
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

FRANCESCO ZACCANTI

**Osservazioni autoradiografiche sopra gonadi larvali di
Rana latastei in inversione sessuale indotta mediante
testosteronee bloccata mediante actinomicina**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 57 (1974), n.3-4, p.
247-254.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1974_8_57_3-4_247_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)

Zoologia. — *Osservazioni autoradiografiche sopra gonadi larvali di Rana latastei in inversione sessuale indotta mediante testosterone e bloccata mediante actinomicina* (*). Nota (**) di FRANCESCO ZACCANTI, presentata dal Socio P. PASQUINI.

SUMMARY. — Tadpoles of a sexually undifferentiated race of *Rana latastei* were injected with a testosterone oil-solution. After six weeks a group of testosterone treated animals was injected with an actinomycin D water solution. Finally, after eight weeks, treated and control animals were killed a day after the injection of a ^3H -uridine water-solution.

In control specimens the gonads preserved their typical ovarian structure; in testosterone treated specimens a sex reversal was constantly induced; in specimens treated with testosterone plus actinomycin D the medullo-stimulating effect of testosterone was suppressed.

By means of autoradiographic studies after ^3H -uridine incorporation the testosterone target-cells have been identified in the extragonadic interrenal region; firstly these activated cells strongly increase the RNA-neosynthesis, and successively they begin to descend towards the ovaries along their mesogonia, so operating their sex reversal. These two steps of the testosterone-induced masculinization were disconnected by the pulse administration of actinomycin D.

La presente ricerca vuole essere un ulteriore contributo allo studio del differenziamento sessuale degli Anfibi, e in particolare degli effetti di somministrazioni sperimentali di testosterone sul differenziamento delle gonadi in *Rana*.

Vannini e Stagni (1967, 1968, 1971, 1972) in seguito a ricerche su girini di una razza sessualmente indifferenziata di *Rana dalmatina* trattati con testosterone associato ad inibitori delle sintesi proteiche quali l'actinomicina D e la puomicina, hanno dimostrato due differenti effetti dell'ormone sulle gonadi: un effetto antiovogenetico e un effetto medullostimolatore e pertanto masculinizzante. Soltanto questo secondo effetto viene bloccato in seguito a somministrazioni subletali di actinomicina D.

Questi risultati sono stati inquadrati nell'ipotesi secondo la quale il testosterone agisce sulla morfogenesi delle gonadi dereprimendo fattori genici responsabili del differenziamento in senso maschile, presenti in ambedue i sessi, definitivamente repressi nei genotipi femminili, momentaneamente repressi nei genotipi maschili durante la fase sessualmente indifferenziata di tipo femminile che caratterizza la gonadogenesi nella razza di *Rana dalmatina* studiata.

Risultati ottenuti mediante studio di inversioni sessuali molto iniziali indotte in *Rana esculenta* con testosterone hanno permesso di confermare i

(*) Indagini eseguite nell'Istituto di Zoologia dell'Università di Bologna, diretto dal prof. Enrico Vannini, con una sovvenzione del C.N.R.

(**) Pervenuta all'Accademia il 1° settembre 1974.

due differenti effetti del testosterone anche attraverso osservazioni autoradiografiche sulle differenze di incorporazione di uridina triziata negli animali trattati e in quelli normali. L'effetto antiovogenetico del testosterone è rilevabile sotto forma di un brusco decremento delle sintesi di RNA nei nuclei degli ovociti diplotenici, mentre l'effetto mascolinizzante si manifesta inizialmente in cellule extragonadiche del blastema interrenale, che presentano un netto incremento delle sintesi di RNA. Queste cellule, bersaglio del testosterone, sono state considerate come possibili medulloblasti che, migrando nella gonade, danno origine alla *medulla* mascolinizzante (Zaccanti, 1974).

Il differenziamento delle gonadi in senso maschile come effetto di somministrazioni sperimentali di testosterone, si manifesta inizialmente con la formazione di nuova *medulla* gonadica, la cui origine non è accompagnata da significativi incrementi di quadri mitotici a carico di cellule somatiche della gonade o di vicine sedi extragonadiche. La *medulla* neoformata è dotata di attività mascolinizzante presumibilmente mediata dalla sintesi e dalla diffusione di una sostanza capace di indurre le cellule germinali a comportarsi da spermatogoni; in altre parole all'attivazione delle cellule somatiche midollari dovrebbe corrispondere un incremento della loro attività di sintesi delle diverse categorie di RNA responsabili della sintesi proteica.

Ciò premesso, allo scopo di ottenere ulteriori informazioni sui meccanismi di formazione di nuova *medulla* gonadica mascolinizzante in dipendenza di somministrazioni sperimentali di testosterone a girini di *Rana*, è stato impiegato nella recente ricerca un precursore radioattivo dell'RNA, l'uridina triziata, è ciò nell'intento di riconoscere le cellule bersaglio dell'ormone nelle loro sedi extragonadiche; infatti è noto che le sintesi di RNA messaggeri indotte dagli ormoni steroidi sono normalmente congiunte a importanti sintesi di RNA ribosomici (Tata, 1970; Williams-Ashman e Reddi, 1972), e pertanto facilmente riconoscibili nei preparati istologici. Nell'ipotesi poi che le localizzazioni delle cellule bersaglio del testosterone si fossero dimostrate possibili, si è cercato di bloccare almeno parzialmente il reclutamento e la migrazione di tali cellule nella gonade, mediante impiego di actinomicina D, somministrando questo antibiotico unitamente al testosterone, analogamente a quanto fatto da Vannini e Stagni nelle suddette occasioni.

MATERIALE E METODI

Girini di *Rana latastei* sviluppati in laboratorio da ovature raccolte in località « Punte Alberete » (Ravenna), ad uno stadio di sviluppo paragonabile a quello dello stadio 45 delle tavole di Cambar e Marrot (1954) per la *Rana dalmatina*, sono stati raggruppati in due diversi lotti, l'uno dei quali numericamente doppio dell'altro. Ai girini del gruppo più numeroso sono stati somministrati per iniezione intraperitoneale 0,01 ml. di una soluzione oleosa di testosterone, pari a 10 µg. di ormone per animale (T). Ai girini dell'altro gruppo sono stati iniettati 0,01 ml. di olio solvente (C). Gli animali dei due gruppi sono stati parallelamente allevati fino alla sesta settimana dall'inizio del trattamento, quando a metà degli animali trattati con testosterone sono stati iniettati 0,01 ml. di una soluzione acquosa di actinomicina D, pari a 0,85 µg. di antibiotico per animale (T+A).

Gli animali dei tre gruppi, C, T e T + A sono stati fissati in liquido di Sanfelice otto settimane dopo l'inizio del trattamento, e quindi due settimane dopo l'unica somministrazione di actinomicina D al gruppo T + A; 24 ore prima della fissazione, a tutti gli animali sono stati iniettati in sacca linfatica dorsale 0,01 ml di soluzione fisiologica di uridina triziata, pari a 10μ del precursore radioattivo dell'RNA per animale.

Dal materiale raccolto sono stati ottenuti preparati istologici a livello delle gonadi e dei mesoreni; per la visualizzazione delle marcature autoradiografiche dovute all'incorporazione di uridina triziata è stato impiegato il metodo dell'emulsione liquida secondo Belanger e Leblond (1946), modificato da Messier e Leblond (1957) e da Kopriwa e Leblond (1962), descritto da Monesi (1966). È stata impiegata emulsione Kodak con esposizione di 20 giorni e sviluppo di 30 secondi.

Sono state eseguite osservazioni dei preparati istologici, ricostruzioni dei corpi genitali e valutazioni quantitative del grado di marcatura autoradiografica delle cellule somatiche del blastema interrenale, del mesogonio e della medulla gonadica mediante conteggio dei granuli di argento su superfici note dei preparati autoradiografici. Il confronto tra i dati quantitativi ottenuti per i diversi gruppi di animali è stato fatto mediante impiego della «t» di Student.

OSSERVAZIONI

Le osservazioni microscopiche condotte sui preparati istologici ed autoradiografici forniscono tre diversi gruppi di risultati, in stretta relazione con i diversi gruppi di trattamento sperimentale.

Gli animali di controllo al momento della fissazione avevano raggiunto uno sviluppo comparabile con quello descritto per lo stadio 48 delle tavole di Cambar e Marrot su *Rana dalmatina*, stadio nel quale l'arto posteriore raggiunge una lunghezza pari a un terzo della coda. I quadri di sviluppo gonadico sono riferibili a quelli noti per le razze sessualmente indifferenziate delle rane rosse: sia nei maschi che nelle femmine si riscontrano gonadi ad aspetto ovarico, con elementi germinali nella *cortex* allo stadio di ovogoni, di ovociti agli stadi sinaptici della profase meiotica e di ovociti diplotenici in auxocitosi. I maschi genetici sono tuttavia distinguibili dalle femmine in quanto in essi lo sviluppo ovarico è meno spinto. Nelle femmine infatti la *cortex* è ricca di ovociti in secondo periodo di accrescimento ovocitario, corrispondente all'auxocitosi, mentre nei maschi genetici le cellule germinali si presentano in primo periodo di accrescimento ovocitario, che va dal leptotene al pachitene della prima divisione maturativa, e solo raramente raggiungono la fase di auxocitosi. In entrambi i sessi la *medulla* è fortemente regredita e scavata al centro.

Negli animali uccisi al termine del trattamento con testosterone sono riscontrabili i noti effetti di mascolinizzazione delle gonadi negli esemplari di genotipo femminile e l'anticipazione dell'inversione sessuale degli ovari nei genotipi maschili. La cavità ovarica si presenta ripiena di tessuto midollare attivo in quanto include cellule germinali con il valore di spermatogoni, e i cui elementi somatici sono in stretta continuità con il blastema interrenale attraverso il mesogonio particolarmente inspessito. Tale quadro suggerisce l'idea della provenienza del tessuto midollare gonadico dal contiguo blastema interrenale in seguito ad una migrazione attiva attraverso il mesogonio. A testimonianza della precedente condizione ovarica, accanto alle cellule germi-

nali con valore di spermatogoni in moltiplicazione, permangono ancora residui ovociti sinaptici e diplotenici che presentano netti quadri degenerativi. È da osservare infine che la mascolinizzazione delle gonadi appare più spinta nei maschi che nelle femmine.

I quadri descritti confermano l'effetto mascolinizzante del testosterone sulla gonade larvale di *Rana*, effetto ampiamente riportato in letteratura, per una rassegna della quale si veda Collenot (1966).

Negli animali sottoposti a un prolungato trattamento con testosterone al quale è stata sovrapposta la somministrazione di actinomicina D mediante un'unica iniezione a due settimane dalla fissazione, l'effetto mascolinizzante del testosterone non si manifesta. Le gonadi, sia nelle femmine che nei maschi genetici permangono nella condizione di tipo ovarico riscontrabile negli animali di controllo, sebbene si possano rilevare quadri degenerativi a carico degli ovociti. Tale risultato conferma quanto dimostrato da Vannini e Stagni, secondo i quali delle due azioni del testosterone soltanto quella mascolinizzante è bloccata dall'actinomicina D. Sembra opportuno sottolineare come un unico « polso » di actinomicina, somministrato con un ritardo di sei settimane rispetto al trattamento mascolinizzante abbia potuto quasi completamente bloccarlo.

I risultati relativi allo studio delle autoradiografie ottenute dai tre gruppi di preparati istologici precedentemente illustrati permettono una analisi più approfondita del processo di mascolinizzazione indotto dal testosterone.

Le osservazioni sono state rivolte alle incorporazioni di uridina triziata nelle cellule somatiche della gonade e nelle cellule del blastema interrenale localizzate lateroventralmente alla vena cava in prossimità delle radici dorsali dei mesogonii.

Una prima serie di osservazioni ha permesso di stabilire che in tutti gli animali, di controllo o diversamente trattati, le incorporazioni di uridina triziata erano costantemente più elevate nelle cellule del blastema interrenale che non nelle cellule somatiche della gonade. Confrontando poi le valutazioni quantitative della marcatura autoradiografica nei diversi gruppi di animali, è stato possibile osservare come le incorporazioni di uridina triziata fossero massime negli animali trattati con il solo testosterone, sia nelle cellule del blastema interrenale che nelle cellule somatiche della *medulla* gonadica. Negli animali trattati con testosterone e actinomicina D si riscontrava invece una forte marcatura delle cellule del blastema interrenale, mentre più scarsa era quella delle poche cellule somatiche della gonade. Infine la marcatura autoradiografica negli animali di controllo appariva scarsa sia nelle cellule del blastema interrenale, sia nelle cellule somatiche della gonade (fig. 1).

Il confronto statistico tra le medie degli indici di marcatura autoradiografica ottenuti mediante ripetuti conteggi dei granuli di argento su aree note delle diverse regioni, fornisce le seguenti indicazioni. Per le cellule del blastema interrenale gli indici di marcatura degli animali di controllo sono significativamente più bassi che per gli animali trattati con il solo testosterone o con testosterone più actinomicina D. Per gli animali trattati con testosterone gli indici di marcatura non presentano significative differenze rispetto a quelli ottenuti

per gli animali trattati con testosterone più actinomicina D, e sono significativamente più elevati di quelli ottenuti per gli animali di controllo.

Per quanto riguarda invece le cellule somatiche della gonade gli indici di marcatura autoradiografica ottenuti per gli animali di controllo e per quelli

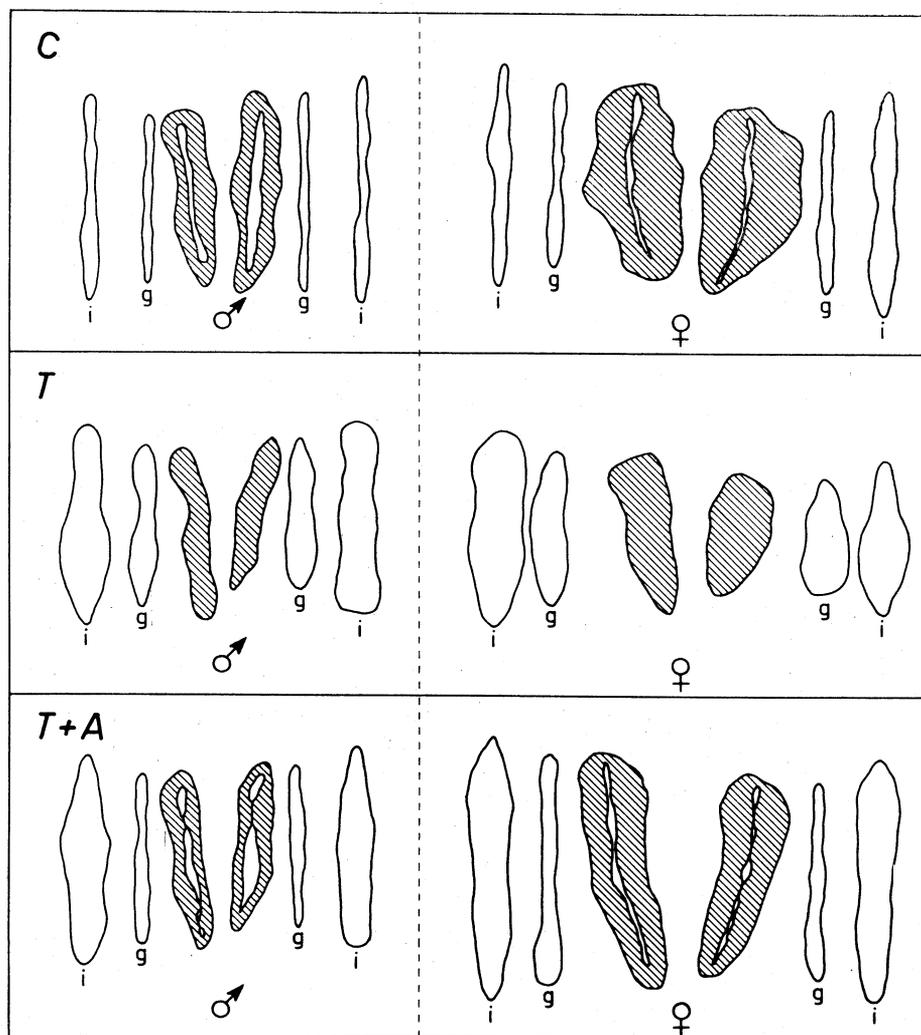


Fig. 1. - Ricostruzioni volumetriche delle gonadi (aree tratteggiate) e rappresentazioni quantitative della marcatura autoradiografica dovuta ad incorporazione di uridina triziata nel blastema interrenale (i) e nelle cellule somatiche della gonade (g) (aree bianche) in alcuni degli animali esaminati. C: maschio e femmina di controllo. T: maschio e femmina trattati con testosterone; T + A: maschio e femmina trattati con testosterone più actinomicina D.

trattati con testosterone più actinomicina D sono significativamente più bassi di quelli ottenuti per gli animali trattati con il solo testosterone, non essendovi invece significative differenze tra di loro (fig. 2).

È da rilevare che le notevoli marcature riscontrate negli animali trattati con actinomicina D sono da mettere in relazione con una ripresa delle sintesi di RNA dopo il relativamente lungo intervallo intercorso tra somministrazione dell'inibitore e fissazione degli animali.

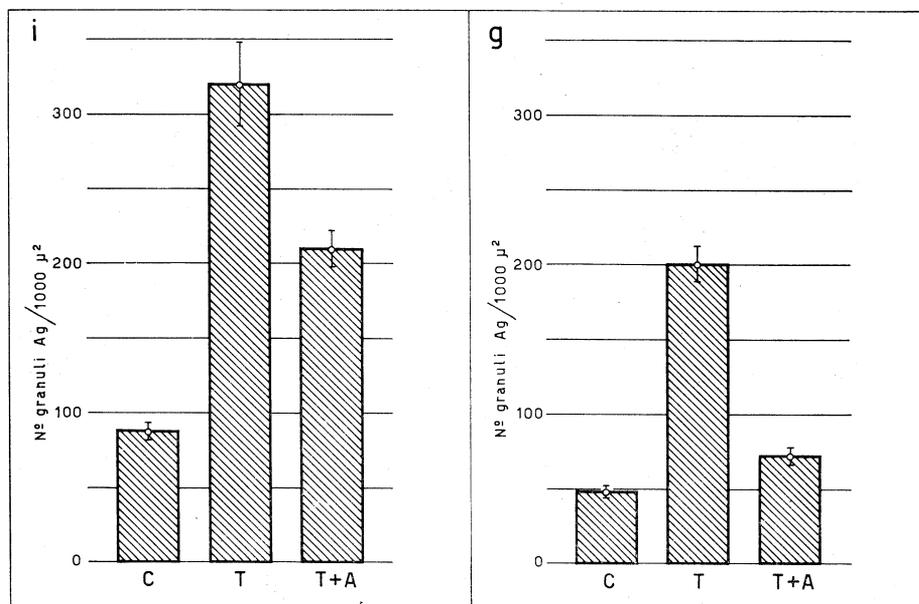


Fig. 2. - Confronto delle marcature autoradiografiche medie dovute ad incorporazione di uridina triziata in animali di controllo (C), trattati con testosterone (T) e trattati con testosterone e actinomicina D (T + A). A sinistra (i) sono rappresentati i risultati relativi alla marcatura delle cellule del blastema interrenale. A destra (g) sono rappresentati i risultati relativi alla marcatura delle cellule somatiche della gonade.

CONCLUSIONI

Le osservazioni su esposte, relative a preparati istologici e autoradiografici di gonadi larvali di *Rana latastei* trattate con testosterone e testosterone più actinomicina D, confermano che l'effetto mascolinizante del testosterone sulle gonadi è bloccabile in seguito a somministrazione di inibitori delle sintesi di RNA DNA-dipendenti, come l'actinomicina D e ciò in accordo con i succitati risultati di Vannini e Stagni.

Secondo la terminologia introdotta da Goldschmidt (1931), che distingue i differenziatori del sesso in differenziatori primari (i fattori genici di mascolinità e femminilità), in differenziatori secondari (la medullarina e la corticina di Witschi, 1929) e in differenziatori terziari, gli ormoni sessuali dell'adulto (il testosterone e l'estradiolo), appare lecito attribuire al testosterone un'azione sul differenziamento delle gonadi paragonabile a quella dei differenziatori primari, e cioè dei fattori genici di mascolinità, altrimenti repressi nei genotipi femminili e, nella razza sessualmente indifferenziata in esame, anche nei genotipi maschili durante la vita larvale.

L'ormone sessuale del maschio adulto, il testosterone, somministrato alle larve, scatena una serie di azioni che si traducono nella formazione di nuovo tessuto midollare gonadico. L'origine di tale tessuto, capace di mascolinizzare la cellule germinali, come già avevano visto mediante studi morfologici Vannini (1942) su *Rana* e Vannini e Busetto (1945) su *Bufo*, non è imputabile a processi moltiplicativi di cellule somatiche gonadiche, ma bensì ad una migrazione nella gonade di elementi somatici extragonadici appartenenti al blastema interrenale che penetrano nella gonade attraverso il mesogonio. Il reclutamento di tali cellule è confermato da osservazioni autoradiografiche su ovari larvali di *Rana esculenta* in inversione sessuale indotta con testosterone (Zaccanti, 1974) e dalle presenti osservazioni secondo le quali i primi effetti dell'azione mascolinizzante del testosterone sono riscontrabili a carico di cellule del blastema interrenale caratterizzate da un notevole incremento delle sintesi di RNA, rilevabili dalle massicce incorporazioni di uridina triziata. Queste cellule vengono qui ritenute i possibili bersagli del testosterone, che assumono il valore di medulloblasti e, una volta migrati nella gonade attraverso il mesogonio, vanno a formare il nuovo tessuto midollare mascolinizzante. L'attività della nuova *medulla* è paragonabile a quella dei differenziatori sessuali secondari, in quanto induce le cellule germinali inglobate a differenziarsi in spermatogoni.

Il procedimento impiegato nella presente ricerca, secondo il quale a sei settimane dall'inizio di un trattamento con testosterone in soluzione oleosa è stata somministrata una sola dose di actinomicina D, ha permesso di riscontrare all'ottava settimana di trattamento, e quindi due settimane dopo la somministrazione dell'antibiotico, il blocco pressoché completo del processo di mascolinizzazione della gonade. Precedentemente alla somministrazione della actinomicina D si era però già verificata l'attivazione delle cellule bersaglio del testosterone, o medulloblasti, nei quali, a due settimane dall'iniezione di actinomicina D, erano riprese intense sintesi di RNA, messe in evidenza dalle notevoli marcature autoradiografiche anche negli animali non mascolinizzati a causa della inibizione dell'effetto mascolinizzante del testosterone.

Questi fatti inducono a ritenere che il fenomeno di mascolinizzazione delle gonadi provocato dal testosterone sia articolato in più fasi, riassumibili nella attivazione dei medulloblasti, nella migrazione di questi all'interno delle gonadi, nella formazione di nuova *medulla* gonadica dotata di attività mascolinizzante sulle cellule germinali. La somministrazione di actinomicina D in un unico « polso » avrebbe bloccato la fase di migrazione dei medulloblasti precedentemente attivati dal testosterone.

Ricerche in corso sono volte al tentativo di individuare i momenti precedenti del processo di mascolinizzazione, verificando la loro eventuale sensibilità all'actinomicina.

Inoltre i risultati finora conseguiti forniscono indicazioni sulla probabile identità tra meccanismi chiamati in causa dalle somministrazioni sperimentali di testosterone e meccanismi che stanno alla base dei processi di mascolinizzazione spontanea durante il normale differenziamento sessuale delle gonadi negli Anfi Anuri.

BIBLIOGRAFIA

- BELANGER L. F. e LEBLOND C. P. (1946) - *A method for locating radioactive elements in tissues by covering histological sections with a photographic emulsion*, «Endocrinology», 30, 8-13.
- CAMBAR E. e MARROT B. (1954) - *Table chronologique du développement de la grenouille agile (Rana dalmatina)*, «Bull. Biol. France Belg.», 88, 168-177.
- COLLENOT A. (1965) - *Recherches comparatives sur l'inversion sexuelle par les hormones stéroïdes chez les Amphibiens*, «Mem. Soc. Zool. France», 33, 1-141.
- GOLDSCHMIDT R. (1931) - *Die sexuellen Zwischenstufen*, Berlin: J. Springer ed.
- KOPRIWA B. M. e Leblond C. P. (1962) - *Improvements in the coating technique of radioautography*, «J. Histochem. Cytochem.», 10, 269-284.
- MONESI V. (1966) - *L'autoradiografia con i precursori degli acidi nucleici e delle proteine*, «Riv. Istochimica», 13, 5-95.
- MESSIER B. e LEBLOND C. P. (1957) - *Preparation of coated radioautographs by dipping sections in fluid emulsion*, «Proc. Soc. Exp. Biol. Med.», 96, 7-10.
- TATA J. R. (1970) - *Regulation of protein synthesis by growth and developmental hormones*. In: Biochemical action of hormones, di G. Litwack, vol. I, 89-133. New York-London: Academic Press.
- VANNINI E. (1942) - *Sull'origine interrenale dei « cordoni della rete » e dei « corpi grassi » durante lo sviluppo delle gonadi e sulla partecipazione dell'interrenale ai processi di intersessualità giovanile nella Rana agilis*, «Atti R. Accad. Italia», 13, 731-787.
- VANNINI E. e Busetto I. (1945) - *Origine interrenale del tessuto midollare della gonade e sviluppo dell'organo di Bidder nel Bufo vulgaris e nel Bufo viridis*, «Atti Ist. Veneto Sc. Lett. Arti», 104, 631-680.
- VANNINI E. e STAGNI A. (1967) - *Repression by actinomycin D of testosterone induced sex reversal in Rana dalmatina tadpoles*, «Exptl. Cell. Res.», 46, 460-463.
- VANNINI E. e STAGNI A. (1968) - *Repression by puromycin of testosterone-induced sex reversal in Rana dalmatina tadpoles*, «Exptl. Cell. Res.», 50, 683-687.
- VANNINI E. e STAGNI A. (1971) - *Nuove ricerche sul differenziamento sessuale nelle larve degli Anfibi*, «Rend. Accad. Sc. Ist. Bologna», 8, 83-94.
- VANNINI E. e STAGNI A. (1972) - *Inibizione con actinomomicina D dei processi di inversione sessuale provocati dal testosterone sugli ovari dei girini di Rana dalmatina*, «Arch. It. Anat. Embriol.», 77, 25-68.
- WILLIAMS-ASHMAN H. G. e REDDI A. H. (1972) - *Androgenic regulation of tissue growth and function*. In: Biochemical action of hormones, di G. Litwack, vol. II, 257-294, New York-London: Academic Press.
- WITSCHI E. (1929) - *Bestimmung und Vererbung des Geschlechts bei Tieren*, «Handb. Vererb.», 2, 1-115.
- ZACCANTI F. (1974) - *Osservazioni istologiche ed autoradiografiche su ovari di girini di Rana esculenta in iniziale inversione sessuale indotta con testosterone*, «Rend. Accad. Naz. Lincei», in stampa.