

---

ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI  
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

# RENDICONTI

---

MICHELA D'ISTRIA, VIRGILIO BOTTE, GIOVANNI CHIEFFI

**La regolazione ormonale dei caratteri sessuali  
secondari degli anfi anuri. Azione del propionato di  
testosterone sulla callosità del pollice di maschi  
adulti castrati di *Rana esculenta***

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,  
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 50 (1971), n.2, p. 205–210.*  
Accademia Nazionale dei Lincei

[http://www.bdim.eu/item?id=RLINA\\_1971\\_8\\_50\\_2\\_205\\_0](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1971_8_50_2_205_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/>



### SEZIONE III

(Botanica, zoologia, fisiologia e patologia)

**Endocrinologia.** — *La regolazione ormonale dei caratteri sessuali secondari degli anfibii anuri. Azione del propionato di testosterone sulla callosità del pollice di maschi adulti castrati di Rana esculenta* (\*). Nota di MICHELA D'ISTRIA, VIRGILIO BOTTE e GIOVANNI CHIEFFI, presentata (\*\*) dal Socio G. MONTALENTI.

SUMMARY. — The thumb pads of *Rana esculenta* regress in adult males following castration. Administration of small amounts of testosterone propionate (50 µg total dose) in the castrates induces hypertrophy in both epidermal and glandular layers. In addition there is accumulation of PAS-positive secretion in the cytoplasm of glandular cells of treated castrates.

The mechanism of action of testosterone is similar to that known for mammalian target organs; hormonal administration in castrates causes an increase in RNA content and metabolism. The protein content of thumb pads is also increased in these animals.

These results indicate that testosterone is implied in the hormonal regulation of thumb pads in the Amphibians.

La callosità del pollice è un carattere sessuale secondario tipico del maschio di alcuni anfibii anuri. Essa riveste la superficie ventrale del pollice ed è costituita da un'epidermide corneificata e da uno strato di grosse ghiandole acinose semplici dislocate nel derma sottostante. Le cellule ghiandolari sono voluminose, con nucleo spostato verso la membrana basale e citoplasma infarcito di granuli di secreto.

Un complesso di ricerche sperimentali ha messo in evidenza che l'asportazione dell'ipofisi o delle gonadi determina l'atrofia della callosità del pollice; mentre la somministrazione di estratti testicolari o il trapianto di testicoli è sufficiente ad impedire negli animali castrati gli effetti di questa operazione sulla callosità (Takahashi, 1923; Aron, 1926; Harms, 1926; Christensen, 1931; Berk, 1939; Horie, 1939; Gallien, 1940; Sluiter *et al.*, 1950). Inoltre, il maggior sviluppo della callosità si osserva, durante il ciclo sessuale, quando appare più intensa l'attività del tessuto interstiziale del testicolo (Lofts, 1964; Botte, 1964).

Queste osservazioni stanno, quindi, a indicare che lo sviluppo della callosità del pollice è sotto il controllo della secrezione endocrina del testicolo. Gli androgeni, infatti, stimolano lo sviluppo di questa struttura negli anuri.

(\*) Lavoro eseguito presso la II Cattedra di Anatomia Comparata, Facoltà di Scienze dell'Università di Napoli con un contributo del Consiglio Nazionale delle Ricerche.

(\*\*) Nella seduta del 20 febbraio 1971.

da poco metamorfosati (Horie, 1939). Ormoni steroidi, inoltre, sono stati identificati negli estratti testicolari dell'anfibio anuro *Bufo vulgaris* (Chieffi e Lupo, 1961).

È sembrato interessante, perciò, stabilire se il testosterone possa essere l'ormone implicato nella regolazione della callosità del pollice nell'animale adulto. I risultati degli esperimenti qui riportati indicano che questo ormone, anche in dosi relativamente basse, è in grado di stimolare lo sviluppo della callosità nei maschi adulti castrati.

#### MATERIALE E METODI

Maschi adulti di *Rana esculenta* sono stati catturati nei dintorni di Napoli nel settembre del 1970. Dopo una settimana di cattività venivano castrati, tenuti in vasca per almeno sei settimane prima del trattamento sperimentale ed alimentati una volta alla settimana con fegato bovino. Gli animali venivano quindi riuniti in gruppi di 50 e trattati: alcuni gruppi con 12,5 µg di propionato di testosterone sciolti in 100 µl di olio di mandorle ogni tre giorni per un totale di 4 somministrazioni (intramuscolari); altri gruppi con il solo solvente. Due giorni dopo l'ultima somministrazione di ormone, a tutti gli animali erano inoculati 100 µCi di uridina- $H^3$  (uridina-5T, Amersham: a.s. 27600 mCi/mM) in 100 µl di soluzione fisiologica per anfibi, per via endoperitoneale. Due ore dopo tale inoculazione gli animali venivano sacrificati, previa anestesia in etere, e da essi si prelevavano il fegato e le callosità del pollice. Alcune callosità venivano fissate in Bouin e sezionate per l'esame istologico ed istochimico (colorazione con l'ematosilina-eosina, con il PAS e l'Alcian). Per le determinazioni biochimiche si riunivano pezzi di fegato e le callosità di almeno sei animali. I tessuti venivano pesati ed omogeneizzati in buffer ac. acetico-acetato di sodio 0,01M pH5, contenente 4 µg/ml di polivinil solfato (a).

Su parte di questo omogenato, previo allontanamento dei detriti di tessuto mediante breve centrifugazione a basso numero di giri, venivano determinati il contenuto di DNA (reazione alla difenilammina di Diske, 1955) e le proteine (metodo di Lowry *et al.*, 1951, usando l'albumina serica di cavallo come standard).

La restante parte dell'omogenato, previa aggiunta di sodio lauril solfato nella concentrazione dello 0,5 %, veniva trattata con eguale volume di fenolo all'88 % per tre volte; la prima a 60° per 5 minuti, le successive a temperatura ambiente. L'RNA sciolto nella fase acquosa veniva precipitato con 2 volumi di alcool etilico assoluto contenente 0,1 volume di NaCl 0,1 N, a -20° per una notte. L'RNA era quindi raccolto mediante centrifugazione e lavato almeno due volte con alcool. Allontanato l'alcool, l'RNA era sciolto nel buffer (a). Da questa soluzione si operava un prelievo di 0,5 ml, che portato a secco veniva contato, previa aggiunta di 10 ml di liquido scintillatore (POP 15 % e POPOP 5 % in toluolo), per il contenuto in  $H^3$  in uno spettrometro Packard (Serie 4320).

La restante parte veniva digerita con DNAsi (SIGMA) a 37°C per 30 minuti (5 µg di enzima/ml) e l'RNA veniva riestratto con fenolo, come indicato sopra. L'RNA, ripreso nel buffer (a) era valutato mediante assorbimento all'UV e la reazione all'orcinolo.

## RISULTATI

### a) *Azione del propionato di testosterone sulle caratteristiche morfologiche della callosità del pollice.*

La callosità del pollice si presenta, nel periodo di massimo sviluppo, costituita di un epidermide pluristratificata ricoperta da uno strato corneo. Nel derma sottostante si osservano numerose ghiandole acinose, le cui cellule sono infarcite di granuli di secreto PAS-positivi, che vengono riversati nel lume ghiandolare (Tav. I, fig. 1).

Negli animali tenuti in cattività per circa due mesi si nota un'atrofia sia dell'epidermide che delle ghiandole (Tav. I, fig. 2). Tale processo involutivo è ancora più marcato negli animali castrati. Nello strato epidermico si presenta ridotta soprattutto la parte corneificata; le ghiandole si riducono di diametro e le loro cellule divengono molto basse con scarsissimo citoplasma, privo di granuli di secreto (Tav. I, fig. 3).

TABELLA I.

*Azione del propionato di testosterone sulla callosità del pollice di maschi adulti castrati di Rana esculenta.*

|                                | Spessore dello strato epidermico (in microns) (*) | Altezza delle cellule ghiandolari (in microns) (*) |
|--------------------------------|---|--|
| Castrati . . . . .             | 65,50 ± 1,25                                      | 17,50 ± 0,67                                       |
| Trattati (**). . . . .         | 91,75 ± 1,03 (***)                                | 40,60 ± 0,98 (***)                                 |
| Controlli (in cattività) . . . | 55,96 ± 0,67                                      | 24,00 ± 0,67                                       |

(\*) Media di almeno 50 misurazioni ± l'errore standard.

(\*\*) Trattati con 12,5 µg di propionato di testosterone ogni tre giorni. Dose totale: 50 µg.

(\*\*\*) Differenza significativa rispetto ai castrati (P < 0,01).

La somministrazione cronica del propionato di testosterone determina un significativo ispessimento dello strato epidermico (P < 0,01) con aumento degli strati cornei, un'ipertrofia delle cellule ghiandolari (P < 0,01), che si presentano infarcite di granuli di secreto (Tabella I). Il secreto è anche accumulato nel lume delle ghiandole. Le reazioni istochimiche indicano che esso è di natura mucopolisaccaridica e contiene mucopolisaccaridi neutri. Infatti è positivo alla colorazione con il PAS, ma negativo all'Alcian (Tav. I, fig. 4).

b) *Azione del propionato di testosterone sul contenuto di DNA, RNA e proteine della callosità del pollice.*

Nella Tabella II sono indicati i risultati della somministrazione dell'ormone negli animali castrati sul contenuto di DNA, RNA e proteine della callosità del pollice e del fegato.

TABELLA II.

*Azione del propionato di testosterone sul contenuto in DNA, RNA e proteine della callosità del pollice e del fegato di maschi adulti castrati di Rana esculenta. I valori sono espressi in  $\mu\text{g}$  per mg di peso fresco.*

|                     | DNA (*)         | RNA (*)                 | Proteine (*)          |
|---------------------|-----------------|-------------------------|-----------------------|
| <i>Callosità:</i>   |                 |                         |                       |
| controlli . . . . . | 2,33 $\pm$ 0,04 | 71,60 $\pm$ 8,40        | 63,35 $\pm$ 3,60      |
| trattati . . . . .  | 2,48 $\pm$ 0,03 | 114,90 $\pm$ 22,90 (**) | 81,87 $\pm$ 2,04 (**) |
| <i>Fegato:</i>      |                 |                         |                       |
| controlli . . . . . | 3,46 $\pm$ 1,40 | 765,00 $\pm$ 97,00      | 115,39 $\pm$ 9,30     |
| trattati . . . . .  | 4,52 $\pm$ 0,45 | 651,00 $\pm$ 151,00     | 98,34 $\pm$ 13,00     |

(\*) Media di tre osservazioni  $\pm$  l'errore standard.

(\*\*) Differenza significativa rispetto ai controlli ( $P < 0,01$ ).

Il contenuto di DNA, RNA e proteine non si modifica nel fegato in seguito al trattamento ormonale. Nella callosità, invece, aumentano significativamente nei trattati sia l'RNA che le proteine, mentre nessuna modificazione significativa è apprezzabile per il DNA.

TABELLA III.

*Azione del propionato di testosterone sull'incorporazione dell'uridina- $\text{H}^3$  nell'RNA della callosità del pollice e del fegato di maschi adulti castrati di Rana esculenta.*

|                     | Callosità del pollice | Fegato         |
|---------------------|-----------------------|----------------|
| Controlli . . . . . | 653 $\pm$ 50 (*)      | 1072 $\pm$ 110 |
| Trattati . . . . .  | 3538 $\pm$ 752        | 1509 $\pm$ 896 |

(\*) Espressi in cpm/gr di peso fresco. Lo spettrometro Tricarb aveva una efficienza del 52% per il tritio.

La somministrazione ormonale determina un aumento significativo dell'incorporazione dell'uridina- $H^3$  nell'RNA estratto dalla callosità; nessun effetto è, invece, osservato a carico dell'RNA del fegato (Tabella III).

#### DISCUSSIONE

Le modificazioni, conseguenti alla castrazione, della callosità del pollice di maschi adulti di *Rana esculenta* sono caratterizzate da atrofia dello strato epidermico e delle ghiandole le cui cellule divengono basse e del tutto prive di granuli di secreto.

Tali effetti sono eliminati dalla somministrazione del propionato di testosterone nei castrati. Quest'ormone induce un ispessimento dello strato corneo dell'epidermide e la ipertrofia delle cellule ghiandolari che appaiono di nuovo infarcite di granuli di secreto. Ad un primo esame, utilizzando prove istochimiche, il secreto sembra essere formato di mucine del tipo neutro, in quanto positive al PAS e negative all'Alcian.

Che il testosterone possa essere implicato nella regolazione ormonale della callosità è sostenuto anche dai risultati delle prove biochimiche. Negli animali castrati, alla somministrazione cronica dell'ormone segue un aumento della sintesi dell'RNA e della incorporazione in esso dell'uridina marcata nella callosità, mentre nessun effetto è riscontrabile nel fegato. Anche le proteine solubili appaiono aumentate, mentre, almeno nelle condizioni sperimentali usate, non appare modificato il contenuto del DNA.

I risultati riportati convalidano quanto da noi già osservato in precedenza (dati non pubblicati). La somministrazione di una singola dose di 50  $\mu$ g di propionato di testosterone, infatti, induce un aumento dell'incorporazione di uridina marcata nell'RNA della callosità dopo circa 12 ore dal trattamento ormonale, a cui fa seguito, tra la 16<sup>ma</sup> e la 40<sup>ma</sup> ora anche un incremento significativo del contenuto in DNA e proteine.

Le modificazioni indotte dall'ormone sul contenuto di RNA e proteine presentano un andamento molto simile a quello osservato negli organi bersaglio per gli steroidi dei mammiferi (Liao e Fang, 1969). Tuttavia negli estratti di testicoli di anfibii anuri sono stati identificati il progesterone e gli estrogeni, ma non testosterone (Chieffi e Lupo, 1961). Il testicolo è in grado, però, di operare *in vitro* la biosintesi del testosterone a partire dal pregnenolone (Dale e Dorfman, 1967, in *Rana catesbiana*; Kirby, 1970, in *Rana pipiens*).

La ulteriore dimostrazione che il testosterone è l'ormone regolatore della callosità del pollice potrà venire dallo studio delle correlazioni tra sintesi dell'ormone o sua presenza nel sangue e ciclo della callosità durante la riproduzione. Le osservazioni di Lofts (1964) in *Rana esculenta* sembrano indicare che lo sviluppo di questo carattere sessuale secondario avviene quando nelle cellule interstiziali del testicolo si notano i segni istochimici di una aumentata sintesi ormonale (riduzione del contenuto in colesterolo); ma, naturalmente, tale metodo non dà alcuna indicazione circa il tipo di ormone steroide secreto.

È interessante ricordare, infine, che anche la cattività causa una certa atrofia della callosità. Ciò potrebbe dipendere da una insufficienza ipofisaria che si ripercuote sull'attività endocrina del testicolo. Infatti, recentemente, è stato messo in evidenza che la cattività provoca la degranolazione delle cellule gonadotrope dell'ipofisi (Rastogi e Chieffi, 1970).

#### BIBLIOGRAFIA

- ARON M., « Arch. Biol. Paris », 36, 3 (1926).  
 BERK L., « S. African J. Med. Sci. », 4, 47 (1939).  
 BOTTE V., « Atti Soc. Pelorit. Sci. fis. mat. nat. », 10, 521 (1964).  
 CHIEFFI G. e LUPO C., « Atti Acc. Naz. Lincei, Rc. », 30, 399 (1961).  
 CHRISTENSEN K., « Anat. Record », 48, 241 (1931).  
 DALE E. e DORFMAN R., « Gen. comp. Endocrinol. », 9, 313 (1967).  
 DISCHE Z., In: E. CHARGAFF e J. N. DAVIDSON, Eds « The Nucleic Acids », Vol. 1, p. 285 (1955).  
 GALLIEN L., « Bull. Biol. France et Belg. », 74, 1 (1940).  
 HARMS J. W., « Körper und Keinsellen », Springer, Berlin 1926.  
 HORIE H., « Proc. Imp. Acad. (Tokyo) », 15, 362 (1939).  
 KIRBY A. C., « Comp. Biochem. Physiol. », 34, 237 (1970).  
 LIAO S. e FANG S., « Vit. Hormon. », 27, 17-90 (1969).  
 LOFTS B., « Gen. comp. Endocrinol. », 4, 550 (1964).  
 LOWRY O. H., ROSEBROUGH N. J., FARR A. L. e RANDALL R. J., « J. Biol. Chem. », 193, 265 (1951).  
 RASTOGI K. e CHIEFFI G., « Gen. comp. Endocrinol. », 15, 488 (1970).  
 SLUITER J. W., VAN OORDT G. J. e MIGHROST J. C. A., « Quart. J. Microscop. Sci. », 91, 131 (1950).  
 TAKAHASHI N., « Endocrinology », 7, 302 (1923).

#### SPIEGAZIONE DELLA TAVOLA I

- Fig. 1. - Sezione di callosità del pollice di *Rana esculenta*, maschio adulto, sacrificato subito dopo la cattura. Colorazione ematossilina-eosina. 135×.
- Fig. 2. - Sezione di callosità del pollice di maschio adulto, allevato per circa due mesi in cattività. Notare l'atrofia dell'epitelio ghiandolare. Colorazione ematossilina-eosina. 192×.
- Fig. 3. - Sezione di callosità del pollice di maschio adulto castrato da sei settimane. Notare la notevole atrofia dell'epitelio ghiandolare. Colorazione ematossilina-eosina. 153×.
- Fig. 4. - Sezione di callosità del pollice di maschio adulto castrato, trattato con 50 µg (dose totale) di propionato di testosterone. Notare l'ipertrofia delle cellule ghiandolari, ricche di secreto, abbondante anche nel lume della ghiandola. Colorazione ematossilina-eosina. 153×.

