

Presencia de osteopontina en la leche de tapir (*Tapirus terrestris*, Perissodactyla, Tapiridae)

Pérez, M. Eugenia¹; Marcela Hernández de Sánchez¹;
Raúl Zalazar³; Francisco M. Fernández²

¹ Fundación Miguel Lillo, Miguel Lillo 251. maeuge75@hotmail.com

² Facultad de Ciencias Naturales e Instituto Miguel Lillo.

³ Bioparque Temaikén.

► **Resumen** — La osteopontina (OPN) se halla en el organismo de todos los vertebrados donde se la ha investigado. Asimismo ha sido encontrada en la leche de varias especies de mamíferos domesticados y de laboratorio. En el presente trabajo se exponen resultados sobre su presencia en leche de tapir. En esta especie silvestre se expresa en forma de dos bandas electroforéticas de 58 y 75 kDa, seguramente monómeros, y una tercera polimérica, de MM (masa molecular) mayor a 200 kDa. La OPN se encuentra en mayor concentración relativa en el lactosuero (68%) que unida a las micelas de caseína (32%). En este último compartimiento, solamente se presentan las isoformas de 58 y 75 kDa.

Palabras clave: Osteopontina; lactación; tapir; mamíferos silvestres; lactoproteínas.

► **Abstract** — “Presence of osteopontin in Tapir milk (*Tapirus terrestris*: Perissodactyla, Tapiridae)”. Osteopontin (OPN) was found in all the vertebrate species where it was investigated. This protein has been found in milk of various domesticated and laboratory mammal species. In this study, we present the results of its occurrence in tapir milk. In this wild specie, OPN is expressed as two electrophoretic bands of 58 and 75 kDa, which very probably represent monomers, and a third polymeric band with a MW higher than 200 kDa. OPN was observed in greater concentration in lactoserum (68%) than in casein micelles (32%). In this latter compartment, only the two monomeric forms are present.

Keywords: Osteopontin; lactation; tapir; wild mammals; milk proteins.

INTRODUCCIÓN

En casi todos los mamíferos estudiados hasta el presente las principales proteínas lácteas corresponden a un grupo conspicuo en el que se destacan: las caseínas, la seroalbúmina, la α -lactalbúmina, las inmunoglobulinas, la lactoferrina (o la transferrina). A ellas hay que agregar la β -lactoglobulina y la proteína ácida del suero (WAP) cuya presencia depende de la especie que se trate. Se desprende de ello que esta notable ubicuidad depende seguramente de la gran importancia funcional de tales proteínas. La expresión de otras proteínas específicas y su función en la leche de los mamíferos es un tema poco tratado desde el punto de vista comparativo. Aunque la osteopontina (OPN) es una proteína que seguramente existe en el

organismo de todos los vertebrados, las especies en que se la ha convalidado entre los mamíferos según las exigencias de las bases de datos (UniProt, 2010) incluye a *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Mesocricetus auratus*, *Oryctolagus cuniculus*, *Canis familiares*, *Capra hircus*, *Bos taurus*, *Ovis aries*, *Bubalus bubalis*, *Bos gaurus frontalis* y *Sus scrofa*.

La OPN es una fosfoproteína altamente fosforilada y medianamente glicosilada (Sørensen *et al.* 1995; Sørensen *et al.* 2003) que se expresa en varios tejidos y órganos (huesos, riñón, sistema inmune, glándula mamaria), y cuya función está siendo estudiada activamente. Su estructura incluye dos aspectos importantes. Presenta dos isoformas, de diferente masa molecular, producidas por un tipo de traducción alternativa (Shinohara *et al.*, 2008). Además se ha comprobado la existencia de una forma po-

limérica de la OPN (Kaartinen *et al.*, 1999; Higashikawa *et al.*, 2007) que sería exclusivamente extracelular. Existe un solo gen en el genoma de los animales hasta ahora estudiados y la masa molecular media de la proteína OPN de once especies de mamíferos, de acuerdo a la región codificante del gen es $32,65 \pm 1,95$ kDa.

Se sabe que interviene en numerosos procesos fisiológicos, los cuales pueden agruparse en: aquellos relacionados con la adhesión e interacciones celulares, y los que cumplen funciones de señalización intracelular. Su función en la secreción láctea no ha sido dilucidada.

El Objetivo del presente trabajo consistió en investigar la presencia de osteopontina en la leche de tapir, su masa molecular aparente a partir de su comportamiento electroforético, y su distribución en los principales compartimentos lácteos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron muestras de leche de tapir correspondientes a un ejemplar perteneciente al Bioparque Temaikén. El lactosuero (LS) y las micelas de caseínas (Cn) se separaron mediante precipitación ácida a pH 4,3 y centrifugación. Se hicieron electroforesis en gels de poliacrilamida en presencia de dodecil-sulfato de sodio (PAGE-SDS) en condiciones reductoras (Harris y Angal, 1989). Para la detección de la OPN se utilizaron anticuerpos de conejo anti-osteopontina humana (Sigma, USA) que demostraron que pueden reconocer la OPN bovina (Azuma *et al.*, 2006; Higashikawa *et al.*, 2007), y a partir de ello muy probablemente la de otros ungulados. Con las muestras de LS y de Cn, se hicieron inmunodots y luego western-blottings previa separación de las proteínas por PAGE-SDS en medio reductor (Puyol de León, 1994). La transferencia hacia la placa de nitrocelulosa se hizo por capilaridad (Gabriel y Gersten, 1998). Como segundo anticuerpo se utilizó anti-IgG de conejo marcado con peroxidasa. Las proteínas se determinaron según Lowry *et al.*, (1955). La determinación del porcentaje relativo de la concen-

tración de OPN en los distintos compartimentos lácteos se realizó mediante análisis densitométrico de las imágenes, utilizando el software QuantiScan (Biosoft, USA).

RESULTADOS

Los resultados demostraron que en la secreción láctea de tapir se encuentran tres bandas de proteínas que reaccionan con los anticuerpos específicos mencionados. En la Fig. 1 se muestra el western-blotting de las bandas de OPN. Los valores de la masa molecular calculados para dos de estas bandas corresponden a unos 58 y 75 kDa aproximadamente, y la tercera posee una masa molecular superior a 200 kDa. En el lactosuero se encuentran las tres bandas mencionadas, mientras que asociadas a las caseínas solamente se observan las correspondientes a 58 y 75 kDa. En la Fig. 2 se muestra el perfil electroforético del lactosuero de tapir determinado por densitometría al que se le han superpuesto las bandas de OPN detectadas por western-blotting. Además se observó, a partir de la determinación densitométrica de

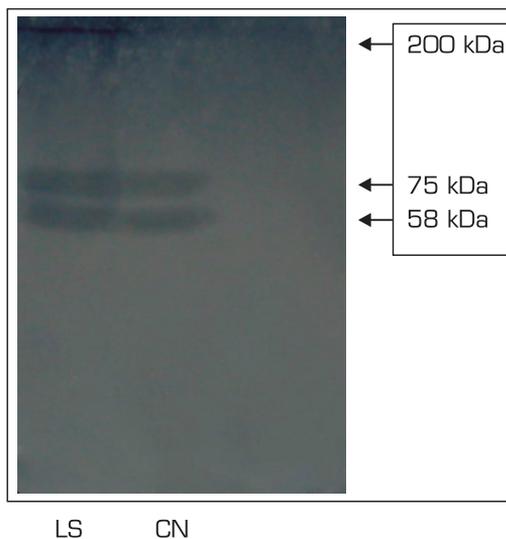


Figura 1. Western-blotting de lactosuero (Ls) y de micelas de caseínas (Cns) de leche de tapir. Las flechas señalan las bandas que reaccionan con el anticuerpo anti-OPN. En la calle correspondiente a LS, se evidencian tres bandas. LS: lactosuero. Cn: caseínas.

los inmunodots (imagen no mostrada) que la osteopontina en la leche de tapir se encuentra en mayor concentración en el lactosuero (68 %) que asociado a las micelas de caseínas (32 %).

DISCUSIÓN

Es evidente que no se han generado hasta el momento hipótesis fuertes acerca de las funciones que la OPN lleva a cabo en la leche. Tampoco hay información sobre la ocurrencia de esta proteína en los animales silvestres. De hecho la información existente sobre OPN está centrada en las investigaciones existentes en la especie humana, los roedores de laboratorio, el ganado bovino, conejo, y cerdo.

Existe una gran cantidad de trabajos, (citados por Sodek *et al.*, 2000 y Denhardt *et al.*, 2001) que describen aspectos fisiológicos importantes enfocados desde el papel que desempeña la OPN en el organismo: inhibición del crecimiento/agregación de cristales de

oxalato de calcio y por ende inhibición de la formación de cálculos renales; regulación de algunos procesos de la respuesta inmune; co-fectora en la vascularización y regeneración celular, a través de interacciones con células endoteliales y mononucleares; unión a receptores de membrana, y a las integrinas (sus ligantes por excelencia); funciones celulares de migración, fusión, movilidad; importancia de la OPN como factor de pronóstico del desarrollo de crecimientos tumorales; regulación de la expresión del IFN γ y del IFN α en varias de las funciones anteriores.

Trabajos recientes demostrarían que las actividades extracelulares y las intracelulares estarían a cargo de dos isoformas (de diferente MM) de la proteína producidas por un tipo de traducción alternativa (Shinohara *et al.*, 2008). Otro aspecto importante es la existencia de una forma polimérica de la OPN (Kaartinen *et al.*, 1999; Higashikawa *et al.*, 2007) a la cual se le ha atribuido funciones en las interacciones intercelulares. El papel desempeñado en los procesos de bio-

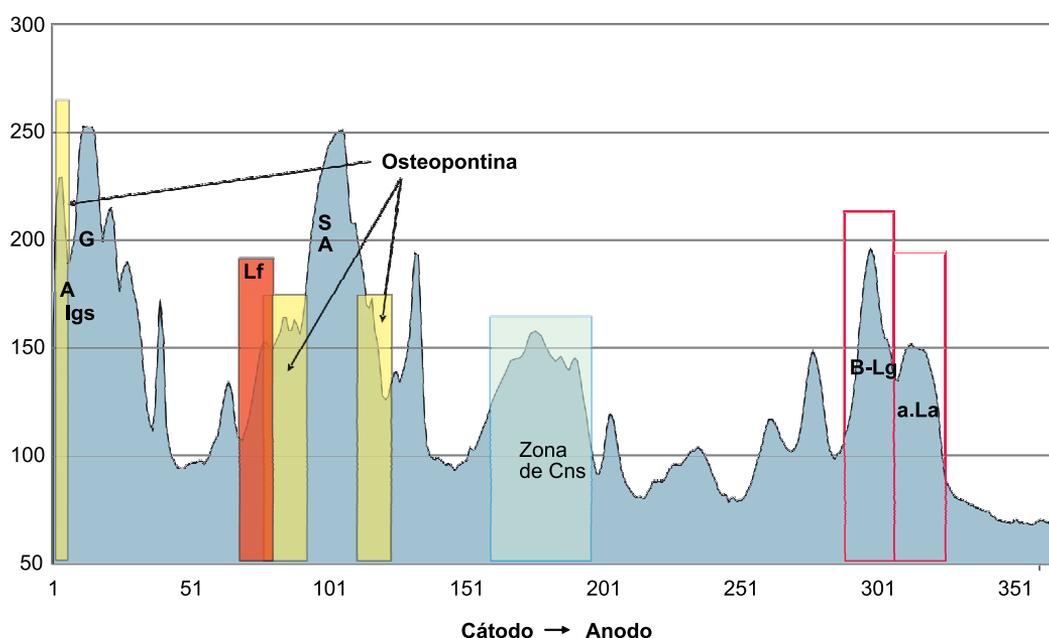


Figura 2. Perfil densitométrico de lactosuero de tapir. Los valores de la abscisa indican el desplazamiento real de las bandas en el gel en unidades arbitrarias, no corresponden a las masas moleculares. Los valores de la ordenada son indicativos de la intensidad de las bandas electroforéticas. Lo escrito sobre las bandas indica la posición de las proteínas mayores del lactosuero.

mineralización asociados con el calcio parece ser un tema abierto (Tawada *et al.*, 1999; Goldsmith *et al.*, 2002; Ito *et al.*, 2004; Gerike *et al.*, 2005). En lo correspondiente a la función de la proteína en la leche, ha sido mencionado como una posibilidad (Sørensen *et al.*, 1995) que actúe como solubilizante de los cristales de fosfato de calcio que se encuentran integrando las micelas de caseína. Lo mismo se ha postulado en la inhibición de la formación de cálculos en riñón y vías urinarias, lo que ha recibido apoyo experimental (Razzouk *et al.*, 2002; Hunter *et al.*, 2009; Langdon *et al.*, 2009).

Según las bases de datos (UniProt, 2010) existe un solo gen de OPN en el genoma de los mamíferos hasta ahora estudiados y la masa molecular de la proteína posee un valor de entre 33 y 35 kDa, según la especie. Este valor se basa en la secuencia y tamaño de la región codificante del gen correspondiente, o en la síntesis *in vitro* de la proteína a partir del cDNA, obviamente sin las modificaciones postraduccionales.

Hace más de veinte años, Azuma y Yamauchi (1987) observaron la asociación de la OPN con la fracción de caseínas. Sin embargo, sobre este interesante aspecto, no parece haber publicaciones posteriores.

En el presente trabajo, se ha demostrado que la OPN está presente en la leche de tapir, distribuida entre el lactosuero (68 %) y las micelas de caseínas (32 %). Ello es diferente a lo que sucede en la leche materna (Hernández de Sánchez y Fernández, en preparación) donde la mayor fracción se asocia con las micelas de caseínas. La situación no puede atribuirse a la abundancia relativa de los tipos de proteínas pues el número de caseína es mayor en el tapir respecto a la especie humana.

El hallazgo de dos bandas monoméricas principales de OPN (58 y 75 kDa) en la leche de tapir puede interpretarse de distintas formas. En el trabajo sobre aislamiento de OPN de leche bovina, Azuma *et al.*, (2006) incluyen fotografías de los western-blottings (Fig. 2 de su publicación) donde se ven claramente dos bandas notorias (que también aparecen en su Fig. 3) y otras menores de

OPN en leche de vaca. Esta heterogeneidad que los autores atribuyen a modificaciones diferentes postraduccionales, también podrían ser atribuidas a un proceso de traducción alternativo (Shinohara *et al.*, 2008) que se conoció posteriormente. Lo mismo podríamos decir de nuestras observaciones. No obstante, consideramos que el gran problema subyacente a los estudios de PAGE-SDS sobre la OPN es el comportamiento anómalo de esta proteína que muestra en las corridas electroforéticas una masa aparente muy alta (60-70 kDa) en relación a la masa atribuible a la suma de los aminoácidos (33 kDa), hecho que puede observarse en todas las publicaciones sobre el tema y que dificulta el análisis de los resultados. Tratándose de monómeros de la OPN esta diferencia de masa no se explica por la masa agregada de fosfatos orgánicos y los glúcidos. La concentración de la OPN en la leche de las especies analizadas hasta el momento (20 a 140 mg/L) alcanza una concentración casi mil veces superior a la que tiene en la sangre (10 a 100 $\mu\text{g/L}$), según publicaciones sobre el tema (Diao *et al.*, 2008; Shack *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009). Ello estaría demostrando que esta proteína debe tener una considerable importancia para la glándula mamaria y muy probablemente para la cría. Se ha comprobado que en ratones hembras en las que se ha inhibido la expresión de la OPN no pueden desarrollar adecuadamente la glándula mamaria y no sintetizan normalmente las proteínas lácteas (Nemir *et al.*, 2000).

Respecto a la banda de muy alto peso molecular que se evidencia en el western-blotting del LS, pero no de las Cn, consideramos que se trata de la forma polimérica de la OPN. Ello estaría demostrando que la forma polimérica tendría menor afinidad por las micelas de Cn que las monoméricas. Hasta donde pudimos establecer, no ha sido descrito este hecho con anterioridad. Los presentes resultados demuestran que la OPN en la leche de tapir y sus características, tienen una gran similitud con lo que se ha encontrado en la leche de animales domésticos y de laboratorio. Consideramos que a partir de los datos

existentes se puede suponer que la presencia de la OPN en leche debe constituir un hecho generalizado entre los mamíferos.

AGRADECIMIENTOS

A la Lic. Gabriela Silenzi por su colaboración. A la Lic. Paula González Ciccía por el apoyo brindado. A la Fundación Miguel Lillo por su respaldo y contribución.

Este trabajo se llevó a cabo mediante el subsidio 26G/ 415 del Consejo de Investigaciones de la Universidad Nacional de Tucumán.

BIBLIOGRAFÍA

- Azuma, N. y Yamauchi, K. 1987. A glyco-phosphoprotein in Human Milk. *Journal of Dairy Research*, 54: 199-205.
- Azuma, A., Maeta, A., Fukuchi, K. y Kanno, C. 2006. A rapid method for purifying osteopontin from bovine milk and interaction between osteopontin and other milk proteins. *International Dairy Journal*, 16: 370-378.
- Denhardt, D. T., Noda, M., O'Regan, A. W., Pavlin, D. y Berman, J. S. 2001. Osteopontin as a mean to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodelling, and cell survival. *The Journal of Clinical Investigation*, 107: 1055-1061.
- Diao, H., Iwabuchi, K., Li, L., Onoe, K., van-Kaer, L., Kon, S., Saito, Y., Morimoto, J., Denhardt, D. T., Rittling, S. y Uede, T. 2008. Osteopontin regulates development and function of invariant natural killer T cells. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 105: 15884-15889.
- Gabriel, O. y Gersten, D. M. 1998. Detection of enzymatic activity after polyacrylamide isoelectrofocusing. En: R. Eisenthal y M.J. Danson (eds.), *Enzymes Assays. A Practical approach*. IRL Press at Oxford University Press, pp 217-253.
- Goldsmith, H. L., Labrosse, J. M., McIntosh, F. A., Maenpaa, P. H., Kaartinen, M. T. y McKee, M. D. 2002. Homotypic interactions of soluble and immobilized osteopontin. *Annals of Biomedical Engineering*, 30: 840-850.
- Harris, E. L.V. y Angal, S. 1989. Protein purification methods. A practical approach. IRL at Oxford University Press, New York, 317 pp.
- Higashikawa, F., Eboshida, A. y Yokosaki, Y. 2007. Enhanced biological activity of polymeric osteopontin. *FEBS Letters*, 581: 2697-2701.
- Hunter, G. K., Grohe, B., Jeffrey, S., O'Young, J., Sørensen, E. S. y Goldberg, H. A. 2009. Role of phosphate groups in inhibition of calcium oxalate crystal growth by osteopontin. *Cells, Tissues, Organs*, 189: 44-50.
- Ito, S., Saito, T. y Amano, K. 2004. In vitro apatite induction by osteopontin: interfacial energy for hydroxyapatite nucleation on osteopontin. *Journal of Biomedical Materials Research A*, 69: 11-16.
- Kaartinen, M. T., Pirhonen, A., Linnala-Kankkunen, A. y Maenpaa, P. H. 1999. Cross-linking of osteopontin by tissue transglutaminase increases its collagen binding properties. *Journal of Biological Chemistry*, 274: 1729-1735.
- Langdon, A., Wignall, G. R., Rogers, K., Sørensen, E. S., Denstedt, J., Grohe, B., Goldberg, H. A. y Hunter, G. K. 2009. Kinetics of calcium oxalate crystal growth in the presence of osteopontin isoforms: an analysis by scanning confocal interference microscopy. *Calcified Tissue International*, 84: 240-248.
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J. 1955. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-275.
- Nemir, M., Bhattacharyya, D., Li, X., Singh, K., Mukherjee, A. B. y Mukherjee, B. B. 2000. Targeted inhibition of osteopontin expression in the mammary gland causes abnormal morphogenesis and lactation deficiency. *Journal of Biological Chemistry*, 275: 969-976.
- Puyol de León, P. 1994. Estudio de la interacción del retinol y ácidos grasos con la beta-lactoglobulina bovina. Efectos sobre sus propiedades físico-químicas y biológicas. Tesis Doctoral, Universidad de Zaragoza, Facultad de Veterinaria, España, 172 pp.
- Razzouk, S., Brunn, J. C., Qin, C., Tye, C. E., Goldberg, H. A. y Butler, W. T. 2002. Osteopontin posttranslational modifications, possibly phosphorylation, are required for *in vitro* bone resorption but not osteoclast adhesion. *Bone*, 30: 40-47.
- Shack, L., Lange, A., Kelsen, J., Agnholt, J., Christensen, B., Petersen, T. E. y Sørensen, E. S. 2009. Considerable variation in the concentration of osteopontin in human milk, bovine milk, and infant formulas. *Journal of Dairy Science*, 92: 5378-5385.
- Shinohara, M. L., Kim, H.-J., Kim, J.-H., García, V. A. y Cantor, H. 2008. Alternative translation of osteopontin generates intracellular and secreted isoforms that mediate distinct biological activities in dendritic cells. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 105: 7235-7239.
- Sodek, J. B., Ganz, B. y McKee, M. D. 2000. Osteopontin. *Critical Reviews on Oral Biology and Medicine*, 11: 279-303.
- Sørensen, E. S., Højrup, P. y Petersen, T. E. 1995. Posttranslational modifications of bovine osteopontin: identification of twenty-eight phosphorylation and three O-glycosylation sites. *Protein Science*, 4: 2040-2049.

- Sørensen, S., Justesen, S. J. y Johnsen, A. H. 2003. Purification and characterization of osteopontin from human milk. *Protein Expression and Purification*, 30: 238-245.
- Tawada, T., Fujita, K., Sakakura, T., Shibutani, T., Nagata, T., Iguchi, M. y Kohri, K. 1999. Distribution of osteopontin and calprotectin as matrix protein in calcium-containing stone. *Urological Research*, 27: 238-242.
- Wang, K. X. , Shi, Y. F., Ron, Y., Kazanecki, C. C. y Denhardt, D. T. 2009. Plasma osteopontin modulates chronic restraint stress-induced thymus atrophy by regulating stress hormones: inhibition by an anti-osteopontin monoclonal antibody. *The Journal of Immunology*, 182: 2485-2491.