

PATOLOGIA SUINA

Attività ed espressione dell'enzima 3-β-idrossisteroide deidrogenasi in testicoli sani e criptorchidi di suino

Nei mammiferi il criptorchidismo è una delle più frequenti patologie dell'apparato urogenitale maschile a eziologia multifattoriale; condizioni predisponenti potrebbero essere legate ad alterazioni dell'asse ipotalamo-ipofisario e del metabolismo degli ormoni sessuali steroidei. A tale proposito in questo lavoro gli autori hanno valutato l'attività della 3-β-idrossi-Δ⁵-steroide deidrogenasi (3 β-HSD) enzima fondamentale nella conversione dei “-Δ⁵-3-β-idrossisteroidi” a “-Δ⁴-3-chetosteroidi” in testicoli sani e criptorchidi di suino.

La mancata discesa dei testicoli nello scroto rappresenta un'anomalia congenita nota come *criptorchidismo*, e può coinvolgere un solo testicolo (criptorchidismo monolaterale) o entrambi (criptorchidismo bilaterale); in ogni caso le maggiori conseguenze riscontrate dal punto di vista clinico sono rappresentate da un elevato rischio d'infertilità e d'insorgenza di cancro testicolare nell'adulto [1, 13, 18, 19]. L'eziologia di tale patologia è idiopatica, multifattoriale e sembra in parte dovuta a uno squilibrio nel metabolismo degli ormoni steroidei e a un difetto dell'asse ipotalamo-ipofisario [1, 2, 17]. Recenti studi hanno dimostrato che nella genesi del disturbo possono essere coinvolti fattori ambientali, come il contatto con sostanze chimiche (per esempio ftalati, pesticidi, detergenti) e lo stile di vita [7, 12, 15, 23, 24] oppure una predisposizione genetica [13, 14]. Dal punto di vista ormonale è di notevole interesse l'attività di enzimi denominati “*idrossisteroide deidrogenasi*” (HSD), essenziali per la biosintesi degli steroidi

nei tessuti steroidogenici, come le ghiandole surrenali, le gonadi e la placenta. Diversi lavori hanno evidenziato che in testicoli di ratto o uomo resi sperimentalmente criptorchidi, i livelli di testosterone e di alcuni degli enzimi preposti alla sua sintesi sono inferiori rispetto a quelli riscontrati in testicoli sani [2, 6, 9, 10, 21]. Anche in un recente studio Heimej e Bilińska [11] hanno dimostrato che in testicoli criptorchidi di stallone i livelli di testosterone sono ridotti rispetto ai valori misurati in testicoli sani. Gli stessi autori riportano inoltre nel testicolo criptorchide rispetto a quello sano una diminuzione nell'espressione della 3-β-idrossi-Δ⁵-steroide deidrogenasi (3-β-HSDH). Quest'ultimo è un complesso enzimatico che gioca un ruolo importante nella conversione dei “-Δ⁵-3-β-idrossisteroidi” a “-Δ⁴-3-chetosteroidi”, e in particolare è responsabile della sintesi del testosterone a partire da pregnenolone [4, 16, 22]. Il frequente riscontro nei suini in corso di macellazione di testicoli criptorchidi, già riportato in precedenti lavori [8], ha indotto gli autori ad ►►

Stefano Amedeo*
Fulvia Cerruti**

Maria Teresa Capucchio*
Raffaella De Maria**

Michele Apicella***
Monica Giberti***

Franco Guarda****
Silvia Mioletti**

*Dipartimento di Patologia Animale
Università degli Studi di Torino

**Dipartimento di Morfofisiologia
Veterinaria, Università degli Studi
di Torino

***ASL 17/2 Saluzzo, Cuneo

****Centro di Referenza di Patologia
Comparata Bruno Maria Zaini
Dipartimento di Patologia Animale
Torino



approfondire gli studi su questa anomalia. A tal proposito è sembrato interessante valutare la presenza di eventuali differenze nell'attività e nell'espressione della 3- β -HSDH in testicoli sani e criptorchidi di suino, anche in considerazione del suo utilizzo quale modello animale ideale per studi comparativi in medicina veterinaria e umana a causa delle marcate analogie con l'uomo, in particolare per quel che riguarda il periodo di discesa dei testicoli nello scroto, la morfologia dello sperma e la struttura testicolare [18].

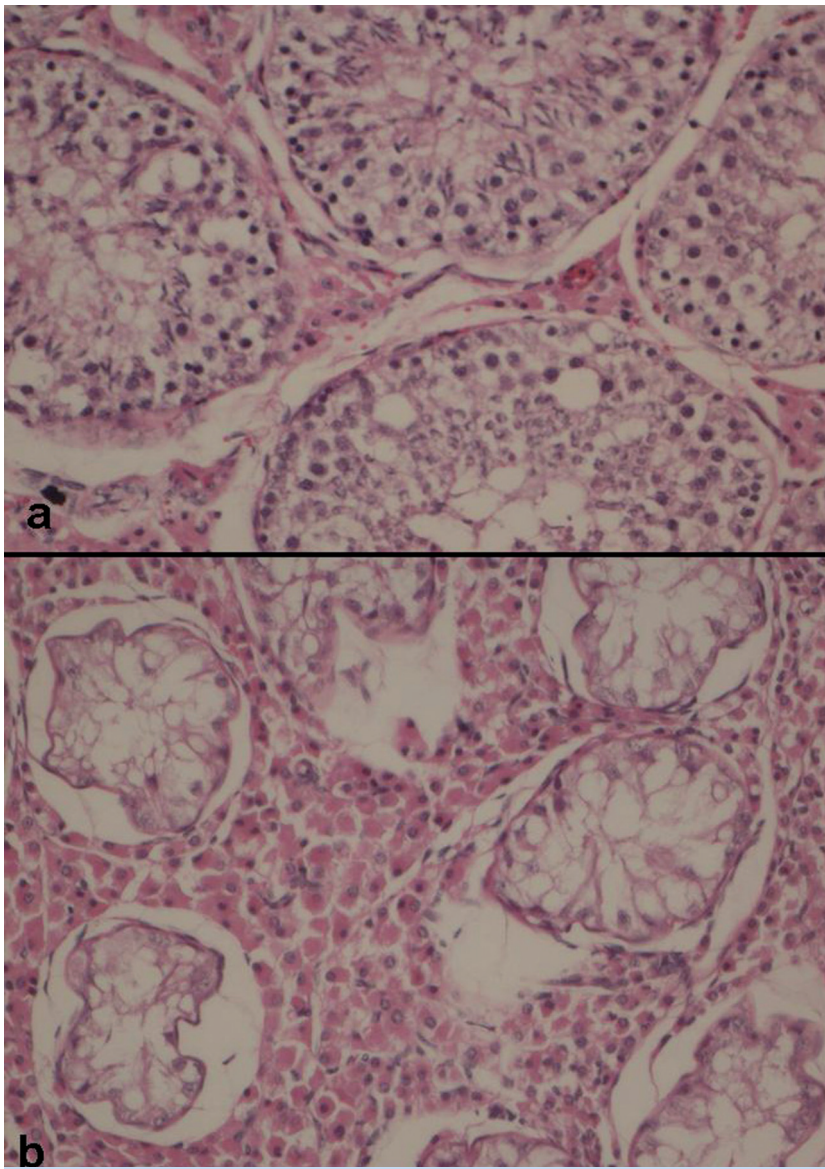


Foto 1. **a.** Quadro istopatologico di un testicolo di suino sano: tubuli seminiferi contenenti l'intera linea seminale e scarse cellule di Leydig nell'interstizio. **b.** Testicolo criptorchide: tubuli seminiferi quasi vuoti rivestiti da un solo strato di spermatogoni intercalati a cellule del Sertoli; nell'interstizio notevolmente aumentate ed ipertrofiche le cellule del Leydig. Ematossilina-eosina 200x.

● **Materiali e metodi**

In questo studio sono stati utilizzati 10 testicoli normali, come controllo, e 10 testicoli criptorchidi monolaterali di suini, ibridi commerciali della razza Landrace e appartenenti al tipo pesante (p.v. 150-170 kg). Gli animali sono stati macellati all'età di nove mesi e i testicoli immediatamente rimossi. Una parte dei tessuti è stata immersa in formalina tamponata per la valutazione istologica e una parte è stata invece congelata in azoto liquido per l'analisi biochimica.

Per l'indagine istologica i tessuti normali e patologici sono stati fissati in formalina tamponata al 10%, inclusi in paraffina, sezionati al microtomo (5 μ m) e colorati con ematossilina eosina. Per l'analisi biochimica i testicoli sono stati omogenizzati in tampone TRIS-HCl 0.15 M pH 7.25, centrifugati a 10.000 x g per un'ora a 4 °C e il surnatante è stato utilizzato per la valutazione dell'attività della 3- β -HSDH. Per questa determinazione è stato utilizzato il metodo colorimetrico descritto da Qujeq D [20]: in breve l'attività enzimatica è stata saggiata in tampone TRIS-HCl 0,15 M contenente NAD⁺ (500 μ M) e il substrato (pregnenolone 300 μ M), in un volume finale di 3 ml. Il contenuto di proteine dei vari estratti enzimatici è stato determinato con il metodo Bradford [3] e l'attività enzimatica è stata calcolata su una curva standard di NADH ed espressa come *nmol NADH/min/mg proteina*. Per stabilire la normalità della distribuzione è stato utilizzato il test di Shapiro-Wilk, quindi è stato applicato il test parametrico "test t" di uguaglianza delle medie per campioni indipendenti considerando $P < 0.05$ come statisticamente significativo e $P < 0.01$ altamente significativo.

Sugli stessi campioni è stata effettuata la RT-PCR estraendo l'RNA totale dai testicoli secondo il metodo di Chomczynski e Sacchi [5] e rimuovendo tutti i residui di DNA con il kit "DNA free" (Ambion). L'integrità dell'RNA è stata confermata mediante elettroforesi su gel di agarosio in condizioni denaturanti, mentre la concentrazione è stata quantificata misurandone la densità ottica a 260nm con uno spettrofotometro.

Il cDNA è stato sintetizzato a partire da 400ng di RNA totale usando ImProm-II Reverse Transcriptase (Promega) e random primers (Promega). Al fine di determinare la quantità di gene specifico codificante per la 3- β -HSDH di suino, il

Grafico rappresentativo dell'attività della 3- β -idrossi- Δ^5 -steroidi deidrogenasi nei testicoli sani e criptorchidi di suino (nmol NADH/min/mg proteina)

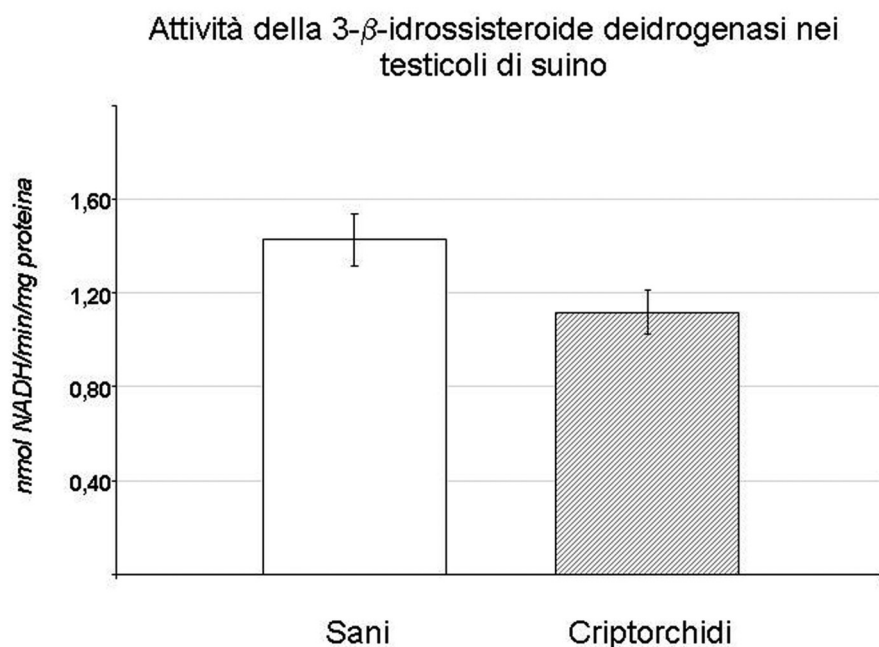


Figura 1

cDNA è stato sottoposto a PCR quantitativa utilizzando il metodo Syber Green e il sistema di rilevazione IQ 5 (Bio-Rad), mentre le sequenze dei primers sono state disegnate usando il programma *Primer Express (Version 1.5)* (Senso: 5' GTG TGC TCT GAG GCC CAT GT 3'; Antisense: 5' GTT GTG TGT CAG GAC GCC ATT 3'). La quantità dell'espressione genica è stata calcolata mediante un saggio di quantificazione relativa corrispondente al metodo comparativo C_T , dove la quantità di "target", normalizzata su un gene "housekeeping" endogeno (il gene della gliceraldeide fosfato deidrogenasi - GAPDH, Senso: 5' CGTCCCTGAGACACGATGGT 3'; Antisense: 5' CAATGTCCACTTTGC-CAGAGTTAA 3'), e relativa a un campione di controllo, si ottiene dalla formula $2^{-\Delta\Delta C_T}$, dove $\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T \text{ campione}} - \Delta C_{T \text{ controllo}}$ e ΔC_T è il C_T del gene "target" sottratto al C_T del gene "housekeeping".

Risultati

L'esame istologico dei testicoli sani ha evidenziato i tubuli seminiferi contenenti l'intera linea seminale e scarse cellule di Leydig nell'interstizio (foto 1a). Nei testicoli criptorchidi i tubuli seminiferi ap-

paiono vuoti con un solo strato di cellule a disposizione disordinata, spermatozoni, intercalate a cellule del Sertoli. Nell'interstizio sono poi ben visibili numerose cellule del Leydig di aspetto ipertrofico (foto 1b).

Dai risultati delle prove sperimentali è stato interessante rilevare come l'attività enzimatica della 3- β -HSDH sia significativamente inferiore ($P < 0.5$) nei testicoli criptorchidi rispetto a quelli sani (1.43 ± 0.41 vs. 1.12 ± 0.34 nmol NADH/min/mg protein) (figura 1), ma non si è osservata alcuna differenza significativa tra tessuto sano e patologico per quanto riguarda i livelli di mRNA dell'enzima, quantificati con l'RT-PCR.

Considerazioni e conclusioni

Il criptorchidismo è considerato nell'uomo la patologia congenita più importante nello sviluppo, presente in più dell'1% dei bambini sotto i tre mesi di età [1,7]. È noto dalla letteratura che un ruolo decisivo nella discesa anomala del testicolo è svolto da un'alterata funzionalità delle cellule del Leydig, congiuntamente a una non idonea secrezione di testosterone, il prin-



cipale ormone maschile responsabile del mantenimento delle più importanti funzioni testicolari. Un'alterazione nel percorso metabolico che porta alla sintesi di quest'ormone potrebbe quindi essere uno dei fattori legati alla mancata discesa dei testicoli nella loro naturale sede anatomica.

La 3- β -HSDH è un enzima fondamentale in diverse tappe che portano alla sintesi di testosterone perciò l'analisi della sua attività e della sua espressione nel tessuto testicolare è parsa fondamentale per evidenziare eventuali anomalie che possono coinvolgere questa via metabolica. Inoltre, come già accennato, gli autori hanno voluto utilizzare il suino come modello animale perché per diversi aspetti pre-

senta marcate analogie con l'uomo.

Gli autori valutano interessanti i risultati del lavoro poiché in base ad essi si può ipotizzare che i minori livelli di testosterone riportati in letteratura per quel riguarda i testicoli criptorchidi possano essere riconducibili anche a una diminuita attività della 3- β -HSDH, enzima estremamente importante per la sintesi di questo ormone. Inoltre, come rivelato dall'analisi mediamente RT-PCR, questa minore attività enzimatica potrebbe essere imputabile a cause ancora da stabilire (per esempio fattori ambientali, squilibri ormonali, etc.), ma sicuramente non a una differenza significativa tra i livelli di mRNA dell'enzima tra tessuto sano e criptorchide. ■

Bibliografia

- 1-Amann, R. P., and D. N. R. Veeramachaneni Cryptorchidism in common eutherian mammals. *Reproduction*. 2007; vol. 133: pp. 541-561.
- 2-Bergh A., Ason Berg A., Damberg J E, Hammar M., Selstan G. Steroid biosynthesis and Leydig cell morphology in adult unilaterally cryptorchid rats. *Acta Endocrinol (Copenh) Dec*; 1984; vol. 107, n. 4: pp. 556-62.
- 3-Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* 1976; vol. 72: pp. 248-254.
- 4-Brooks RI., Pearson AM. Steroid hormone pathways in the pig, with special emphasis on boar odor: a review. *J Anim. Sci.* 1986; vol. 62, n. 3: pp. 632-45.
- 5-Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987; vol. 162, n. 1: pp. 156-9.
- 6-Farrer JH, Sikka SC, Xie HW, Constantinide D., Rajfer J. Impaired testosterone biosynthesis in cryptorchidism. *Fertil Steril.* 1985; vol. 44, n. 1: pp. 125-32.
- 7-Foresta C, Zuccarello D, Garolla A, Ferlin A. Role of hormones, genes, and environment in human cryptorchidism. *Endocr. Rev.* 2008; vol. 29, n. 5: pp. 560-80.
- 8-Gambino F., Giberti M., Apicella M., Druetta P., Amedeo S., Dore B., Lusich S., Guarda F. Osservazioni al macello sulla patologia testicolare nei suini con particolare riferimento ai criptorchidi. *Large Anim. Rev.* 2003; vol. 9, n. 5: pp. 49-55.
- 9-Gendrel D, Roger M, Job JC. Plasma gonadotropin and testosterone values in infants with cryptorchidism. *J Pediatr.* 1980; vol. 97, n. 2: pp. 217-20.
- 10-Grizard G., Azaoui A., Boucher D. Testosterone, androstenedione, progesterone and 17 alpha-hydroxyprogesterone in plasma and testes of immature rats under basal conditions and after hCG stimulation. Effect of bilateral cryptorchidism. *Steroid Biochem.* 1987; vol. 28, n. 6: pp. 703-10.
- 11-Hejmej A, Bilińska B. The effects of cryptorchidism on the regulation of steroidogenesis and gap junctional communication in equine testes. *Endokrynol. Pol.* 2008; vol. 59, n. 2: pp. 112-8.
- 12-Hu GX, Lian QQ, Ge RS, Hardy DO, Li XK. Phthalate-induced testicular dysgenesis syndrome: Leydig cell influence. *Trends Endocrinol Metab.* 2009; vol. 20, n. 3: pp. 139-45.
- 13-Ivell, R., and S. Hartung The molecular basis of cryptorchidism. *Mol. Hum. Reprod.* 2003; vol. 9: pp. 175-181.
- 14-Klonisch T, Fowler PA and Hombach-Klonisch S. Molecular and genetic regulation of testis descent and external genitalia development. *Developmental Biology.* 2004; vol. 270: pp. 1-18
- 15-Main KM, Skakkebaek NE, Toppari J. Cryptorchidism as part of the testicular dysgenesis syndrome: the environmental connection. *Endocr Dev.* 2009; vol. 14: pp. 167-73.
- 16-Payne AH, Abbaszade IG, Clarke TR, Bain PA, Park CH. The multiple murine 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase isoforms: structure, function, and tissue- and developmentally specific expression. *Steroids.* 1997; vol. 62, n. 1: pp. 169-75.
- 17-Pierik FH, Deddens JA, Burdorf A, de Muinck Keizer-Schrama SM, de Jong FH, Weber RF The hypothalamus-pituitary-testis axis in boys during the first six months of life: a comparison of cryptorchidism and hypospadias cases with controls. *Int J Androl.* 2008; vol. 32, n. 5: pp. 453-461.
- 18-Pinart E, Sancho S, Briz M, Bonet S. Morphologic study of the testes from spontaneous unilateral and bilateral abdominal cryptorchid boars. *J Morphol.* 1999; vol. 239, n. 3: pp. 225-43.
- 19-Pinart E., Sancho S., Briz M., Bonet S., Garcia N., Badia E. Ultrastructural study of the boar seminiferous epithelium: changes in cryptorchidism. *Journal Morphol.* 2000; vol. 244: pp. 190-202.
- 20-Qujeq D. Development of a quantitative assay method for 3 beta-hydroxy-delta 5-steroid dehydrogenase in the rat testis. *Steroids.* 2002; vol. 67: pp. 1071-1077.
- 21-Sharpe RM, Cooper I, Doogan DG. Increase in Leydig cell responsiveness in the unilaterally cryptorchid rat testis and its relationship to the intratesticular levels of testosterone. *J Endocrinol.* 1984; vol. 102, n. 3: pp. 319-27.
- 22-Thomas JL, Duax WL, Adlagatta A, Kacsoh B, Brandt SE, Norris WB Structure/function aspects of human 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Mol Cell Endocrinol.* 2004; vol. 215, n. 1-2: pp. 73-82.
- 23-Thonneau, P. F., P. Candia, and R. Miesusset. Cryptorchidism: Incidence, risk factors, and potential role of environment; an update. *J. Androl.* 2003; vol. 24: pp. 155-162.
- 24-Virtanen HE, Toppari J. Epidemiology and pathogenesis of cryptorchidism. *Hum Reprod Update.* 2008; vol. 14, n. 1: pp. 49-58.