notevolmente esaltata. I granuli ed i vacuoli sono più fitti e numerosi; confluiscono tra di loro in unità più voluminose che occupano la maggior parte del citoplasma e finiscono con il deformare la cellula.

Accanto a questi aspetti che non rappresentano in fondo che l'esagerazione di fenomeni normali si aggiungono modificazioni della struttura cellulare di significato strettamente patologico.

Mentre nell'epitelio di larve ad alimentazione normale il processo di secrezione decorre senza che la struttura e la conformazione cellulare risultino alterate, conservando inalterate le dimensioni, la forma ed i rapporti, nelle larve trattate con DDT le cellule si presentano notevolmente modificate.

Ciò che è caratteristico è la forma variabilissima che assume ciascun elemento: la modificazione principale è caratterizzata da un eccessivo allungamento delle cellule epiteliali le quali non si presentano di forma cubica o cilindrica ma con aspetto del tutto irregolare.

Osservando minutamente l'epitelio si sorprendono le varie fasi che conducono alla deformazione cellulare; in un primo tempo si determina un allungamento della regione distale della cellula che sporge verso il lume intestinale, successivamente tutto il protoplasma segue questa estroflessione fino a che in definitiva rimane un sottile lembo cellulare ancora in rapporto con la membrana basale mentre la maggior parte del citoplasma ed il nucleo sono contenuti nella regione estroflessa.

La cellula viene perciò ad assumere in definitiva un aspetto piriforme con peduncolo in alcuni casi molto sottile ed estremità ingrossata costituita dalla maggior parte del citoplasma e dal nucleo (fig. 4).

In una fase successiva la regione ingrossata, e perciò anche il nucleo, si distacca completamente dall'esile colletto e si libera nel lume intestinale dove successivamente si dissolve.

In alcuni elementi il protoplasma si dissolve in situ.

La profonda deformazione cellulare e la partecipazione del nucleo ad un processo difensivo che conduce in ultimo alla dissoluzione cellulare indicano l'esistenza di una intensa azione tossica di fronte alla quale la cellula si difende con un meccanismo abnorme che conduce alla sua distruzione.

Roma. — Istituto Superiore di Sanità, Laboratorio di Parassitologia.
Novembre 1948.

BIBLIOGRAFIA

- CHRISTOPHERS S. R., «The Anatomy and Histology of the adult female mosquito».
GENNA M., «Ricerche sulla nutrizione dell'*Anopheles Claviger* q. Archivio Zoologico, 10, 15-34 (1921).
THOMPSON M., «Alimentary canal of the mosquito» Proceeding of the Boston Soc. Nat. Hist., 32, 145-202 (1905).
VEROLINI F., «Sul meccanismo di azione del DDT sulle larve di Culicine», Rivista di Parassitologia, 9, 31-37 (1948).
WIGGLESWORTH V. B., «Insect Physiology» Methuen & Co. Ltd, London (1934).
WIGGLESWORTH V. B., «The principles of insect physiology», Methuen & Co. Ltd., London (1947).
-