

---

ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI  
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

# RENDICONTI

---

VIRGILIO BOTTE, GIOVANNI DELRIO

## **Idrolisi degli steroidi fosfati. Attività delle fosfatasi alcalina e acida estratte da vari tessuti di topine adulte**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 44 (1968), n.5, p. 701-704.*  
Accademia Nazionale dei Lincei

<[http://www.bdim.eu/item?id=RLINA\\_1968\\_8\\_44\\_5\\_701\\_0](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1968_8_44_5_701_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/>



**Endocrinologia.** — *Idrolisi degli steroidi fosfati. Attività delle fosfatasi alcalina e acida estratte da vari tessuti di topine adulte*<sup>(\*)</sup>.

Nota di VIRGILIO BOTTE e GIOVANNI DELRIO, presentata <sup>(\*\*)</sup> dal Socio B. MONTALENTI.

SUMMARY. — Steroid-phosphates, from different tissues of adult female mice, were used as substrates for acid and alkaline phosphatases. The hydrocortisone-21-phosphate was split by both acid and alkaline phosphatases from tissues from the ovary, uterus, vagina, adrenal, kidney and small intestine. With this substrate, the maximum effect was obtained with alkaline phosphatase from the adrenal, ovarian and uterine tissues.

The estradiol-17  $\beta$ -phosphate was split only by acid phosphatase from ovarian, uterine, vaginal, adrenal and small intestine tissues and both enzymes from kidney tissue.

These results obtained were similar to those on human term placenta and show the peculiar behaviour of phosphatases with estradiol-17  $\beta$ -phosphate.

Esistono sinora solo scarse indicazioni sulla capacità delle fosfatasi alcalina ed acida (fosfoidrolasi del monoestere ortofosforico EC 3.1.3.1 ed EC 3.1.3.2), estratte dai tessuti animali, di idrolizzare gli steroidi fosfati (Botte e Koide, 1968). D'altra parte la possibilità che gli ormoni steroidi possano essere trasportati nel sangue sotto forma di fosfati è suggerita da alcune ricerche, nelle quali, dalla frazione fosfolipidica del plasma, trattata con fosfatasi acida od alcalina, si libera deidroepiandrosterone (Oertel ed Eik-Nes, 1958). Recentemente abbiamo potuto dimostrare che le fosfatasi acide ed alcaline estratte dalla placenta umana a termine si comportano diversamente a seconda degli steroidi fosfati usati come substrato. Mentre, infatti, gli steroidi 21,3  $\alpha$  e 3  $\beta$  fosfati sono scissi sia dalla fosfatasi acida che da quella alcalina, gli steroidi 17  $\beta$ -fosfati vengono idrolizzati esclusivamente dalla fosfatasi acida (Botte e Koide, 1968). Nel plasma, invece, solo l'idrocortisone-21-fosfato è scisso dalla fosfatasi alcalina e, in piccolissima quantità, il testosterone-17  $\beta$ -fosfato da quella acida (Botte e Koide, in corso di stampa).

Queste osservazioni hanno reso interessante stabilire se il comportamento delle fosfatasi placentari è peculiare di questo organo o se piuttosto la scissione degli steroidi-17  $\beta$ -fosfati sia proprietà comune della fosfatasi acida di tutti i tessuti. In questa Nota riferiamo sul comportamento delle fosfatasi acida

(\*) Ricerche eseguite presso l'Istituto di Zoologia ed Anatomia Comparata dell'Università di Camerino con un contributo del Consiglio Nazionale delle Ricerche. Ringraziamo il prof. Elio Borghese, per averci permesso di utilizzare gli animali dello stabulario dell'Istituto di Anatomia Topografica della Facoltà di Medicina di Napoli, ed il sig. Carlo Basile per la sua assistenza tecnica.

(\*\*) Nella seduta dell'11 maggio 1968.

ed alcalina ottenute da differenti organi di topine adulte nei riguardi di due substrati: l'idrocortisone-21-fosfato e l'estradiolo-17  $\beta$ -fosfato.

L'idrocortisone-21-fosfato è stato acquistato dalla SIGMA Chem. Co., St. Louis, U.S.A.; l'estradiolo-17  $\beta$ -fosfato dalla MANN Res. Co., New York; la Silica Gel GF<sub>254</sub> dalla Merck, Germania; i prodotti per le colonne gas-cromatografiche dalla BDH-Italia. Tutti i solventi organici per l'estrazione e la cromatografia degli steroidi erano della ORTANAL, Italia; essi sono stati, in molti casi, distillati prima dell'uso.

Per questa ricerca sono state utilizzate topine adulte di ceppo BALB/C. L'ovario, l'utero, la vagina, il surrene, il rene e l'intestino, prelevati rapidamente, sono stati omogenizzati in acqua distillata, in modo che circa 30 mg di proteine fossero contenuti in 1 ml di omogenato. Le proteine erano determinate col metodo di Lowry (1951). Sull'omogenato venivano saggiate le fosfatasi alcalina ed acida utilizzando l'idrocortisone-21-fosfato e l'estradiolo-17  $\beta$ -fosfato come substrati. Il mezzo di incubazione era costituito da 2 ml di buffer Tris-HCl 0.05 M, 0.01 M MgCl<sub>2</sub>, pH 9.2 per la fosfatasi alcalina; e di buffer acetato 0.005 M a pH 5 per la fosfatasi acida; da 50  $\mu$ l della soluzione di substrato (1 mg/ml)<sup>(1)</sup>, da 10  $\mu$ l di soluzione di protamina solfato (1 mg/ml) e da 0.3 ml di omogenato. La soluzione di protamina solfato era aggiunta per limitare la eventuale inibizione del substrato sull'attività enzimatica (Aldman *et al.*, 1948; Aldman *et al.*, 1951; Ferno *et al.*, 1958). Venivano preparati parallelamente dei controlli utilizzando lo stesso mezzo di incubazione privo o del substrato o dell'omogenato.

Le incubazioni erano protratte per 30' a 37°C in un Dubnoff. I tempi di incubazione e la quantità di substrato erano stabilite mediante prove preliminari.

Lo steroide libero formato era estratto dal mezzo di incubazione con 3 ml di acetato di etile (2 volte) e 3 ml di cloruro di metilene. L'estratto era portato a secco sotto corrente di azoto e cromatografato su strato sottile utilizzando per l'idrocortisone il sistema etile acetato-benzolo (85 : 15 v/v) e per l'estradiolo il sistema benzolo-alcool etilico (90 : 10 v/v). Le zone corrispondenti per R<sub>f</sub> all'idrocortisone venivano eluite e l'estratto veniva utilizzato per l'analisi quantitativa mediante assorbimento a 240 m $\mu$ , con la correzione di Allen (1950) e la reazione al blu di tetrazolio (Kingsley e Getchell, 1961).

Le zone corrispondenti per R<sub>f</sub> all'estradiolo-17  $\beta$  erano eluite e gli estratti utilizzati per la determinazione quantitativa dell'estradiolo-17  $\beta$  mediante analisi gas-cromatografica, su colonna di 4 mm di  $\varnothing$  riempita con SE 30 1% a 240°C, con un flusso di argon di 90 ml/minuto, con un gas-cromatografo Barber-Colman (Serie 5000) con detector radioattivo. Su un'aliquota del campione si confermava l'estradiolo-17  $\beta$  preparando il derivato acetato ed analizzandolo al gas-cromatografo su SE 30 2%, a 215°C, con

(1) Per le modalità di preparazione delle soluzioni di substrato rimandiamo al lavoro: « Botte e Koide, Biochim. Biophys. Acta », 152, 396-400 (1968).

un flusso di argon di 90 ml/minuto. Gli RT dell'estradiolo-17 $\beta$  e del suo acetato erano rispettivamente 3.5 e 5.37 m.

Le attività enzimatiche sono state espresse in  $\mu$  moli di steroide liberato in 30 minuti di incubazione per mg di proteina dell'omogenato.

TABELLA I.

*Attività delle fosfatasi alcalina ed acida estratte da vari tessuti di topine adulte.*

TESSUTI	SUBSTRATI			
	C-21-P (*)		E-17 $\beta$ -P (*)	
	alcalina	acida	alcalina	acida
Ovario . . . . .	23,1 $\pm$ 2,9 (**)	14,1 $\pm$ 4,4	o	12,0 $\pm$ 1,0
Utero . . . . .	27,6 $\pm$ 2,8	10,4 $\pm$ 1,7	o	9,9 $\pm$ 1,4
Vagina . . . . .	11,6 $\pm$ 1,5	5,0 $\pm$ 0,6	o	7,9 $\pm$ 0,9
Surrene . . . . .	34,4 $\pm$ 2,4	13,5 $\pm$ 2,7	o	12,5 $\pm$ 1,4
Rene . . . . .	6,9 $\pm$ 0,8	5,0 $\pm$ 0,6	4,8 $\pm$ 1,0	5,7 $\pm$ 0,8
Intestino . . . . .	14,7 $\pm$ 1,9	9,5 $\pm$ 0,7	o	8,5 $\pm$ 1,1

(\*) C-21-P = idrocortisone-21-fosfato; E-17 $\beta$ -P = estradiolo-17 $\beta$ -fosfato.

(\*\*) Le attività enzimatiche (valori medi di sei determinazioni per ogni esperimento) sono espresse in  $\mu$  moli di substrato scisso per milligrammo di proteine dell'omogenato,  $\pm$  l'errore standard.

La Tabella I mostra le attività enzimatiche delle fosfatasi alcalina ed acida con i due substrati steroidi fosfati. L'idrocortisone-21-fosfato è scisso da entrambe le fosfatasi, con una maggiore attività di quella alcalina. Diversamente l'estradiolo-17 $\beta$ -fosfato viene scisso solo dalla fosfatasi acida dell'ovario, dell'utero, della vagina, del surrene e dell'intestino e da entrambe le fosfatasi del rene.

L'attività nei confronti degli steroidi-fosfati è più alta nell'ovario, utero e surrene rispetto agli altri organi studiati.

I nostri dati indicano che la capacità di scindere l'estradiolo-17 $\beta$ -fosfato è proprietà della fosfatasi acida di tutti gli organi studiati. Ciò esclude che tale attività della fosfatasi acida fosse caratteristica della placenta.

La presenza, nei vari organi, di una attività delle fosfatasi per gli steroidi fosfati pone il problema della presenza di enzimi specifici per questi substrati. È noto che le fosfatasi sono presenti nei tessuti sotto forma di diversi isoenzimi, per cui non si può escludere che solo alcuni di questi possano scindere gli steroidi fosfati.

## BIBLIOGRAFIA.

- ALLEN W. M., « J. Clin. Endocrinol. Metab. », 10, 71 (1950).  
ALDMAN B., DICZFALUSY E. e ROSENBERG T., « Acta Scand. », 2, 529 (1948).  
ALDMAN B., DICZFALUSY E., HÖGBERG B. e ROSENBERG T., « Biochem. J. », 49, 218 (1951).  
BOTTE V. e KOIDE S. S., « Biochim. Biophys. Acta », 152, 396-400 (1968 a).  
BOTTE V. e KOIDE S. S., « Endocrinology », in corso di stampa.  
FERNÖ O., FEX H., HÖGBERG B., LINDEROT T., VEIGE S. e DICZFALUSY E., « Acta Chem. Scand. », 12, 1675 (1958).  
KINGSLEY G. R. e GETCHELL G., « Anal. Biochem », 2, 1 (1961).  
LOWRY O. H., ROSEBROUGH N. T., FARR A. L. e RANDALL R. J., « J. Biol. Chem. », 193, 265 (1951).