
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

CONCETTA LUPO, GIOVANNI CHIEFFI

Ormoni sessuali e attività steroide-3

β -olodeidrogenasica del testicolo di Morone labrax

Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 34 (1963), n.4, p. 443–446.

Accademia Nazionale dei Lincei

http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1963_8_34_4_443_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/>

Embriologia. — *Ormoni sessuali e attività steroide-3 β -olo-deidrogenasica del testicolo di Morone labrax* (*). Nota di CONCETTA LUPO (**) e GIOVANNI CHIEFFI, presentata (***) dal Corrisp. G. MONTALENTI.

La dimostrazione dell'attività androgena degli estratti testicolari dei Vertebrati inferiori è stata finora ottenuta quasi esclusivamente mediante prove biologiche. Poco si sa, invece, circa la natura degli ormoni testicolari.

Recentemente abbiamo potuto identificare negli estratti testicolari di *Scyliorhinus stellaris* (Selacio Squaliforme) [1] e di *Bufo vulgaris* (Anfibio Anuro) [2] diversi steroidi già noti per i Mammiferi. Proseguendo nella nostra indagine comparativa abbiamo analizzato gli estratti testicolari di *Morone labrax*, Teleosteo marino.

Le uniche ricerche riguardanti gli ormoni androgeni di altri Teleostei sono quelle di Galzigna [3], che ha identificato qualitativamente il testosterone negli estratti testicolari di *Salmo irideus* e *Cyprinus carpio*, e quelle di Grajcer e Idler [4] che hanno isolato dal plasma di salmone il testosterone in forma libera e coniugata.

In questa Nota vengono inoltre riferiti i dati relativi all'attività della steroide-3 β -olo-deidrogenasi nel testicolo di *Morone labrax*.

METODI.

La tecnica di estrazione usata è quella di Anliker et al. [5], già da noi sperimentata per altri Vertebrati inferiori e riportata estesamente su questi « Rendiconti » [2]. Sono stati eseguiti due esperimenti: nel primo siamo partiti da 140 gr di tessuto testicolare fresco di maschi maturi di *Morone labrax* raccolti all'epoca della riproduzione; nel secondo da 250 gr. Entrambe le volte il metodo Anliker è stato fedelmente seguito, sia per l'estrazione acetonica che per la purificazione degli estratti e la cromatografia su carta, secondo i sistemi di Bush [6] e Zaffaroni [7].

Inoltre sono state eseguite una purificazione supplementare e altre prove finali di identificazione, oltre la cromatografia su carta. Il residuo neutro, dopo separazione dalla parte fenolica, è stato ripreso con metanolo al 70 %.

(*) Lavoro eseguito presso la Stazione Zoologica di Napoli e la Cattedra di Istologia ed Embriologia dell'Università di Messina, con un contributo (RG-6455) della Division of General Medical Sciences, Public Health Service, U.S.A.

(**) Borsista del Consiglio Nazionale delle Ricerche presso la Stazione Zoologica di Napoli.

(***) Nella seduta del 20 aprile 1963.

e lasciato a -15°C per una notte. Dopo centrifugazione a 12.000 g.p.m. sempre a bassa temperatura, il supernatante è stato estratto con etere di petrolio, quindi essiccato e cromatografato. Questo passaggio, consigliato da Short ed Eckstein [8], permette di liberare l'estratto dalle ultime tracce di lipidi.

Per l'ulteriore purificazione delle macchie, le zone del cromatogramma finale assorbenti all'U.V. ($\lambda = 253,7\text{ m}\mu$) sono state eluite con metanolo e di queste soluzioni è stato eseguito uno spettro da 220 a 270 $\text{m}\mu$; infine dopo l'esecuzione dello spettro le soluzioni sono state ricromatografate e il cromatogramma è stato colorato con la reazione di Zimmermann.

Per quanto riguarda la frazione fenolica, gli ormoni estrogeni sono stati messi in evidenza sul cromatogramma con la reazione di Barton et al. [9]. La determinazione quantitativa degli steroidi è stata eseguita dosando il Fe^{+++} del reattivo di Barton fissato dagli estrogeni. La determinazione del Fe^{+++} era eseguita secondo la tecnica di Kecskès et al. [10], trattando le zone di carta prima con NaOH 0,3 N e poi con HClN e leggendo l'assorbimento della soluzione cloridrica a 480 $\text{m}\mu$ subito dopo aggiunta di KCNS al 20 %.

Per la determinazione dell'attività steroide-3 β -olo-deidrogenasica, è stata seguita la tecnica di Rubin et al. [11], incubando 60 mg di polvere acetonica di testicolo in presenza di 500 μg di deidroepiandrosterone e DPN per 1 1/2, 3,6 h. L'estratto etero del liquido di incubazione veniva portato a secco, ripreso con metanolo per l'esecuzione dello spettro da 220 a 270 $\text{m}\mu$. Il massimo di assorbimento a 238-242, caratteristico dei Δ^4 -3-chetosteroidi, era riferito alla formazione di Δ^4 -androstene-3,17-dione. Infatti la cromatografia su carta della soluzione metanolica, eseguita secondo il sistema Bush A, presentava una sola macchia corrispondente per R_f a puro Δ^4 -androstene-3,17-dione.

Tutte le misure spettrofotometriche sono state eseguite allo spettrofotometro registratore Beckman modello DK-2, usando cuvettes da 1 cm.

RISULTATI E DISCUSSIONE.

Nell'estratto acetnico di 140 gr di tessuto testicolare fresco sono stati identificati 15 μg di progesterone, 30 μg di estriolo, 20 μg di estrone e tracce di estradiolo-17 β ; nell'estratto di 250 gr di tessuto tracce di testosterone (identificato solo cromatograficamente), 20 μg di progesterone, 20 μg di estriolo, 20 μg di estrone e 10 μg di estradiolo-17 β (Tabella I).

La presenza di estrogeni negli estratti testicolari di *Morone labrax* coincide con i risultati ottenuti da altri Autori nei Mammiferi [12, 13] e da noi in altri Vertebrati inferiori, come *Scyliorhinus stellaris* [1] e *Bufo vulgaris* [2]. Ricerche recenti sulla biosintesi degli ormoni steroidi hanno dimostrato da parte del tessuto testicolare la conversione di androgeni in estrogeni, che avverrebbe attraverso l'androstenedione [14].

La presenza di progesterone nel tessuto testicolare di *Morone labrax* in quantità relativamente maggiori del testosterone, da noi isolato solo in

tracce, può essere interpretata formulando l'ipotesi, già da noi precedentemente avanzata [2], che nel tessuto testicolare dei Vertebrati inferiori la concentrazione degli enzimi che catalizzano la trasformazione del progesterone ad androstenedione e testosterone sia trascurabile rispetto alla quantità di steroide-3 β -olo-deidrogenasi, cioè dell'enzima responsabile della ossidazione del pregnenolone, prima tappa della trasformazione di questo a progesterone. Infatti lo spostamento irreversibile del doppio legame in posizione coniugata rispetto al chetogruppo è dovuto ad una Δ^5 -3-chetoisomerasi [15].

TABELLA I.

Concentrazione degli ormoni sterodi negli estratti testicolari di Morone labrax.

Tessuto fresco gr	Testosterone $\mu\text{g/Kg}$	Progesterone $\mu\text{g/Kg}$	Estriolo $\mu\text{g/Kg}$	Estrone $\mu\text{g/Kg}$	Estradiolo- 17 β $\mu\text{g/Kg}$
140	0	15	20	20	tracce
250	tracce	20	20	20	10

Abbiamo cercato di provare la validità di questa ipotesi, dosando l'attività della steroide-3 β -olo-deidrogenasi nel tessuto testicolare di diverse specie di Vertebrati. Alcune ricerche preliminari hanno dimostrato la presenza di questo enzima nei testicoli di *Morone labrax*, *Scyliorhinus stellaris*, *Bufo vulgaris* e *Bos taurus*. Infatti incubando deidroepiandrosterone con polvere acetonica di questi tessuti, abbiamo ottenuto la formazione di Δ^4 -androstene-3,17-dione. Nel caso di *Morone labrax* sono stati eseguiti alcuni esperimenti sulla formazione di Δ^4 -androstene-3,17 dione in funzione del tempo. Da queste ricerche preliminari è risultato che dopo 1 1/2 e 3 ore di incubazione, la concentrazione di questo steroide va decrescendo, probabilmente per la sua ulteriore trasformazione ad opera di altri sistemi enzimatici presenti nel tessuto testicolare.

Purtroppo la difficoltà di confrontare quantità uguali di tessuto attivo, che certamente varia da specie a specie, ci impedisce per ora di trarre delle conclusioni. Lo studio comparativo delle attività dei diversi enzimi responsabili della biosintesi del testosterone, probabilmente potrà fornirci qualche indicazione.

Comunque la presenza della steroide-3 β -olo-deidrogenasi nel testicolo delle specie studiate dimostra che almeno la prima tappa della biosintesi degli androgeni è la stessa sia nei Mammiferi che nei Vertebrati inferiori.

BIBLIOGRAFIA.

- [1] G. CHIEFFI, C. LUPO, « Nature », 190, 169-170 (1961).
- [2] G. CHIEFFI, C. LUPO, « Rendiconti Accad. Naz. Lincei », Classe sci. fis. mat., 30, 339-402 (1961).
- [3] L. GALZIGNA, « Rendiconti Accad. Naz. Lincei », Classe sci. fis. mat. nat. 31, 92-95 (1961).
- [4] D. GRAJČER, D. R. IDLER, « Can. J. Bioch. Physiol. », 39, 1585 (1961).
- [5] R. ANLIKER, O. ROHR, L. RUZICKA, « Liebigs Ann. Chem. », 603, 109-114 (1957).
- [6] I. E. BUSH, « Biochem. J. », 50, 370-378 (1952).
- [7] R. B. BURTON, A. ZAFFARONI, E. H. KEUTMANN, « J. Biol. Chem. », 118, 763-771 (1951).
- [8] R. V. SHORT, P. ECKSTEIN, « J. Endocrinol. », 22, 15-22 (1961).
- [9] G. M. BARTON, R. S. EVANS, J. A. F. GARDNER, « Nature », 170, 249-250 (1952).
- [10] L. KECSKÈS, F. MUTSCHLER, I. GLOS, E. THAN, I. FARKAS, J. CEGLESI, J. KOBOR, « Acta endocrinol. », 38, 545-562 (1962).
- [11] B. L. RUBIN, G. LEIPSNER, H. W. DEANE, « Endocrinology », 69, 619-625 (1961).
- [12] D. BEALL, « Biochem. J. », 34, 1293-1298 (1940).
- [13] J. M. GOLDZIEHER, I. S. ROBERTS, « J. Clin. Endocrinol. Metab. », 12, 143-150 (1952).
- [14] B. BAGGETT, L. L. ENGEL, L. BALDARAS, B. LAMMANN, K. SAVARD, R. I. DOREMAN, « Endocrinology », 64, 600-608 (1959).
- [15] A. WETTSTEIN, « Experientia », 17, 325-344 (1961).