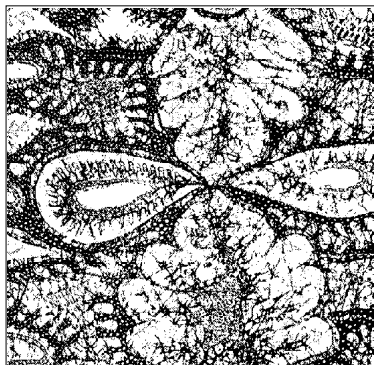


Caleidoscopio

Italiano



Ivan Manduchi

Steroidi

*Laboratorio Analisi
Ospedale "Infermi" USL 40
Rimini*

95

**Direttore Responsabile
Sergio Rassu**

 **MEDICAL
SYSTEMS S.p.A.**

Via Rio Torbido, 40 - Genova (Italy) Tel. 010 83.401
Stampato a Genova 1995

ISTRUZIONI PER GLI AUTORI



INFORMAZIONI GENERALI. *Caleidoscopio* pubblica lavori di carattere monografico a scopo didattico su temi di Medicina. La rivista segue i requisiti consigliati dall'*International Committee of Medical Journal Editors*. Gli Autori vengono invitati dal Direttore Responsabile. La rivista pubblica anche monografie libere, proposte direttamente dagli Autori, redatte secondo le regole della Collana.

TESTO. La monografia deve essere articolata in paragrafi snelli, di rapida consultazione, completi ed allo stesso tempo chiari. I contenuti riportati devono essere stati sufficientemente confermati. E' opportuno evitare di riportare solo proprie personali opinioni dando un quadro limitato delle problematiche. La lunghezza del testo può variare dalle 60 alle 70 cartelle dattiloscritte. Si prega di dattilografare su una sola facciata del foglio formato A4 con margini di almeno 25 mm. Usare dovunque doppi spazi e numerare consecutivamente. Ogni sezione dovrebbe iniziare con una nuova pagina.

FRONTESPIZIO. Deve riportare il nome e cognome dell'Autore(i) -non più di cinque- il titolo del volume, conciso ma informativo, la Clinica o Istituto cui dovrebbe essere attribuito il lavoro, l'indirizzo, il nome e l'indirizzo dell'Autore (compreso telefono e fax) responsabile della corrispondenza.

BIBLIOGRAFIA. Deve essere scritta su fogli a parte secondo ordine alfabetico seguendo le abbreviazioni per le Riviste dell'Index Medicus e lo stile illustrato negli esempi:

1) Björklund B., Björklund V.: Proliferation marker concept with TPS as a model. A preliminary report. J. Nucl. Med. Allied. Sci 1990 Oct-Dec, VOL: 34 (4 Suppl), P: 203.

2 Jeffcoate S.L. e Hutchinson J.S.M. (Eds): The Endocrine Hypothalamus. London. Academic Press, 1978.

Le citazioni bibliografiche vanno individuate nel testo, nelle tabelle e nelle legende con numeri arabi tra parentesi. La Redazione è collegata on-line con le più importanti Banche Dati (Medline, Cancerlit, AIDS etc) e fornisce ogni eventuale assistenza agli Autori.

TABELLE E FIGURE. Si consiglia una ricca documentazione iconografica esplicativa (in bianco e nero eccetto in casi particolare da concordare). Figure e tabelle devono essere numerate consecutivamente (secondo l'ordine di citazione nel testo) e separatamente; sul retro delle figure deve essere indicato l'orientamento, il nome dell'Autore ed il numero. Le figure devono essere realizzate professionalmente; è inaccettabile la riproduzione di caratteri scritti a mano libera. Lettere, numeri e simboli dovrebbero essere chiari ovunque e di dimensioni tali che, quando pubblicati, risultino ancora leggibili. Le fotografie devono essere stampe lucide, di buona qualità. Gli Autori sono responsabili di quanto riportato nel lavoro ed in particolare dell'autorizzazione alla pubblicazione di figure o altro. Titoli e spiegazioni dettagliate appartengono alle legende, non alle figure stesse.

Su fogli a parte devono essere riportate le legende per le figure e le tabelle.

UNITÀ DI MISURA. Per le unità di misura utilizzare il sistema metrico decimale o loro multipli e nei termini dell'International system of units (SI).

ABBREVIAZIONI. Utilizzare solo abbreviazioni standard. Il termine completo dovrebbe precedere nel testo la sua abbreviazione, a meno che non sia un'unità di misura standard.

PRESENTAZIONE DELLA MONOGRAFIA. Riporre le fotografie e le diapositive in busta separata, una copia del testo e dei grafici archiviati su un dischetto da 3.5 pollici preferibilmente Macintosh, se MS-DOS il testo dovrà essere in formato RTF ed i grafici in formato PC.TIF o PC.Paintbrush.

Il dattiloscritto originale, le figure, le tabelle, il dischetto, posti in busta di carta pesante, devono essere spediti al Direttore Responsabile con una lettera di accompagnamento. L'autore dovrebbe conservare una copia a proprio uso. Dopo la valutazione espressa dal Direttore Responsabile, la decisione sulla eventuale accettazione del lavoro sarà tempestivamente comunicata all'Autore. Il Direttore responsabile deciderà sul tempo della pubblicazione e conserverà il diritto usuale di modificare lo stile del contributo; più importanti modifiche verranno eventualmente fatte in accordo con l'Autore. I manoscritti e le fotografie se non pubblicati non si restituiscono.

L'Autore riceverà le bozze di stampa per la correzione e sarà Sua cura restituire al Direttore Responsabile entro cinque giorni, dopo averne fatto fotocopia. Le spese di stampa, ristampa e distribuzione sono a totale carico della Medical Systems che provvederà a spedire all'Autore cinquanta copie della monografia.

L'Autore della monografia cede i pieni ed esclusivi diritti sulla Sua opera alla Rivista *Caleidoscopio* con diritto di stampare, pubblicare, dare licenza a tradurre in altre lingue in Nazioni diverse rinunciando ai diritti d'Autore.

Tutta la corrispondenza deve essere indirizzata al Direttore Responsabile al seguente indirizzo:

Dott. Sergio Rassu
Via Pietro Nenni, 6
07100 Sassari

Editoriale

Il titolo di questa monografia non deve trarre in inganno. Come è facilmente comprensibile non è lo scopo di questo volume dare una completa ed esaustiva trattazione di questo argomento.

Come ben sottolinea l'Autore, parlare di steroidi significa parlare di acidi biliari, ma anche di ormoni sessuali, di glicosidi cardiaci, di ormoni surrenalici e di vitamina D ed altri.

Si capisce quindi come queste molecole possano rivestire ruoli e significati estremamente complessi e diversi tra loro.

Vien difficile d'altronde cercare di stabilire una gerarchia tra i tanti compiti che questi composti svolgono.

E' sufficiente pensare al campo della fertilità o della differenziazione sessuale, a quello degli anabolizzanti o nella terapia immunosoppressiva, nella rigenerazione motoneuronale o nel trattamento di patologie allergiche quali l'asma.

La prospettiva dalla quale trattare inoltre i singoli argomenti può essere quanto mai diversa: può essere quella del patologo clinico, del farmacologo, del tossicologo o del clinico medico.

L'approccio scelto dall'Autore, di tipo biochimico, pone le basi per qualsiasi sviluppo che non potrà che essere specifico. E' possibile cogliere nel leggere il volume, l'interesse con il quale l'Autore ha sempre seguito questo settore ed il senso del "vissuto" della storia di queste molecole nei nostri laboratori in questi ultimi venti anni.

Molti dei nostri lettori conoscono l'argomento per aver *combattuto* strenue battaglie quando, nel campo della fertilità, veniva fatto il dosaggio degli steroidi sessuali utilizzando come marcato il trizio dopo faticosi processi di estrazione e facendo ricorso al processo di scintillazione liquida. Oggi, che sono disponibili dosaggi in chemiluminescenza con filosofia "walk-away", fa sorridere quel periodo eroico.

Penso valga la pena anche evidenziare un dato economico. Se per l'industria farmaceutica questo argomento ha una importanza notevole, non è tuttavia trascurabile quella nel campo diagnostico.

Il dosaggio degli steroidi sessuali e degli ormoni corticosurrenali ha superato, in Italia, i venticinque miliardi/anno con un progressivo calo negli ultimissimi anni della metodologia radioimmunologica che viene sostituita dai metodi alternativi. In questa evoluzione metodologica, che è anche una *selezione delle specie*, molti che non hanno saputo o potuto cogliere il significato sono scomparsi.

Il Dott. Ivan Manduchi, Chimico Coadiutore presso il Laboratorio Analisi dell'Ospedale "Infermi" di Rimini, si è laureato in Chimica Industriale all'Università di Bologna nel 1968. Dopo un'esperienza di qualche anno nel campo della ricerca di tecnologie per le materie plastiche all'ENI, da oltre 20 anni si occupa di Chimica Clinica e di dosaggi ormonali in particolare, come Responsabile del Settore di Immunometria.

E' stato impegnato per lungo tempo nel campo delle Tossicodipendenze e numerose sono le sue pubblicazioni su questo argomento. Ha presentato relazioni in Congressi sia nazionali che internazionali ed ha pubblicato articoli su tutte le principali riviste scientifiche. Attualmente svolge anche attività didattica presso l'Istituto di Chimica dell'Università di Urbino.

Sergio Rasso

Premessa

Lo studio dei processi biochimici e fisiologici degli organismi viventi porta ad interessarsi di un grande numero di molecole, delle quali spesso si perde purtroppo il significato intrinseco. Ci sono molecole i cui meccanismi biochimici sono stati indagati nei minimi particolari e su cui è stata scritta un'enormità di articoli, altre invece su cui non tutto è stato ancora chiarito, nonostante gli enormi mezzi tecnici oggi a disposizione a livello analitico. Ci sono poi le molecole privilegiate dai ricercatori, quelle in qualche modo legate a quel meraviglioso "meccanismo" che regola la vita.

Sono infatti gli aminoacidi, le proteine, gli enzimi, le complesse e strutturalmente affascinanti molecole del DNA che comunemente vengono associate a tutto ciò che riguarda la vita. Non si può negare però che l'innescare e l'attivazione di tutto quel misterioso processo legato alla vita ed alla sua continuazione, in tutti gli esseri viventi, siano strettamente legate alle molecole steroidee. Sono steroidi infatti le molecole che determinano i caratteri sessuali, quelle che provocano l'attrazione sessuale e che assicurano la fecondità in tutto il regno animale; sono gli steroidi che concorrono in maniera predominante a portare a buon fine la gestazione.

Senza considerare poi la diffusione di queste molecole nel regno vegetale e la loro importanza in campo farmacologico. Gli steroidi mi hanno sempre affascinato e interessato per quella loro piccola struttura geometrica e per la loro così differenziata attività fisiologica anche per impercettibili diversità strutturali. Ho quindi raccolto e cercato di riassumere quelli che a mio avviso sono gli aspetti più interessanti degli steroidi in campo clinico-chimico soprattutto, cercando di mettere in risalto anche le problematiche relative alla determinazione, non facile, di tali molecole. Alcuni argomenti saranno solo accennati e le formule saranno ridotte al minimo indispensabile per rendere la lettura il più agevole possibile anche per chi non possieda una cultura specifica sulla materia.

Chimica degli steroidi - Generalità

Gli steroidi (dal greco *stereos*= solido) costituiscono un gruppo di composti molto diffusi in natura che, dal punto di vista chimico-strutturale contengono un sistema tetraciclico di atomi di carbonio (ciclopentanoperidrofenantrene) (Figura 1).

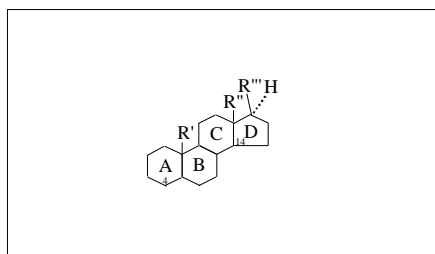


Figura 1. Formula generale degli steroidi.

A parte le piccole, ma sostanziali, differenze dovute alla presenza di sostituenti nel nucleo ed al grado di insaturazione, i diversi tipi di composti si differenziano soprattutto per R', R'' e R''' (1).

Il gruppo R' può essere assente (quando l'anello A e/o B è aromatico); generalmente R' e R'' sono gruppi metilici, benché talvolta si incontrino residui, in tali posizioni, parzialmente o completamente ossidati: -CH₂OH, -CHO, -COOH. R' e R'' possono essere anche atomi di idrogeno. La catena laterale in posizione 17 (R''') può essere assente oppure può contenere 2, 4, 5, 8, 9, 10 o 11 atomi di carbonio e talvolta può essere associata ad atomi di ossigeno o più raramente di azoto. La sostituzione dei due atomi di idrogeno in posizione 4 e 14 con gruppi metilici porta ad un vasto gruppo di composti che viene denominato come 4, 4, 14 trimetil-steroidi o trimetilsteroli, presenti in natura sia nel regno animale che vegetale.

Quasi tutti gli steroidi naturali possiedono in posizione 3 un ossidrilico (OH) o un gruppo chetonico (-C=O) (Figura 2).

Per convenzione gli anelli della struttura base degli steroidi si indicano con le lettere A, B, C, D: i primi tre sono anelli di cicloesano, il quarto è un ciclopentano; gli atomi di carbonio hanno una numerazione specifica.

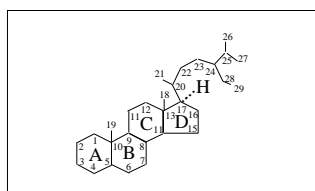


Figura 2.

Nomenclatura

Il sistema usato per la descrizione e per la rappresentazione degli steroidi è quello proposto originariamente da Louis Fieser (1937), ampliato da Reichstein e Shoppee (1943) e modificato da Luis e Mary Fieser (1949). Le regole emanate nella Conferenza della Fondazione CIBA (Londra, 1950), sono state successivamente emendate e ripubblicate (1960) dalla International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC).

Il nome sistematico, compresi i prefissi stereochimici, di uno steroide e della sua formula di struttura designa la configurazione assoluta di ciascun centro chirale (si dicono chirali due oggetti non sovrapponibili, ma uno l'immagine speculare dell'altro, come per esempio le mani). Nei centri chirali, la posizione viene indicata dal numero dell'atomo di carbonio e la configurazione dal suffisso oppure ; un atomo o un gruppo che si trova al di sotto del piano generale del sistema anulare viene denominato e rappresentato con un legame a tratto punteggiato, mentre un atomo, o gruppo che si trova al di sopra del piano viene chiamato e rappresentato da un legame a linea continua spessa. I legami con atomi o gruppi di configurazione sconosciuta vengono rappresentati da una linea ondulata.

L'insaturazione viene indicata cambiando la desinenza -ano nelle desinenze -ene, -adiene, precedute dai numeri indicanti la posizione. I sostituenti possono essere indicati o come prefissi o come suffissi, ad eccezione degli alogeni, del nitrogruppo e del gruppo alchilico, che possono essere usati solo come prefissi.

L'eliminazione di un gruppo metilico angolare nelle posizioni C10 o C13 viene indicato con il prefisso nor, o se entrambi sono eliminati, dal prefisso dinor.

Mentre nel nucleo dello steroide la stereoisomeria è geometrica, quella della catena laterale R'' nella posizione C17 è del tipo classico.

Si suppone che lo scheletro di una catena laterale nella posizione C17 si trovi nel piano del foglio e lo si indica con legami a linea continua sottile.

La configurazione molecolare spaziale degli steroidi non è rigida, in quanto, mentre gli anelli B e C hanno una forma fissa a sedia, l'anello A può assumere sia la forma a sedia, sia quella a barca; la forma dell'anello D (ciclopentano) può variare notevolmente nelle varie classi di steroidi. I gruppi metilici attaccati nelle posizioni C10 e C13 sono assiali e sono detti anche angolari, in quanto sporgono da un angolo acuto della struttura generale della molecola (Figura 2 bis).

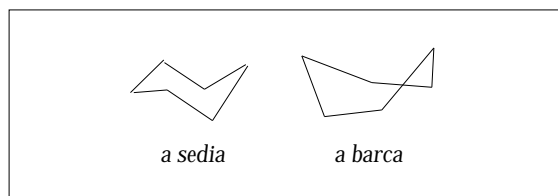


Figura 2 bis. Conformazioni spaziali di un anello a sei atomi.

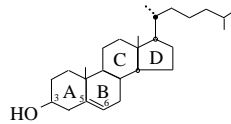
Classificazione degli steroidi

Gli steroidi si possono suddividere in 9 classi principali: steroli, acidi biliari, ormoni sessuali, ormoni corticosurrenali, glicosidi cardiaci ed agliconi, saponine e sapogenine, ecdisoni, vitamina D e trimetilsteroli.

Steroli:

sono alcoli steroidici che contengono un gruppo 3^o-ossidrilico ed una catena laterale alifatica in C 17. Il colesterolo è lo sterolo caratteristico degli animali superiori ed è presente in tutti i tessuti; è il precursore di tutti gli ormoni steroidei. Circa due terzi del colesterolo del sangue sono esterificati da acidi grassi per lo più insaturi, l'altro terzo è libero. Un prodotto di deidrogenazione del colesterolo è il 7-deidrocolesterolo, che è presente nella pelle e costituisce il precursore della vitamina D₃; l'ergosterolo, caratteristico del lievito, è il precursore della vitamina D₂ (Figura 3).

Il colesterolo può essere di origine endogena ed esogena, ed è presente in tutti gli alimenti di origine animale. Il fegato, che è la principale sede della sua biosintesi, ha il compito di mantenere costante il rapporto tra la quota esterificata e quella libera.



Acidi biliari:

sono derivati dell'acido colanico: si formano nel fegato per degradazione del colesterolo e si trovano nella bile sotto forma di sali idrosolubili di sodio del composto peptidico coniugato con gli aminoacidi glicina e taurina. Questi composti coniugati sono sostanze tensioattive, che promuovono il riassorbimento nel tratto intestinale dei grassi e delle sostanze idrofobe; l'idrolisi porta alla formazione di acidi biliari liberi. I principali acidi della bile umana sono l'acido colico (3, 7, 12 triidrossi-5 colanico), l'acido desossicolico (3, 12 - diidrossi - 5 colanico), l'acido chenodesossicolico (3, 7 - 5 colanico) e l'acido litocolico (3 idrossi-5 colanico) (Figura 4).

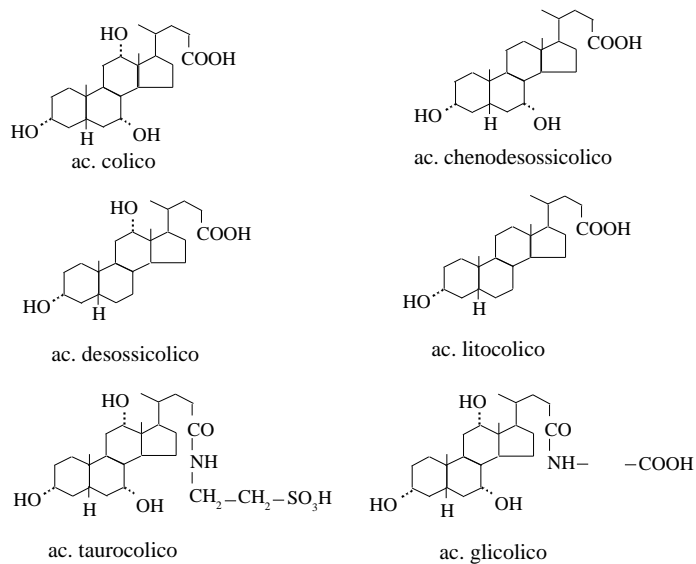


Figura 4. Struttura dei più comuni acidi biliari.

Ormoni sessuali:

sono prodotti dalle ghiandole del sistema riproduttivo del maschio e della femmina e la loro sintesi viene modulata dagli ormoni ipofisari.

Vi sono tre classi di ormoni steroidei sessuali:

- Estrogeni
- Gestageni (Progestinici)
- Androgeni

| | |
|--|---|
| Estrogeni: 17 Estradiolo Estrone Estriolo | Gestageni: Pregnenolone Progesterone (17 OH Prog.) |
| Androgeni: Testosterone Androstenedione Deidroepiandrosterone Diidrotestosterone | |

Gli Estrogeni sono caratterizzati dall'anello aromatico (A) con l'ossidrilico (fenolico) in C3; i Gestageni hanno un gruppo $-CO-CH_3$ in C17 mentre l'attività degli androgeni è strettamente connessa con particolarità della struttura tridimensionale e con la presenza nel nucleo di alcuni gruppi funzionali: è infatti determinante, in senso androgeno, un atomo di ossigeno in C17, meglio se in forma di ossidrilico; un altro atomo di ossigeno si trova in C3, e la struttura con doppio legame tra C4 e C5 e gruppo chetonico in C3 è quella più valida da un punto di vista ormonale, come nel Testosterone (Figura 5).

Ormoni corticosurrenali:

sono prodotti dalle ghiandole surrenali; la loro produzione è controllata dall'ormone adrenocorticotropo (ACTH), un polipeptide prodotto dal lobo anteriore dell'ipofisi.

I principali steroidi di questa classe sono:

- Cortisone
- Cortisolo
- 11-deossicorticosterone
- Corticosterone
- 11-deidrocorticosterone
- Aldosterone

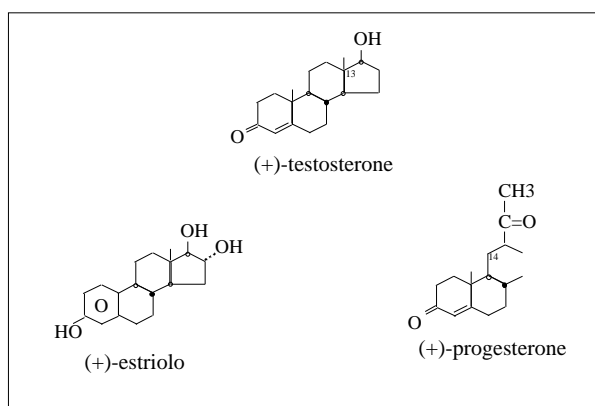


Figura 5. Formula di struttura di alcuni ormoni sessuali.

Sono caratterizzati dalla presenza di un gruppo chetonico in C3 e di una catena $-CO-CH_2OH$ in C17 (Figura 6).

Glicosidi di cardiaci ed agliconi:

la molecola di questi composti è costituita da due parti: una zuccherina e una non zuccherina detta aglicone, che è rappresentato da una struttura steroidea. Sono presenti nelle foglie, nei fiori, nei semi, nelle radici e nella corteccia di una grande varietà di piante. Per idrolisi acida o enzimatica danno gli agliconi steroidici o genine, che sono veleni convulsivanti. Tra i principali steroidi glicosidici vi sono alcuni derivati della *digitalis*, digossina e digitossina, che sono sostanze ad attività cardiotonica, ed altri derivati della *scilla maritima*, usati fino dal XIII secolo come veleno per topi (Figura 7).

Saponine e sapogenine:

sono glicosidi che si trovano nelle foglie, nei semi e nelle radici di alcune piante come la saponaria, la salsapariglia e nelle varietà messicane delle liliacee (yucca, agave, trillium). Sono sostanze ad attività emolitica e tossica se somministrate ai mammiferi per iniezione, mentre sono innocue se ingerite per via orale; sono altamente tossiche per gli animali a sangue freddo.

Le loro soluzioni acquose producono schiuma. Possono essere sinteticamente utilizzate come composti di base per la sintesi di ormoni come il testosterone, il progesterone, il 17 estradiolo e il cortisolo.

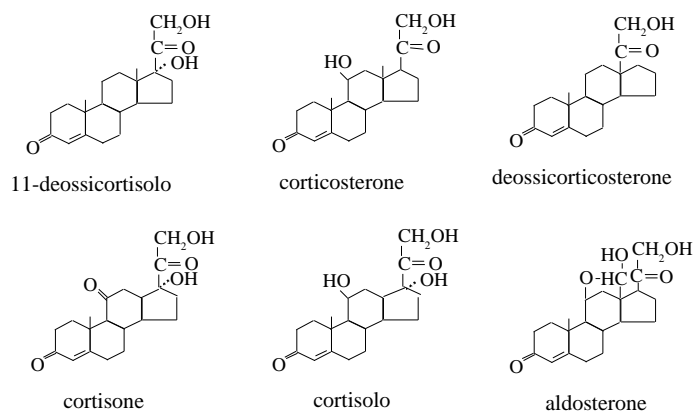


Figura 6. Formule di struttura dei principali ormoni corticosurrenali.

Ecdisoni:

sono soprattutto gli ormoni della metamorfosi degli insetti, che stimolano la trasformazione nei vari stadi dello sviluppo. Dagli insetti, dai crostacei e dalle piante sono stati isolati una trentina di ecdisoni; è probabile che questi steroidi siano di origine esogena e che si trovino negli insetti e nei crostacei provenienti dai loro alimenti. Tutti questi steroidi sono riconducibili ad un'unica forma strutturale biogeneticamente correlata al colesterolo.

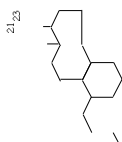
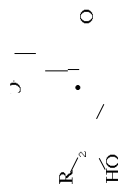
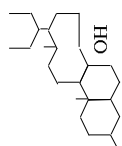
Vitamina D:

il calciferolo o vitamina D fu scoperto in seguito al riconoscimento del benefico effetto esercitato dalla luce ultravioletta, da alcuni alimenti (uova e latticini) e dagli oli di fegato di alcuni pesci, nel trattamento del rachitismo. Lo sterolo implicato in questo processo è l'ergosterolo, che si può considerare il precursore della vitamina D. In realtà si tratta di una miscela di due molecole, denominate D_2 e D_3 (quest'ultima deriva dal 7-deidrocolesterolo).

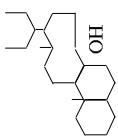
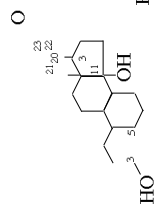
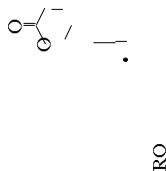
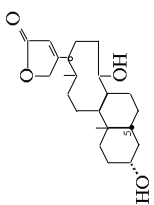
ergosterolo \rightarrow vitamina D_2 (ergocalciferolo)

7-deidrocolesterolo \rightarrow vitamina D_3 (colecalfiferolo)

Queste vitamine hanno potere antirachitico e regolano il metabolismo degli ioni calcio e fosfato (Figura 8).



periplogenina (R=CH₃)
strofandina (R=CHO)



digitossigenina

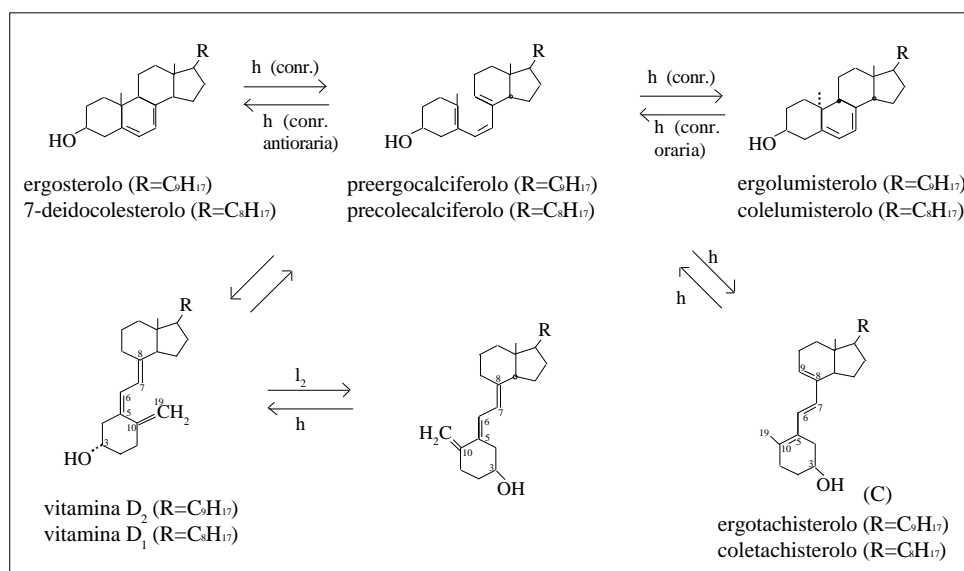


Figura 8. Conversione dell'ergosterolo a vitamine D.

Trimetilsteroli (4,4,14 trimetilsteroidi):

Il più rappresentativo è il lanosterolo, che è presente nella frazione insaponificabile del grasso della lana. La maggior parte degli steroidi appartenenti a questa classe sono però di origine vegetale; sono presenti in resine e funghi. Esistono metodi per rimuovere i gruppi 4,4 e 14 metilici, così che il lanosterolo è una materia prima potenziale per la preparazione degli steroidi sintetici. Anche altri trimetilsteroli, come il cicloartenolo (ottenuto dall'*artocampus integrifolia*) e l'acido eburicoico (ottenuto da diverse specie di funghi), sono potenziali fonti di steroidi.

Ormoni steroidei

Gli ormoni steroidei sono presenti nei diversi liquidi biologici in tre differenti stati chimico-fisici:

- Liberi
- Legati alle proteine veicolanti
- Coniugati (come solfati, glucuronati, solfo-glucuronati)

Nel plasma si ritrovano tutte queste forme; in misura maggiore quella "coniugata", prevalentemente come solfato (anche se non per tutti gli steroidi), segue poi quella veicolata dalle proteine vettrici e infine quella "libera", che rappresenta una frazione estremamente bassa. Nelle urine gli steroidi sono presenti in misura massiva come "coniugati", prevalentemente glucuronati, e, in quantità molto inferiore, anche nella forma "libera". La quota veicolata dalle proteine è assente, sia per la natura stessa del liquido, che non è congeniale a tale tipo di legame, ma soprattutto per la quasi assenza di proteine, che, anche se presenti, sembra non siano più in grado di legare lo steroide in forma stabile (Figura 9).

La coniugazione avviene per mezzo di sistemi enzimatici specifici verso il "sito" di attacco e, per i glucuronati, ha luogo quasi esclusivamente nel fegato; per i solfati invece questo meccanismo è prerogativa anche di altri tessuti, quali le surrenali, l'endometrio, le gonadi e alcuni sono addirittura prodotti come tali (DHEA-Solfato ed Estrone-solfato).

Per quanto riguarda il legame degli steroidi con le proteine vettrici, questo dipende dalla costante di associazione tipica per ogni

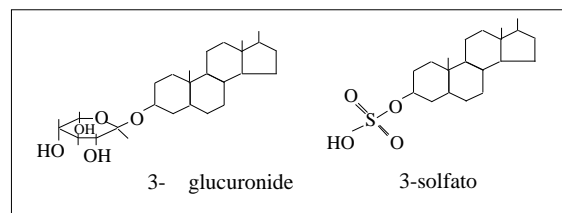


Figura 9. Steroidi coniugati.

steroidi e proteina; essa varia in funzione della concentrazione molare dello steroidi e della proteina, della temperatura e del pH del mezzo. In generale sono le Albumine ad essere responsabili del trasporto della maggiore quota degli steroidi nel circolo sanguigno, trattandosi di proteine a bassa affinità, ma ad alta capacità di legame. Seguono poi le proteine veicolanti specifiche, la cui forza di legame dipende soprattutto dall'affinità delle proteine stesse per lo steroidi considerato e, in ultima analisi, da fattori sterici: esistono infatti su queste proteine siti specifici in grado di legare, non covalentemente, molecole specifiche. I legami in causa sono "legami deboli": legami idrogeno, idrofobici in genere e forze di Van der Waals.

La globulina che lega gli ormoni sessuali (SHBG = Sex Hormon Binding Globulin) possiede un'elevata affinità e capacità per estrogeni ed androgeni, mentre quella che lega i corticosteroidi, la transcortina (CBG), lega anche il progesterone. SHBG e CBG sono glicoproteine acide (PM=45000 e 65000 Daltons rispettivamente), che, oltre alla funzione di trasporto hanno anche quella di proteggere gli steroidi dal metabolismo inattivante durante il percorso verso l'organo bersaglio. E' importante quindi riportare i risultati di concentrazione degli steroidi nei diversi liquidi biologici specificando sempre la forma dello steroidi misurato: totale, coniugato, non coniugato, frazione "libera".

Biosintesi degli ormoni steroidei

Tutte le vie metaboliche nella biosintesi degli ormoni steroidei partono dal Colesterolo, che ne è quindi il precursore.

Il Colesterolo, steroidi a 27 atomi di Carbonio, per scissione enzimatica perde una catena di 6 atomi di carbonio (in C17) dando luogo al Pregnenolone (21 atomi di Carbonio), dal quale successivamente, per l'azione di complessi sistemi enzimatici presenti negli organi interessati, vengono sintetizzati i diversi ormoni steroidei. Le dotazioni enzimatiche dell'ovaio e del surrene, per esempio, sono simili, perché entrambi si formano nel periodo embrionale a partire dalla cresta genitale. Di conseguenza i processi biosintetici avvengono in modo uguale ad eccezione della fase finale; le differenze nella sintesi dei vari ormoni steroidei fra organi diversi e fra uomo e donna risiedono proprio in questi corredi enzimatici contenuti in quantità diverse, nella fase finale (Figura 10).

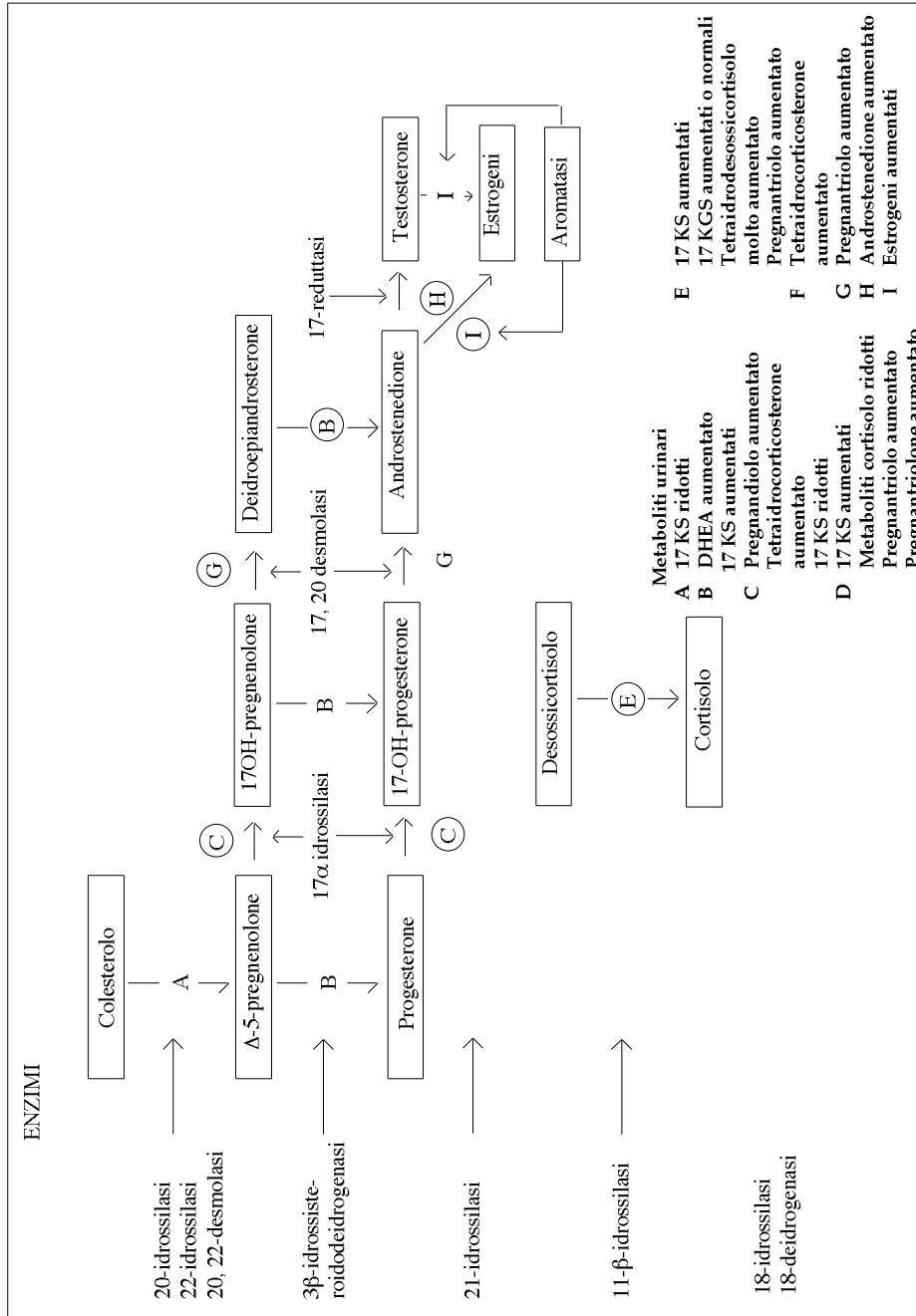


Figura 10. Enzimi coinvolti nella biosintesi steroidea e alterazioni dei metaboliti urinari legate a loro deficit.

Meccanismo di azione degli ormoni steroidei

Gli stadi attraverso cui si esplica l'azione degli ormoni steroidei sono i seguenti:

- a) riconoscimento della struttura ormonale da parte della cellula bersaglio.
- b) passaggio dell'ormone all'interno della cellula.
- c) sua captazione da parte di una proteina specifica definita "recettore".
- d) penetrazione del complesso ormone-recettore attivato nel nucleo e legame alla cromatina nucleare.
- e) dissociazione dalla molecola recettoriale ed attivazione della RNA Polimerasi.
- f) sintesi di RNA messaggero che, fuoriuscito dal nucleo, stimola a livello di reticolo endoplasmatico la sintesi di proteine attive metabolicamente che determinano l'azione metabolica dello steroide.

Gli ormoni liposolubili, idrofobici, come gli steroidi ed anche gli ormoni tiroidei, diffondono passivamente, attraverso la membrana cellulare, al contrario degli ormoni idrofilici (polipeptidici, glicoproteici) che interagiscono direttamente con il recettore di membrana. Una volta all'interno della cellula bersaglio, lo steroide si lega ad un recettore specifico; il complesso steroide-recettore viene sottoposto ad una modificazione di struttura detta "attivazione" e traslocato dal citoplasma al nucleo. A livello del compartimento nucleare il complesso ormone-recettore si lega ai siti recettoriali della cromatina, dove inizia la sua attività specifica. Tali siti di legame vengono descritti frequentemente con il termine "accettore nucleare". L'ipotesi dell'esistenza di tale "accettore" è basata sulla dimostrazione che al nucleo della cellula può legarsi solo un numero limitato di complessi ormone-recettore e che il legame è possibile solo (o soprattutto) con la cromatina della cellula bersaglio. Il destino del complesso ormone-recettore, dopo la sua interazione con gli accettori nucleari, non è chiaro. E' verosimile che, in seguito a modifiche che avvengono nelle strutture dello steroide o del recettore, si realizzi il rilascio del recettore dall'accettore nucleare. I recettori allontanati dal nucleo vengono inattivati da enzimi specifici a localizzazione nucleare. In conclusione la teoria recettoriale implica l'esistenza di un'unica entità proteica capace di modulare l'effetto ormonale: il recettore, comune a tutte le cellule bersaglio. Quello che cambia è la risposta allo stimolo, dipendente dalla diversa struttura cromatinica cellulare, pur in presenza di uguale patrimonio genetico. Il recettore cellulare è definito da alcune caratteristiche:

a) alta affinità di legame -

L'alta affinità di legame (fra 10^8 e 10^{11} M⁻¹) è indispensabile per la definizione di recettore ormonale, perché gli ormoni steroidei sono presenti nel plasma e nei tessuti in concentrazione relativamente bassa e spesso legati a strutture proteiche, con bassa affinità, non definibili quindi come recettori.

b) capacità limitata -

Il recettore è saturabile e quindi è limitato il numero di molecole steroidee capaci di entrare nella cellula bersaglio. La saturabilità della proteina legante recettoriale varia nelle diverse situazioni fisiologiche e determina l'ampiezza della risposta biologica. La concentrazione dei recettori per cellula bersaglio è compresa tra 10^3 e 10^5 .

c) specificità -

Ogni recettore è specifico per una classe di ormoni (es.: il recettore per gli estrogeni lega solo le strutture di tipo estrogenico), il che comporta una risposta cellulare specifica.

d) reversibilità di legame -

Il complesso ormone-recettore (H-R) è dissociabile; quando il legame è specifico la velocità di dissociazione è lenta.

e) specificità tissutale -

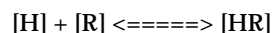
La differenza tra organi non ormono-responsivi ed organi ormono-responsivi risiede nella distribuzione sia quantitativa che qualitativa dei recettori specifici.

f) risposta biologica -

Una risposta biologica specifica definisce sia il recettore, sia l'organo bersaglio: la presenza della risposta biologica testimonia la presenza di un recettore specifico.

Cinetica del legame recettoriale

Il legame ormone-recettore segue la reazione bimolecolare:



[H] = concentrazione dell'ormone libero

[R] = concentrazione del recettore libero

Indicando con K₁ e K₂ le costanti di associazione e dissociazione rispettivamente, quando il sistema è all'equilibrio le velocità di associazione e dissociazione sono uguali e l'equazione diventa:

$$\frac{[H][R]}{[HR]} = \frac{K_2}{K_1} = K_d$$

dove K_d è la costante di dissociazione all'equilibrio e rappresenta la misura dell'affinità del recettore all'equilibrio.

Poiché la risposta biologica dell'ormone è controllata dal segnale generato proporzionalmente al numero dei complessi HR che si formano, l'equazione diventa:

risposta biologica $\rightarrow [HR] = [H] [R] \cdot 1/K_d$

La risposta biologica dipende quindi in definitiva dai seguenti fattori:

- concentrazione ormone libero
- concentrazione recettore
- costante di affinità dell'ormone per il recettore

Estrogeni

Gli estrogeni sono caratterizzati dalla presenza di un anello aromatico (A) nella struttura steroidea e le molecole di maggiore interesse sono (Figura 11):

17- Estradiolo
Estrone
Estriolo

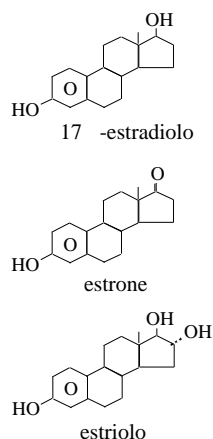


Figura 11. Formule di struttura dei principali estrogeni.

L'anello fenolico (A) caratteristico degli estrogeni deriva dall'aromatizzazione degli steroidi a 19 atomi di carbonio per mezzo di un enzima specifico (aromatasi) e si attua attraverso una ossidazione del gruppo metilico angolare in C19; si ha formazione di un 19-idrossi e successivamente di un 19-osso-steroidi; l'eliminazione di formaldeide da quest'ultimo composto porta all'Estradiolo e all'Estrone.

La biosintesi degli estrogeni nei mammiferi si verifica principalmente nelle ovaie ed è regolata dagli ormoni gonadotropi (FSH e LH) dell'ipofisi anteriore. Questi ormoni ipofisari sono controllati da

neuroormoni ipotalamici che, a loro volta, sono sottoposti a regolazione, mediante un meccanismo di retroazione, da parte dell'Estradiolo e del Progesterone. Le piccole quantità di estrogeni che vengono escrete nei maschi sono di origine soprattutto surrenalica.

Il **17- Estradiolo** viene prodotto dall'ovaio, dalla placenta ed in piccole quantità dalla corteccia surrenale, nonché dalle conversioni periferiche del testosterone. E' questo il motivo per cui anche nella donna in menopausa, quando la funzionalità ovarica diminuisce, e nell'uomo, sono rilevabili, anche se in piccole quantità, livelli circolanti di Estradiolo. L'Estradiolo in circolo è veicolato per la maggior parte legato alla proteina vettore SHBG, la restante parte è coniugata e piccole quote sono libere. L'Estradiolo coniugato come solfato e glucuronato viene poi escreto con la bile e con le urine. La secrezione di questo ormone è modulata dalle gonadotropine ipofisarie (FSH e LH) ed ha un andamento caratteristico, con picco a metà ciclo, 24 ore dopo il picco ovulatorio dell'LH. Nel periodo prepuberale l'Estradiolo è responsabile nella donna del normale sviluppo dei caratteri sessuali secondari e delle ghiandole mammarie. Durante l'età feconda è responsabile delle modificazioni dell'endometrio durante la fase proliferativa, così come della ritenzione idrosalina, dei cambiamenti in quantità del muco cervicale e della motilità tubarica. Durante la gravidanza l'Estradiolo viene prodotto dal corpo luteo (fino alla sesta settimana), poi, con il progredire della stessa, dal trofoblasto placentare (Figura 12).

L'Estrone è dotato di scarso potere estrogenico; viene prodotto sia dall'ovaio, sia dalle surrenali, ma una buona parte dell'Estrone totale deriva dall'aromatizzazione extraghiandolare dell'androstenedione e sta in equilibrio con la quantità circolante di Estradiolo, da cui si forma per deidrogenazione enzimatica a livello di C17. L'Estrone possiede una debole attività biologica a causa del suo debole legame col recettore e della mancanza di accumulo nel nucleo della cellula. Rappresenta comunque la massima fonte di estrogeni nella menopausa ed in alcuni casi patologici quali la sindrome dell'ovaio policistico (PCO). La sua concentrazione durante il ciclo mestruale segue un andamento con un picco simile a quello dell'Estradiolo, anche se di minore entità (Figura 13).

L'Estriolo è prodotto durante la gravidanza in concentrazione crescente: la sua sintesi avviene essenzialmente nell'unità fetoplacentare. Le ghiandole surrenali fetali producono steroidi idrossilati che sono metabolizzati ad Estriolo attraverso le cellule del trofoblasto

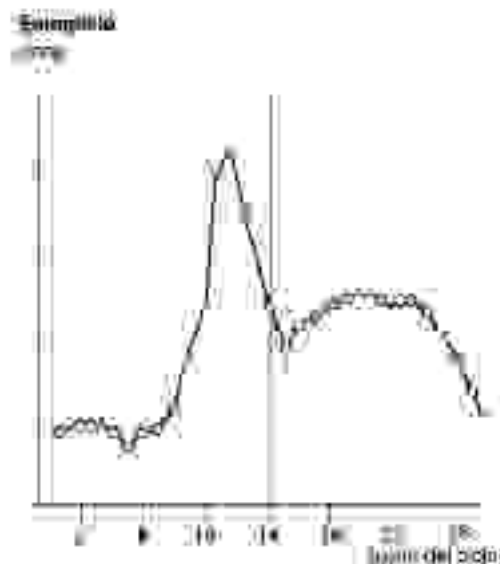


Figura 12. Andamento dei livelli plasmatici di estradiolo durante un ciclo mestruale normale.

sinciziale placentare. L'Estriolo prodotto dalla placenta è coniugato nel fegato materno per formare glucuronidi e solfati (E_3 -3 glucuronide, E_3 -16 glucuronide e E_3 -3 solfato-16 glucuronide). In tutti questi coniugati, almeno un gruppo caratteristico (OH fenolico o alcolico) viene mascherato. Nel sangue l'Estriolo circola sia in forma libera, sia non coniugata, sia nell'insieme dei coniugati, ed è il solo estrogeno per cui si utilizza attualmente il dosaggio diversificato nella forma non coniugata ed in quella totale (per la determinazione di quest'ultimo è necessaria una idrolisi enzimatica preliminare). La produzione di Estriolo durante la gravidanza normale è costantemente crescente; bassi livelli di tale sterioide si possono tuttavia osservare in caso di mancanza dell'enzima solfatasi placentare, sebbene il feto in questa condizione si sviluppi normalmente. Il fatto che l'origine dei precursori dell'estriolo sia soprattutto il surrene fetale (principalmente DHEA-S), consente di spiegare l'esistenza di un ritmo circadiano della concentrazione di questo sterioide nel siero materno. Questo è infatti caratterizzato da livelli più elevati verso le ore 20, con un minimo alle 8 del mattino (Figura 14).

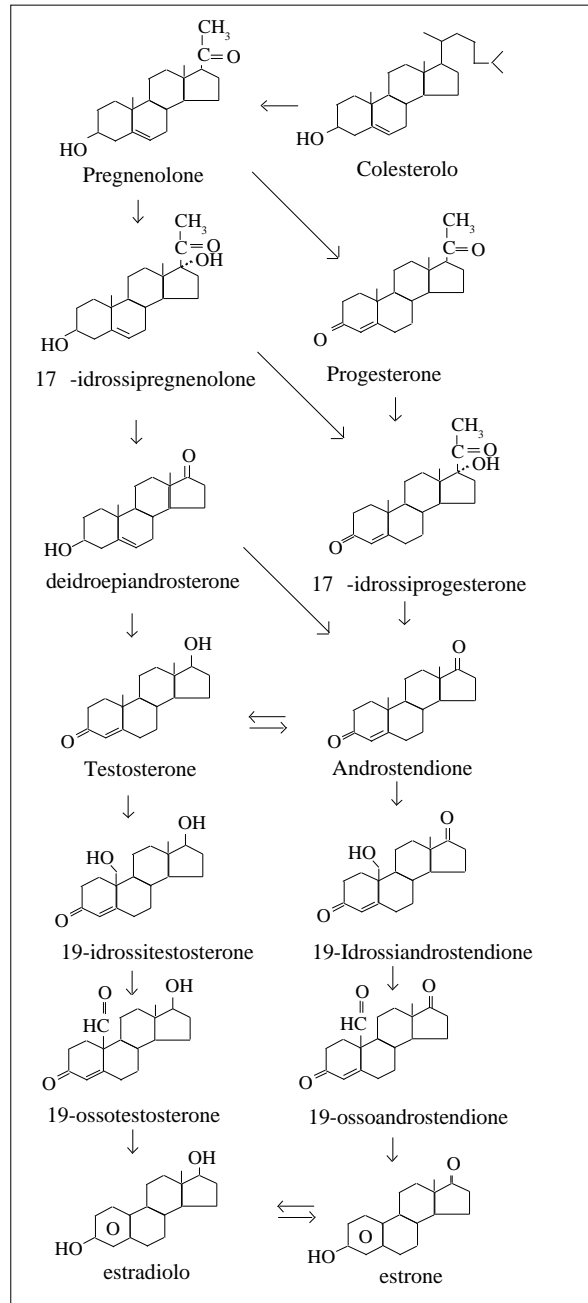


Figura 13. Biogenesi del 17 -estradiolo e dell'estrone nelle ghiandole endocrine.

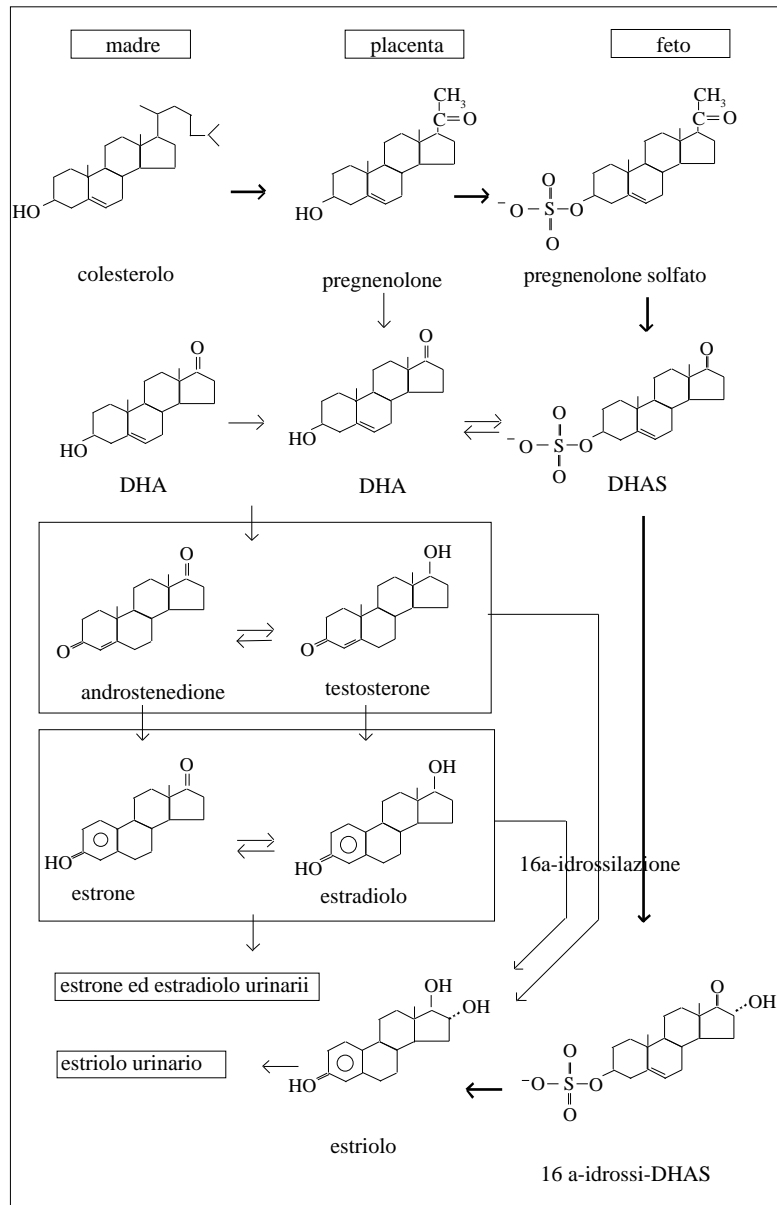


Figura 14. Principali vie (freccie in grassetto) della biosintesi dell'estrone nell'unità feto-placentare.

Gestageni (Progestinici)

In questa classe di composti il più importante è certamente il *Progesterone*; il *Pregnenolone*, suo precursore, trova trascurabili applicazioni in campo endocrinologico. Il Progesterone viene sintetizzato in quantità rilevanti soprattutto dal corpo luteo e dalla placenta; piccole quantità provengono anche dalle surrenali. Viene veicolato nel circolo ematico da proteine vettrici rappresentate soprattutto dalla transcortina (CBG) e dall'albumina. L'emivita di questo steroide è molto breve: nel fegato viene convertito nel suo principale metabolico di escrezione, il pregnandiolo. In un normale ciclo mestruale, piccole quote di Progesterone sono secrete durante la fase follicolare; solo dopo il picco di LH, parallelamente al decrescere del 17-Estradiolo si ha un progressivo aumento di Progesterone, coincidente con la formazione del corpo luteo. Il Progesterone esercita numerose azioni fisiologiche, fra le quali i cambiamenti ciclici della cervice e le modificazioni dell'endometrio; favorisce il passaggio da una fase proliferativa ad una secretiva. In seguito alla caduta dei valori del Progesterone alla fine del ciclo, la mucosa endometriale diviene necrotica ed esfoliativa. Durante la gravidanza, quando viene sintetizzato dalla placenta, il Progesterone è indispensabile per il mantenimento della normale gestazione ed inibisce la secrezione di Prolattina e la lattogenesi prima del parto.

Pur presentando un andamento costantemente crescente durante la gestazione, il Progesterone non è generalmente utilizzato come indice di funzionalità placentare, in quanto è caratterizzato da un'ampia variabilità individuale, che rende problematica l'interpretazione del dato di laboratorio (Figura 15).

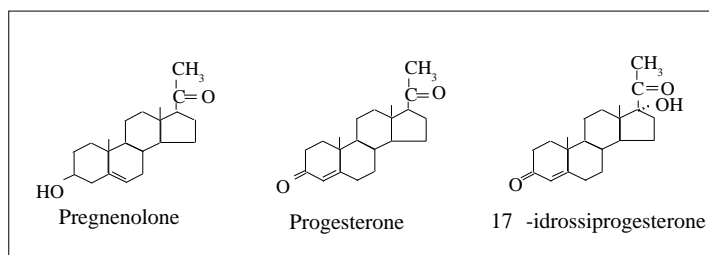


Figura 15. Formule di struttura dei principali progestinici.

Il **17 -idrossi-Progesterone**, che non sarebbe propriamente classificabile come gestagene ma che consideriamo in questa classe di steroidi per comodità, è un prodotto intermedio di diverse vie metaboliche e deriva sia dalla corteccia surrenale, sia dalle gonadi. Anche se la sua attività progestinica è relativamente scarsa, esso è uno steroide di grande interesse clinico, essendo l'immediato precursore dell'11-desossicortisolo. Poiché quest'ultimo viene prodotto per mezzo di una 21-idrossilazione dal 17 -OH-Progesterone la sua misura è un utile indizio riguardo alla funzionalità della 21-idrossilasi.

La determinazione del 17 -OH-Progesterone risulta importante nella diagnosi iniziale di iperplasia surrenale congenita (valori fortemente aumentati).

Nel corso del ciclo mestruale, nella donna fertile, la concentrazione è più elevata nella fase luteinica rispetto a quella follicolare; in gravidanza la secrezione del 17 -OH-Progesterone aumenta lentamente fino al termine (valori circa quattro volte quelli basali).

Androgeni

Gli steroidi appartenenti a questa classe sono presenti in quantità apprezzabili sia nella donna che nell'uomo, anche se è in quest'ultimo che esplicano la loro principale attività biologica.

Nell'organismo femminile i principali sono il Testosterone, l'Androstenedione ed il Deidroepiandrosterone solfato (DHEA-S) che ha origine principalmente nella corteccia surrenale (Figura 16).

L'iperandrogenismo porta nella donna a disturbi nella fertilità ed a mascolizzazione. Come tutti gli ormoni steroidei, agiscono attraverso i recettori intracellulari specifici; a questo proposito occorre sottolineare che il testosterone non è l'ormone attivo a livello recettoriale, ma bensì lo è il diidrotestosterone (DHT), che si forma nella cellula bersaglio in seguito alla riduzione enzimatica del doppio legame tra il carbonio C4 ed il carbonio C5 ad opera della 5 riduttasi. Nell'uomo i principali androgeni biologicamente attivi sono il Testosterone ed il DHT.

Anche nell'organismo maschile, in alcuni tessuti (pelle, prostata e vescicole seminali), il Testosterone agisce praticamente come pre-ormone, in quanto a livello cellulare l'azione viene svolta dal DHT in seguito alla conversione enzimatica.

In altri organi il Testosterone esercita invece la sua azione androgena direttamente.

L'attività biologica degli altri androgeni come l'Androstenedione, il Deidroepiandrosterone solfato e l'Androsterone è, confrontata con quella del Testosterone, molto ridotta (da 5 a 20 volte).

Nell'uomo il Testosterone, prodotto dalle cellule di Leydig nei testicoli, stimola la spermatogenesi, la crescita e la funzione delle ghiandole sessuali secondarie e la crescita dei peli; agisce inoltre da anabolizzante sui muscoli e sulle ossa. Il Testosterone è veicolato nel circolo sanguigno da una globulina, designata con il nome di Testosterone binding globulin (circa il 98 % è legato). La quota libera è considerata la parte metabolicamente attiva dei livelli totali di Testosterone.

Il DHEA-S e l'Androstenedione vengono elaborati nella zona reticolare del corticosurrene attraverso la via biosintetica che parte dal Pregnenolone ed arriva al Testosterone.

L'Androstenedione da origine a quella piccola parte di Testosterone secreta dal corticosurrene mentre a livello testicolare è un prodotto

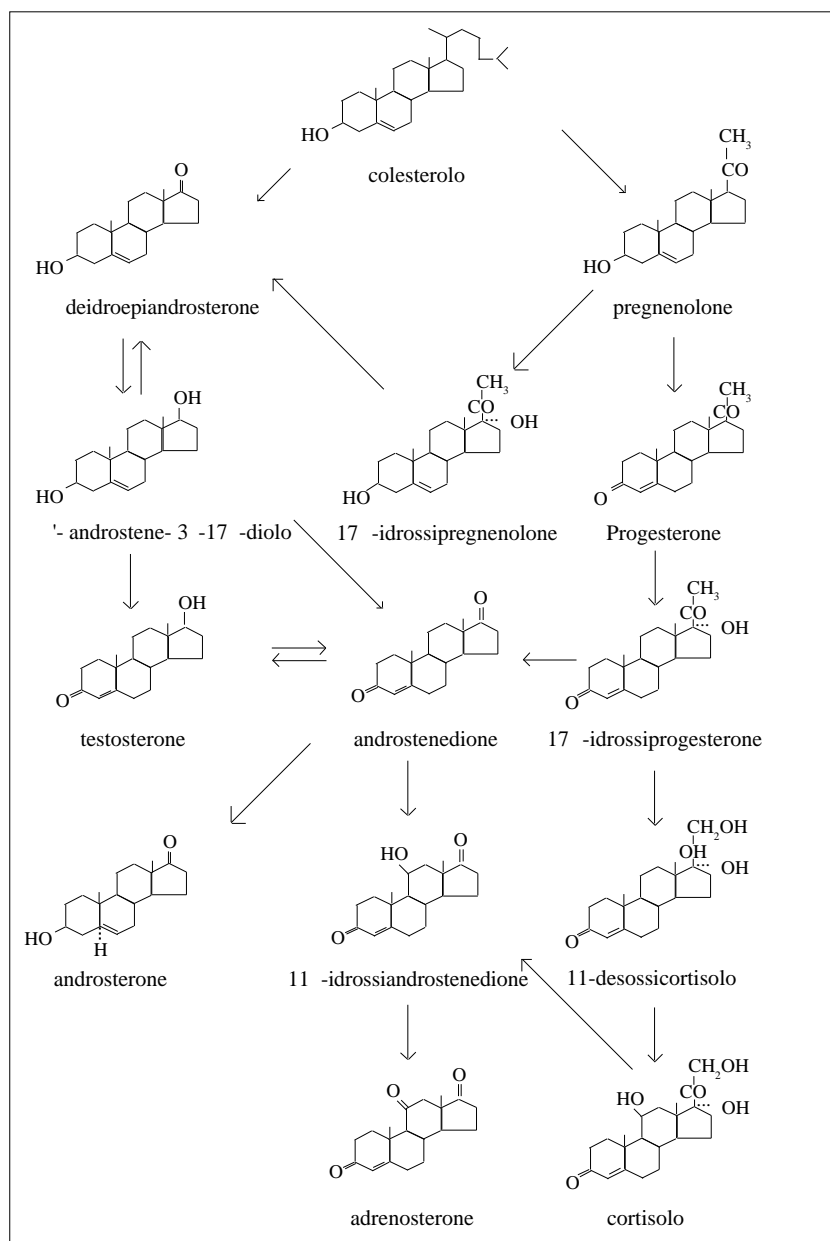


Figura 16. Schema riassuntivo delle tappe per la biosintesi degli androgeni a partire dal colesterolo.

| Androgeno | conc. nel siero ng/ml |
|-----------------|--------------------------|
| Testosterone | 3 - 9 |
| DHEA-S | 1000-4200 |
| Androstenedione | 0.6 - 1.6 |
| DHT | 0.16 - 1.08 |

Tabella. Valori di riferimento dei più importanti androgeni nell'uomo.

di trasformazione del Testosterone stesso. E' il più importante androgeno secreto dall'ovaio e ciò avviene da parte delle cellule luteiniche e della granulosa.

Può essere eliminato sotto forma di estere dell'acido glucuronico e/o solforico oppure, dopo varie trasformazioni, entra a fare parte del gruppo dei 11 ossi - 17 chetosteroidi. Durante il ciclo mestruale i livelli aumentano in fase preovulatoria (quando il contributo ovarico è preponderante); anche per l'androstenedione esiste un ritmo circadiano analogo a quello del cortisolo.

Il *Deidroepiandrosterone-solfato (DHEA-S)* è un ormone secreto sotto forma di solfato (coniugazione in C3), in massima parte dalla corteccia surrenale: i suoi precursori si possono considerare il Colesterolo-solfato, il Pregnenolone-solfato e il 17 -OH-Progesterone-solfato. Il DHEA-S viene eliminato con le urine dove costituisce la quota maggiore dei 17 chetosteroidi.

Il ruolo del DHEA-S nell'ambito della ghiandola surrenale è quello di "effettore enzimatico" in quanto, in equilibrio con il DHEA (non coniugato), regola l'attività di due enzimi di fondamentale importanza per la biosintesi steroidea surrenale: la 3- α -deidrogenasi e la 11- β -idrossilasi. Un altro importante ruolo intrasurrenale è quello di substrato (per l'Androstenedione e quindi per il Testosterone) e di prodotto di detossicazione della ghiandola surrenale, interpretabile come riserva e come scarico metabolico della corteccia surrenale. Il DHEA-S si può inoltre considerare un precursore degli Estrogeni a livello placentare, dove viene concentrato sia il DHEA-S proveniente dalla corteccia surrenale fetale, sia quello che si forma dalla steroidogenesi placentare. I livelli di concentrazione nell'adulto rimangono pressoché costanti fino a 45-50 anni, dopodiché si ha un progressivo decremento.

Il *Diidrotestosterone (DHT)* è l'androgeno più potente. Viene secreto direttamente dal surrene e dall'ovaio, oltre che derivare in parte dalla conversione periferica del Testosterone. Nei tessuti viene metabolizzato a sua volta in Androstenediolo. Il DHT aumenta progressiva-

mente dalla nascita fino alla fine della pubertà. Non ci sono significative modificazioni dei suoi livelli plasmatici durante il ciclo mestruale (Figura 17).

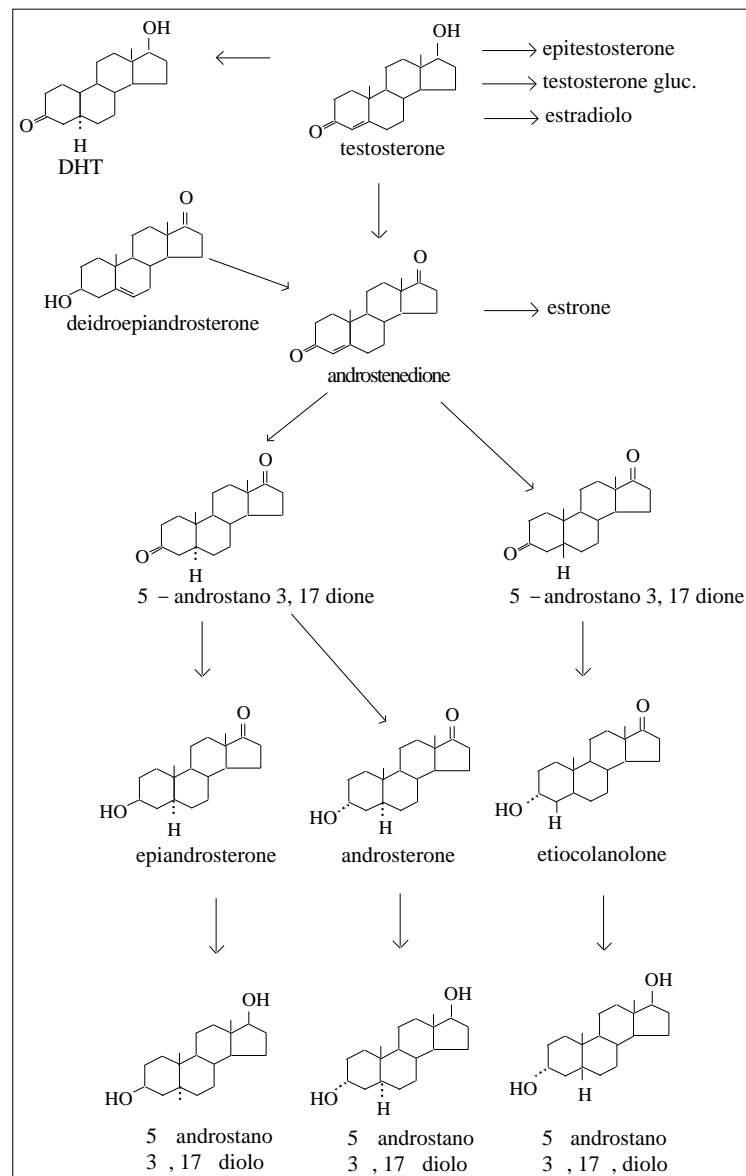


Figura 17. Schema del metabolismo degli androgeni.

Ormoni Corticosurrenali

La corteccia surrenale produce steroidi a 18, 19, 20 e 21 atomi di carbonio; tuttavia, poiché la maggior parte degli ormoni secreti da questa ghiandola sono steroidi a 21 atomi di carbonio, con il nome di Corticosteroidi vengono indicati tutti gli steroidi a 21 atomi di Carbonio. I Corticosteroidi biologicamente attivi sono caratterizzati dalla presenza di un doppio legame tra il carbonio C4 e il carbonio C5, da una funzione chetonica in C3 e C20, da un gruppo idrossilico in C21 e, in alcuni casi, da gruppi ossidrilici in posizione 11 o 17, oppure da una funzione aldeidica (-CHO) in posizione C18 (Aldosterone).

Riguardo alla loro attività biologica gli ormoni corticosurrenali vengono classificati in due gruppi principali: i glicocorticoidi (Cortisone, Cortisolo, Corticosterone) e i mineralcorticoidi (Aldosterone, Deossicorticosterone, 18-idrossi-corticosterone). Questa classificazione non va comunque intesa in senso assoluto poiché gli ormoni corticosurrenali possono avere contemporaneamente entrambi i tipi di attività.

I Glicocorticoidi intervengono nel metabolismo glicidico e proteico inducendo l'attività di alcuni enzimi epatici (glucosio-6-fosfatasi, fruttosio-1, 6 difosfatasi, glicogenosintetasi, glutammico-piruvico-transaminasi e triptofanopirrolasi). Incrementando queste attività enzimatiche i Glicocorticoidi stimolano la glicogenesi a spese degli aminoacidi determinando un aumento del contenuto in glicogeno del fegato, un innalzamento della glicemia ed un aumento della escrezione urinaria di azoto.

I Mineralcorticoidi intervengono nella regolazione del ricambio idrosalino; in particolare l'Aldosterone provoca una ritenzione di sodio, cloro e di acqua ed un'escrezione di potassio. Questa azione si esplicita principalmente a livello del tratto distale del tubulo renale. E' stato dimostrato che diversi steroidi di sintesi hanno effetti biologici molto più spiccati dei glicocorticoidi e dei mineralcorticoidi naturali; alcuni di questi composti, come il desametasone, il prednisone e il triamcinolone, hanno trovato una larga applicazione in campo clinico (Figura 18).

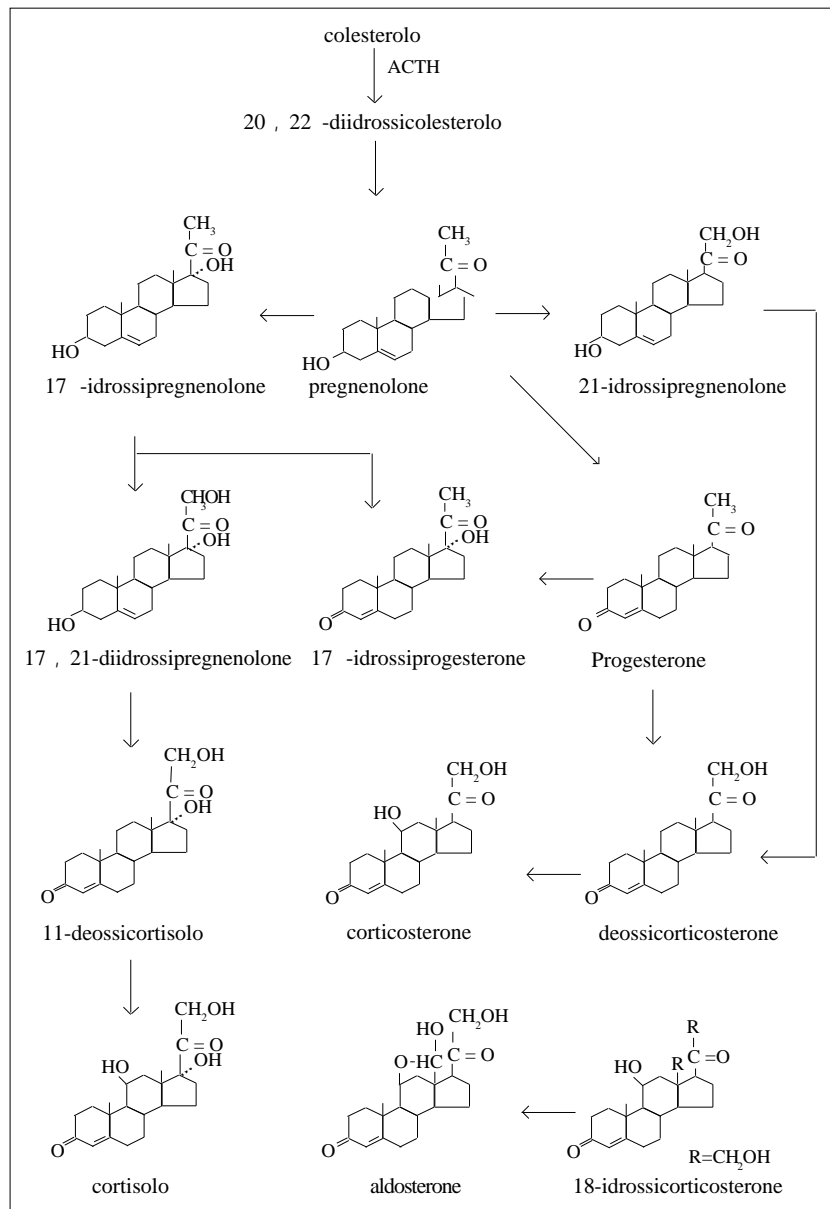


Figura 18. Biosintesi degli ormoni corticosurrenali.

Il Cortisolo è il più rappresentativo dei glicocorticoidi secreti dalla corteccia surrenale; influenza il metabolismo dei carboidrati, delle proteine, dei grassi, quello purinico, il bilancio idrico ed elettrolitico, la regolazione della pressione sanguigna e le risposte anti-infiammatorie. La sua secrezione è episodica e mostra un ritmo circadiano con valori più alti al mattino e più bassi di sera; è veicolato per circa il 95 % legato alla proteina Transcortina. La secrezione surrenale del Cortisolo è regolata da un complesso meccanismo di feed-back negativo che interessa il sistema nervoso centrale, l'ipotalamo, l'ipofisi e i surreni.

Un'aumentata capacità legante di questo steroide alla sua proteina vettrice si ha durante la gravidanza ed in pazienti in terapia estrogenica; la concentrazione plasmatica del Cortisolo è modulata dall'adrenocorticotropina (ACTH).

La deficienza congenita o mancanza di uno qualunque degli enzimi della via biosintetica al Cortisolo, porta ad una produzione in eccesso di ACTH da parte dell'ipofisi e ad iperplasia della corteccia surrenale. La deficienza più comune è quella di 21-idrossilasi, l'enzima necessario per la conversione del 17 OH-Progesterone a 11 desossi Cortisolo.

Le patologie più caratteristiche da difetti adrenocorticali sono caratterizzate da ipofunzione (Addison), con valori di Cortisolo inferiori a 5 µg/dl e iperfunzione (Cushing), con valori di Cortisolo nella norma ma senza differenziazione tra mattino e sera (il bioritmo è perciò soppresso) (Figura 19).

L'Aldosterone è il più importante mineralcorticoide elaborato dalla zona glomerulare della corteccia surrenale; la sua principale funzione è a livello nefrosurrenale, per il controllo del bilancio del Sodio. Allorché il flusso ematico del rene è ridotto, si libera renina la quale porta a formazione di Angiotensina (II). Questa stimola direttamente le cellule della zona glomerulare a produrre Aldosterone che, promuovendo la ritenzione di Sodio ed acqua, ripristina il flusso ematico renale e sopprime il rilascio di Renina. La Corticotropina (ACTH) e l'aumento di potassio nel plasma possono stimolare per brevi periodi la formazione surrenalica di Aldosterone.

Le condizioni patologiche nelle quali vi è un aumento di Aldosterone in circolo vengono suddivise in aldosteronismo primario, nel quale l'ipersecrezione deriva da tumori Aldosterone secernenti della corteccia surrenale, e aldosteronismo secondario, nel quale lo stimo-

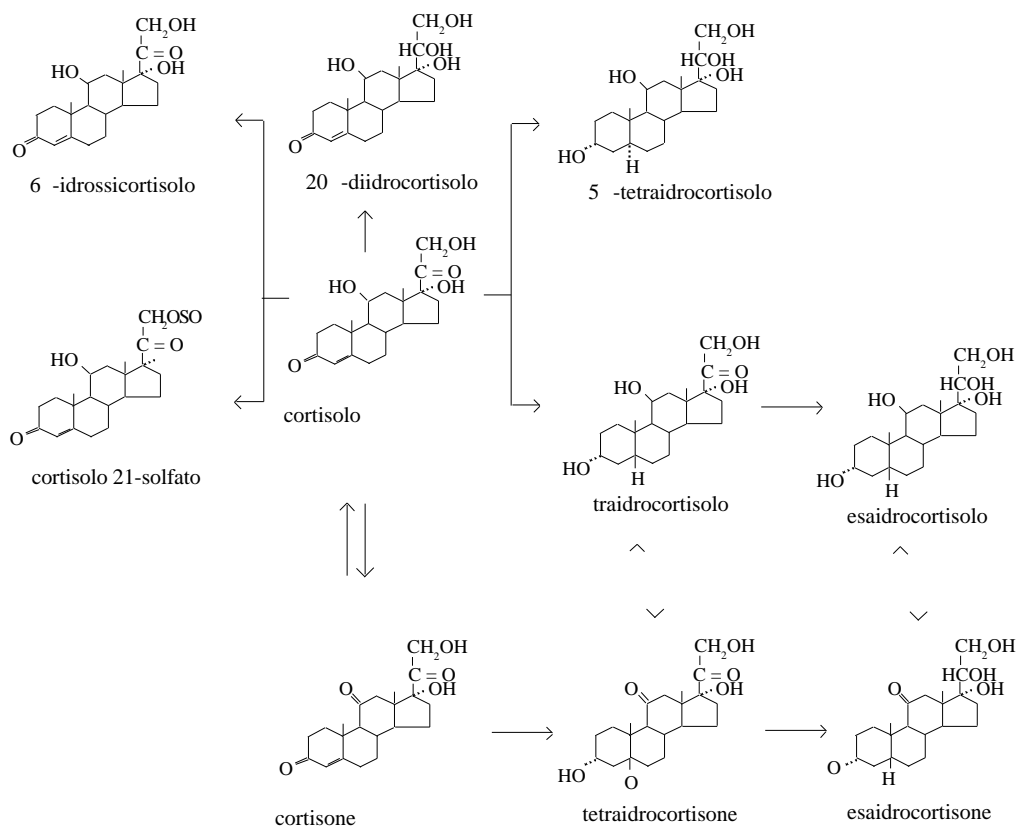


Figura 19. Metabolismo del cortisolo.

lo alla secrezione di Aldosterone è di origine extrasurrenale. La produzione subnormale di Aldosterone può essere associata a perdita renale di NaCl (Figura 20).

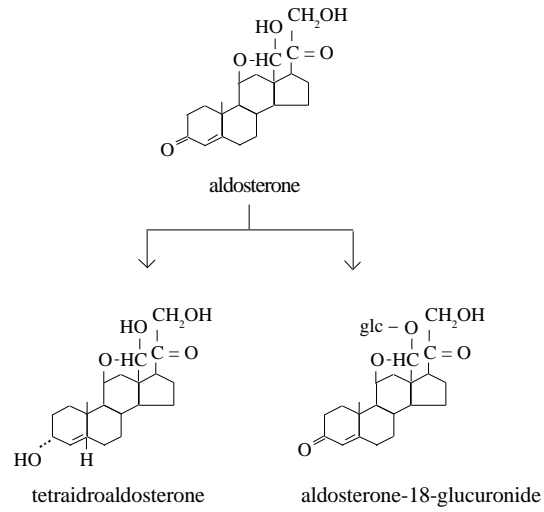


Figura 20. Metabolismo dell'aldosterone.

Metodi di determinazione degli steroidi

Nel corso degli ultimi anni, notevoli sono stati gli sforzi per rendere le misure di sostanze nei liquidi biologici, sempre più accurate, precise e sensibili. Nel campo dei dosaggi immunologici il problema è stato sentito in modo particolare, data la complessità di questo tipo di tecnica analitica. Si va attuando (e in gran parte si è già attuata) una sostituzione sempre più accentuata delle tecniche che utilizzano marcatori isotopici (RIA), con metodi alternativi che utilizzano sostanze marcate con composti non radioattivi (enzimi, fluorofori, composti chemiluminescenti). Non tutte le tecniche alternative consentono di ottenere prestazioni ottimali per tutti gli analiti, hanno però il notevole vantaggio di essere facilmente automatizzabili, di non utilizzare sostanze radioattive e di avere tempi di risposta spesso molto brevi.

Per quanto riguarda gli Steroidi, la loro determinazione non può prescindere inoltre dal fatto che essi siano veicolati nel sangue in gran parte da proteine vettrici, che siano apteni (non immunogeni quindi), e che tra una molecola e l'altra le differenze siano strutturalmente minime. Anche la tecnica "sandwich" (o a due siti), che consente di ridurre notevolmente la reattività crociata e quindi di migliorare le caratteristiche di specificità nel dosaggio immunometrico in genere, non è utilizzabile per gli Steroidi a causa del loro basso peso molecolare (l'impedimento sterico non permette il legame simultaneo di due anticorpi).

Quindi per gli Steroidi è possibile utilizzare solo il dosaggio competitivo tradizionale che utilizza un unico anticorpo (policlonale o monoclonale), e che continua ad essere il metodo di elezione nonostante il grado elevato di reattività crociata.

Come già detto, gli ormoni steroidei sono apteni in quanto possono combinarsi con un anticorpo, ma non sono di per sé immunogeni se non vengono accoppiati con una molecola più grande. Le sostanze a peso molecolare elevato che più comunemente vengono usate per tale scopo sono proteine quali la BSA (albumina bovina sierica) e l'HSA (albumina umana sierica), oppure polimeri sintetici a catena non ramificata quali la poli-L-Lisina.

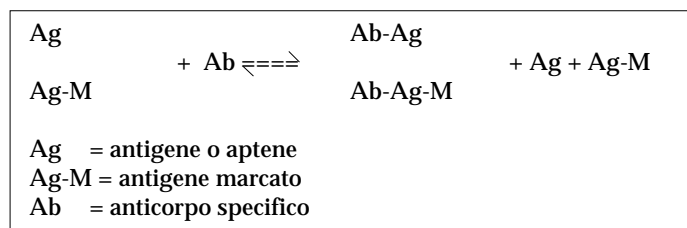
Metodologie utilizzate per la determinazione degli steroidi:

- a) estrazione preliminare e dosaggio RIA (marcato triziato)
- b) estrazione preliminare e dosaggio RIA (marcato iodato)
- c) dosaggio diretto RIA (marcato iodato)
- d) dosaggio immunoenzimatico (EIA)
- e) dosaggio immunofluorimetrico (FIA)
- f) dosaggio immunochemiluminescente (CIA)
- g) gas cromatografia-spettrometria di massa (GC-MS)
(metodo di riferimento)

Il metodo di riferimento (metodo definitivo) per gli ormoni a basso peso molecolare è il GC-MS e quindi questo è il metodo accettato anche per gli steroidi, per i quali, tra l'altro, è relativamente facile reperire degli standard opportunamente marcati con isotopi (Deuterio) da utilizzare come standard interni. Questo metodo, pur essendo certamente il più accurato e specifico non permette però di ottenere sensibilità molto elevate.

Il metodo certamente più utilizzato fino ad oggi nei laboratori di endocrinologia per la determinazione degli steroidi è stato, e in parte lo è tuttora, quello radioimmunologico (RIA), inizialmente con marcato triziato e successivamente con marcato iodato. Questi metodi che originariamente prevedevano anche un'estrazione preliminare con solvente organico, sono stati sostituiti poi da metodi diretti (senza estrazione) con tempi di incubazione relativamente brevi e separazione libero/legato mediante fasi solide (coated tubes, particelle magnetiche ecc.), molto semplici da eseguire, però con una serie di problematiche, che saranno analizzate in seguito.

Schema di dosaggio immunometrico competitivo:



Come è noto si tratta di una reazione di equilibrio, in cui uno dei punti critici è rappresentato dalla separazione della frazione legata (immunocomplesso) da quella libera, operazione che non dovrebbe, in teoria, alterare l'equilibrio della reazione stessa.

La “marcatura” dell’antigene (Ag-M) che compete con quello “nativo” può essere fatta con un isotopo, con un enzima, con un fluoroforo oppure con una sostanza chemiluminescente; lo schema di reazione rimane identico, ciò che cambia è solamente il tipo di “segnale” che viene prodotto e che permette di quantizzare la concentrazione della molecola in esame.

Nella maggioranza dei metodi commerciali non isotopici l’antigene è coniugato con un enzima ed è il substrato su cui l’enzima agisce che può essere combinato con un cromogeno, con un fluoroforo o con una sostanza chemiluminescente; il “detector” dello strumento, necessario per il rilevamento del “segnale” sarà quindi rispettivamente uno spettrofotometro, un fluorimetro o un luminometro.

Caratteristiche dell’enzima: un marcatore enzimatico dovrebbe soddisfare i seguenti requisiti:

- 1) essere rilevabile in piccolissime quantità
- 2) essere disponibile a basso costo
- 3) avere disponibilità di gruppi reattivi per il legame con altre molecole
- 4) essere stabile ed attivo nella forma libera e in quella legata
- 5) avere una immunoreattività analoga a quella dello steroide non coniugato.

Preparazione del coniugato enzima-steroidi

I metodi per accoppiare l’enzima ad un aptene differiscono generalmente da quelli utilizzati per accoppiare l’enzima ad una proteina, in quanto i punti di attacco, nel caso degli steroidi, sono limitati e la coniugazione non deve inoltre “mascherare” i gruppi funzionali caratteristici. I metodi usati sono spesso identici a quelli utilizzati per preparare i coniugati aptene-proteina per l’immunizzazione.

Il legame covalente dello steroide ad un enzima richiede la presenza di un gruppo carbossile (-COOH) libero nella molecola dello steroide. Il gruppo carbossile viene introdotto generalmente per derivatizzazione di un gruppo chetonico o idrossilico; questi gruppi non devono essere gruppi funzionali caratteristici dello steroide in esame ma vengono introdotti sinteticamente. Per la derivatizzazione di gruppi idrossilici si usa generalmente anidride succinica, mentre per i gruppi chetonici carbossimetil-idrossilamina. Per la preparazione dei coniugati steroide-enzima si utilizzano i seguenti metodi:

- a) metodo all’anidride mista
- b) metodo alla carbodiimide.
- c) metodo imidato bifunzionale
- d) metodo del periodato

Tutti i metodi sfruttano il legame con un gruppo $-NH_2$ nella molecola dell'enzima. E' necessaria poi una purificazione del coniugato steroide-enzima in quanto la presenza di steroide non coniugato interferirebbe nel dosaggio. La rimozione dello steroide non coniugato si può realizzare mediante dialisi o cromatografia su Sephadex; altri metodi prevedono l'ultracentrifugazione, la cromatografia per scambio ionico e la cromatografia di affinità.

Gli enzimi più utilizzati sono la perossidasi da rafano (HRP) e la fosfatasi alcalina, in misura minore la glucosio-6-fosfato deidrogenasi (EIA omogeneo). La perossidasi ha la possibilità di avere numerosi substrati disponibili che danno differenti reazioni colorate. Sia la fosfatasi alcalina, sia la perossidasi hanno trovato ampia applicazione anche nei metodi emergenti che sfruttano la chemiluminescenza di alcune molecole, quali il luminolo, l'isoluminolo, gli esteri di acridinio ed i più recenti diossetani. I metodi chemiluminescenti rappresentano molto probabilmente il futuro sviluppo dell'immunometria, in quanto consentono di ottenere bassi livelli di background, segnale stabile ed alta efficienza dell'emissione luminosa, tutte prerogative che permettono il raggiungimento di livelli di sensibilità molto elevati, specialmente in molecole presenti in concentrazioni molto basse, come gli steroidi.

Determinazione degli steroidi: problematiche

La semplificazione del dosaggio degli steroidi col passaggio dai metodi estrattivi a quelli diretti, se da un lato ha comportato la riduzione dell'operatività sperimentale e migliori prestazioni in termini di ripetibilità del dato analitico, ha introdotto dall'altro lato l'esigenza di una più elevata qualità dei reagenti ed una ottimizzazione più rigorosa dei metodi.

Il principale problema relativo alla determinazione degli steroidi è legato alla somiglianza strutturale delle molecole, ai diversi livelli circolanti, alla presenza nel siero di proteine interattive e di cataboliti, ed infine alla natura stessa del legame steroide-anticorpo.

Effetti delle proteine vettrici

La competizione fra proteine vettrici presenti nella soluzione di reazione e proteine "analitiche anticorpali", se sfavorisce la formazione di immunocomplessi, può tuttavia tradursi in una notevole espansione del numero di siti comunque in grado di legare l'aptene. L'effetto netto sarà allora di un appiattimento più o meno accentuato della curva di risposta. E' da questa situazione che scaturisce la problematica specifica, definita dalla necessità di ristabilire un'adeguata sensibilità di risposta e di evitare che differenze fra le condizioni delle soluzioni di standard e campioni possano generare variazioni sistematiche di stima.

L'azione di disturbo delle proteine vettrici è la più ovvia e vistosa conseguenza dell'eliminazione del passaggio estrattivo nello schema di dosaggio degli steroidi. Gli approcci correttivi seguono due schemi diversi: la degradazione preliminare delle proteine interferenti (denaturazione al calore, proteolisi enzimatica) o l'inibizione selettiva dell'interazione steroide-proteina. Questo secondo approccio può a sua volta basarsi o sull'indebolimento del legame proteico ad un pH acido o su meccanismi di competizione sul legame stesso; comune è l'uso a questo scopo di ANS (acido 8-anilino, 1 naftalen solfonico), che esercita un'inibizione competitiva "bloccando" i siti interferenti.

Interferenze dei cataboliti coniugati

La reazione crociata con eventuali cataboliti coniugati è uno degli aspetti più critici nel dosaggio diretto degli steroidi. Questo è importante e particolarmente sentito nel caso, per esempio, del Testosterone ed in modo particolare dell'Estriolo, per il quale, da tempo, si utilizzano due diversi parametri, il "totale" e il "non coniugato". E' proprio la misura selettiva diretta del "non coniugato" che pone un non piccolo problema di specificità anticorpale per il riconoscimento delle lievi differenze che intercorrono tra le molecole dell'estriolo e dell'estriolo-3-solfato (l'altro principale catabolita, l'estriolo 16-glucuronato è di norma efficacemente discriminato).

Il caso dell'Aldosterone sembra poi concentrare tutte le difficoltà implicate dai cataboliti interferenti, che sono presenti ad un livello rilevante ed in forma non ben definita.

La determinazione diretta dell'Aldosterone comporta per questi motivi una sistematica sovrastima che dipende dalle caratteristiche dell'anticorpo utilizzato. E' comune in questo caso l'artificio di correggere lo standard di riferimento "addizionandolo" con sostanze interattive estranee, oppure assegnare ad esso un valore nominale maggiore del vero, per riallineare i dati analitici con quelli ottenibili con un metodo estrattivo, che sono quelli più vicini al valore "vero".

Interferenza dei lipidi

Le sostanze lipidiche possono interferire in diversi modi:

- inglobamento del ligando (nativo e/o tracciante) nelle micelle lipidiche;
- inibizione della capacità legante dei siti anticorpali;
- inibizione della capacità separativa della tecnica adottata ("avvelenamento" della superficie attiva dell'adsorbente).

Il prevalere dell'uno o dell'altro dei meccanismi e le loro combinazioni, nonché il peso di variabili sperimentali come il tipo di tracciante utilizzato (somiglianza strutturale più o meno stretta con l'analita) ed il tipo di separazione, possono portare a situazioni complesse e difficili da prevedere e controllare.

Interazione coniugato-anticorpo

L'interazione dell'anticorpo con il coniugato può coinvolgere non solo la molecola dello steroide, ma anche il "ponte" che lega lo steroide all'enzima e al limite anche parte della stessa molecola dell'enzima. E' importante in questo caso che siano differenti i due

derivati utilizzati per la preparazione dell'immunogeno e del coniugato. Usando lo stesso derivato (combinazione omologa) si avrebbe infatti perdita di sensibilità, dovuta ad una maggiore affinità dell'anticorpo per il coniugato rispetto all'aptene libero; con due derivati diversi (combinazione eterologa) invece l'affinità del coniugato è simile a quella dell'aptene libero.

| Steroide (siero) | Valori di riferimento (indicativi) | | |
|-----------------------------|---|-------------|-------|
| Cortisolo | | 5.0 - 25.0 | µg/dl |
| DHEA-S | donna | 0.8 - 3.9 | µg/ml |
| | menopausa | 0.1 - 0.6 | " |
| | uomo | 1.0 - 4.2 | " |
| 17 OH-Progesterone | fase follicolare | 0.2 - 1.0 | ng/ml |
| | " luteinica | 1.0 - 4.0 | " |
| | menopausa | 0.1 - 0.5 | " |
| | uomo | 0.5 - 2.5 | " |
| Aldosterone | posiz. supina | 15 - 125 | pg/ml |
| | " eretta | 70 - 300 | " |
| Androstenedione | donna | 0.6 - 1.8 | ng/ml |
| | uomo | 0.6 - 1.6 | " |
| Testosterone | donna | 0.1 - 0.8 | ng/ml |
| | menopausa | 0.2 - 1.1 | " |
| | uomo | 3.0 - 9.0 | " |
| DHT | donna | 56 - 200 | pg/ml |
| | uomo | 0.16 - 1.08 | ng/ml |
| 17 Estradiolo | fase follicolare | 20-120 | pg/ml |
| | picco ovulatorio | 80 - 400 | " |
| | fase luteinica | 60 - 170 | " |
| | menopausa | 10 - 30 | " |
| | uomo | 5 - 35 | " |
| Estrone | fase follicolare | 30 - 100 | pg/ml |
| | " luteinica | 90 - 160 | " |

Gli steroidi in farmacologia

Numerose sono le applicazioni delle molecole steroidee come farmaci: quasi tutte si rifanno alla loro azione biologica naturale legata alla particolare struttura molecolare. La maggior parte degli steroidi utilizzati sono comunque di sintesi in quanto questi hanno spesso un'attività biologica di molto superiore a quella dei composti naturali.

Cortisonici-Antiinfiammatori

Sono detti cortisonici il cortisone, i suoi analoghi fisiologici (principalmente idrocortisone o cortisolo) ed i loro derivati semi-sintetici ed analoghi strutturali a preminente attività glicocorticoide e/o antiflogistica.

Il glicocorticoide fisiologico per eccellenza è il cortisolo; il suo derivato di ossidazione (posizione 11) è il cortisone. Da questi due glicocorticoidi naturali derivano due ulteriori antiflogistici steroidei: il prednisolone ed il prednisone.

Questi quattro cortisonici si possono considerare i composti di partenza per la produzione di un grande numero di cortisonici di sintesi usati come antiinfiammatori. Numerose sono le loro applicazioni cliniche; sono utilizzati soprattutto in reumatologia e sono efficaci a dosi inferiori a una parte per milione di peso corporeo. L'applicazione topica è preferita in certe malattie della pelle e degli occhi. I cortisonici non sono però privi di effetti collaterali, il che rende la terapia corticosteroidica non senza problemi nel caso in cui questa sia prolungata nel tempo.

Cardiotonici

Sono farmaci di origine naturale, e più precisamente vegetale; comprendono numerosi derivati glicosidici di agliconi a struttura steroidea ricavabili da alcune piante e famiglie vegetali, quali le Scrofulariacee, le Liliacee, le Ranunculacee e le Apocinacee.

Dalla *digitalis lanata* (scrofulariacee), mediante opportuni metodi estrattivi si ottengono, tra gli altri, due glicosidi: il Lanatoside A ed il Lanatoside C, dai quali derivano rispettivamente la *Digitossina* e la *Digossina*. Quest'ultima è considerata il glicoside cardioattivo per eccellenza. La somministrazione di queste sostanze produce, in vari

gradi, una diminuita velocità ed una aumentata intensità del battito cardiaco. E' importante il monitoraggio di questi farmaci durante la terapia, perchè una dose eccessiva può dare luogo a fenomeni di tossicità anche gravi.

Estroprogestinici - Contraccettivi orali

Sono così definiti una grande quantità di farmaci di origine naturale, semisintetica e sintetica a struttura steroidea: per il loro meccanismo di azione e la loro larga accettabilità trovano applicazione soprattutto come contraccettivi orali.

Questi non rappresentano in realtà una classe di ormoni a struttura chimica unitaria, ma sono delle associazioni, a dosi opportune, di un estrogeno con un progestinico. Gli estrogeni ed i progestinici utilizzati sono di origine sintetica, avendo questi un'attività di gran lunga superiore a quella degli steroidi naturali: le dosi utilizzate devono infatti essere minime per ridurre gli eventuali effetti collaterali, senza però ridurre l'efficacia anticoncezionale. La principale azione dei composti estro-progestinici sintetici è di impedire l'ovulazione.

Questa inibizione è prodotta, almeno in parte, tramite un meccanismo di regolazione a feed-back sul sistema ipotalamo-ipofisario. Il trattamento con contraccettivi orali costituiti da associazioni estroprogestiniche può essere utilizzato anche nella terapia di diversi disturbi ginecologici, quali: dismenorrea essenziale, amenorrea e polimenorrea, menometrorragie. Grazie al cosiddetto "fenomeno di rimbalzo", il riposo ovarico indotto dal trattamento contraccettivo, è seguito da una fase di esaltazione funzionale della fertilità.

Androgeni - Anabolizzanti

Gli Androgeni sintetici in uso nelle preparazioni farmaceutiche vengono generalmente ottenuti sottoponendo a reazioni chimiche opportune alcuni Androgeni naturali. Le indicazioni farmacologiche degli Androgeni sono suggerite dai loro effetti biologici: indurre nel maschio, nell'età prepubere, il completo sviluppo degli organi sessuali secondari, permetterne il normale mantenimento nell'adulto e stimolare la spermatogenesi.

Nella donna gli androgeni producono atrofia ovarica, blocco dell'ovulazione e dei cicli estrali.

Anabolizzanti sono in genere definiti i composti di natura steroidea, che causano ritenzione di azoto come segno di un metabolismo proteico positivo. Si ottengono modificando le strutture mole-

colari di alcuni steroidi androgeni, allo scopo di avere composti con una buona attività sull'anabolismo proteico senza però, in teoria, alcun effetto virilizzante. Sono generalmente derivati del Testosterone e dell'Androstenedione.

In questa classe di steroidi, forse più che in ogni altra, la correlazione struttura-azione riveste una importanza fondamentale. E' infatti determinante modificare opportunamente i gruppi che definiscono la struttura degli steroidi Androgeni per favorire il rapporto tra attività androgena ed attività anabolizzante a favore dell'una o dell'altra a seconda della loro utilizzazione.

Gli anabolizzanti sono usati per stimolare la sintesi proteica oppure per antagonizzare l'effetto catabolico o antianabolico dovuto a trattamenti prolungati con cortisonici. Gli effetti secondari sono diversi, secondo il tipo di prodotto: nell'uomo, in presenza di una normale produzione androgena, sopprimono, per effetto di feedback, l'increzione tropinica ed inibiscono la produzione del testosterone endogeno. Sono pertanto necessarie dosi sopra-fisiologiche di androgeni prima che possa evidenziarsi un effetto anabolizzante pieno, nell'uomo adulto normale. Nella donna, invece, gli ormoni androgeni, anche a piccole dosi, svolgono un netto effetto anabolizzante e, anche se indesiderabile, virilizzante. La dissociazione fra l'effetto virilizzante ed anabolizzante non si è potuta ottenere che in modo molto incompleto, e tutti gli anabolizzanti, fino ad oggi prodotti, inducono anche virilizzazione; solo a piccole dosi è possibile mantenere una significativa dissociazione d'effetto.

Il miglioramento del trofismo muscolare è alla base dell'impiego degli anabolizzanti come doping negli sportivi.

Sviluppo storico della chimica degli steroidi

Le prime osservazioni furono limitate agli steroli ed agli acidi biliari. Nel 1815 Chevreul trovò che il colesterolo (dal greco chole = bile), il principale costituente dei calcoli biliari, non poteva essere saponificato e nel 1823 effettuò un'analisi accurata, i cui risultati, ricalcolati nel 1859 da Berthelot, condussero alla formula bruta $C_{26}H_{44}O$, che è notevolmente vicina alla formula bruta esatta stabilita nel 1888 da Reinitzer $C_{27}H_{46}O$. Nel 1785 il medico inglese William Withering scoprì le proprietà cardiotoniche della digitale, un preparato ottenuto sottoponendo ad estrazione le foglie ed i semi essiccati della *digitalis purpurea*; i costituenti cardiotonici vennero individuati da Nativelle (1869) che isolò la digitossigenina pura cristallina e da Schmiedeberg (1875), mentre Kiliani, nel 1890, ne cominciava la caratterizzazione della struttura.

L'indagine delle strutture degli steroli e degli acidi biliari, effettuate principalmente mediante degradazione ossidativa, è associata ai nomi di Mauthner (1894), Diels (1903), Windaus (1903), Shenck (1910) e Wieland (1912). I lavori di Windaus effettuati a Gottinga sugli steroli e di Wieland sugli acidi biliari effettuati a Friburgo e a Monaco seguirono due vie parallele ma indipendenti.

Ai due scienziati fu conferito, nel 1928, il premio Nobel per i loro studi su queste molecole; a posteriori si scoprì che le strutture da loro proposte per il colesterolo e per l'acido desossicolico erano sbagliate. Negli anni 1929-1932 le strutture di queste prime classi di steroidi furono definite grazie all'introduzione di nuove tecniche analitiche (distillazione molecolare, cromatografia di adsorbimento ed altre tecniche di microanalisi). Gli steroidi sessuali (estrogeni, androgeni, progesterone) ed i corticosteroidi furono isolati negli anni 1930-1935. Solo nel 1952 si riuscì ad estrarre dalle ghiandole surrenali l'aldosterone. Il decennio 1940-1950 fu dedicato allo studio della stereochimica degli steroidi e della loro sintesi parziale; i due argomenti erano correlati come causa ed effetto.

La complessità di questa stereochimica costringeva a ricorrere ad una sintesi parziale basata sulla supposizione di un vasto grado di omogeneità stereochimica fra gli steroidi naturali e l'impiego, come

materiale di partenza, di steroli e di acidi biliari forniti dalla natura. Si trovò che questa ipotesi era giustificata e si fecero rapidi progressi. Uno sviluppo inaspettato, proveniente dalla sintesi parziale, fu la preparazione di composti analoghi agli ormoni di tutti i tipi di steroidi che possedevano un'attività fisiologica superiore a quella degli ormoni naturali. Furono così sintetizzati il cortisone, per la cura dell'artrite reumatoide cronica, l'aldosterone ed altri steroidi. Nel ventennio 1950-1970 ci si è dedicati specialmente allo studio delle proprietà fisiche degli steroidi, ai loro meccanismi di reazione, alla determinazione della configurazione assoluta e ad effettuarne la sintesi totale. Il carattere rigido del nucleo steroideo ed il grande numero di derivati aventi struttura ben definita, forniva un quadro eccellente entro cui sviluppare le relazioni tra le proprietà fisiche e struttura e per studiare i meccanismi di reazione. La spettroscopia di risonanza magnetica protonica degli steroidi, iniziata da Shoolery nel 1953, con l'utilizzo spesso di deuterio, è diventata una tecnica di routine per la determinazione della struttura.

La spettroscopia di massa, introdotta nel 1958, ha fornito infine un rapido e decisivo impulso per la determinazione esatta dei pesi molecolari delle molecole degli steroidi, da cui si possono quindi ottenere le formule molecolari con certezza assoluta.

Bibliografia

- 1) Blickenstaff R.T., Ghosh A.C. (1973): Total Synthesis of Steroids, New York-London, Academic Press.
- 2) Fieser L.F., Fieser M. (1959): Steroids, 4a ed., New York, Reinhold.
- 3) Hanson J.R. (1968): Introduction to Steroid Chemistry (Reaction mechanism), London, Pergamon Press.
- 4) Shoppee C.W. (1964): Chemistry of the Steroids, 2a ed., London Butterworths.
- 5) Adlercreutz H., Hunneman D.H. (1973): *J. Steroid Biochem.* 4; 233-237.
- 6) Honour J.W., Shackleton G.H.L. (1977): *J. Steroid Biochem.*, 8; 233-237.
- 7) Axelson M. (1977): *J. Steroid Biochem.*, 8; 693-698.
- 8) Comoglio S., Celadia F. (1976): *J. Immunol. Methods*, 10; 161-170.
- 9) Ekins R. (1981): Free hormones and drugs: their physiological significance and direct measurement by radioimmunoassay, in: *Physiological Peptides and new trends in radioimmunology*, Bizollon C.A., Elsevier, Amsterdam.
- 10) Pardridge W.M. (1981): Transport of protein-bound hormones into tissues in vivo, *Endocrine Rew.*, 2, 103.
- 11) Wallace E., Silberman N. (1964): Biosynthesis of steroid sulfates by human ovarian tissue, *J. Biol. Chem.*, 239; 2809-2812.
- 12) Chandhri R., Coulson W.F. (1980): An improved hapten design for the radioimmunoassay of steroid glucuronides, *J. Steroid Biochem.* 13; 691-696.
- 13) Westphal U. (1971): *Monographs on Endocrinology: Steroid-Protein interaction*, F.Gross et al. Eds., vol. 4, Springer-Verlag, Berlin and New York.

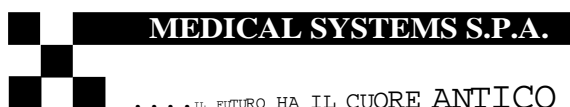
- 14) Anderson D.C. (1974): Sex hormone binding globulin, *Clin. Endocrinol.*, 3, 69.
- 15) Siiteri P.K., Murai J.T., Hammond G.L., Nisker J.A., Raimoure W.J. and Kuhn R.W. (1981): The serum transport of steroid hormones, *Rec. Prog. Horm. Res.*, 38, 457.
- 16) Moll G.W., Rosenfield R.L. and Helke J.H. (1981): Estradiol-Testosterone binding interactions and free plasma estradiol under physiological conditions, *J. Clin. Endocrinol.*, 52, 868.
- 17) Brodie A.H., Tait J.F. (1968): *Methods in hormone research*, I, 2a ed., New York, Academic press.
- 18) Chan I., Tindall D. (1981): Steroid hormone action. In *Pediatric Endocrinology*. Ed. Collier e coll., Raven Press, New York, 63-97.
- 19) Cooper T.G., Waites G.M.H. (1980): Role of Proteins in the Transport of Steroids into epididymis, in Steinberg A., Steinberg E., *Testicular Development, Structure and Function*, Raven Press, New York, 299-304.
- 20) Cunningham G.R., Tindall D.J., Means A.R. 1979): Differences in steroid specificity for rat androgen binding protein and the cytoplasmic receptor. *Steroids* 33: 261-276.
- 21) King R.J., Greene G.L. (1984): Monoclonal antibodies localise estrogen receptors in the nucleus of target cells. *Nature* 307: 745-753.
- 22) Liao S., Liang T., Fang S., Castaneda E., Shao T.C. (1973) Steroid structure and androgenic activity. Specificities involved in the receptor binding and nuclear retention of various androgens. *J. Biol. Chem.* 248: 6154-6162.
- 23) Martin P.M., Sheridan P.J. (1982): Towards a new model for the mechanism of action of steroids. *J. Steroid Biochem.* 16: 215-221.
- 24) Westphal U. (1971): Steroid-protein interactions. *Monographs of endocrinology*, Vol.4, Springer-Verlag Ed. New York, Heidelberg, Berlin, 187-189.

- 25) Benedetto S., David F., Galbiati A., Malvano R., Vignati G. (1984): Il dosaggio diretto degli steroidi circolanti. *Quaderni Ligand Quarterly*, 1, vol. 3, N. 3.
- 26) Simoni M., Seghedoni S., Zini D., Baraghini G.F. (1984): Il dosaggio degli steroidi liberi plasmatici. Metodologia e considerazioni clinico-sperimentali. *Quaderni di Ligand Quarterly* 1, vol3, N. 3.
- 27) Mimmi P., Bolelli G.F., Franceschetti F.F., Vecchi F. (1989): State of the art of steroid assay in Italy. *J. Nucl. Med. All. Sci*, 33: 162.
- 28) Biffignardi P., Massucchetti C., Molinatti G.M. (1984): Il trasporto plasmatico e la recettorialità periferica degli ormoni androgeni. *Androl. e Fisiol. della Riprod. Field Educational Italia Acta medica*: 115-131.
- 29) Gorski J., Gannon F. (1976): Current models of steroid hormone action: a critique. *Annu. Rev. Physiol.* 38: 425-450.
- 30) Gower D.B., Fotherby K. (1975): Biosynthesis of the androgens and estrogens, in: *Biochemistry of steroid Hormones*, Makin H.L.J. Blackwell Scientific Publications, Oxford-London-Edinburgh-Melbourne, 77-104.
- 31) Horton R. (1978): Sex steroid production and secretion in the male. *Andrologia* 10: 183-194.
- 32) Szego C., Pietras R. (1981): Biochemical activation of hormones G. Zituak ed. Vol III, Academic Press, 307.
- 33) Maroulis G.B., Abraham G.F. (1980): Concentration of androgens and cortisol in the zones of the adrenal cortex, in *Adrenal Androgens*. Genazzani A.R. et al., Raven Press, New York, 49-53.
- 34) Applesweig N. (1964): *Steroid Drugs I-II*, New York, Mc-Graw Hill Book Co Inc.
- 35) Camerino B., Sciaky R. (1972): *Structure and function of anabolic steroid*, Oxford-London-Edimburg, Pergamon Press.

Indice

| | | |
|---|------|----|
| Editoriale..... | pag. | 3 |
| Premessa | » | 5 |
| Chimica degli steroidi - Generalità | » | 6 |
| Nomenclatura..... | » | 7 |
| Classificazione degli steroidi..... | » | 8 |
| Steroli | » | 8 |
| Acidi biliari | » | 9 |
| Ormoni sessuali..... | » | 10 |
| Glicosidi di cardiaci ed agliconi | » | 11 |
| Saponine e sapogenine | » | 11 |
| Ecdisoni | » | 12 |
| Vitamina D | » | 12 |
| Trimetilsteroli | » | 14 |
| Ormoni steroidei..... | » | 15 |
| Biosintesi degli ormoni steroidei | » | 16 |
| Meccanismo di azione degli ormoni steroidei | » | 18 |
| Cinetica del legame recettoriale..... | » | 19 |
| Estrogeni | » | 21 |
| 17- Estradiolo..... | » | 22 |
| Estrone | » | 22 |
| Estriolo..... | » | 22 |
| Gestageni (Progestinici) | » | 26 |
| Androgeni..... | » | 28 |
| Ormoni Corticosurrenali | » | 32 |
| Metodi di determinazione degli steroidi..... | » | 37 |
| Determinazione degli steroidi: problematiche..... | » | 41 |
| Effetti delle proteine vettrici..... | » | 41 |
| Interferenze dei cataboliti coniugati..... | » | 42 |
| Interferenza dei lipidi..... | » | 42 |
| Interazione coniugato-anticorpo..... | » | 42 |
| Gli steroidi in farmacologia..... | » | 44 |
| Cortisonici - Antiinfiammatori..... | » | 44 |
| Cardiotonici | » | 44 |
| Estroprogestinici - Contraccettivi orali | » | 45 |
| Androgeni - Anabolizzanti..... | » | 45 |
| Sviluppo storico della chimica degli steroidi | » | 47 |
| Bibliografia | » | 49 |
| Indice | » | 52 |

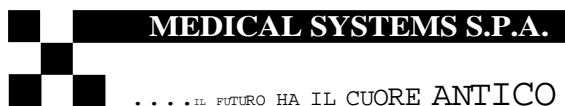
Collana Caleidoscopio - Ed. Italiana



1. Rassu S.: *Principi generali di endocrinologia*. Gennaio '83
2. Rassu S.: *L'ipotalamo endocrino*. Giugno '83
3. Rassu S.: *L'ipofisi*. Dicembre '83
4. Alagna., Masala A.: *La prolattina*. Aprile '84
5. Rassu S.: *Il pancreas endocrino*. Giugno '84
6. Fiorini I., Nardini A.: *Citomegalovirus, Herpes virus, Rubella virus (in gravidanza)*. Luglio '84.
7. Rassu S.: *L'obesità*. Settembre '84
8. Franceschetti F., Ferraretti A.P., Bolelli G.F., Bulletti C.: *Aspetti morfofunzionali dell'ovaio*. Novembre '84.
9. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (1)*. Dicembre '84.
10. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (2) parte prima*. Gennaio '85.
11. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (2) parte seconda*. Febbraio '85.
12. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (3) parte prima*. Aprile '85.
13. Nacamulli D., Girelli M.E., Zanatta G.P., Busnardo B.: *Il TSH*. Giugno '85.
14. Facchinetti F. e Petraglia F.: *La b-endorfina plasmatica e liquorale*. Agosto '85.
15. Baccini C.: *Le droghe d'abuso (1)*. Ottobre '85.
16. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (3) parte seconda*. Dicembre '85.
17. Nuti R.: *Fisiologia della vitamina D: Trattamento dell'osteoporosi post-menopausale*. Febbraio '86
18. Cavallaro E.: *Ipnosi: una introduzione psicofisiologica*. Marzo '86.
19. Fanetti G.: *AIDS: trasfusione di sangue emoderivati ed emocomponenti*. Maggio '86.
20. Fiorini I., Nardini A.: *Toxoplasmosi, immunologia e clinica*. Luglio '86.
21. Limone P.: *Il feocromocitoma*. Settembre '86.
22. Bulletti C., Filicori M., Bolelli G.F., Flamigni C.: *Il Testicolo. Aspetti morfo-funzionali e clinici*. Novembre '86.
23. Bolcato A.: *Allergia*. Gennaio '87.
24. Kubasik N.P.: *Il dosaggio enzimologico ed immunologico*. Febbraio '87.
25. Carani C.: *Patologie sessuali endocrino-metaboliche*. Marzo '87.
26. Sanna M., Carcassi R., Rassu S.: *Le banche dati in medicina*. Maggio '87.
27. Bulletti C., Filicori M., Bolelli G.F., Jasonni V.M., Flamigni C.: *L'amenorrea*. Giugno '87.
28. Zilli A., Pagni E., Piazza M.: *Il paziente terminale*. Luglio '87.
29. Pisani E., Montanari E., Patelli E., Trinchieri A., Mandressi A.: *Patologie prostatiche*. Settembre '87.
30. Cingolani M.: *Manuale di ematologia e citologia ematologica*. Novembre '87.
31. Kubasik N.P.: *Ibridomi ed anticorpi monoclonali*. Gennaio '88.
32. Andreoli C., Costa A., Di Maggio C.: *Diagnostica del carcinoma mammario*. Febbraio '88.
33. Jannini E.A., Moretti C., Fabbri A., Gnessi L., Isidori A.: *Neuroendocrinologia dello stress*. Marzo '88.
34. Guastella G., Cefalù E., Carmina M.: *La fecondazione in vitro*. Maggio '88.

35. Runello F., Garofalo M.R., Sicurella C., Filetti S., Vigneri R.: *Il gozzo nodulare*. Giugno '88.
36. Baccini C.: *Le droghe d'abuso (2)*. Luglio '88.
37. Piantino P., Pecchio F.: *Markers tumorali in gastroenterologia*. Novembre '88.
38. Biddau P.F., Fiori G.M., Murgia G.: *Le leucemie acute infantili*. Gennaio '89.
39. Sommariva D., Branchi A.: *Le dislipidemie*. Febbraio '89.
40. Butturini U., Butturini A.: *Aspetti medici delle radiazioni*. Marzo '89.
41. Cafiero F., Gipponi M., Paganuzzi M.: *Diagnostica delle neoplasie colo-rettali*. Aprile '89.
42. Palleschi G.: *Biosensori in Medicina*. Maggio '89.
43. Franciotta D.M., Melzi D'Eril G.V. e Martino G.V.: *HTLV-I*. Giugno '89.
44. Fanetti G.: *Emostasi: fisiopatologia e diagnostica*. Luglio '89.
45. Contu L., Arras M.: *Le popolazioni e le sottopopolazioni linfocitarie*. Settembre '89.
46. Santini G.F., De Paoli P., Basaglia G.: *Immunologia dell'occhio*. Ottobre '89.
47. Gargani G., Signorini L.F., Mandler F., Genchi C., Rigoli E., Faggi E.: *Infezioni opportunistiche in corso di AIDS*. Gennaio '90.
48. Banfi G., Casari E., Murone M., Bonini P.: *La coriagonadotropina umana*. Febbraio '90.
49. Pozzilli P., Buzzetti R., Procaccini E., Signore E.: *L'immunologia del diabete mellito*. Marzo '90.
50. Cappi F.: *La trasfusione di sangue: terapia a rischio*. Aprile '90.
51. Tortoli E., Simonetti M.T.: *I micobatteri*. Maggio '90.
52. Montecucco C.M., Caporali R., De Gennaro F.: *Anticorpi antinucleo*. Giugno '90.
53. Manni C., Magalini S.I. e Proietti R.: *Le macchine in terapia intensiva*. Luglio '90.
54. Goracci E., Goracci G.: *Gli allergeo-acari*. Agosto '90.
55. Rizzetto M.: *L'epatite non A non B (tipo C)*. Settembre '90.
56. Filice G., Orsolini P., Soldini L., Razzini E. e Gulminetti R.: *Infezione da HIV-1: patogenesi ed allestimento di modelli animali*. Ottobre '90.
57. La Vecchia C.: *Epidemiologia e prevenzione del cancro (I)*. Gennaio '91.
58. La Vecchia C.: *Epidemiologia e prevenzione del cancro (II)*. Febbraio '91.
59. Santini G.F., De Paoli P., Mucignat G., e Basaglia G., Gennari D.: *Le molecole dell'adesività nelle cellule immunocompetenti*. Marzo '91.
60. Bedarida G., Lizioli A.: *La neopterin nella pratica clinica*. Aprile '91.
61. Romano L.: *Valutazione dei kit immunochimici*. Maggio '91.
62. Dondero F. e Lenzi A.: *L'infertilità immunologica*. Giugno '91.
63. Bologna M. Biorci L. Martinotti S.: *Gli Oncogeni*. Luglio '91.
64. Filice G., Orsolini P., Soldini L., Gulminetti R., Razzini E., Zambelli A. e Scevola D.: *Infezione-malattia da HIV in Africa*. Agosto '91.
65. Signore A., Chianelli M., Fiore V., Pozzilli P., Andreani D.: *L'immunoscintigrafia nella diagnosi delle endocrinopatie autoimmuni*. Settembre '91.
66. Gentilomi G.A.: *Sonde genetiche in microbiologia*. Ottobre '91.
67. Santini G.F., Fornasiero S., Mucignat G., Besaglia G., Tarabini-Castellani G. L., Pascoli L.: *Le sonde di DNA e la virulenza batterica*. Gennaio '92.
68. Zilli A., Biondi T.: *Il piede diabetico*. Febbraio '92.
69. Rizzetto M.: *L'epatite Delta*. Marzo '92.
70. Bracco G., Dotti G., Pagliardini S., Fiorucci G.C.: *Gli screening neonatali*. Aprile '92.
71. Tavani A., La Vecchia C.: *Epidemiologia delle patologie cardio e cerebrovascolari*. Luglio '92.
72. Cordido F., Peñalva A., De la Cruz L. F., Casanueva F. F., Dieguez C.: *L'ormone della crescita*. Agosto '92.

73. Contu L., Arras M.: *Molecole di membrana e funzione immunologica (I)*. Settembre '92.
74. Ferrara S.: *Manuale di laboratorio I*. Ottobre '92.
75. Gori S.: *Diagnosi di laboratorio dei patogeni opportunisti*. Novembre '92.
76. Ferrara S.: *Manuale di laboratorio II*. Gennaio '93.
77. Pinna G., Veglio F., Melchio R.: *Ipertensione Arteriosa*. Febbraio '93.
78. Alberti M., Fiori G.M., Biddau P.: *I linfomi non Hodgkin*. Marzo '93.
79. Arras M., Contu L.: *Molecole di membrana e funzione immunologica (II)*. Aprile '93.
80. Amin R.M., Wells K.H., Poiesz B.J.: *Terapia antiretrovirale*. Maggio '93.
81. Rizzetto M.: *L'epatite C*. Settembre '93.
82. Andreoni S.: *Diagnostica di laboratorio delle infezioni da lieviti*. Ottobre '93.
83. Tarolo G.L., Bestetti A., Maioli C., Giovanella L.C., Castellani M.: *Diagnostica con radionuclidi del Morbo di Graves-Basedow*. Novembre '93.
84. Pinzani P., Messeri G., Pazzagli M.: *Chemiluminescenza*. Dicembre '93.
85. Hernandez L.R., Osorio A.V.: *Applicazioni degli esami immunologici*. Gennaio '94.
86. Arras M., Contu L.: *Molecole di Membrana e funzione immunologica. Parte terza: I Infociti B*. Febbraio '94.
87. Rossetti R.: *Gli streptococchi beta emolitici di gruppo (SGB)*. Marzo '94.
88. Rosa F., Lanfranco E., Balleari E., Massa G., Ghio R.: *Marcatori biochimici del rimodellamento osseo*. Aprile '94.
89. Fanetti G.: *Il sistema ABO: dalla sierologia alla genetica molecolare*. Settembre '94.
90. Buzzetti R., Cavallo M.G., Giovannini C.: *Citochine ed ormoni: Interazioni tra sistema endocrino e sistema immunitario*. Ottobre '94.
91. Negrini R., Ghielmi S., Savio A., Vaira D., Miglioli M.: *Helicobacter pylori*. Novembre '94.
92. Parazzini F.: *L'epidemiologia della patologia ostetrica*. Febbraio '95.
93. Proietti A., Lanzafame P.: *Il virus di Epstein-Barr*. Marzo '95.
94. Mazzarella G., Calabrese C., Mezzogiorno A., Peluso G.F., Micheli P., Romano L.: *Immunoflogosi nell'asma bronchiale*. Maggio '95.
95. Manduchi I.: *Steroidi*. Giugno '95.





Caleidoscopio
Rivista mensile di Medicina
anno 13, numero 95

Direttore Responsabile

Sergio Rassu
Via Pietro Nenni, 6
07100 Sassari
Tel.-Fax 079 270464
Tel. mobile 0360 509973
E-mail:rassu@mbox.vol.it

Responsabile Commerciale

Alessandra Pater



Editore

Medical Systems S.p.A.

... IL FUTURO HA IL CUORE ANTICO

Consulenti di Redazione

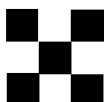
Giancarlo Mazzocchi ed
Angelo Maggio

Segretaria di Direzione

Giovanna Nieddu

Servizio Abbonamenti

Fina Grandeppieno
Flavio Damarciasi



Via Rio Torbido, 40
16165 Genova (Italy)

Tel. (010) 83401 Numero Verde 167 801005 (senza prefisso);

Telex 270310 Ideal I.

Telefax (010) 803498- 809070.

La Medical Systems pubblica anche le seguenti riviste: Caleidoscopio Español, Kaleidoscope, Caleidoscopio letterario, Caleidoscopio literario, Pandora, The Medical Systems Voice, Journal of Preventive Medicine and Hygiene.

Stampa

ALGRAPHY S.n.c.

Passo Ponte Carrega, 62 R. - GENOVA

tel. 010/8366272 - Fax 010/8358069

Registrazione Tribunale di Sassari n. 189 del 6/11/84

Iscrizione al Registro Nazionale della Stampa n° 2661 del 2 Settembre 1989

Finito di stampare: Giugno 1995

Sped. in Abb. Post. 50%

Pubblicazione protetta a norma di legge dall'Ufficio proprietà letteraria, artistica e scientifica della Presidenza del Consiglio dei Ministri, dedicata all'aggiornamento professionale continuo e riservata ai medici.

Caleidoscopio viene anche letto e rilanciato da:

"L'ECO DELLA STAMPA"

Via Compagnoni, 28 - Milano

SAGGIO FUORI COMMERCIO ESENTE IVA E BOLLA DI ACCOMPAGNAMENTO (Art. 4 - 3/8/6 DPR 627/78)