



RIPRODUZIONE SUINA

Espressione immunoistochimica e biochimica dell'osteopontina in testicoli sani e criptorchidi di suino

RIASSUNTO

In questo studio gli autori hanno analizzato l'espressione dell'osteopontina in testicoli normali e criptorchidi di suino, allo scopo di evidenziare eventuali differenze tra organi sani e organi che non sono in grado di produrre spermatozoi maturi. Dal punto di vista immunoistochimico si è osservata una marcata presenza della proteina nelle cellule di Leydig, sia nei campioni normali che in quelli patologici. Inoltre, mediante la tecnica Western blotting, entrambi i tipi di tessuto hanno mostrato positività anticorpale all'OPN, sia per quanto riguarda la proteina integra, con peso molecolare di 66 kDa, sia per il suo frammento a peso molecolare di 32 kDa, frutto di degradazione proteolitica operata da metalloproteasi. È stato interessante osservare che quest'ultimo frammento appare espresso maggiormente nel tessuto criptorchide rispetto a quello sano. Secondo gli autori questo lavoro conferma in parte i risultati di precedenti ricerche, ma suggerirebbe per l'OPN un ruolo ancora da definire nel criptorchidismo, meritevole di ulteriori approfondimenti.

Parole chiave: criptorchidismo, osteopontina, suino, testicolo.

SUMMARY

Immunohistochemical and biochemical investigations on Osteopontin in healthy and cryptorchid pig testes

In this work the authors studied the expression of OPN in normal and cryptorchid pig testes, to show possible differences between healthy organs and organs that are not able to produce mature sperm. Immunohistochemical investigations revealed a quite marked OPN positivity in Leydig cells in normal and cryptorchid pig testes. Furthermore, both normal and cryptorchid samples, when analyzed by Western blotting, showed either a 66 kDa and a 32 kDa OPN immunopositive bands, the latest resulting from metalloproteinases proteolytic degradation. Interestingly the latter fragment appeared more expressed in cryptorchid than in healthy tissue. This work confirms in part the results of previous studies, but it suggests other potential roles for OPN in cryptorchid testes, worthy of further study.

Keywords: cryptorchidism, osteopontin, pig, testis.

Stefano Amedeo*,¹, Fulvia Cerruti*,¹, Maria Teresa Capucchio*
Domenico Palmerini*, Michele Apicella**, Monica Giberti **, Gabriele D'Andrea***
Franco Guarda****, Silvia Mioletti*

*Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Torino

**ASL 17/2 Saluzzo, Cuneo

***Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche, Università degli Studi dell'Aquila

****Centro di Referenza di Patologia Comparata Bruno Maria Zaini, Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Torino.

¹Questi autori hanno contribuito in ugual misura alla ricerca

Il criptorchidismo è il difetto congenito più comune nei bambini causato dalla mancata discesa nello scroto di uno o entrambi i testicoli [2, 25]. L'eziologia di questa patologia rimane ancora oscura ed è correlata a un alto rischio di infertilità e di cancro testicolare nell'adulto [17, 18, 19]. L'osteopontina (OPN) è una glicoproteina acida fosforilata, codificata dal gene *Spp-1*, identificata inizialmente come una proteina della matrice ossea e successivamente ritrovata in molti altri distretti [22, 29]. Recenti studi dimostrano un coinvolgimento dell'OPN nella proliferazione, nell'adesione e nella migrazione cellulare, nonché nelle malattie infiammatorie croniche e autoimmuni [5, 6, 11, 26]. Inoltre la proteina sembra essere importante nella progressione tumorale e nella formazione di metastasi nell'uomo, tanto che per alcune neoplasie si è suggerito di utilizzare i livelli plasmatici dell'OPN come marker prognostico potenziale di malattia [7, 12, 20, 21, 23]. Secondo alcuni autori le diverse funzioni biologiche dell'OPN potrebbero essere correlate con alcuni tratti della sua sequenza aminoacidica, alcuni dei quali diventano accessibili solo se la proteina viene tagliata in frammenti a basso peso molecolare da almeno due classi di proteasi (trombina e metalloproteasi della matrice) [1, 14, 16, 21, 26, 27, 28]. Nel sistema riproduttivo maschile di diverse specie l'OPN è stata evidenziata in vari distretti, compresi testicolo, epididimo e sperma [3, 4, 8, 9, 10, 13, 15, 24, 29]. Cancel e coll. [4] ri-

portano la mancata reattività immunoistochimica alla proteina in testicoli, epididimo, vasi deferenti, prostata e ghiandole bulbo uretrali di toro ma la stessa è stata evidenziata sulla superficie epiteliale e all'interno del lume dell'ampolla e nelle vescicole seminali. Rodriguez e coll. [13] hanno osservato nella stessa specie l'espressione genica dell'OPN nelle cellule germinali in sviluppo, nei tubuli seminiferi contenenti spermatozoi allungati, nelle cellule epiteliali dell'ampolla e nello sperma situato entro il lume del testicolo. Erikson e coll. [8] hanno identificato la proteina nel toro anche nella membrana degli spermatozoi, suggerendone un possibile ruolo nei processi di fecondazione. Nei ratti, studi compiuti mediante immunofluorescenza confermano la presenza dell'OPN nell'epididimo, negli spermatozoi e negli spermociti, ma risultati contraddittori sono stati osservati per quanto riguarda le cellule del Sertoli e gli spermatozoi [15]. Luedtke e coll. [10] hanno anche mostrato l'espressione della proteina nel testicolo di ratto durante le prime fasi della differenziazione delle cellule germinali, da spermatozoi fino a spermociti. Nel testicolo di topo la proteina è stata identificata sia nelle cellule germinali che nelle cellule del Sertoli [24]. Kim e Shin [9] hanno dimostrato la presenza dell'OPN nei testicoli di suini adulti e neonati, e suggeriscono un ruolo di questa proteina nello sviluppo delle cellule germinali e nella spermatogenesi.

L'obiettivo di questo lavoro è stato quello di ►►



Formazione

verificare la presenza dell'osteopontina in testicoli sani e criptorchidi di suino utilizzando tecniche immunohistochimiche e biochimiche, per rilevare eventuali differenze nella sua distribuzione ed espressione tra organi normali, in cui la spermatogenesi è completa, e patologici, che non sono in grado di produrre spermatozoi maturi.

Materiali e metodi

In questo studio sono stati utilizzati 9 testicoli normali, come controllo, e 14 testicoli criptorchidi monolaterali 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 al 10% per l'esame istologico e una parte è stata invece congelata in azoto liquido per l'analisi biochimica. Per l'indagine istologica i tessuti normali e patologici dopo fissazione sono stati inclusi in paraffina, sezionati al microtomo (5 µm) e colorati con ematossilina eosina.

Per l'immunohistochimica, le sezioni sono state incubate a temperatura ambiente in una soluzione di metanolo con il 3% di perossido d'idrogeno per 20 minuti (per bloccare l'attività perossidasi endogena), successivamente incubate con siero di capra al 5% per 2 ore e poi con un anticorpo policlonale anti-osteopontina umana diluito 1:1000 (Rockland, USA) per 60 minuti. La rilevazione è stata eseguita mediante il complesso avidina-biotina (ABC) (Pierce, 32020). La proteina è stata quindi visualizzata con l'uso della 3, 3'-diaminobenzidina-tetraidrocloreuro 0,005% (DAB; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri) e perossido di idrogeno 0,025% in 200 ml di tampone fosfato (PBS, 137 mM NaCl, 12 mM fosfato, 2,7 mM KCl, pH 7,4). Per l'analisi biochimica i tessuti congelati sono stati omogeneizzati in tampone (40 mM Tris-HCl pH 7,4, 120 mM NaCl, 0,1% (p/v) Nonidet P-40, con 0,5 µg/ml di leupeptina, 1 mM PMSF e 5 g/ml aprotinina come inibitori delle proteasi) mediante un omogeneizzatore Ultraturax DIAX900 (Heidolph Instruments, Kelheim, Germania) e centrifugati a 14.000 rpm per 30 minuti a 4 °C. La concentrazione di proteine nel surnatante è stata misurata con il metodo di Bradford (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Una quantità pari a 30 µg di estratto totale è stata separata elettroforeticamente in SDS-PAGE e quindi trasferita su una membrana Hybond-P (Amersham Pharmacia, Buckinghamshire, UK) per il western blotting. La membrana è stata poi

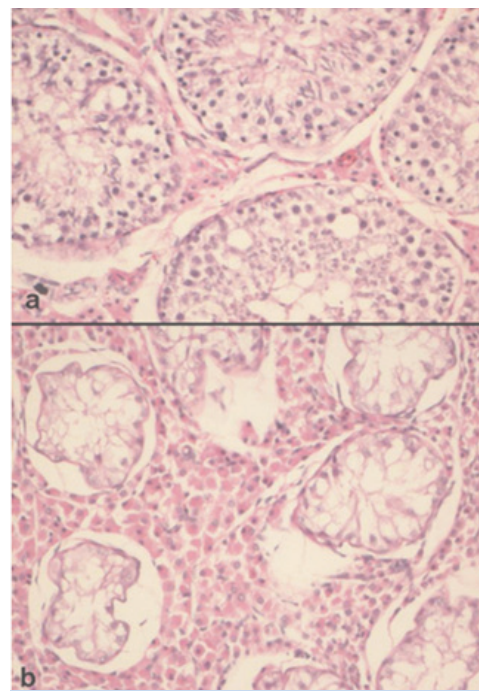


Foto 1. a. Istologia del testicolo normale: tubuli seminiferi contenenti l'intera linea seminale e poche cellule interstiziali di Leydig. b. Testicolo criptorchide: tubuli seminiferi atrofici e ridotti di numero contenenti spermatogoni in via di degenerazione disposti in sede basale tra le cellule del Sertoli. Le cellule interstiziali di Leydig appaiono abbondanti e ipertrofiche. H&E, 200x.

incubata con lo stesso anticorpo anti-OPN utilizzato per l'immunohistochimica (quest'anticorpo riconosce la proteina completa di 66 kDa, nonché il suo frammento C-terminale di 32 kDa, che si libera in seguito all'attività di metalloproteasi). L'anticorpo legato è stato visualizzato con la tecnica ECL (ECLPlus Western Blotting Reagents di Rivelazione, Amersham Pharmacia), e le bande sono state quantificate mediante analisi densitometrica con un sistema VersaDoc 1000 Imaging (Bio-Rad Laboratories) utilizzando il software Quantity One (Bio-Rad Laboratories). Come controllo interno, la membrana è stata poi incubata con un anticorpo anti-β-actina (AC-15, Sigma), e analizzata con il sistema di imaging citato precedentemente. L'intensità delle bande relative all'OPN è stata normalizzata sull'intensità di quelle relative alla β-actina. L'analisi statistica, condotta con il test Shapiro-Wilk, ha dimostrato che i risultati densitometrici non avevano una distribuzione normale (dati non riportati) e quindi è stato eseguito il test non parametrico di Mann-Whitney, per stabilire se i livelli di espressione dell'OPN (bande a 66 kDa e 32 kDa) differivano significativamente tra controlli e criptorchidi. Inoltre il test di Wilco-

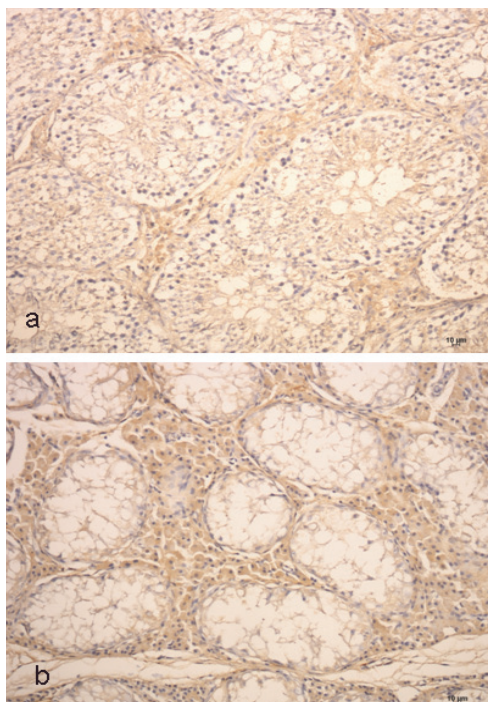


Foto 2. Indagine immunohistochemica volta a valutare l'espressione dell'osteopontina in testicoli sani (a) e criptorchidi (b) di suino. (a) Nel testicolo sano è evidente una immunoreattività multifocale in alcune cellule interstiziali di Leydig e in alcuni tubuli seminiferi, in particolare in spermatozoi, spermatogoni e acrosomi di spermatidi e in alcune cellule del Sertoli. (b) Nel tessuto criptorchide l'immunoreattività è distribuita uniformemente a carico delle cellule interstiziali del Leydig; qualche positività anticorpale si rileva nei tubuli seminiferi a carico degli spermatozoi. 200x.

non è stato utilizzato per stabilire se i livelli di espressione delle due bande di 66 kDa e 32 kDa differivano in modo significativo all'interno dei gruppi di controllo e dei criptorchidi. Un valore di $P < 0,05$ è stato considerato statisticamente significativo, mentre $P < 0,01$ è stato considerato altamente significativo. I dati sono stati visualizzati graficamente utilizzando un box plot.

Risultati

Sezioni di testicoli sani, colorate con ematossilina-eosina, hanno mostrato numerose cellule interstiziali di Leydig e tubuli seminiferi contenenti spermatozoi, spermatociti, cellule del Sertoli, spermatidi e spermatozoi (foto 1a). I testicoli criptorchidi hanno mostrato una riduzione del numero dei tubuli seminiferi, contenenti cellule del Sertoli e alcuni spermatozoi; nel tessuto interstiziale sono state osservate numerose cellule di Leydig ipertrofiche (foto 1b). I campioni fissati in formalina e analizzati mediante immunohistochemica per valutare

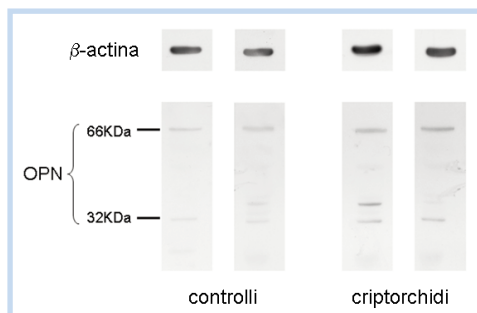


Foto 3. Immagine rappresentativa del Western blotting che evidenzia le bande di 32 kDa e 66 kDa dell'OPN, e i relativi controlli contro la β -actina, nei testicoli sani e criptorchidi di suino.

la localizzazione cellulare dell'OPN, hanno evidenziato nei testicoli sani una diffusa e moderata immunoreattività per l'OPN nelle cellule (foto 2a).

Nei testicoli criptorchidi l'immunoreattività si è osservata diffusamente distribuita nelle cellule interstiziali di Leydig, mentre nessuna immunopositività è stata rilevata nei tubuli seminiferi (foto 2b). L'analisi biochimica eseguita con il Western blotting ha rivelato la presenza dell'OPN nei testicoli sani e criptorchidi, sia come proteina integra (66 kDa) che come frammento C-terminale (32 kDa). È stato interessante notare però che l'espressione della banda di 66 kDa appariva invariata tra i testicoli di controllo e i testicoli criptorchidi, mentre la banda di 32 kDa risultava maggiormente espressa nei tessuti criptorchidi (foto 3). L'analisi densitometrica delle bande specifiche ha confermato per la banda di 66 kDa un livello di espressione identico sia nei campioni sani che patologici ($U = 52$, $p = 0,49$), e per quella di 32 kDa un aumento significativo dell'espressione nei criptorchidi rispetto ai controlli ($U = 31$, $p = 0,04$). Inoltre, confrontando i campioni all'interno di ciascuno dei due gruppi, i livelli di espressione relativi alle bande di 66 kDa e 32 kDa non risultavano significativamente differenti (controllo: $Z = -1,24$, $p = 0,21$; criptorchidi: $Z = -1,66$, $p = 0,10$) (figura 1).

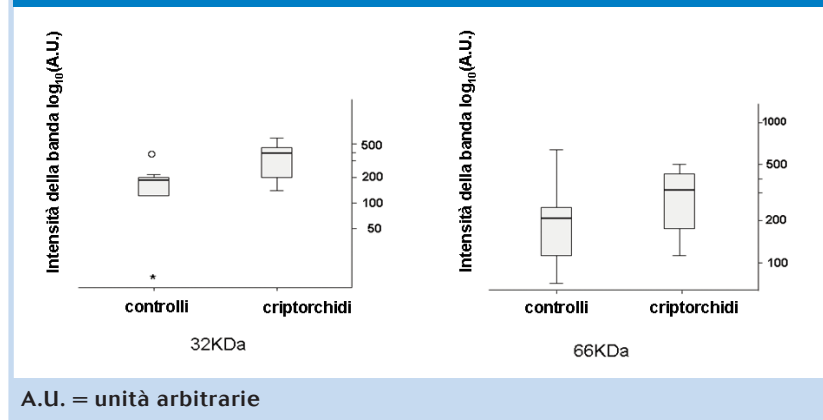
Discussione

In medicina veterinaria numerosi studi hanno dimostrato l'espressione dell'OPN nel sistema riproduttivo maschile di toro, topo e ratto, con qualche differenza per quanto riguarda la sua specifica localizzazione [4, 8, 9, 13, 15, 24]. In particolare Kim e Shin [9] hanno riportato la presenza dell'OPN in testicoli di suini neonati e adulti. Nei testicoli di animali adulti questi autori hanno di-



Formazione

FIGURA 1. Box plot dell'espressione delle bande di 32KDa e 66KDa dell'OPN nei gruppi di testicoli sani e criptorchidi di suino. I risultati sono espressi come \log_{10} dell'intensità delle bande



mostrato un'immunoreattività cellulare variabile tra i diversi tubuli seminiferi, e non tutti i tubuli risultavano positivi; inoltre alcune cellule di Leydig apparivano debolmente reattive a seguito dell'esame immunostochimico. L'analisi mediante Western blotting di testicoli adulti effettuata dagli stessi autori rivelava la proteina sia integra (66 kDa) che frammentata (32 kDa), e l'immunoreattività dell'OPN nel testicolo adulto era più intensa di quella osservata nei testicoli postnatali. In relazione a questi risultati Kim e Shin [9] hanno suggerito che l'OPN possa avere un ruolo nell'adesione cellulare alla membrana basale e alle adiacen-

ti cellule del Sertoli, ipotizzando che la stessa proteina possa anche essere utile per lo sviluppo delle cellule germinali. In questo lavoro è stata rilevata un'immunopositività all'OPN localizzata e irregolare negli spermatogoni dei testicoli sani, mentre una diffusa reattività alla proteina è stata osservata nelle cellule di Leydig dei testicoli sia sani che criptorchidi. Inoltre l'analisi mediante Western blotting e i risultati densitometrici hanno rivelato la presenza della proteina nei testicoli normali e criptorchidi, sia per quanto riguarda la banda a peso molecolare di 66 kDa, sia per il suo frammento proteolitico di 32 kDa, ma quest'ultimo è risultato più espresso nel tessuto criptorchide. Poco si conosce sulla presenza della proteina nelle cellule di Leydig ma, come riportato da Kim e Shin [9], potrebbe essere possibile che essa giochi un ruolo nella segnalazione o nell'adesione cellulare. Secondo gli autori, un aumento dell'espressione del frammento proteolitico di 32 kDa osservato nei testicoli criptorchidi di suino potrebbe essere la conseguenza dello stress subito dal testicolo ritenuto nell'addome, ma questo fatto potrebbe anche indicare altri ruoli svolti dall'OPN in questo contesto, forse anche in correlazione con la trasformazione neoplastica di questi organi, osservata in umana, ma non ancora dimostrata nel suino. Alla luce di questi risultati gli autori ritengono interessante approfondire gli studi su questa proteina nei testicoli criptorchidi, per una migliore comprensione del suo ruolo in questa importante patologia congenita. ■



La bibliografia completa è disponibile sul sito: www.pointvet.it

Per saperne di più

1-Agnihotri R, Crawford HC, Haro H, Matrisian LM, Havrda MC, Liaw L. Osteopontin, a novel substrate for matrix metalloproteinase-3 (stromelysin-1) and matrix metalloproteinase-7 (matrilysin). *J Biol Chem.* 2001; vol. 276: pp. 28261-28267.
 2-Boisen KA, Kaleva M, Main KM, Virtanen HE, Haavisto AM, Schmidt IM, Chellakooty M, Damgaard IN, Mau C, Reunanen M, Skakkebaek NE, Toppari J. Difference in prevalence of congenital cryptorchidism in infants between two Nordic countries. *Lancet.* 2004; vol. 363: pp. 1264-1269.
 3-Brown LF, Berse B, Van de Water L, Papadopoulos-Sergiou A, Perruzzi CA, Manseau EJ, Dvorak HF, Senger DR. Expression and distribution of osteopontin in human tissues: widespread association with luminal epithelial surfaces. *Mol Biol Cell.* 1992; vol. 3: pp. 1169-1180.
 4-Cancel AM, Chapman DA, Killian GJ. Osteopontin localization in the Holstein bull reproductive tract. *Biol Reprod.* 1999; vol. 60: pp. 454-460.
 5-Denhardt DT, Giachelli CM, Rittling SR. Role of osteopontin in cellular signaling and toxicant injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2001a; vol. 41: pp. 723-749.
 6-Denhardt DT, Noda M, O'Regan AW, Pavlin D, Berman JS. Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. *J Clin Invest.*

2001b; vol. 107: pp. 1055-1061.
 7-El-Tanani MK. Role of osteopontin in cellular signaling and metastatic phenotype. *Front Biosci.* 2008; vol. 13: pp. 4276-4284.
 8-Erikson DW, Way AL, Chapman DA, Killian GJ. Detection of osteopontin on Holstein bull spermatozoa, in cauda epididymal fluid and testis homogenates, and its potential role in bovine fertilization. *Reproduction.* 2007; vol. 133: pp. 909-917.
 9-Kim S, Shin T. Immunohistochemical study of osteopontin in boar testis. *J Vet Sci.* 2007; vol. 8: pp. 107-110.
 10-Luedtke CC, McKee MD, Cyr DG, Gregory M, Kaartinen MT, Mui J, Hermo L. Osteopontin expression and regulation in the testis, efferent ducts, and epididymis of rats during postnatal development through to adulthood. *Biol Reprod.* 2002; vol. 66: pp. 1437-1448.
 11-Ramaiah SK, Rittling S. Pathophysiological role of osteopontin in hepatic inflammation, toxicity, and cancer. *Toxicol Sci.* 2008; vol. 103: pp. 4-13.
 12-Rangaswami H, Bulbule A, Kundu GC. Osteopontin: role in cell signaling and cancer progression. *Trends Cell Biol.* 2006; vol. 16: pp. 79-87.
 13-Rodríguez CM, Day JR, Killian GJ. Osteopontin gene expression in the Holstein bull reproductive tract. *J Androl.* 2000; 21: 414-420.

14-Senger DR, Wirth D F, Hynes RO. Transformed mammalian cells secrete specific proteins and phosphoproteins. *Cell.* 1979; vol. 16: pp. 885-893.
 15-Siiteri JE, Ensrud KM, Moore A, Hamilton DW. Identification of osteopontin (OPN) mRNA and protein in the rat testis and epididymis, and on sperm. *Mol Reprod Dev.* 1995; vol. 40: pp. 16-28.
 16-Takafuji V, Forgues M, Unsworth E, Goldsmith P, Wang XW. An osteopontin fragment is essential for tumor cell invasion in hepatocellular carcinoma. *Oncogene.* 2007; vol. 26: pp. 6361-6371.
 17-Virtanen HE, Bjerknes R, Cortes D, Jørgensen N, Rajpert-De Meyts E, Thorsson AV, Thorup J, Main KM. Cryptorchidism: classification, prevalence and long-term consequences. *Acta Paediatr.* 2007a; vol. 96: pp. 611-616.
 18-Virtanen HE, Cortes D, Rajpert-De Meyts E, Ritzen EM, Nordenskjöld A, Skakkebaek NE, Toppari J. Development and descent of the testis in relation to cryptorchidism. *Acta Paediatr.* 2007b; vol. 96: pp. 622-627.
 19-Virtanen HE, Toppari J. Epidemiology and pathogenesis of cryptorchidism. *Hum Reprod Update.* 2008; vol. 14: pp. 49-58.
 20-Wai PY, Kuo PC. Osteopontin: regulation in tumour metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 2008; vol. 27: pp. 103-118.