
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

GIOVANNI DELRIO, MICHELA D'ISTRIA, FRANCA
CITARELLA

**Dosaggio radioimmunologico del testosterone in
girini di *Rana esculenta* a vari stadi di sviluppo**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 67 (1979), n.5, p. 363–365.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1979_8_67_5_363_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/>

Biologia. — *Dosaggio radioimmunologico del testosterone in girini di Rana esculenta a vari stadi di sviluppo* (*). Nota di GIOVANNI DELRIO, MICHELA D'ISTRIA e FRANCA CITARELLA, presentata (**) dal Corrisp. G. CHIEFFI.

SUMMARY. — The testosterone level in the tissues of *Rana esculenta* tadpoles was determined by RIA at different stages of development.

The testosterone level (pg/tadpole) was 40 ± 10.6 at stages 23–24, 48 ± 8.4 at stage 28, 31 ± 5.9 at stage 29 and 49 ± 11.2 at stages 31 + 33.

Lo studio della comparsa della secrezione di ormoni steroidei negli stadi larvali o embrionali ha sempre attirato l'attenzione dei ricercatori per tentare di risolvere il problema della natura chimica degli induttori del differenziamento sessuale.

Negli Anfibi, Chieffi (1955) e Chieffi e Botte (1963), con tecniche istochimiche, hanno dimostrato la presenza della $\Delta^5-3\beta$ -idrossisteroidedeidrogenasi ($\Delta^5-3\beta$ -HSDH) nell'interrenale di girini di *Rana esculenta*; tale enzima è invece risultato assente nelle gonadi.

La messa in evidenza, già nei girini, di uno degli enzimi cardini della steroidogenesi ci ha spinti a determinare la presenza o meno di steroidi nei tessuti dei vari stadi larvali per verificarne la comparsa in relazione al differenziamento delle gonadi. Tra i vari ormoni sessuali è stato dosato, con il metodo RIA, il testosterone in quanto ricerche condotte su recettori per gli ormoni sessuali hanno dimostrato che nella pelle dei girini, negli stadi 31–33 della tabella del Witschi, è dosabile un recettore per gli androgeni (Chieffi *et al.*, 1975).

MATERIALE E METODI

Girini di *Rana esculenta*, pescati nel lago Patria (Napoli), nel periodo Maggio-Luglio, sono stati divisi nei seguenti gruppi, classificati secondo la tabella del Witschi (1956): gruppo I, stadi 23–24; gruppo II, stadi 25–27; gruppo III, stadio 28; gruppo IV, stadio 29; gruppo V, stadio 30; gruppo VI, stadi 31–33. Ai girini degli stadi 28–33 veniva prelevata la zona rene-gonade, mentre negli stadi precedenti venivano allontanati l'intestino, la parte cefalica, la regione caudale ed il rimanente tessuto veniva utilizzato per il dosaggio.

(*) Lavoro eseguito nell'ambito del progetto finalizzato del C.N.R. « Biologia della Riproduzione ».

(**) Nella seduta del 27 novembre 1979.

I reagenti usati erano di grado analitico della Baker (USA) ed il testosterone- H^3 (A. S. 95 Ci/mmol) era del Centro Radiochimico di Amersham (Inghilterra). L'antisiero è stato fornito dal Servizio di Fisiopatologia Ostetrica della Università di Bologna e presentava una reazione crociata del 59,6 % con il 5 α -diidrotestosterone, dello 0,3 % con l'androstenedione e < 0,01 % con i progestinici e gli estrogeni. Il testosterone è stato dosato con il metodo di Collins *et al.* (1972) e poiché il sistema di purificazione usato non consentiva la separazione del testosterone dal diidrotestosterone, i risultati ottenuti sono comprensivi di entrambi gli ormoni. La curva standard copriva l'intervallo 10-150 pg e la sensibilità del metodo era di 5 pg/tubo. I valori di bianco erano praticamente di 0 pg. Il procedimento usato per il dosaggio è stato il seguente: il tessuto veniva pesato e ad esso si aggiungeva metanolo al 70 % nel rapporto peso/volume 1 : 2. Il tutto veniva omogenizzato con un Polytron PT 105 a velocità 2 per 60 sec. All'omogenato venivano aggiunti 1000 cpm di testosterone- H^3 , come standard interno, e veniva lasciato per una notte a 4 °C. Successivamente si centrifugava per 10 min a 600 $\times$ g in una centrifuga refrigerata. Il volume del sopranatante veniva ridotto sotto una corrente di azoto a 37 °C e si procedeva come descritto da d'Istria *et al.* (1974). Sono stati effettuati anche dei controlli aggiungendo ad un gruppo di campioni quantità note di testosterone non marcato prima di omogenizzare i tessuti. Il testosterone dosato in questi campioni, dopo correzione per lo standard interno, era del 92 % $\pm$ 1,35 (media $\pm$ deviazione standard).

RISULTATI E DISCUSSIONE

Il testosterone è presente in quantità dosabili, col metodo da noi utilizzato, fin dagli stadi 23-24 con una concentrazione di $40 \pm 10,6$ pg/girino. Allo stadio 28 il suo valore è di $48 \pm 8,4$ pg/girino, scende a valori di $31 \pm 5,9$ pg/girino allo stadio 29 per risalire a valori di $49 \pm 11,2$ pg/girino. Il valore riportato per ogni stadio rappresenta la media $\pm$ la deviazione standard di 10 pool di tessuti.

La dosabilità del testosterone negli stadi 23-24, quando ancora le gonadi non sono differenziate, lascia pensare che probabilmente questo ormone non interviene nel processo di differenziamento sessuale, suffragando l'ipotesi riportata da Iela *et al.* (1975) secondo cui l'induttore sessuale è una molecola di natura diversa dagli ormoni gonadici. I risultati ottenuti da Chieffi e Botte (1963) suggeriscono che l'origine del testosterone potrebbe essere interrenale; questi autori, infatti, hanno osservato istochimicamente che la $\Delta^5-3 \beta$ -HSDH è scarsamente evidenziabile nei testicoli di girini, mentre la reazione è fortemente positiva nell'interrenale anche in stadi molto precoci.

Woods ed Erton (1978) hanno messo in evidenza la comparsa di quantità dosabili di estradiolo-17 β e di estrone in stadi embrionali molto precoci di *Gallus domesticus*. Essi, infatti, mediante metodi immunocitochimici hanno dosato i due estrogeni nelle cellule « interstiziali » della gonade indifferenziata fin dal giorno 3,5 di incubazione e, sulla base dei risultati ottenuti, ipotizzano

che la sintesi di ormoni sessuali può essere una manifestazione del processo di differenziamento sessuale delle gonadi piuttosto che la sua causa.

L'abbassamento del tasso di testosterone, da noi osservato, allo stadio 29, potrebbe coincidere con un incremento della secrezione di idrocortisone così come descritto da Dale (1962) nei girini di *Rana pipiens* allo stadio 29-30. In tale stadio la via metabolica degli steroidi potrebbe favorire la formazione di idrocortisone a discapito del testosterone e solo successivamente verrebbe ripristinata la normale secrezione di testosterone.

Inoltre, la dosabilità del testosterone negli stadi 23-24 e 28, che precedono quelli in cui diviene dosabile, nella pelle, un recettore per gli androgeni, fa pensare che anche nei girini il recettore dipende dalla secrezione di testosterone così come è stato osservato negli adulti (Delrio *et al.* 1979) e contrariamente a quanto Clark e Gorski (1970) hanno dimostrato per il recettore dell'estradiolo nell'utero di ratto.

BIBLIOGRAFIA

- CHIEFFI G. (1955) - *Contributo allo studio dei differenziatori embrionali del sesso. Ricerche istochimiche nell'interrenale e nelle pieghe genitali di girino di Rana esculenta*. « Riv. Biol. », 47, 439-452.
- CHIEFFI G. e BOTTE V. (1963) - *Osservazioni istochimiche sull'attività della steroide-3 β -olodeidrogenasi e nell'interrenale e nelle gonadi di girini e adulti di Rana esculenta*. « Riv. Istoch. Norm. Patol. », 9, 172-174.
- CHIEFFI G., DELRIO G., D'ISTRIA M. e VALENTINO M. A. (1975) - *Appearance of sex hormone receptors in frog (Rana esculenta) tadpole skin during metamorphosis*. « Experientia », 31, 989-990.
- CLARK J. H. e GORSKI J. (1970) - *Ontogeny of the estrogen receptor during early uterine development*. « Science », 169, 76-78.
- COLLINS W. P., MANSFIELD M. D., ALLADINA N. S. e SOMMERVILLE I. F. (1972) - *Radioimmunoassay of plasma testosterone*. « J. Steroids Biochem. », 3, 333-348.
- DALE E. (1970) - *Steroid excretion by larval frogs*. « Gen. Comp. Endocrinol. », 2, 171-176.
- DELRIO G., D'ISTRIA M. e CITARELLA F. (1979) - *Androgen receptor in thumb pad of Rana esculenta: dynamic aspects*. In press.
- D'ISTRIA M., DELRIO G., BOTTE V. e CHIEFFI G. (1974) - *Radioimmunoassay of testosterone, 17 β -estradiol and estrone in the male and female plasma of Rana esculenta during sexual cycle*. « Steroids Lipids Res. », 5, 42-48.
- IELA L., RASTOGI R. K. e CHIEFFI G. (1975) - *Biological activity of some steroidal compounds in the adult and larval frogs*. « Steroids », 26, 663-669.
- WITSCHI E. (1956) - « *Development of Vertebrates* », ed. Saunders, Philadelphia.
- WOODS J. E. e ERTON L. (1978) - *The synthesis of estrogens in the gonads of the chick embryo*. « Gen. Comp. Endocrinol. », 36, 360-370.