

## L'azione proliferativa della follicolina studiata sulle popolazioni ciliate del rumine

E' noto che la follicolina provoca una proliferazione dell'epitelio della mucosa dell'apparato genitale femminile, proliferazione che è particolarmente marcata per l'epitelio della vagina dei roditori, tanto da servire da controllo della follicolina stessa. L'azione proliferativa non è limitata all'apparato genitale: essa sembra di carattere generale (azione stimolante della follicolina sulla cicatrizzazione delle ferite dei tessuti animali, tra l'altro ben dimostrata da un allievo del Cattaneo, il TAMBURELLO (1), da uno nostro collaboratore, il GIANNI (2), e da ricerche in corso di BRUNI e USUELLI; azione della follicolina sui tessuti vegetali, confermata anche dal TEODORO (3); rapporti tra carcinogenesi ed estrogenesi, ecc.), tanto che fra i vari nomi coi quali la follicolina è stata battezzata vi è anche quello di « proliferina » (MORICARD (4). Operando sulle comuni infusioni di vegetali abbiamo ottenuto risultati poco chiari per quanto riguarda l'azione della follicolina sugli Infusori (e del resto analoghi erano stati i reperti che la DI CAPUA (5) aveva rilevato nell'Istituto di Fisiologia della Facoltà Veterinaria di Milano studiando l'azione degli estratti ovarici sullo stesso materiale); è probabile che a più chiare conclusioni si potrà arrivare lavorando su colture pure dei comuni Infusori. Un buon materiale d'indagine però, già a priori, si poteva presumere costituito dalle popolazioni Ciliate del primo stomaco dei ruminanti in quanto (per un complesso di condizioni che già abbiamo in altri lavori (6) considerato) il numero dei Ciliati del rumine, in condizioni normali e costanti di alimentazione dell'ospite, è relativamente costante.

Nelle tabelle N. 1 e 2 sono riassunti i protocolli di alcune *esperienze preliminari* condotte su due ovini maschi di tre anni di età, alimentati prima e durante il decorso delle esperienze con erba medica e zuppa d'orzo.

La follicolina (Cristallovar I.B.I.) fu introdotta nel rumine mediante sonda alla dose di 30.000 U.I. diluite in 150 cc. di acqua. A scopo

di controllo si saggiò precedentemente l'influenza, sul numero dei Ciliati del rumine, della introduzione nel rumine di 150 cc. di acqua. Il prelievo del contenuto del rumine, la fissazione ed il conteggio degli Infusori furono eseguite secondo la tecnica che abbiamo minutamente descritta in altri lavori. (6)

Da queste esperienze preliminari risultò chiaramente che la follico-

TABELLA I. — OVINO N. 1.

1.a giornata	2.a giornata	3.a giornata	4.a giornata
<i>Ore 9,30</i> A digiuno infusori per mm. <sup>3</sup> : 846	<i>Ore 9,30</i> A digiuno infusori per mm. <sup>3</sup> : 564	<i>Ore 9,30</i> A digiuno infusori per mm. <sup>3</sup> : 1162.	<i>Ore 9,30</i> A digiuno infusori per mm. <sup>3</sup> : 997.
<i>Ore 9,35</i> Somministrazione di 150 cc. di acqua	<i>Ore 9,35</i> Somministrazione di 30.000 U.I. di <i>Follicolina</i> in 150 cc. di acqua.	—	—
<i>Ore 11,30</i> Infusori per mm. <sup>3</sup> 822	<i>Ore 11,30</i> Infusori per mm. <sup>3</sup> 1198.	—	—
<i>Ore 11,35</i> Somministrazione paste di erba medica e orzo.	<i>Ore 11,35</i> Somministrazione pasto di erba medica e orzo.	—	—
<i>Ore 16</i> Numero infusori per mm. <sup>3</sup> : 869.	<i>Ore 16</i> Numero infusori per mm. <sup>3</sup> : 1541.	<i>Ore 16</i> (Dopo il pasto) Numero infusori per mm. <sup>3</sup> : 1580.	<i>Ore 16</i> (Dopo il pasto) Numero infusori per mm. <sup>3</sup> : 1320.

lina, già dopo poche ore dalla sua somministrazione, manifesta una forte azione proliferativa sui Ciliati del rumine. A meglio precisare il fenomeno eseguiamo i due gruppi di esperienze, le cui modalità e risultati andiamo ora esponendo.

### PRIMO GRUPPO DI ESPERIENZE

Due ovini maschi, di anni due, vennero alimentati a fieno e crusca di frumento. Dopo otto giorni di tale alimentazione si iniziò il controllo del numero normale degli Infusori Ciliati del rumine praticando per tre

volte il conteggio a due giorni di distanza. Alle ore 16 del dodicesimo giorno dell'inizio delle esperienze venne somministrato ai due ovini, con sonda immessa nel rumine, rispettivamente 2000 e 6000 Unità Internazionali di Follicolina (Cristallovar I.B.I.) diluite in 100 cc. di acqua tiepida ed il giorno seguente, sempre a digiuno, venne ripreso il controllo

TABELLA II. — OVINO N. 2.

1.a giornata	2.a giornata	3.a giornata	4.a giornata
<i>Ore 9,30</i> A digiuno infusori per mm. <sup>3</sup> : 1217.	<i>Ore 9,30</i> A digiuno infusori per mm. <sup>3</sup> : 1004.	<i>Ore 9,30</i> A digiuno infusori per mm. <sup>3</sup> : 1525.	<i>Ore 9,30</i> A digiuno infusori per mm. <sup>3</sup> : 1449.
<i>Ore 9,35</i> Somministrazione di 150 cc. di acqua.	<i>Ore 9,35</i> Somministrazione di 30.000 U. I. di Follicolina in 150 cc. di acqua.	—	—
<i>Ore 11,03</i> Infusori per mm. <sup>3</sup> 1202.	<i>Ore 11,30</i> Infusori per mm. <sup>3</sup> 1811.	—	—
<i>Ore 11,35</i> Somministrazione pasto di erba medica e orzo.	<i>Ore 11,35</i> Somministrazione pasto di erba medica e orzo.	—	—
<i>Ore 16</i> Infusori per mm. <sup>3</sup> 1635.	<i>Ore 16</i> Infusori per mm. <sup>3</sup> 2211.	<i>Ore 16</i> (Dopo il pasto) Infusori per mm. <sup>3</sup> 2070.	<i>Ore 16</i> (Dopo il pasto) Infusori per mm. <sup>3</sup> 2032.

del numero degli infusori che fu eseguito giornalmente per i primi tre giorni, ed una altra volta ancora alla distanza di sei giorni. I risultati sono esposti nella Tabella III. Il numero degli Infusori essendo ritornato normale fu iniziata un'altra serie di esperienze analoghe alle precedenti, ma con la differenza che alle due pecore furono immesse nel rumine rispettivamente 20.000 e 50.000 U.I. di Follicolina e che il conteggio degli infusori fu continuato per oltre tre settimane a partire dalla somministrazione della Follicolina (controllo giornaliero nella prima settimana, in seguito ogni tre giorni). I risultati sono esposti nella Tabella IV.

Dai risultati di questo primo gruppo di esperienze si deduce:

1) che la somministrazione di 2000 U.I. di Follicolina agli ovini è stata insufficiente a provocare sensibili modificazioni numeriche alla fauna protozoaria del rumine.

2) che l'introduzione nel rumine di 6.000 U.I. di Follicolina ha aumentato discretamente il numero degli Infusori e che l'aumento ha raggiunto il suo massimo (di circa il 45%) in seconda giornata.

3) che l'immissione nel rumine di 20.000 e 50.000 Unità Internazionale di Follicolina provoca sin dal primo giorno un rapido multipli-

TABELLA III.

OVINO N. 3			OVINO N. 4		
Data	Osservazioni	Num. degli inf. per mm. <sup>3</sup> ore 9	Data	Osservazioni	Num. degli inf. per mm. <sup>3</sup> ore 9
12/1	Da 8 g.ni a fieno e crusca	564	12/1	Da 8 g.ni a fieno e crusca	690
14/1	» 10 » » »	703	14/1	» 10 » » »	645
16/1	» 12 » » »	657	16/1	» 12 » » »	624
	Media . . . . .	641		Media . . . . .	653
16/1	Alle ore 16 somministrazione di 2000 U. I. follicolina in 100 cc. di acqua.		16/1	Alle ore 16 somministrazione di 2000 U. I. follicolina in 100 cc. di acqua.	
17/1	Alim. a fieno e crusca	784	17/1	Alim. a fieno e crusca	898
18/1	» » »	604	18/1	» » »	957
19/1	» » »	614	19/1	» » »	714
25/1	» » »	523	25/1	» » »	690
	Media . . . . .	631		Media . . . . .	814

carsi delle popolazioni Ciliate con un aumento massimo rispettivo del 360% in terza giornata e in quinta giornata del 380%.

4) Che l'aumento degli infusori provocato dalla Follicolina perdura a lungo: il numero degli Infusori non ritorna alla norma che verso la 15<sup>a</sup> giornata dall'introduzione del rumine di 20.000 U.I. di Follicolina ed in 23<sup>o</sup> giornata dall'introduzione di 50.000 U.I..

### c) SECONDO GRUPPO DI ESPERIENZE

Queste esperienze furono istituite con lo scopo di studiare l'influenza della follicolina sullo sviluppo delle popolazioni Ciliate del rumine in animali precedentemente privati della loro normale fauna protozoaria; al tempo stesso si ebbe occasione di studiare l'influenza della follicolina sul regredire da digiuno delle medesime popolazioni Ciliate.

Due ovini maschi, di mesi 9 vennero per 18 giorni alimentati con fieno ed orzo: durante questo periodo si controllò il numero degli infusori per mm.<sup>3</sup> di contenuto del rumine prelevato come al solito a digiuno, verso le ore 9 del mattino. I due animali vennero privati dalla loro fauna ciliata col metodo (ampiamente studiato da MANGOLD, da USUELLI e dai loro allievi), dell'alimentazione lattea esclusiva, metodo che come MAN-

TABELLA IV.

OVINO N. 3			OVINO N. 4		
Data	Osservazioni	Num. degli inf. per mm. <sup>3</sup> ore 9	Data	Osservazioni	Num. degli inf. per mm. <sup>3</sup> ore 9
27/1	Alimentazione a fieno e crusca . . . . .	488	27/1	Alimentazione a fieno e crusca . . . . .	683
29/1	Alimentazione a fieno e crusca . . . . .	710	29/1	Alimentazione a fieno e crusca . . . . .	555
31/1	Alimentazione a fieno e crusca . . . . .	573	31/1	Alimentazione a fieno e crusca . . . . .	760
	Media . . . . .	590		Media . . . . .	666
31/1	Alle ore 16 somministrazione di 20.000 U. I. follicolina.		31/1	Alle ore 16 somministrazione di 50.000 U. I. follicolina.	
1/2	Alim. a fieno e crusca	1327	1/2	Alim. a fieno e crusca	1170
2/2	» » »	1751	2/2	» » »	1980
3/2	» » »	2818	3/2	» » »	2658
4/2	» » »	2750	4/2	» » »	2521
5/2	» » »	2420	5/2	» » »	3229
6/2	» » »	2618	6/2	» » »	2795
7/2	» » »	1950	7/2	» » »	3028
9/2	» » »	1245	9/2	» » »	2840
12/2	» » »	733	12/2	» » »	2710
15/2	» » »	590	15/2	» » »	2191
18/2	» » »	647	18/2	» » »	1046
21/2	» » »	794	21/2	» » »	895
23/2	» » »	663	23/2	» » »	731
	Media . . . . .	1562		Media . . . . .	2138

GOLD e USUELLI (7) hanno dimostrato, si basa sul forte abbassamento del pH provocato dalla fermentazione acida del latte nel rumine. La dieta lattea fu continuata per 14 giorni; indi, tenendo isolati gli animali dagli altri ruminanti, si riprese la dieta a fieno ed orzo e dopo altri 10 giorni (durante i quali si potè constatare che le popolazioni ciliate erano totalmente distrutte) si immise nel rumine dei due animali 50 cc. di contenuto del rumine (ricco di circa 620 Infusori per mm.<sup>3</sup>) appena prelevato da una pecora in condizioni normali di alimentazione, avendo cura

di agitare a lungo (secondo le modalità studiate da USUELLI nel Laboratorio del MANGOLD) il contenuto stesso prima di separarne ed esattamente misurarne le due porzioni, affinché il numero totale degli Infusori immessi nei rumini dei due animali non presentasse sensibili differenze.

TABELLA V.

OVINO N. 5			OVINO N. 6		
Data	Annotazioni	Num. degli inf. per mm. <sup>3</sup> ore 9	Data	Annotazioni	Num. degli inf. per mm. <sup>3</sup> ore 9
18/12	Da 8 g. a fieno e orzo	848	18/12	Da 8 g. a fieno e orzo	703
28/12	» 18 » » »	909	28/12	» 18 » » »	682
28/12	Somminist. latte 1 litro al giorno; viene sospeso ogni altro alimento . .	618	28/12	Somminist. latte 1 litro al giorno; viene sospeso ogni altro alimento . .	460
2/1	» » » . .	230	2/1	» » » . .	2/2
5/1	» » » . .	23	5/1	» » » . .	pochi inf. morti
12/1	» » » . .	0	12/1	» » » . .	0
13/1	Si ritorna all'alim. a fieno ed orzo tenendo isolato l'animale.		13/1	Si ritorna all'alim. a fieno e orzo tenendo isolato l'animale.	
23/1	Alle ore 16 si somministra 50 cc. di contenuto del rum. di una pecora (con 850 infu. per mm. <sup>3</sup> ) e alle ore 17 si somministra 100 cc. di acqua tiepida . . . . .	0	23/1	In tutto come per l'agnello N. 1; alle ore 17 si somministra invece di acqua pura 20.000 U. I. di follicolina in 100 cc. di acqua . . . . .	0
24/1	Alimen. a fieno ed orzo	14	24/1	Alimen. a fieno ed orzo	210
25/1	» » »	150	25/1	» » »	590
26/1	» » »	410	26/1	» » »	1084
28/1	» » »	590	28/1	» » »	1870
30/1	» » »	508	30/1	» » »	2530
2/2	» » »	710	2/2	» » »	2043
4/2	» » »	650	4/2	» » »	1591
8/2	» » »	695	8/2	» » »	1112

Un'ora dopo, ad uno degli animali furono somministrate 20.000 U.I. di Follicolina in 100 cc. di acqua, all'altro animale, per controllo cc. 100 di acqua. Indi si continuò per 25 giorni l'alimentazione a fieno ed orzo praticando la numerazione degli Infusori del ruminale a intervalli crescenti come appare dalla tabella V.

Si ripetè poi tutto il ciclo sperimentale precedentemente descritto, ma invertendo gli animali; a quello che prima era servito di controllo si somministrò la follicolina e viceversa per l'altro animale. I risultati

TABELLA VI.

OVINO N. 5			OVINO N. 6		
Data	Annotazioni	Num. degli inf. per mm. <sup>3</sup> ore 9	Data	Annotazioni	Num. degli inf. per mm. <sup>3</sup> ore 9
18/2	Alim. a fieno ed orzo .	784	18/2	Alim. a fieno ed orzo .	893
19/2	Somm. latte 1 litro . .		19/2	Somm. latte 1 litro . .	
22/2	» » . .	360	22/2	» » . .	458
25/2	» » . .	98	25/2	» » . .	136
27/2	» » . .	30	27/2	» » . .	0
5/3	Fieno ed orzo, isolamento	0	5/3	Fieno ed orzo, isolamento	0
7/3	» » »	0	7/3	» » »	0
17/3	Alle ore 16 si somministrano 50 cc. di contenuto del ruminale (620 inf. per mm. <sup>3</sup> ) e alle ore 17 si somministrano 20000 U. I. di follicolina in 100 cc. di acqua.		17/3	Alle ore 16 si somministrano 50 cc. di contenuto del ruminale (620 inf. per mm. <sup>3</sup> ) e alle ore 17 si somministrano 100 cc. di acqua pura.	
18/3		65	18/3		Qualche esem.
19/3		470	19/3		70
20/3		1250	20/3		318
21/3		1976	21/3		540
22/3		2730	22/3		510
24/3	Alimentazione a fieno ed orzo.	2480	24/3	Alimentazione a fieno ed orzo.	641
26/3		2835	26/3		590
30/3		1680	30/3		710
5/4		1125	5/4		940
15/4		1010	15/4		870
25/4		847	25/4		795

di queste esperienze che si protrassero per altri 66 giorni sono esposti nella tabella N. 4.

Altre ricerche furono condotte sugli stessi animali che erano serviti per il primo gruppo di esperienze. Le due pecore furono alimentate per

tre settimane a fieno e crusca; poi ad uno degli animali fu somministrato un litro di latte ed all'altro un litro di latte con l'aggiunta di 30.000 U.I. di Follicolina. Nella successiva settimana i due animali furono tenuti a dieta lattea esclusiva praticando ogni giorno il conteggio degli Infusori del rumine; indi all'animale di controllo furono introdotti nel rumine

TABELLA VII.

OVINO N. 3			OVINO N. 4		
Data	Osservazioni	Num. degli inf. per mm. <sup>3</sup> ore 9	Data	Osservazioni	Num. degli inf. per mm. <sup>3</sup> ore 9
23/2	Alim. fieno e crusca . .	663	23/2	Alim. fieno e crusca . .	731
15/3	Dopo il prelievo delle ore 9 si somministra un litro di latte . . . .	754	15/3	Dopo il prelievo si somministra un litro di latte e 30.000 U. I. follicolina	637
16/3	Aliment. lattea (1 litro)	580	16/3	Aliment. lattea (1 litro)	945
17/3	» » »	415	17/3	» » »	718
18/3	» » »	392	18/3	» » »	251
19/3	» » »	114	19/3	» » »	Qualche cadav.
20/3	» » »	84	20/3	» » »	0
21/3	» » »	27	21/3	» » »	0
22/3	» » »	0	22/3	» » »	0
23/3	Somm. 50 cc. di conten. del rum. (con 810 inf. per mm. <sup>3</sup> ) poi fieno e crusca . . . . .	0	23/3	Somm. 50 cc. dello stesso conten. del rum. poi fieno e crusca e 30.000 U. I. follicolina . . . . .	0
24/3	Alim. fieno e crusca . .	63	24/3	Alim. fieno e crusca . .	385
26/3	» » » . .	214	26/3	» » » . .	648
28/3	» » » . .	385	28/3	» » » . .	1170
30/3	» » » . .	342	30/3	» » » . .	1903
4/4	» » » . .	550	4/4	» » » . .	1751

30 cc. di contenuto del rumine (con circa 810 Infusori per mm.<sup>3</sup>) ed all'altro animale pure 50 cc. dello stesso contenuto del rumine unitamente a 30.000 U.I. di Follicolina. I due animali furono rimessi a fieno e crusca e per altri 11 giorni si controllò il numero degli Infusori. I risultati sono esposti nella Tabella VII.

Dai risultati di questo secondo gruppo di esperienze si deduce:

1) che, se dopo aver privato col metodo della dieta lattea esclusiva il rumine della sua fauna Ciliata, si ritorna all'alimentazione nor-



male tenendo isolati gli animali dagli altri ruminanti, gli Infusori Ciliati non ricompaiono.

2) che se in animali così privati della loro fauna Ciliata si introduce il contenuto del rumine di un animale ricco di Infusori i Ciliati si sviluppano progressivamente sino a raggiungere il loro numero normale in 10-12 giorni.

3) che se insieme al contenuto del rumine di un animale a popolazioni infusorie distrutte una sufficiente quantità di follicolina i Ciliati si sviluppano con *straordinaria rapidità*: raggiungono il loro numero normale in due tre giorni, lo triplicano ed anche lo quadruplicano in quinta-sesta giornata, per poi ritornare lentamente alla norma.

4) che se all'inizio della dieta lattea esclusiva viene somministrata follicolina le popolazioni Ciliate del rumine invece di diminuire progressivamente aumentano nelle prime 48 ore per poi declinare rapidamente tanto da scomparire assai prima di quanto non si verifica normalmente per effetto dell'alimentazione lattea.

#### CONSIDERAZIONI

Dai risultati del primo gruppo di esperienze e tenendo conto del fatto che la quantità normale di contenuto del rumine della pecora si aggira sui quattro-cinque litri possiamo calcolare che la *concentrazione minima per l'esplicazione dell'azione proliferativa della follicolina sulla fauna Ciliata del rumine sia vicina ad una Unità Internazionale per cc.* e che quella massima, al di là della quale un aumento della concentrazione non provoca un ulteriore sensibile incremento del numero degli Infusori, si aggiri sulle 5 U.I. per cc.. Non è possibile per ora dire se questa concentrazione massima abbia un significato intrinseco, diretto, nel senso di una reale insensibilità dei Ciliati a concentrazioni più alte di follicolina oppure se l'ulteriore incremento delle popolazioni Infusorie trovi la sua limitazione in condizioni di ambiente; e la riserva è tanto più necessaria in quanto la densità delle popolazioni Ciliate raggiunta in queste esperienze per effetto della follicolina (anche oltre i 3000 Infusori per mm.<sup>3</sup>) è, a quanto ne sappiamo, la più alta registrata nella letteratura sugli Infusori Ciliati che vivono nell'apparato digerente degli Erbivori.

Il fatto che gli effetti della somministrazione di 50.000 U.I. di follicolina persistono più a lungo di quelli della somministrazione di 20.000 U.I. ci sembra con ogni probabilità collegato col tempo di permanenza del prodotto nel rumine; è evidente che la concentrazione minima per il manifestarsi dell'azione proliferativa sarà raggiunta tanto più tardi

quanto maggiore sarà la quantità di follicolina somministrata. A questo proposito ricordiamo:

a) che FALASCHINI (8) ha potuto dimostrare che nelle pecore le ultime tracce di alimento non scompaiono dal rumine che verso la tredicesima giornata dalla somministrazione dell'alimento stesso.

b) che esperienze, ancora inedite, di USUELLI starebbero a dimostrare che la follicolina, contrariamente ad altri ormoni di struttura non sterolica, non viene alterata anche dopo molti giorni di permanenza nel rumine.

### R I A S S U N T O

Gli AA. dimostrano, attraverso numerose esperienze condotte su *Ovis aries*, che la Follicolina, alla concentrazione di 1-5 U.I. per cc. di contenuto del rumine, manifesta una rapida intensa azione proliferativa sulle popolazioni Ciliate del rumine.

BIBLIOGRAFIA

- (1) TAMBURELLO - *Annali della Fac. Med.-Chir. di Perugia* - V. XXXIX, 1935-36.
- (2) GIANNI - *Atti del XXXV Congr. Soc. It. Ostetr. e Ginec.* - Perugia, 1938.
- (3) TEODORO - *Arch. Ist. Bioch. Ital.* - f. IV, 1935.
- (4) MORICARD - *T. Med.* - Parigi, 1934.
- (5) DI CAPUA - *Boll. Lab. Zoolog. Agr. e Bach. del R. Ist. Sup. Agr. di Milano*, V. II, 1929-30.
- (6) USUELLI - *Clin. Veter.* - Milano, 1930.
- (7) MANCOLD u. USUELLI - *Wissenschaft. Arc. f. Landwirt. Ab. B.* - Berlino, 1930.
- (8) FALASHINI - *Boll. Soc. Eustac.* - Camerino, 1933.