

**ESPRESSIONE DELL'OSTEOPONTINA IN TESTICOLI SANI
E CRIPTOCHIDI DI SUINO: RISULTATI PRELIMINARI**

***OSTEOPONTIN EXPRESSION IN NORMAL AND CRIPTORCHID BOAR
TESTES: PRELIMINARY RESULTS***

§S. AMEDEO, *F. CERRUTI, §M.T. CAPUCCHIO, §D. PALMERINI,
#M. APICELLA, #M. GIBERTI, §F. GUARDA, *S. MIOLETTI

*§ Dipartimento di Patologia Animale, Grugliasco (TO) e Centro di Referenza di Patologia Comparata Bruno Maria Zaini, Torino; *Dipartimento di Morfofisiologia Veterinaria, Grugliasco (TO); # ASL 17/2 Saluzzo (Cuneo)*

Parole chiave: criptorchidismo, osteopontina, suino, testicolo

Key words: boar, cryptorchidism, osteopontin, testis

Riassunto. Il criptorchidismo è la più frequente patologia congenita nei bambini e rappresenta un importante rischio di tumore testicolare ma la sua eziologia è ancora in gran parte sconosciuta. L'osteopontina (OPN) è una glicoproteina fosforilata multifunzionale che svolge in molti tessuti importanti funzioni fisiopatologiche essendo coinvolta ad esempio nella migrazione cellulare, nella regolazione dei meccanismi immunitari, nei processi infiammatori e nella crescita tumorale. In questo lavoro abbiamo esaminato l'espressione dell'OPN in testicoli normali e in testicoli criptorchidi di suino utilizzando tecniche immunocistochemiche e Western blotting.

Nei testicoli sani una immunoreattività multifocale all'anticorpo anti-OPN è stata osservata a carico degli spermatozoi, degli spermatidi, degli spermatociti, in alcune cellule del Sertoli e nelle cellule interstiziali del Leydig; nei testicoli criptorchidi l'immunopositività si è osservata in alcuni spermatogoni e nelle cellule del Leydig.

Mediante Western blotting sono state identificate due bande reattive all'anticorpo anti-OPN, che migrano a 66 e 32- kDa, ed è stato interessante osservare che esse risultano molto più intense nei testicoli criptorchidi rispetto a quelli sani. Precedenti ricerche avevano ipotizzato un ruolo fondamentale per l'osteopontina nella spermatogenesi ma i nostri risultati preliminari suggeriscono altri possibili ruoli di questa molecola *in vivo* nel testicolo di suino e in particolar modo in quello affetto da criptorchidismo.

Abstract. Cryptorchidism is the most frequent congenital birth defect in male children and represents a risk factor for testicular cancer but its aetiology remains for the most part unknown. Osteopontin (OPN) is a multifunctional phosphorylated glycoprotein that in many tissues is involved in important physiopathological processes such as cell migration, regulation of immune cell function, inflammation and cancer progression. In this study we examined the expression of osteopontin in normal and in cryptorchid boar testes using immunohistochemical and Western blot analysis.

In normal testis immunoreactivity to anti-OPN antibody was detected in sperm, spermatids, spermatocytes, in few Sertoli cells and in Leydig cells with varying intensities while in cryptorchid testis immunostaining was seen in some spermatogonia and in Leydig cells.

Immunoblot analysis revealed in both normal and cryptorchid testes a 66-kDa and a 32-kDa-OPN immunopositive bands that interestingly were more intense in the cryptorchid ones. Previous works suggested that OPN in the testis could be involved in spermatogenesis but our preliminary findings lead to suppose other roles for this glycoprotein *in vivo* in the testis and in particular in the cryptorchid tissue.

INTRODUZIONE

L'osteopontina (OPN) è una fosfoproteina glicosilata identificata in diversi tessuti e fluidi organici; sembra che le sue funzioni biologiche riguardino principalmente l'adesione, la migrazione e la proliferazione cellulare nonché i processi infiammatori cronici, le malattie autoimmuni e la crescita tumorale. Numerose ricerche hanno dimostrato che l'OPN agisce tramite la produzione di segnali intracellulari e viene scissa da almeno 2 classi di proteasi (trombina e metalloproteasi della matrice) in frammenti a minore peso molecolare. Si è constatato *in vitro* che tali frammenti, oltre a mantenere le funzioni dell'OPN integra, acquistano anche altre attività biologiche, ma il loro ruolo *in vivo* risulta ancora in gran parte sconosciuto. Alcuni scienziati hanno studiato la distribuzione dell'OPN nel sistema riproduttivo maschile, inclusi testicolo ed epididimo, e hanno evidenziato differenze per quanto riguarda l'espressione della proteina, anche a seconda della specie animale considerata. Un recente articolo ha riportato la localizzazione dell'OPN nel testicolo di suino adulto e neonato e gli autori hanno ipotizzato un ruolo fondamentale di questa proteina nella spermatogenesi. Lo scopo del nostro lavoro è stato quello di valutare la presenza dell'OPN in testicoli di suino sani e criptorchidi, per verificare l'espressione di questa proteina anche in un tessuto patologico che non è in grado di produrre spermatozoi maturi.

MATERIALI E METODI

In questo lavoro preliminare sono stati utilizzati tre testicoli sani e tre testicoli criptorchidi di suini ibridi commerciali della razza Landrace, appartenenti al tipo pesante (p.v. 150-170 Kg). Gli animali sono stati macellati all'età di nove mesi e i testicoli immediatamente rimossi. Una parte dei tessuti è stata immersa in formalina tamponata per gli esami istologici e immunoistochimici e una parte è stata invece congelata in azoto liquido per l'analisi biochimica. I tessuti normali e patologici sono stati inclusi in paraffina e tagliati in sezioni di 5 µm. Dopo sparaffinatura, per l'esame istologico le sezioni sono state colorate con ematossilina eosina; per l'esame immunoistochimico, le sezioni sono state immerse in tampone citrato (0.01M, pH 6.0), trattate con H₂O₂ per bloccare l'attività di perossidasi endogene e, dopo lavaggi in tampone fosfato, i campioni sono stati incubati con l'anticorpo anti-human osteopontin (Rockland, USA) e la reazione sviluppata con il sistema avidina-biotina-perossidasi. Per l'analisi biochimica i tessuti congelati sono stati omogenati in tampone contenente 40 mM Tris-HCl pH 7.4, NaCl 120 mM e 0.1% Nonidet P-40 utilizzando come inibitori delle proteasi leupeptina (0.5 µg/ml), PMSF (1mM) e aprotinina (5 µg/ml). Dopo aver effettuato la quantificazione proteica con il metodo di Bradford, i campioni (30µg/campione) sono stati separati elettroforeticamente (SDS-PAGE) e trasferiti su membrana di PVDF. Come anticorpo primario è stato utilizzato un anticorpo anti-OPN policlonale in grado di riconoscere la proteina intera di 66- kDa e il suo frammento C-terminale di 32- kDa,

formato per attività proteasica di trombina e metalloproteasi della matrice. Dopo incubazione della membrana con l'anticorpo secondario coniugato a perossidasi l'attività perossidasi è stata evidenziata con metodo chemiluminescente (ECL, Amersham Biosciences).

RISULTATI

L'esame istologico dei testicoli sani ha evidenziato i tubuli seminiferi contenenti spermatogoni, spermatociti, cellule del Sertoli, spermatidi e spermatozoi; nei testicoli criptorchidi si sono osservate cellule del Sertoli e spermatogoni oltreché numerose cellule interstiziali del Leydig di aspetto ipertrofico. L'esame immunohistochimico condotto sui testicoli sani ha mostrato una immunoreattività multifocale dell'OPN all'interno dei tubuli seminiferi e in particolare a carico degli spermatozoi, degli spermatogoni e degli acrosomi degli spermatidi, con un quadro simile a quello riportato in letteratura da Kim e Shin (2007). Nei testicoli criptorchidi l'immunoreattività è risultata uniformemente distribuita nel tessuto interstiziale a carico delle cellule del Leydig e qualche positività si è rilevata a carico di alcuni spermatogoni. (Fig. 1).

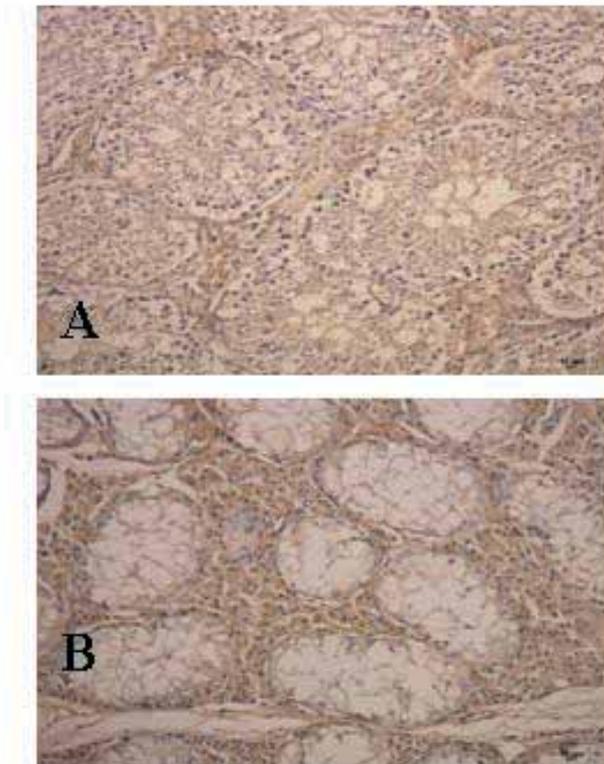


Fig 1: Analisi immunohistochimica dell'OPN nel testicolo di suino normale (A) e criptorchide (B). Ingrandimento 20X.

L'analisi mediante Western blotting ha messo in evidenza la presenza dell'OPN nei testicoli sani e in quelli criptorchidi, sia per quanto riguarda la forma integra della proteina (banda che migra a 66- kDa), sia per quanto concerne il suo frammento proteolitico (migrazione a 32- kDa) ma il dato assai interessante è che, in base a dati densitometrici, entrambe le bande a 66 e 32- kDa risultano maggiormente espresse nel tessuto patologico rispetto a quello normale (Fig. 2).

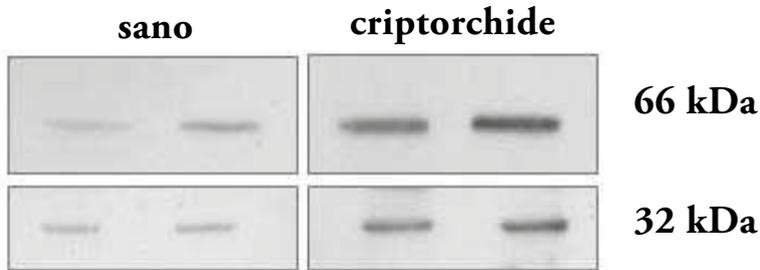


Fig 2: Immagine rappresentativa di un'analisi mediante Western blotting dell'OPN nel testicolo sano e criptorchide di suino

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

L'OPN è stata scoperta inizialmente come una proteina della matrice ossea e in seguito identificata come una citochina, prodotta da cellule T attivate e da linee cellulari modificate, capace di attivare l'adesione cellulare, la chemiotassi e la trasduzione di segnali, legandosi a particolari recettori come certe integrine e alcune varianti della glicoproteina CD44. L'OPN viene sintetizzata, oltre che nel tessuto osseo, in numerosi altri organi, come l'orecchio interno, il cervello, il muscolo, la placenta e il sistema immunitario. In quest'ultimo viene espressa in diversi tipi cellulari come i macrofagi, i neutrofilo, i linfociti T e B. Molte ricerche hanno messo in luce un coinvolgimento dell'OPN nei processi di rimarginazione delle ferite, nel rimodellamento osseo, nell'infiammazione (con attività pro- e anti-infiammatoria), nell'ischemia e nella risposta immunitaria, in alcune forme di stress, e per questo il suo ruolo è stato studiato in molte patologie con implicazioni flogistiche e immunitarie (es. artrite reumatoide, sclerosi multipla) e in malattie che interessano il tessuto osseo come osteoartriti e osteoporosi. Di grande rilievo inoltre sembra il coinvolgimento dell'OPN nella progressione e nella metastatizzazione tumorale, in particolare per quanto riguarda carcinomi della mammella, della prostata, della tiroide, del polmone e nel mieloma multiplo, tanto che per alcune forme neoplastiche si è ipotizzato di utilizzare la misura dei livelli plasmatici dell'OPN quale potenziale marker prognostico della malattia. Un dettaglio importante nella struttura dell'OPN è la presenza di siti di clivaggio per la trombina e per alcune metalloproteasi della matrice (MMP-3 e MMP-7), poiché la proteina idrolizzata espone siti di riconoscimento per specifici recettori non altrimenti visibili nella sua forma integra. Si è dimostrato che le proprietà funzionali della proteina clivata differiscono da quelle della proteina nativa e il ruolo biologico delle modificazioni proteolitiche si è ben osservato

in vitro in alcuni modelli sperimentali, in cui si evidenziano aumentata adesione e migrazione cellulare. Nel sistema riproduttivo maschile l'OPN è stata rilevata in vari distretti, come il testicolo, l'epididimo e gli spermatozoi. A questo proposito diversi lavori hanno dimostrato l'espressione dell'OPN nel toro, nel topo e nel ratto, però con qualche differenza nella localizzazione cellulare. Rodriguez et al., in un articolo del 2000, avevano osservato nel toro la presenza della proteina nell'ampolla dei vasi deferenti e nelle vescicole seminali, mentre nel testicolo l'OPN era stata identificata nei tubuli seminiferi, ma solo in quelli contenenti spermatidi allungati, il che suggeriva una relazione tra espressione della proteina e stadio di maturazione delle cellule germinali. Nelle cellule del Sertoli la proteina si era osservata solo nelle fasi più avanzate della spermatogenesi. In un lavoro più recente invece Erikson et. al. (2007) hanno identificato l'OPN anche nella membrana degli spermatozoi, ipotizzando un probabile ruolo della proteina nei processi di fertilizzazione. Per quanto riguarda il ratto l'OPN sembra essere presente nell'epididimo, negli spermatogoni e negli spermatociti ma risultati contraddittori si osservano per le cellule del Sertoli e gli spermatidi. Nel testicolo di topo invece l'OPN è stata identificata con sicurezza sia nelle cellule germinali che nelle cellule del Sertoli. Un recente lavoro (Kim and Shin, 2007) ha evidenziato l'espressione dell'OPN nel testicolo di suino, sia per quanto riguarda lo stadio neonatale (suinetti di 1 giorno) che quello adulto. In quest'ultimo la proteina si è dimostrata variamente espressa nei tubuli seminiferi, interessando soprattutto i corpi residui e gli acrosomi negli spermatidi, e occasionalmente gli spermatogoni, gli spermatociti e le cellule del Sertoli. Anche le cellule del Leydig si sono osservate debolmente positive all'esame immunoistochimico. Nel neonato la proteina è risultata presente nel testicolo all'interno dei gonociti e in qualche cellula di sostegno nei tubuli seminiferi, così come nelle cellule del Leydig. L'analisi mediante Western blotting ha poi messo in evidenza nell'omogenato testicolare la presenza della proteina sia nella sua forma integra (66kDa) che frammentata (32kDa) nel testicolo dell'animale adulto, ma solo della forma ad alto peso molecolare nel neonato. In relazione a questi risultati gli autori hanno ipotizzato che l'OPN nel testicolo possa avere un ruolo nell'adesione delle cellule germinali alla membrana basale e alle adiacenti cellule del Sertoli e che sia utile allo sviluppo delle cellule germinali sia nell'adulto che nel neonato, anche con l'interessamento delle cellule interstiziali del Leydig. Nel nostro lavoro abbiamo voluto confrontare l'espressione dell'osteopontina nel tessuto testicolare sano di suino adulto con quello invece affetto da criptorchidismo, una patologia che rappresenta il più frequente difetto congenito dell'apparato genitale maschile nei bambini e che si è dimostrata anche il fattore di rischio meglio caratterizzato per quanto riguarda l'insorgenza di cancro testicolare (rischio 2-8 volte superiore alla media di popolazione nell'uomo). Nel nostro studio abbiamo potuto evidenziare come nel tessuto criptorchide di suino l'OPN risulti maggiormente espressa, sia per quanto riguarda la sua forma integra (66 kDa, Western blotting) che il suo frammento proteolitico a minore peso molecolare (32 kDa). Inoltre dal punto di vista immunoistochimico l'osteopontina appare distribuita variamente nel testicolo sano (negli spermatidi, spermatogoni, spermatociti, spermatozoi e in alcune cellule del Sertoli all'interno dei tubuli seminiferi e anche nelle cellule interstiziali del Leydig), confermando i dati dello studio precedente, mentre nel testicolo criptorchide una evidente immunopositività è risultata a carico di alcuni spermatogoni e soprattutto nelle cellule del Leydig nel

tessuto interstiziale. Il lavoro di Kim e Shin (2007) ipotizzava un ruolo fondamentale dell'OPN nella spermatogenesi ma con i nostri risultati abbiamo dimostrato la presenza della proteina anche in un tessuto che non è in grado di produrre spermatozoi maturi. Inoltre il fatto che l'OPN si sia dimostrata maggiormente espressa (sia nella sua forma integra che frammentata) nel tessuto criptorchide potrebbe essere conseguenza dello stress subito dal testicolo ritenuto, e potrebbe anche indicare un coinvolgimento della proteina nella potenziale trasformazione neoplastica del tessuto criptorchide. Dal nostro punto di vista perciò lo studio dell'OPN nel testicolo criptorchide è meritevole di ulteriori approfondimenti.

Bibliografia

- Bernal-Mañas C.M., Morales E., Pastor L.M., Pinart E., Bonet S., De la Rosa P., Briz M.D., Zuasti A., Ferrer C. and Canteras M. (2005) "Proliferation and apoptosis of spermatogonia in postpuberal boar (*Sus domesticus*) testes with spontaneous unilateral and bilateral abdominal cryptorchidism" *Acta Histochem.* 107: 365-372.
- Erikson D.W., Way A. L., Chapman D.A., Killian G.J. (2007) "Detection of osteopontin on Holstein bull spermatozoa, in cauda epididymal fluid and testis homogenates, and its potential role in bovine fertilization" *Reproduction* 133(5):909-17.
- Kim S. and Shin T. (2007) "Immunohistochemical study of osteopontin in boar testis" *J. Vet. Sci.* 8(2), 107-110.
- Wang K.X. and Denhardt D.T. (2008) "Osteopontin: role in immune regulation and stress responses" *Cytokine Growth Factor Rev.* 19 (5-6), 333-45.
- Rodriguez C.M., Day J.R., Killian G.J. (2000) "Osteopontin gene expression in the Holstein bull reproductive tract" *J Androl* 21: 414-20.
- Scatena M., Liaw L., Giachelli C.M. (2007) "Osteopontin: a multifunctional molecule regulating chronic inflammation and vascular disease" *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 27(11), 2302-9.