



UNIVERSITÁ DEGLI STUDI DI MILANO
FACOLTÁ DI MEDICINA E CHIRURGIA

DOTTORATO DI RICERCA IN FISIOLOGIA

SETTORE SCIENTIFICO DISCIPLINARE BIO-09

CICLO XXIII

Tesi di Dottorato di Ricerca

COTRASPORTATORE Na^+ -GLUCOSIO NEL MESOTELIO
PLEURICO E NELL'EPITELIO ALVEOLARE POLMONARE:
ESPRESSIONE E CENNI DI REGOLAZIONE BETA
ADRENERGICA

Dottorando: Dott. Marta Armilli

Matricola: R07668

Tutor: Prof. Luciano Zocchi
Dipartimento di Fisiologia Umana

Coordinatore: Prof. Paolo Cavallari

Anno Accademico 2009-2010

INDICE

<i>Riassunto</i>	pag.I
<i>1. Introduzione</i>	pag.1
1.1 Anatomia funzionale della pleura	pag.1
1.1.1 Mesotelio	pag.2
1.1.2 Tessuto connettivo	pag.6
1.1.3 Vasi sanguigni	pag. 7
1.1.4 Vasi linfatici	pag. 7
1.2 Liquido pleurico	pag. 9
1.2.1 Produzione e riassorbimento del liquido pleurico in condizioni fisiologiche	pag. 10
1.2.2 Accoppiamento meccanico tra parete toracica e polmone	pag.15
1.3 Polmoni	pag. 18
1.3.1 Vasi sanguigni	pag.20
1.3.2 Vasi linfatici	pag. 21
1.3.3 Tessuto connettivo	pag. 22
1.3.4 Struttura della parete alveolare	pag. 22
1.3.5 Epitelio alveolare	pag. 23
1.3.6 Liquido alveolare	pag. 25
1.3.7 Scambio dei gas respiratori attraverso l'epitelio alveolare	pag. 27
1.3.8 Ruolo delle cellule epiteliali alveolari nel trasporto di soluti e acqua	pag. 30
1.3.9 Regolazione del trasporto di soluti nell'epitelio alveolare	pag. 33
1.4 Cotrasporto Na ⁺ -glucosio	pag. 35
1.4.1 Famiglia genica SLC5	pag. 35
1.4.2 SGLT1	pag. 38
1.4.3 Regolazione del cotrasporto Na ⁺ -glucosio	pag. 42
1.4.4 Patologie correlate a mutazioni di SGLT1	pag. 43
1.4.5 Ruolo fisiologico del cotrasporto Na ⁺ -glucosio	pag. 44
1.5 Il recettore β-adrenergico (βAR)	pag. 47

1.5.1 Struttura	pag. 47
1.5.2 Funzione	pag. 48
1.5.3 Ruolo dei recettori beta adrenergici nell'epitelio alveolare	pag. 49
1.6 Endocitosi e trafficking intracellulare	pag. 51
1.6.1 Endocitosi	pag. 51
1.6.2 Sorting delle proteine endocitate	pag. 53
1.7 Obiettivi della ricerca	pag. 55
1.7.1 SGLT1 nel mesotelio pleurico	pag. 55
1.7.2 SGLT1 nell'epitelio alveolare polmonare	pag. 56
1.7.3 Regolazione beta adrenergica di SGLT1	pag. 56
<i>2. Materiali e metodi</i>	pag. 58
2.1 Colture cellulari	pag. 58
2.1.1 Cellule alveolari di ratto	pag. 58
2.1.2 Cellule alveolari umane (linea A549)	pag. 59
2.2 Western blot	pag. 60
2.2.1 Prelievo dei campioni tissutali	pag. 60
2.2.2 Estrazione delle proteine totali	pag. 61
2.2.3 SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)	pag. 61
2.2.4 Trasferimento	pag. 63
2.2.5 Blocco	pag. 64
2.2.6 Incubazione con anticorpi	pag. 64
2.2.7 Sviluppo	pag. 65
2.3 Immunofluorescenza	pag. 65
2.3.1 Preparazione dei campioni	pag. 65
2.3.2 Incubazione con gli anticorpi	pag. 68
2.3.3 Visualizzazione del segnale	pag. 69
2.3.4 Analisi densitometrica e statistica	pag. 69
<i>3. Risultati</i>	pag. 71
3.1 Espressione di SGLT1 nel mesotelio pleurico di specie a pleura viscerale spessa	pag. 71
3.1.1 Western blot su mesotelio paritale e viscerale di pecora	pag. 71
3.1.2 Western blot su linee cellulari di mesotelio umano	pag. 72
3.1.3 Immunolocalizzazione di SGLT1 su mesotelio	

pleurico di pecora	pag. 73
3.2 Immunolocalizzazione di SGLT1 nell'epitelio alveolare	pag. 75
3.2.1 Sezioni di parenchima polmonare di pecora	pag. 77
3.2.2 Sezioni di parenchima polmonare di ratto	pag. 79
3.2.3 SGLT1 e cellule alveolari di secondo tipo	pag. 81
3.2.4 SGLT1 e cellule alveolari di primo tipo	pag. 82
3.2.5 SGLT1 e cellule endoteliali	pag. 84
3.3 Regolazione beta adrenergica di SGLT1 in cellule A549	pag. 86
3.3.1 Immunolocalizzazione dopo trattamento con isoproterenolo	pag. 86
3.3.2 Doppia marcatura SGLT1 e Rab11A	pag. 89
<i>4. Discussione</i>	pag. 92
4.1 Espressione di SGLT1 nel mesotelio pleurico	pag. 92
4.2 Espressione di SGLT1 nell'epitelio alveolare polmonare	pag. 95
4.3 Regolazione β -adrenergica di SGLT1 in cellule alveolari	pag. 98
<i>5. Bibliografia</i>	pag. 102

RIASSUNTO

SGLT1 (SLC5A1) è un cotrasportatore Na^+ -glucosio appartenente alla famiglia SLC5, espresso in numerosi epitelii assorbenti. Da un punto di vista funzionale, è in grado di mediare un cotrasporto di sodio e glucosio all'interno della cellula, sfruttando il gradiente di sodio per trasportare glucosio anche contro gradiente. In passato, esperimenti funzionali hanno suggerito la presenza del cotrasporto Na^+ -glucosio a livello del mesotelio pleurico e dell'epitelio alveolare del polmone.

Studi funzionali condotti *in vivo* (Zocchi *et al.*, 1991; Agostoni e Zocchi, 1993) avevano suggerito che una parte del riassorbimento netto di liquido dal cavo pleurico fosse accoppiata ad un trasferimento di soluti, mediato dalle cellule del mesotelio. Poiché tale fenomeno è parzialmente sensibile all'inibitore specifico di SGLT1 (florizina), si era ritenuto che almeno una frazione di tale trasferimento di liquido fosse conseguente ad un assorbimento di glucosio attraverso la pleura, probabilmente mediato da un cotrasporto Na^+ -glucosio. Studi molecolari (Sironi *et al.*, 2007) avevano successivamente confermato l'espressione di SGLT1 nella pleura di coniglio, animale a pleura viscerale sottile. Questa via di assorbimento di liquido si aggiunge a quelle già conosciute nel delineare un modello dei meccanismi coinvolti nel turnover di liquido pleurico, riconosciuto valido per gli animali a pleura viscerale sottile. Nei mammiferi di maggiori dimensioni (compreso l'uomo), la pleura viscerale è spessa e ha caratteristiche morfologiche e modalità di perfusione tali per cui la validità del modello in queste specie animali è stata messa in discussione. D'altra parte, la dimostrazione della presenza di un trasporto di soluti anche nella pleura di questi animali confermerebbe la validità del modello anche in queste specie. Per verificare la presenza della proteina trasportatrice nel mesotelio pleurico di animali a pleura spessa, sono stati messi a punto saggi di immunoblot e di immunofluorescenza su mesotelio parietale e viscerale di agnello e pecora adulta, oltre che in cellule appartenenti ad una linea di mesotelio pleurico umano. I risultati ottenuti indicano che SGLT1 è presente in tutti i citotipi indagati.

A livello dell'alveolo polmonare, studi fenomenologici volti ad indagare i meccanismi di trasporto coinvolti nel riassorbimento di liquido attraverso l'epitelio avevano dimostrato l'esistenza di un trasporto di glucosio florizina-sensibile riconducibile alla presenza, nelle cellule che costituiscono questo epitelio, del cotrasportatore Na^+ -glucosio SGLT1 (Basset *et al.*, 1987). Successivamente è stata a lungo indagata la

localizzazione di tale proteina a livello della membrana plasmatica dei diversi tipi di cellule alveolari; in particolare, secondo indagini condotte mediante autoradiografia su polmone di topo e coniglio, il carrier sarebbe presente solo nelle cellule alveolari di tipo II (*Boyd, 1990*) e non in quelle di tipo I, che rappresentano circa il 95 % della complessiva superficie alveolare (contro il 5 % circa di quelle del tipo II). In questa ricerca si è voluto verificare se la localizzazione di SGLT1 fosse estesa ad entrambe le tipologie di cellule alveolari o circoscritta alle sole cellule di tipo II. A tale proposito, sono stati condotti saggi d'immunofluorescenza per SGLT1 su sezioni di parenchima polmonare di agnello e di ratto, oltre che su cellule alveolari isolate da polmone di ratto. È stato così possibile osservare la presenza della proteina sia nelle cellule di tipo II sia in quelle di tipo I. La presenza del cotrasporto Na^+ -glucosio nelle cellule alveolari di primo tipo implica che esso abbia un ruolo di grande rilevanza nell'assorbimento di fluido alveolare attraverso l'epitelio, che si verifica al seguito di un trasporto vettoriale transepiteliale di Na^+ . La presenza di SGLT1 a livello della membrana apicale di queste cellule permetterebbe un maggiore assorbimento di Na^+ e di liquido.

Nell'ultima parte della ricerca è stato preso in considerazione un aspetto riguardante la regolazione beta adrenergica del cotrasportatore SGLT1. È noto che gli agonisti dei β_2 AR sono in grado di stimolare il riassorbimento di soluti ed acqua attraverso il mesotelio pleurico (*Zocchi e Agostoni, 1994*), l'epitelio tracheale (*Al-Bazzaz e Cheng, 1979*) e quello polmonare (*Saumon et al., 1987*), intervenendo così nel controllo omeostatico del volume e della composizione di liquido presente nel cavo pleurico, oltre che sulla superficie delle vie aeree e degli alveoli. A tutt'oggi non esistono invece prove di una regolazione β -adrenergica di SGLT1 a livello degli epiteli del sistema respiratorio in genere e dei polmoni in particolare. Per questo motivo si è deciso di indagare, mediante saggi di immunofluorescenza, se anche nelle cellule alveolari l'attivazione dei β_2 AR potesse avere effetti sull'espressione di SGLT1. Sono state utilizzate cellule alveolari umane appartenenti alla linea A549, sottoposte a trattamenti di diversa durata con l'agonista beta adrenergico isoproterenolo. L'analisi dell'intensità media della fluorescenza ha messo in evidenza come, dopo un'ora di stimolazione dei β -AR, si verifichi un aumento dell'espressione della proteina SGLT1; tale dato è in accordo con le informazioni presenti in letteratura, riguardanti la regolazione di SGLT1 in altri epiteli. Il risultato più sorprendente è stato però quello riguardante la variazione della localizzazione subcellulare di SGLT1; infatti, dopo 60 minuti di incubazione con il β -agonista la marcatura relativa a SGLT1 risulta concentrata in un punto della cellula. È

stata formulata un'ipotesi per spiegare la variazione della localizzazione subcellulare della proteina in cellule alveolari; secondo tale ipotesi, in seguito a una stimolazione acuta dei β -AR si verifica un aumento dell'espressione di SGLT1 seguito, nel caso in cui la stimolazione venga prolungata nel tempo, da un processo di endocitosi e successivo recycling in membrana. Una prima verifica dell'attendibilità di questa ipotesi è stata ottenuta grazie a esperimenti di immunofluorescenza con doppia marcatura, nei quali è stata messa in evidenza, dopo 60 minuti di stimolazione beta adrenergica, una colocalizzazione tra la proteina SGLT1 e un marker specifico degli endosomi di recycling (Rab11A). Per verificare in modo più accurato questa teoria saranno necessari successivi esperimenti, in modo anche da definire il pathway esatto a cui va incontro la proteina durante questo processo di regolazione.

1. INTRODUZIONE

1.1. Anatomia funzionale della pleura

La pleura è una membrana sierosa che riveste lo spazio compreso tra i polmoni e la superficie interna della parete toracica; se ne distinguono un foglietto viscerale, che avvolge la superficie di ciascun polmone, e un foglietto parietale, disteso sulle pareti delle logge pleuropolmonari. I due foglietti si continuano uno nell'altro a livello dell'ilo polmonare andando a delimitare la cavità pleurica, uno spazio sottilissimo (di spessore inferiore a 1 mm e perciò indicato anche come spazio virtuale) situato tra parete toracica e polmoni (Figura 1). Tra le due pleure è interposta una sottilissima falda di liquido, il cui volume e la cui composizione sono finemente regolati da vari meccanismi.

Durante lo sviluppo embrionale la pleura origina, intorno all'8°-18° giorno di gestazione a seconda della specie (nell'uomo intorno al 14° giorno), dal mesoderma lateroventrale, un tessuto costituito da due strati distinti: la somatopleura, rivolta verso l'esterno (a ridosso dell'ectoderma), e la splancnopleura, rivolta verso l'interno (addossata all'endoderma). Da queste due strutture derivano rispettivamente la pleura parietale e la pleura viscerale.

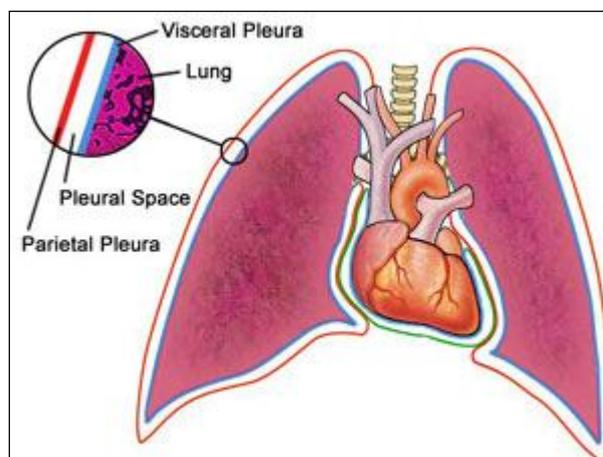


Figura 1. Pleure e cavità pleurica.

La superficie pleurica è proporzionale alla superficie corporea, potendo essere stimata approssimativamente a partire dal peso corporeo (in kg) elevato a $2/3$. In un uomo di 70

kg, la superficie totale della pleura viscerale è di circa 4000 cm², quella della pleura parietale è approssimativamente la stessa (Zocchi, 2002).

Da un punto di vista istologico entrambi i foglietti pleurici sono formati da mesotelio, un monostrato cellulare di rivestimento che poggia su una tonaca propria con un connettivo sottosieroso lasso (Albertine et al., 1982). Lo spessore del connettivo è il principale determinante dello spessore complessivo della pleura, essendo il mesotelio di dimensioni costanti e trascurabili rispetto a quest'ultimo (2 µm). Lo spessore della pleura parietale aumenta con la taglia della specie animale (per esempio, è circa 7 µm nel topo e circa 40 µm nell'uomo). Per quanto riguarda la pleura viscerale, i mammiferi sono stati suddivisi in due gruppi (McLaughlin et al., 1961) sulla base di informazioni quantitative riguardanti lo spessore del connettivo e di differenze nell'apporto ematico (che comportano differenze funzionali potenzialmente rilevanti al fine degli scambi di liquido):

1. mammiferi a pleura viscerale sottile (cane, gatto, coniglio, ratto e topo), nei quali lo spessore della pleura viscerale varia tra 10 e 20 µm (Agostoni et al., 1969; Payne et al., 1988)
2. mammiferi a pleura viscerale spessa, tra i quali sono compresi l'uomo (von Hayek, 1960), la pecora, il maiale, i bovini e gli equini; nella pecora lo spessore della pleura viscerale è 54-83 µm nelle regioni caudo-dorsali, 26-27 µm nelle regioni cranio-ventrali.

1.1.1 Mesotelio

Il mesotelio, descritto per la prima volta nel 1827 da Bichat, è uno monostrato di cellule che riveste le tre cavità sierose (pleura, pericardio e peritoneo) e, nel maschio, anche l'interno del sacco scrotale; studi morfologici hanno dimostrato che esso è essenzialmente simile nelle diverse sierose e nelle varie specie animali.

È composto principalmente da cellule squamose, piatte e allungate, che presentano uno spessore di 1-2 µm e un diametro di 25 µm, con il citoplasma raccolto attorno ad un nucleo centrale tondeggiante oppure ovale. Una caratteristica peculiare di queste cellule è la presenza di microvilli (Figura 2) e di corpi multilamellari; i microvilli variano per lunghezza, forma e densità (da 2-6 a 30 µm⁻²) a seconda del tipo di mesotelio e della regione considerata (Mutsaers, 2002). Il numero di microvilli aumenta quando una

cellula mesoteliale viene attivata (Wang, 1998) e in seguito a iniezione intraperitoneale di albumina (Madison et al., 1979).

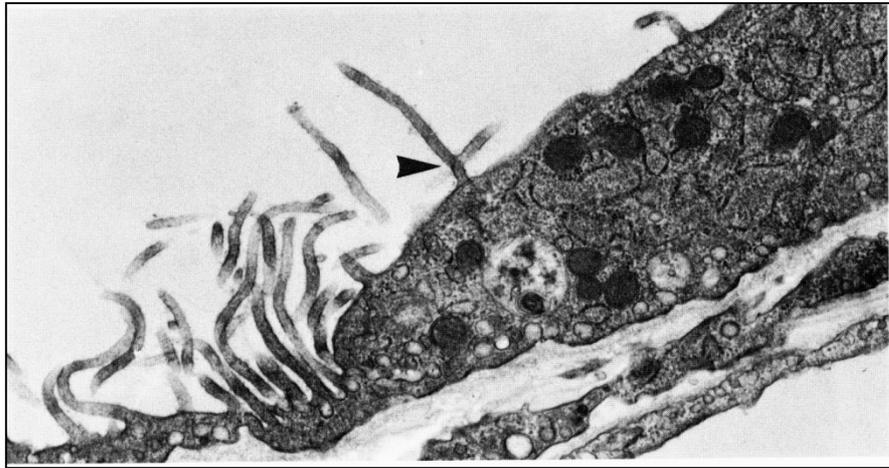


Figura 2. Distribuzione disomogenea dei microvilli in una cellula mesoteliale pleurica.

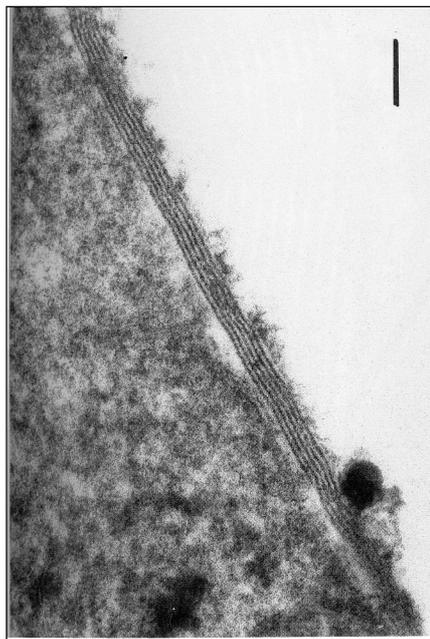


Figura 3. Microfotografia di pleura viscerale di pecora (microscopia elettronica a trasmissione). Alla superficie della membrana apicale di una cellula mesoteliale sono adsorbiti multipli strati di fosfolipidi. Barra: 1 nm (Hills, 1992).

I corpi multilamellari sono organelli contenenti materiale elettrondenso, con una struttura caratterizzata dalla presenza di una serie di membrane disposte concentricamente. Essi costituiscono un deposito di una sostanza tensioattiva simile al surfattante alveolare (composta da fosfolipidi per circa il 90% e da proteine per il

restante 10%). In seguito ad esocitosi verso il cavo pleurico, il materiale si deposita sulla superficie del mesotelio (Figura 3), assicurando lubrificazione e protezione meccanica ai tessuti durante i movimenti respiratori (*Hills, 1992; Michailova, 2004*). Lo strato fosfolipidico che riveste la superficie pleurica, inoltre, aumenta la selettività del monostrato mesoteliale per i soluti idrofili, contribuendo a determinare le caratteristiche di permeabilità del mesotelio (*Zocchi, 2002*).

In varie aree della superficie pleurica, specie in prossimità dei foci di Kampmeier (sedi di agglomerati linfoidei con funzione simile a quella dell'anello del Waldeyer nella laringe), si possono rinvenire anche cellule mesoteliali cuboidali, che aumentano di numero dopo un trauma o in seguito a stimolazione della superficie pleurica. All'analisi ultramicroscopica le cellule cuboidali rivelano la presenza di un reticolo endoplasmatico e di un apparato di Golgi più sviluppati di quelli delle cellule squamose, un maggior numero di mitocondri e maggiori scorte di glicogeno intracellulare che suggeriscono una loro più intensa attività metabolica.

L'analisi microscopica delle cellule mesoteliali mostra la presenza al loro interno di un sistema altamente sviluppato di vescicole e vacuoli; le vescicole, la cui densità varia in relazione allo stato funzionale della cellula (*Jaurand et al., 1997*), sono coinvolte nel trasporto di liquido, macromolecole e materiale corpuscolato attraverso il mesotelio.

Le connessioni tra le cellule mesoteliali sono rappresentate da complessi giunzionali ben sviluppati: tight junctions, adherens junctions, gap junctions e desmosomi. Tra queste, le tight junctions (giunzioni occludenti) sono fondamentali per lo sviluppo della polarità cellulare, nonché per la formazione e il mantenimento di una barriera con permeabilità ai soluti relativamente bassa.

In alcune regioni della pleura parietale (mediastino caudo-ventrale, superficie diaframmatica e spazi intercostali caudali) il cavo pleurico comunica direttamente con il sistema linfatico attraverso aperture tra le cellule mesoteliali, dette stomi, del diametro di 1-6 μm (*Wang, 1998; Negrini et al., 1991*). Gli stomi, il cui numero e la cui densità variano a seconda della specie e della regione di pleura parietale considerata, costituiscono una via d'accesso al cavo pleurico per cellule come macrofagi e linfociti. Secondo alcuni autori (*Zocchi, 2002*), essi contribuirebbero al processo di assorbimento del liquido pleurico, mediando il drenaggio linfatico. Gli stomi non sono presenti nella pleura viscerale, attraverso la quale, quindi, non esiste una comunicazione diretta tra lo spazio pleurico ed il sistema linfatico (*Wang, 1998*).

In passato si pensava che la funzione principale del mesotelio fosse semplicemente quella di costituire una barriera protettiva, oltre a rappresentare un'interfaccia con attrito minimo per facilitare il movimento di organi adiacenti. Più recentemente la funzione delle cellule mesoteliali è stata rivalutata; oggi infatti si ritiene che possano rivestire ruoli importanti in svariati processi (Figura 4):

1. sembrano essere direttamente coinvolte nel trasporto attivo di acqua, soluti e particelle. Oltre ad esprimere a livello della membrana plasmatica alcuni trasportatori e scambiatori coinvolti nell'assorbimento di soluti (*Zocchi et al., 1991, 1996*), presentano anche vescicole citoplasmatiche responsabili dell'endocitosi di macromolecole proteiche (*Wang, 1998*) molto simili a quelle utilizzate dall'endotelio capillare per il trasporto attivo di proteine;
2. una volta attivate secernono glicosamminoglicani, soprattutto ialuronano, i quali aderiscono all'apice dei microvilli impedendo la formazione di aderenze tra i due foglietti pleurici;
3. partecipano all'infiammazione della sierosa secernendo diversi mediatori pro- e anti-infiammatori, prostaglandine, prostaciline, leucotrieni (*Pace et al., 2004*), chemochine, ossido nitrico (NO), specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto, enzimi anti-ossidanti e citochine;
4. possiedono la capacità di secernere diversi fattori di crescita, ad esempio TGF- β 1, PDGF-A e bFGF, nonché molecole della matrice extracellulare e collagene di tipo I e III (*Mutsaers, 2002*);
5. le cellule mesoteliali peritoneali umane sono in grado di fungere da Antigen Presenting Cell (*Valle et al., 1995*);
6. rivestono un ruolo chiave nella deposizione locale di fibrina e nella sua rimozione dal cavo pleurico, mostrando quindi attività sia pro-coagulante sia fibrinolitica.

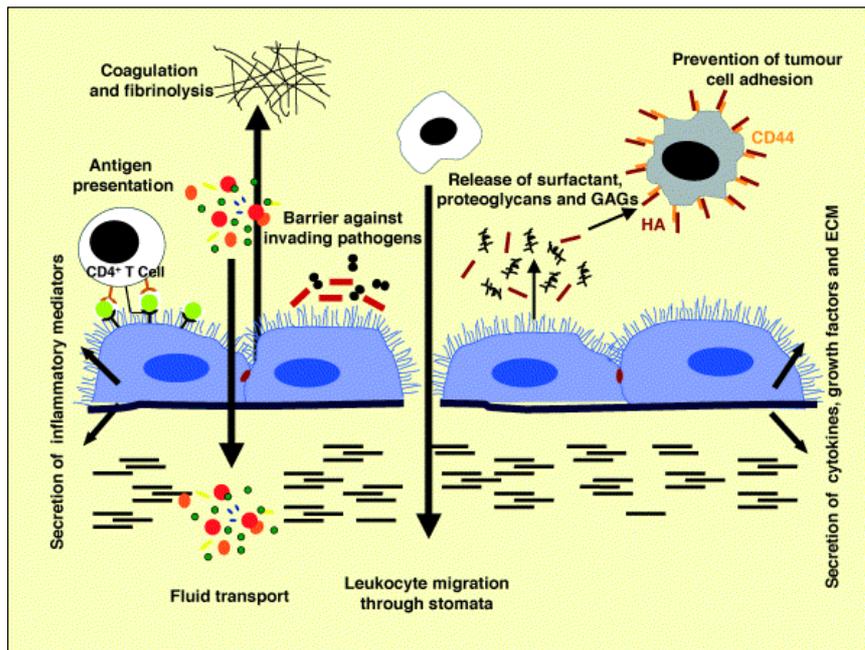


Figura 4. Funzioni delle cellule mesoteliali.

Il ruolo esatto delle cellule mesoteliali nell'adesione delle cellule tumorali metastatiche e nella crescita neoplastica rimane ancora oscuro; numerosi studi hanno dimostrato come le cellule mesoteliali che hanno subito un trauma rappresentino siti preferenziali di adesione; allo stesso tempo però altre ricerche hanno stabilito che la presenza di ialuronano impedirebbe l'attecchimento delle cellule tumorali, grazie ad un blocco del recettore CD44 (Jones *et al.*, 1995).

1.1.2 Tessuto connettivo

Il tessuto connettivo pleurico giace subito al di sotto del sottile strato mesoteliale e rappresenta il principale determinante dello spessore complessivo della pleura. È costituito da diversi strati: la lamina basale del mesotelio, un sottile strato ricco di fibre elastiche, uno strato lasso contenente vasi sanguigni, linfatici e adipociti, uno strato fibroelastico più resistente, che nella pleura parietale si continua con la fascia endotoracica (Wang, 1998). Attraverso studi sperimentali (Rennard *et al.*, 1984) è stato dimostrato che il mesotelio stesso è in grado di produrre gran parte della propria matrice extracellulare e del tessuto connettivo. Le cellule mesoteliali sono responsabili non solo della produzione di sostanze costituenti il connettivo (glicoproteine quali laminina e fibronectina, elastina, collagene di tipo I, III e IV e glicosamminoglicani), ma anche della loro organizzazione per la formazione della matrice extracellulare vera e propria.

1.1.3 Vasi sanguigni

La pleura parietale è irrorata dalle arterie intercostali per quanto riguarda la parte omonima, dalle arterie freniche superiori e inferiori per la pleura diaframmatica e infine dalle arterie mediastiniche per la pleura mediastinica. Le vene seguono il decorso delle arterie e drenano nel sistema delle azygos.

Per quanto riguarda la pleura viscerale, come già accennato essa è sottile (15-35 μ m) in alcune specie animali (cane, ratto, coniglio) (*Bernaudin e Fleury, 1985*), mentre è più spessa in altre specie (uomo, pecora, maiale). La differenza è dovuta ad un diverso spessore dello strato connettivale, ma in entrambi i tipi di pleura la distanza dei capillari sanguigni dal lume (un aspetto rilevante al fine degli scambi di liquido) non supera generalmente i 20-30 μ m. La differenza principale tra i due tipi di pleura consiste nelle diverse modalità di perfusione, che potrebbero essere alla base di diversi regimi pressori nei capillari dei due tipi. Nelle specie con pleura sottile, i vasi che riforniscono la pleura viscerale derivano da arterie del circolo polmonare, mentre in quelle a pleura spessa nascono da arterie del distretto bronchiale, appartenenti al circolo sistemico. D'altra parte, sia nelle specie a pleura viscerale sottile, sia in quelle a pleura spessa i capillari della pleura viscerale drenano nelle vene polmonari. Le implicazioni funzionali delle diverse modalità di perfusione dei due tipi di pleura, potenzialmente rilevanti al fine degli scambi di liquido attraverso il mesotelio, verranno trattate più avanti (Vedi 1.2.1, *Assorbimento attraverso la pleura viscerale*).

1.1.4 Vasi linfatici

I linfatici della pleura viscerale formano nello strato sottosieroso una fitta rete, connessa con il sistema linfatico che accompagna le vene polmonari e che fa capo ai linfonodi bronchiali; i linfatici della pleura parietale formano due reti tra loro comunicanti e drenanti nei linfonodi toracici interni, intercostali e diaframmatici (*Balboni et al., 1998*).

Come accennato, nella pleura parietale del mediastino caudo-ventrale, negli spazi intercostali caudali e sulla superficie del diaframma il sistema linfatico submesoteliale comunica direttamente con lo spazio pleurico attraverso gli stomi (*Kanazawa, 1985*).

Oltre a contribuire alla fuoriuscita di liquido dal cavo pleurico, essi rappresentano l'unico percorso disponibile per la fuoriuscita di particelle e cellule. Svolgono anche un importante ruolo nella rimozione dal cavo pleurico di proteine, le quali, però, possono lasciare lo spazio pleurico anche per altre vie: una piccola quota per convezione e, come

recentemente dimostrato, una quota rilevante per trasporto vescicolare attuato dal mesotelio. In condizioni fisiologiche, il numero degli stomi “aperti” e quindi disponibili al transito di soluti, fluidi e cellule è solo una minima parte del totale; i canali chiusi rappresentano una riserva nel caso in cui dovessero cambiare i volumi del liquido da riassorbire, ad esempio in presenza di versamenti o infiammazione. Non è stata, invece, mai dimostrata la presenza di stomi nella pleura viscerale, perciò non esiste una comunicazione diretta tra lo spazio pleurico e la ricca rete di linfatici sottomesoteliali che si sviluppa sulla superficie polmonare. Questo sistema in ogni caso partecipa al mantenimento del bilancio del liquido pleurico, raccogliendo nei capillari linfatici valvolati liquido e proteine che hanno attraversato la pleura viscerale per altre vie e riversandole, attraverso i linfatici peribroncovascolari e ilari, nel dotto linfatico destro o nel dotto toracico attraverso il sistema linfatico mediastinico.

1.2 Liquido pleurico

Il volume del liquido pleurico è generalmente compreso tra 0,13 e 0,27 mL/kg^{2/3} nella maggior parte delle specie animali studiate (*Agostoni e Zocchi, 1998*); nell'uomo il volume totale, determinato a partire dalla diluizione dell'urea in soggetti sottoposti a toracosopia, risulta pari a circa 0,26 mL/kg (*Noppen et al., 2000*).

La composizione del liquido pleurico è essenzialmente quella di un filtrato plasmatico attraverso due membrane con caratteristiche simili di selettività, l'endotelio capillare e il mesotelio parietale. La concentrazione proteica del liquido (C_{liq}) è bassa, così come il rapporto tra C_{liq} e la concentrazione proteica plasmatica (C_c). Rispetto al plasma, l'albumina rappresenta una frazione maggiore delle proteine totali. La concentrazione di Na^+ è minore rispetto al siero, mentre quella di HCO_3^- è più elevata, in linea con l'equilibrio di Donnan; sempre in relazione al plasma, i livelli di Cl^- sono inferiori (*Zocchi et al., 1991*), riflettendo probabilmente l'elevato numero di cariche negative delle molecole di glicosamminoglicani. La concentrazione del glucosio è simile a quella plasmatica. Il pH è maggiore di quello arterioso (circa 7,6; *Zocchi et al., 1991*), sia a causa della elevata concentrazione di HCO_3^- , sia per la bassa concentrazione di acidi deboli (proteine).

Il liquido pleurico contiene inoltre acido ialuronico, surfattante e cellule di vario tipo, come cellule mesoteliali (dovute all'esfoliazione della pleura), monociti, macrofagi, linfociti e neutrofili, provenienti dai capillari sanguigni e linfatici della pleura (*Noppen et al., 2000*).

Tra le funzioni del liquido pleurico si annovera quella lubrificante, che consente di ridurre l'attrito dovuto allo scivolamento dei polmoni sulla superficie interna della parete toracica durante l'atto respiratorio. Tale funzione si esplica oltre che per la semplice presenza del film di liquido, anche grazie a costituenti come l'acido ialuronico ed il surfattante, prodotti dalle cellule mesoteliali e poi esocitati nel cavo pleurico (*Agostoni et al., 1998; Zocchi, 2002; D'Angelo et al., 2004*). Una seconda importante funzione del liquido pleurico è quella di garantire l'accoppiamento meccanico tra polmoni e parete toracica. La pleura viscerale segue l'espansione della parete toracica durante la fase inspiratoria grazie al fatto che i meccanismi di riassorbimento del liquido e l'interazione tra polmone e parete toracica rendono subatmosferica la pressione del liquido pleurico. Affinché l'accoppiamento sia efficiente, è necessario che il volume del liquido pleurico venga mantenuto a un valore minimo (*Agostoni, 1972; 1986*), e che la

sua composizione, in particolare la concentrazione proteica, rimanga costante. Ciò si realizza grazie ad un corretto bilancio degli scambi di fluido e soluti che si verificano attraverso il mesotelio pleurico (Figura 5).

1.2.1 Produzione e riassorbimento del liquido pleurico in condizioni fisiologiche

In condizioni fisiologiche il volume del liquido pleurico si mantiene costante grazie ad un accurato bilancio tra produzione e assorbimento. Il movimento di liquido attraverso la pleura avviene sia per meccanismi passivi, sia per meccanismi operati dalle cellule mesoteliali.

I flussi passivi di liquido attraverso la pleura (J_v) dipendono dal gradiente complessivo di pressione transpleurica (ΔP), secondo l'equazione di Starling, che descrive il flusso passivo di un fluido attraverso una membrana di superficie S che separa due compartimenti:

$$J_v = L_p S \Delta P$$

dove L_p è la conducibilità idraulica (una misura di permeabilità all'acqua) mentre il prodotto $L_p S$ corrisponde al coefficiente di filtrazione (K_f).

Il gradiente di pressione transpleurica ΔP è dato da:

$$(P_c - P_{liq}) - \sigma (\pi_c - \pi_{liq})$$

dove P_c è la pressione idraulica nei capillari subpleurici, P_{liq} la pressione idraulica del liquido pleurico, π_c e π_{liq} le pressioni colloidosmotiche rispettivamente del plasma e del liquido pleurico, mentre σ è il coefficiente di riflessione per le proteine del mesotelio.

Produzione del liquido pleurico

Il liquido pleurico è prodotto unicamente con meccanismo passivo, per *filtrazione* dai capillari della pleura parietale all'interstizio e da questo nello spazio pleurico. Infatti, applicando il bilancio delle forze di Starling alla pleura parietale, si nota che su questo versante è normalmente presente un gradiente che favorisce la filtrazione di liquido: la pressione idraulica media nei capillari sistemici della pleura parietale è ~28 cmH₂O, mentre quella dello spazio pleurico è pari a -9 cmH₂O (valore medio durante un ciclo respiratorio). Questo dà luogo ad un gradiente netto di pressione idraulica di 37 cmH₂O, che favorisce il movimento di liquido verso lo spazio pleurico. La pressione colloidosmotica del plasma è circa 29 cmH₂O, mentre quella del liquido pleurico è circa 3 cmH₂O; assumendo un valore di 0,9 per σ , il gradiente netto di pressione oncologica che

si oppone a quello di pressione idraulica è di circa 23 cmH₂O (Agostoni e Zocchi, 2007). Attraverso la pleura parietale risulta quindi un gradiente idraulico superiore a quello colloidosmotico, che favorisce la filtrazione di liquido.

Riassorbimento del liquido pleurico

L'assorbimento del liquido si realizza attraverso meccanismi diversi che annoverano flussi passivi (riassorbimento mediato dalle forze di Starling attraverso la pleura viscerale, Agostoni, 1972; drenaggio linfatico attraverso gli stomi della pleura parietale, Negrini e al., 1994) e meccanismi cellulari operati su entrambi i versanti dalle cellule mesoteliali (assorbimento di liquido accoppiato al trasporto attivo di piccoli soluti e trasporto vescicolare accoppiato a transitosi di proteine; Agostoni e Zocchi, 1990 e 1998).

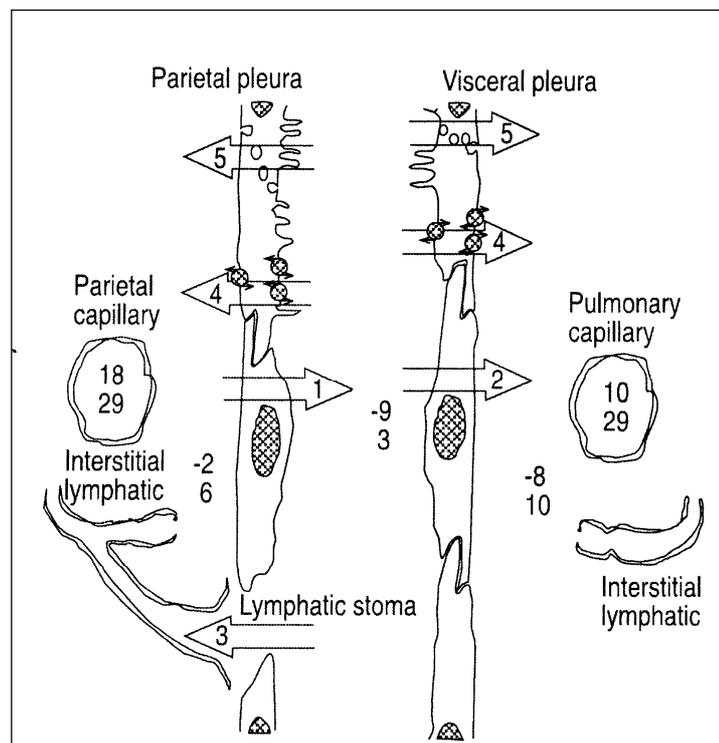


Figura 5. Rappresentazione schematica dei flussi transpleurici di liquido (freccie) in condizioni fisiologiche nel coniglio. Sono raffigurate le cellule mesoteliali della pleura parietale e viscerale, i relativi interstizi, capillari sanguigni e linfatici. La cellula mesoteliale in alto mostra gli aspetti morfologici coinvolti nel ricambio del liquido pleurico (microvilli, vescicole, trasportatori di elettroliti –cerchi grigi-). Le coppie di numeri rappresentano i valori delle pressioni idraulica (sopra) e colloidosmotica (sotto) coinvolte nei bilanci di Starling, relative a (da sinistra a destra): capillare parietale, interstizio parietale, liquido pleurico, interstizio viscerale, capillare viscerale. I numeri nelle frecce indicano i meccanismi responsabili dei flussi di liquido. 1) Filtrazione di Starling nella pleura parietale, 2) Assorbimento di Starling nella pleura viscerale, 3) Drenaggio diretto attraverso gli stomi linfatici, 4) Assorbimento di liquido accoppiato ai soluti, 5) Flusso vescicolare di liquido che accompagna la transitosi di proteine. (da Zocchi, 2002).

Nella pleura viscerale, i meccanismi cellulari operano in serie con le forze di Starling per determinare l'assorbimento finale del liquido nei capillari sanguigni subpleurici: il liquido trasferito dai meccanismi di trasporto cellulare dallo spazio pleurico all'interstizio subpleurico aumenta localmente la pressione idraulica e riduce la pressione colloidosmotica interstiziali, rendendo il bilancio delle forze di Starling favorevole all'assorbimento nei capillari. Inoltre, una parte del liquido trasferito nell'interstizio dai meccanismi cellulari (sia nella pleura viscerale, sia nella pleura parietale) viene rimossa dai capillari linfatici subpleurici.

Assorbimento di liquido accoppiato a trasporto attivo di soluti

La presenza di un trasporto di liquido accoppiato al trasporto attivo di soluti, ipotizzata sulla base di possibili analogie con l'epitelio alveolare del polmone (*Saumon e Basset, 1993*), di indicazioni risultanti da ricerche del passato (*Engelberg e Radin, 1977; D'Angelo et al., 1979*) e del riscontro diretto di una delle proteine trasportatrici nel mesotelio peritoneale (*Schroppel et al, 1998*), è stata suggerita da una serie di studi degli anni '90 (*Agostoni e Zocchi, 1990; Zocchi et al., 1991*). Questi studi, condotti in vivo su coniglio, hanno dimostrato che la velocità di rimozione di liquido dal cavo pleurico si riduce significativamente in idrotoraci sperimentali contenenti inibitori dei meccanismi di trasporto attivo di soluti (Figura 6).

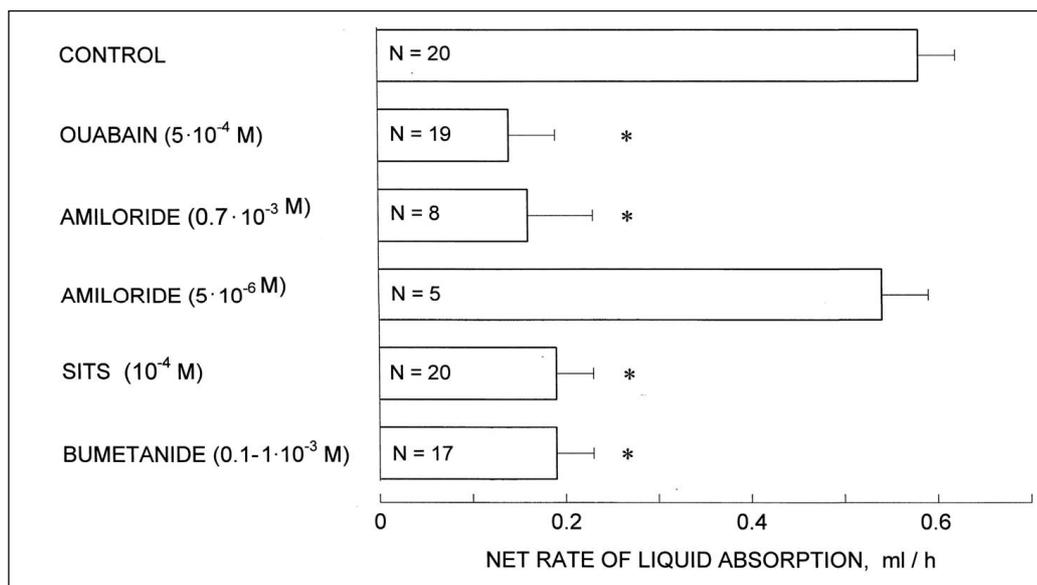


Figura 6. Volume di liquido assorbito in 1 ora da idrotoraci di 2 ml di soluzione di Ringer, senza e con inibitori del trasporto di elettroliti nel coniglio.

* = $P < 0.001$ rispetto alla velocità di rimozione senza inibitori (controllo).

Sulla base dei dati ottenuti utilizzando diversi inibitori quali ouabaina (inibitore dell'ATPasi Na^+/K^+ basolaterale), amiloride ad alte concentrazioni (inibitore dello scambiatore Na^+/H^+), SITS e bumentanide (inibitori dello scambiatore $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$), si è ipotizzato che il trasporto sia attuato da un doppio scambiatore $\text{Na}^+/\text{H}^+-\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, posto sulla membrana luminale, e una ATPasi Na^+/K^+ basolaterale.

Successivamente (Zocchi *et al.*, 1996), sempre sulla base di evidenze funzionali indirette, è stata documentato che anche un cotrasporto Na^+ -glucosio luminale può partecipare al riassorbimento attivo di liquido dal cavo pleurico: in idrotoraci di diverso volume contenenti florizina (inibitore specifico del cotrasporto), la velocità di rimozione del liquido risultava ridotta di circa 0,1 mL/h. Oltre a contribuire alla rimozione di liquido, il cotrasporto Na^+ -glucosio potrebbe avere un altro ruolo: come suggerito per l'epitelio alveolare (Berthiaume *et al.*, 1987), esso potrebbe servire per fornire alla cellula mesoteliale il glucosio da utilizzare per la sintesi di surfattante e ialuronano.

Transcitosi

Il trasporto vescicolare per transcitosi rappresenta un percorso aggiuntivo per l'assorbimento di liquido e di proteine dal cavo pleurico (Jaurand *et al.*, 1997).

La prima dimostrazione diretta della presenza di transcitosi in cellule mesoteliali è stata ottenuta studiando *in vitro* il transito di albumina e destrano marcati attraverso campioni di pericardio parietale di coniglio (Bodega *et al.*, 2002). Lo studio dimostra l'esistenza di un trasporto attivo unidirezionale (dal versante luminale a quello interstiziale) di macromolecole, che viene inibito a basse temperature (12 °C, temperatura alla quale le vescicole non si formano), in presenza di nocodazolo (un inibitore della formazione di vescicole), e in presenza di basse concentrazioni di albumina. Quest'ultimo dato indica che il trasporto è attivato dall'albumina e non è costitutivo. L'esistenza di transcitosi attraverso la pleura di coniglio è stata poi dimostrata *in vivo* (Agostoni *et al.*, 2002), grazie ad esperimenti nei quali è stato documentato che il nocodazolo riduce in modo significativo l'assorbimento di albumina marcata iniettata nello spazio pleurico e la sua comparsa nel plasma.

Drenaggio linfatico

Liquido e proteine passano direttamente dal cavo pleurico al sistema linfatico fluendo attraverso gli stomi della pleura parietale. Oltre a questa componente diretta ($J_{l,s}$), il flusso linfatico totale dallo spazio pleurico (J_l) comprende una componente indiretta, in serie con i meccanismi cellulari, costituita da quella parte di liquido e proteine che, dopo

il trasferimento nell'interstizio operato dai meccanismi cellulari, viene raccolta dai linfatici interstiziali (parietali e viscerali) e riportata nel circolo sanguigno.

Il flusso linfatico diretto attraverso gli stomi, pur rappresentando solo una frazione di quello totale, è essenziale per rimuovere dallo spazio pleurico particelle e cellule insieme al liquido. Esso aumenta con l'aumentare di C_{liq} , in seguito a stimolazione α_2 -adrenergica (Zocchi *et al.*, 1997) e, soprattutto, in seguito all'aumento del volume di liquido contenuto nello spazio pleurico.

Assorbimento attraverso la pleura viscerale

Secondo la veduta prevalente, il bilancio delle forze di Starling a livello della pleura viscerale è favorevole al riassorbimento di liquido dal cavo pleurico nei capillari (Agostoni, 1972; 1986; Zocchi, 2002). Il bilancio si discosta da quello della pleura parietale solo per la pressione idraulica capillare, di valore simile a quella della circolazione polmonare (circa 10 cmH₂O); in questo modo il gradiente idraulico (19 cmH₂O) risulta essere inferiore a quello oncotico, favorendo l'assorbimento di liquido.

Animali a pleura viscerale spessa. Alcuni autori (Lai-Fook, 2004), pur ammettendo che un assorbimento di questo tipo possa verificarsi negli animali a pleura sottile, negano la sua esistenza negli animali a pleura spessa. Essi sostengono che, in queste specie animali, la maggior distanza dei capillari dal mesotelio e la più elevata pressione capillare (dovuta al fatto che originano dal circolo sistemico) rendono il bilancio di Starling favorevole alla filtrazione di liquido anche attraverso la pleura viscerale (Figura 7).

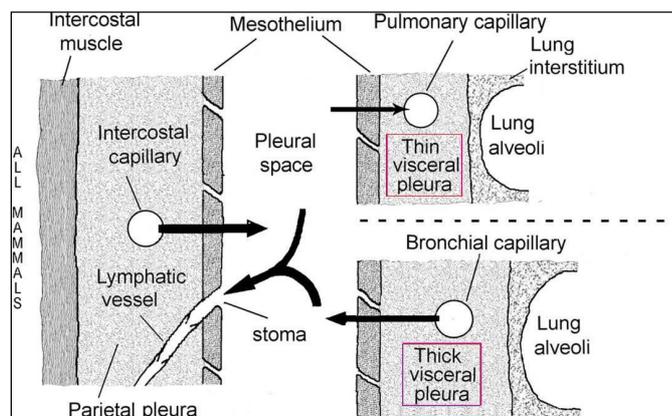


Figura 7. Rappresentazione schematica dei flussi transpleurici di liquido in animali a pleura viscerale sottile (Thin visceral pleura) e spessa (Thick visceral pleura) secondo Lai Fook (2004). La freccia orizzontale spessa a sinistra rappresenta la filtrazione dai capillari della pleura parietale (presente in entrambi i casi); le frecce orizzontali sottili a destra rappresentano gli opposti flussi ipotizzati nei due casi.

Attualmente la questione non è risolta ma va considerato che, anche nella pleura viscerale spessa:

1. la distanza dei capillari dal mesotelio è molto limitata (intorno a 30 μm , Vedi 1.1.3);
2. i capillari pleurici drenano nelle vene polmonari e, quindi, i loro valori di pressione media (mai direttamente misurata) sono presumibilmente molto inferiori a quelli vigenti nei capillari sistemici e solo di poco superiori a quelli vigenti nei capillari polmonari della pleura sottile.

La ricerca della presenza anche nel mesotelio di animali a pleura spessa di un trasporto di liquido accoppiato a trasporto mesoteliale di soluti, finora dimostrata soltanto in animali a pleura sottile, darebbe un contributo rilevante allo studio delle vie coinvolte nel turnover del liquido pleurico. Infatti, tale meccanismo renderebbe possibile l'assorbimento attraverso i capillari della pleura viscerale anche negli animali a pleura spessa, poiché il continuo apporto di liquido all'interstizio sottopleurico aumenterebbe la pressione idraulica e abbasserebbe la pressione colloidosmotica interstiziali, modificando le forze di Starling a favore dell'assorbimento.

1.2.2 Accoppiamento meccanico tra parete toracica e polmone

A volume polmonare medio la parete toracica e il polmone tendono a separarsi: il polmone tende a collassare, mentre la parete toracica ad espandersi. Ciò non si verifica grazie all'esistenza di meccanismi che garantiscono un accoppiamento meccanico tra polmoni e parete toracica. Esistono due ipotesi sul meccanismo con cui si verifica e viene mantenuto l'accoppiamento meccanico tra le due strutture.

Secondo la prima ipotesi (Agostoni, 1972; 1986), i meccanismi operanti nel riassorbimento del liquido esercitano una pressione più subatmosferica di quella esercitata dalla forza di ritorno elastico del polmone, corrispondente alla pressione di superficie della pleura. Per comprendere la differenza tra pressione del liquido pleurico (P_{liq}) e di superficie della pleura (P_{pl}), si consideri il passaggio dalla condizione di idrotorace a quella fisiologica (Figura 8). Nella prima condizione, le pareti non si toccano e P_{liq} eguaglia P_{pl} . Poiché vi sono meccanismi che rimuovono il liquido dal cavo pleurico, le pareti vengono progressivamente avvicinate fino ad arrivare a toccarsi in vari punti di contatto (microvilli, cellule del liquido pleurico, protuberanze delle pareti). Un'ulteriore riduzione del volume del liquido produce una deformazione delle

pareti, che sono costrette ad adattarsi l'una all'altra. Ciò comporta una pressione di deformazione positiva nelle aree di contatto e negativa nelle altre: quest'ultima rende P_{liq} più subatmosferica di P_{pl} . Il volume del liquido viene quindi ridotto, fintanto che la sua pressione si è abbassata in modo tale da stabilire un equilibrio dinamico con la pressione di assorbimento. Ciò permette alle pareti di scivolare l'una sull'altra, pur mantenendo una stretta aderenza fra di loro. Verosimilmente, in condizioni dinamiche il contatto tra i tessuti non è diretto, ma avviene tramite un sottile strato di liquido come nella lubrificazione idrodinamica.

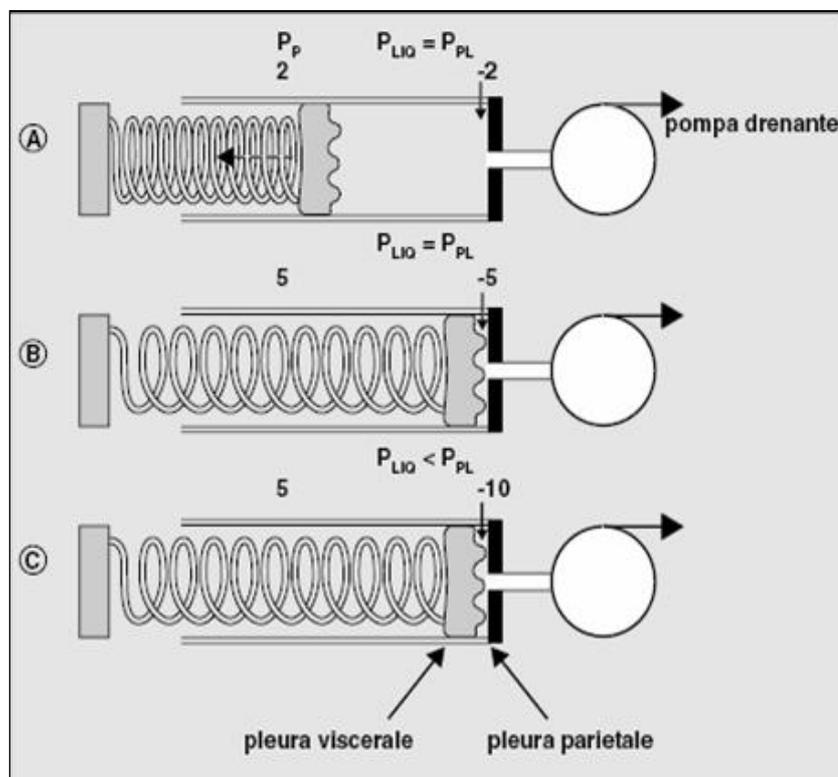


Figura 8. Rappresentazione schematica del meccanismo con cui la pressione del liquido pleurico (P_{liq}) è resa più subatmosferica rispetto a quella pleurica di superficie (P_{pl}). Il polmone è rappresentato da una molla collegata a un pistone che scorre in una siringa (il cavo pleurico); per permettere l'espansione, è necessario un sistema di assorbimento del liquido, rappresentato da una pompa drenante. In A il polmone si sta espandendo e la pressione alla sua superficie eguaglia quella all'interno del liquido pleurico. In B le pressioni sono ancora uguali, anche se maggiori dato che il polmone ha raggiunto la sua espansione massima grazie al continuo drenaggio della pompa. Quest'ultima, però, è in grado di generare pressioni anche maggiori, cioè il polmone manterrà lo stesso volume (come in C) ma la pressione nel liquido presente tra i punti di contatto sarà ancora minore.

I fosfolipidi adsorbiti sulle cellule mesoteliali potrebbero abbassare notevolmente il coefficiente di attrito quando vi fosse un contatto diretto tra i tessuti. Secondo questa ipotesi, il liquido pleurico viene assorbito tramite più meccanismi: passivamente

secondo il bilancio delle forze di Starling attraverso la pleura viscerale, per drenaggio linfatico attraverso gli stomi della pleura parietale, e in entrambe le pleure grazie a meccanismi cellulari che operano un assorbimento al seguito di trasporto attivo di soluti, oltre ad un trasporto vescicolare accoppiato alla transitosi di proteine. Il liquido, trasportato oltre il mesotelio viscerale dai primi tre meccanismi, viene rimosso dai capillari sanguigni e linfatici del connettivo subpleurico. Sempre secondo questa visione, in condizioni fisiologiche il flusso linfatico è molto piccolo ma è comunque essenziale per rimuovere dal cavo cellule, particelle, proteine (mantenendo così bassa la concentrazione proteica del liquido pleurico e, quindi, la sua pressione colloidosmotica) e per aumentare la velocità di rimozione del liquido quando il suo volume e la sua pressione sono aumentati rispetto alle condizioni fisiologiche (idrotorace). In queste condizioni, infatti, il drenaggio linfatico può aumentare di oltre 10 volte e diventa quindi prevalente rispetto agli altri meccanismi.

Secondo l'altra ipotesi (*Lai-Fook, 2004*), non esiste alcun contatto tra le due pleure e P_{liq} è uguale a P_{pl} . Il liquido pleurico viene prodotto per filtrazione attraverso la pleura parietale nelle parti più craniali dello spazio e fluisce verso le regioni più declivi. L'uniformità dello spessore del liquido a diverse altezze sarebbe assicurata da una sua ridistribuzione causata dai movimenti respiratori e cardiaci e da un flusso verso le zone apicali lungo le scissure interlobari, che rappresentano canali di ampio spessore. Secondo questa veduta, il riassorbimento del liquido avviene quasi esclusivamente per drenaggio linfatico attraverso la pleura parietale delle regioni basali del cavo pleurico, dove è maggiore la densità degli stomi.

1.3 Polmoni

I polmoni sono gli organi responsabili dello scambio dei gas fra l'aria e il sangue; rivestiti dalla pleura viscerale, sono alloggiati nel torace in due cavità separate dette cavità pleuriche.

I due polmoni sono diversi per volume, peso e forma: quello di destra, infatti, è più grande e diviso in tre lobi, mentre quello di sinistra ha dimensioni minori ed è diviso in due soli lobi. La forma generale è simile, si presentano come un cono al quale sia stata tagliata con un piano sagittale la parte mediale, per cui si riconosce una faccia laterale (costale) convessa, una faccia inferiore (diaframmatica) leggermente concava, una faccia mediale (mediastinica) pianeggiante e un apice arrotondato. In corrispondenza della faccia mediastinica si trova l'ilo polmonare, a livello del quale entrano ed escono dai polmoni i bronchi, le arterie e le vene.

I lobi sono delimitati da profonde incisure che partono dalla superficie esterna e arrivano fino all'ilo. Nel polmone destro ci sono un'incisura principale e una secondaria che separano un lobo superiore, uno medio e uno inferiore. Nel polmone sinistro esiste una sola incisura che taglia il polmone in due lobi, uno superiore e uno inferiore. Osservando la superficie del polmone, essa appare costituita da aree poligonali denominate lobuli, ciascuno dei quali origina a partire dal peduncolo di connettivo in cui inizia la ramificazione dei bronchioli intralobulari corrispondenti; l'elemento costitutivo principale dei lobuli è l'acino polmonare, ognuno dei quali è incentrato su un bronchiolo terminale.

Gli acini sono formati da un numero elevato di cavità emisferiche chiamate alveoli polmonari (unità funzionali del polmone, Figura 9). L'imponente estensione degli alveoli comporta un enorme incremento della superficie disponibile per gli scambi gassosi, favorito anche dalla ridotta superficie occupata dal connettivo di sostegno; in questo modo, l'area disponibile per gli scambi gassosi arriva ad essere molto estesa, pari nell'uomo a circa 130 m^2 . Come si può osservare dal grafico riportato in Figura 10 (*Tenney e Remmers, 1966*), nelle diverse specie animali esiste una relazione lineare tra l'area della superficie alveolare e il volume di ossigeno assorbito dall'ambiente (consumo di ossigeno, VO_2).

L'organizzazione dell'acino e degli alveoli si comprende bene seguendo lo sviluppo delle ramificazioni dei bronchioli. Partendo dai bronchi e proseguendo lungo le successive ramificazioni si giunge fino ai bronchioli terminali, ognuno dei quali è

formato da un condotto sottile con pareti proprie, a cui si accompagna un ramo dell'arteria polmonare; dal bronchiolo terminale originano le numerose cavità dell'acino, per il tramite di alcune ramificazioni di brevi condotti che presentano lungo le loro pareti dei piccoli diverticoli: questi ultimi sono detti bronchioli respiratori o alveolari. Infine, dai bronchioli alveolari ha origine un sottile canale (canale alveolare) privo di pareti proprie, a fondo cieco, su cui si aprono gli alveoli. Da ogni canale alveolare derivano, in media, da 60 a 120 alveoli.

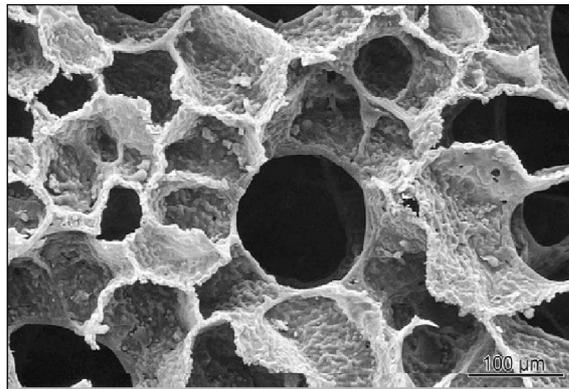


Figura 9. Scansione elettronica di parenchima polmonare umano; è visibile un dotto alveolare circondato dagli alveoli, separati tra loro da setti (Murray, 2010).

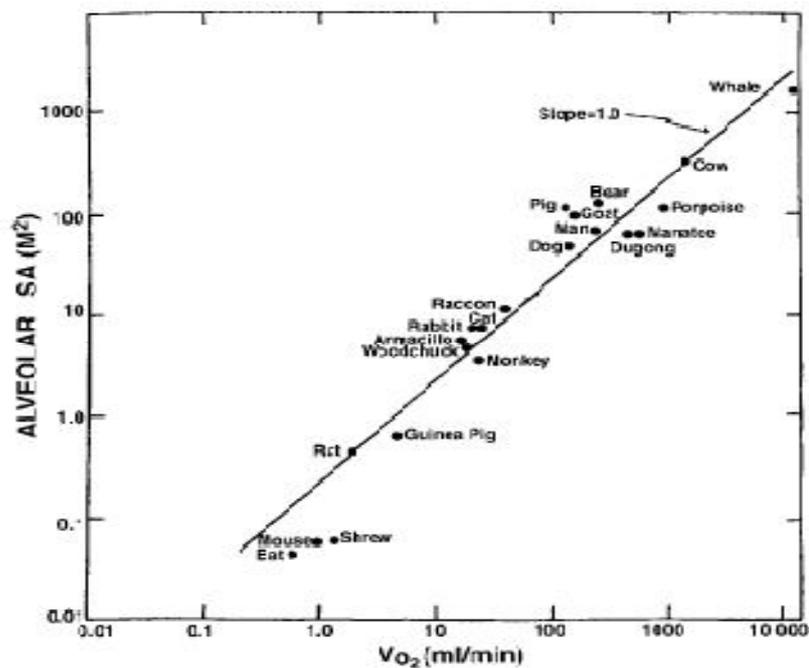


Figura 10. Relazione interspecie tra l'area della superficie alveolare (S_a) e l'assunzione di ossigeno di tutto l'organismo ($\dot{V}O_2$).

I polmoni si sviluppano a partire da due vescicole epiteliali che originano ventralmente dall'endoderma. Il processo di sviluppo si divide in vari stadi istologicamente distinti: pseudoghiandolare, canalicolare, sacculare e alveolare (Figura 11). Durante queste fasi le iniziali vescicole diventano dei tubi rivestiti da cellule epiteliali, che si ramificano nel mesenchima circostante; l'interazione con il mesenchima e con il collagene regola la crescita e il pattern di ramificazione dei polmoni in formazione. In particolare, nello stadio pseudoghiandolare, le strutture tubulari sono rivestite da cellule epiteliali colonnari ricche di glicogeno. La fase canalicolare è caratterizzata dalla formazione dei futuri acini, con cellule epiteliali cuboidali in attiva divisione, contenenti meno glicogeno rispetto alle cellule colonnari.

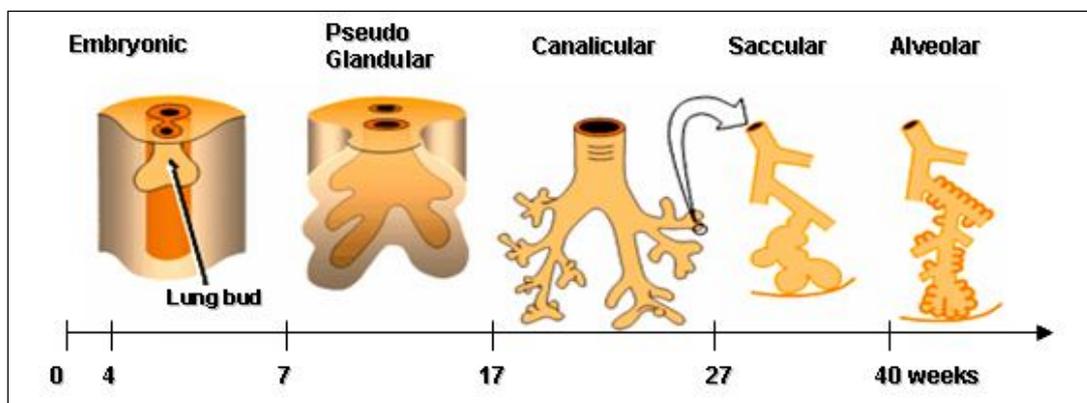


Figura 11. Stadi dello sviluppo polmonare

Al termine di questo stadio di sviluppo e durante la fase sacculare, le cellule rallentano la loro velocità di divisione e diminuiscono i livelli di glicogeno citoplasmatico; contemporaneamente, nelle cellule alveolari cominciano a comparire i corpi multilamellari. Questi vengono conservati in alcune cellule (*cellule alveolari di secondo tipo*), mentre altre cellule li perdono e si differenziano in *cellule alveolari di primo tipo* (Adamson e Bowen, 1975). La formazione degli alveoli inizia nell'uomo durante l'ultimo mese di gestazione e continua anche nei primi mesi dopo la nascita (Langston et al., 1984); in questa fase si verifica la secrezione di surfattante, che si distribuisce sulla superficie del lume alveolare formando un sottile film liposolubile.

1.3.1 Vasi sanguigni

Il polmone è l'unico organo in cui si trovano due dispositivi circolatori sanguigni completi. Il primo dispositivo è la circolazione funzionale, rappresentata dai vasi della piccola circolazione polmonare che partecipano attivamente allo scambio dei gas respiratori. Il secondo dispositivo, o circolo nutritizio, è sostenuto dal sistema dei vasi bronchiali, dipendenti dalla circolazione sistemica.

La disposizione dei vasi dei due circoli è nettamente diversa. I rami arteriosi bronchiali seguono le ramificazioni dei bronchi e arrivano a costituire reti capillari a livello del peduncolo dei singoli lobuli, a ridosso della parete dei bronchi; dalla rete capillare hanno origine le vene bronchiali, che seguono il percorso della ramificazione arteriosa giungendo fino alle grosse vene bronchiali dell'ilo polmonare.

I rami dell'arteria polmonare, invece, si suddividono seguendo le ramificazioni dei grossi bronchi ma non emettono collaterali fino all'arrivo nel lobulo: qui si ha la ramificazione delle arteriole nel distretto capillare, che si estende fino a livello della parete alveolare. La rete capillare si scarica in venule che non seguono il percorso delle arterie, ma dalla periferia degli acini passano nei setti intralobulari e si riconnettono con le arterie a livello del peduncolo polmonare, ripercorrendo a ritroso tutta la sequenza di ramificazioni delle vie aeree, per poi confluire nelle grosse vene dell'ilo polmonare e da qui al cuore.

I capillari hanno un calibro di circa 5 μm e sono fortemente anastomizzati a rete; il loro endotelio si estende in lamine citoplasmatiche estremamente sottili unite da complessi giunzionali. Le cellule endoteliali poggiano su una lamina basale sottile, alla quale a volte si attaccano le fibre collagene del connettivo reticolare della lamina vascolo-connettivale. Il connettivo sottostante forma uno strato molto sottile detto sottoendoteliale, ricco di fibre elastiche, in cui si trovano sparse le cellule dell'interstizio polmonare: fibrociti e cellule del tessuto linfoide.

1.3.2 Vasi linfatici

Nel parenchima polmonare sono riconoscibili due gruppi di vasi linfatici:

1. un gruppo associato all'albero bronchiale e al sistema polmonare arterioso, con vasi linfatici distribuiti all'interno dei lobuli. Si estendono solo fino ai bronchioli terminali, non si ritrovano nella parete alveolare

2. un gruppo associato al sistema polmonare venoso, con vasi linfatici che seguono le vene lungo un percorso prevalentemente interlobulare.

Questi due sistemi linfatici comunicano tra loro e con i linfatici della pleura attraverso i capillari linfatici.

1.3.3 Tessuto connettivo

A livello polmonare si ritrovano tre tipi di tessuto connettivo:

1. tessuto connettivo assiale, che circonda le vie respiratorie e le arterie polmonari;
2. tessuto connettivo periferico, che corrisponde al tessuto connettivo della pleura viscerale
3. tessuto connettivo parenchimoso, situato all'interno della parete alveolare; comprende fibre collagene e fibre elastiche che vanno a circondare ogni singolo alveolo.

Tutti questi tipi di connettivo si trovano all'interno di uno spazio delimitato dall'epitelio alveolare, l'interstizio polmonare.

1.3.4 Struttura della parete alveolare

La parete alveolare presenta un schema strutturale generale simile a quello degli organi cavi. Procedendo dalla cavità aerea verso i capillari alveolari, si susseguono un epitelio alveolare di rivestimento, una lamina sottoepiteliale e una lamina vascolo-connettivale, che rappresenta la componente principale della parete dell'alveolo e che ospita al suo interno le reti di capillari (interposte tra un'arteriola terminale e l'inizio delle venule polmonari).

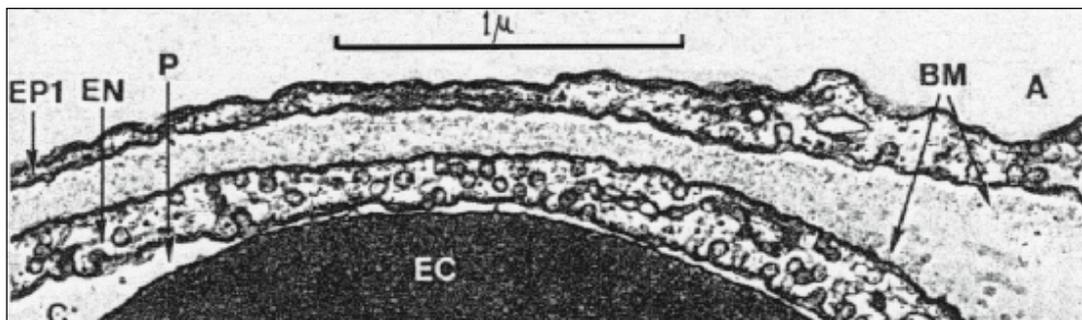


Figura 12. Struttura della parete di un alveolo polmonare. A, cavità alveolare; EP1, cellula epiteliale di primo tipo; BM, membrana basale; C, capillare alveolare; EN, endotelio capillare; P, plasma; EC, eritrocita (Weibel, 1985).

Nella parete alveolare si ritrovano diversi tipi di cellule:

1. cellule alveolari di primo tipo;
2. cellule alveolari di secondo tipo, con funzione secernente e proliferativa, che svolgono anche un ruolo importante nell'immunità innata;
3. cellule endoteliali, importanti per lo scambio dei gas e il metabolismo;
4. macrofagi, fondamentali per la difesa immunitaria;
5. fibroblasti interstiziali, che secernono le proteine della matrice extracellulare.

I primi due tipi, i cui elementi sono tra loro frammisti (con larga predominanza dei primi), formano il monostrato epiteliale, le cellule endoteliali rivestono il lume dei capillari alveolari, le cellule degli ultimi due tipi si trovano nella matrice del sottilissimo strato di interstizio che separa epitelio ed endotelio.

1.3.5 Epitelio alveolare

I primi studi ultrastrutturali che permisero di avere informazioni sulla composizione dell'epitelio alveolare furono condotti nel 1953 da *Low*; egli fu il primo ad osservare che gli alveoli erano rivestiti da uno strato continuo di epitelio, composto principalmente da cellule alveolari di primo tipo (appiattite ed allungate, con notevoli espansioni) tra le quali erano disperse le cellule alveolari di secondo tipo (cuboidali), localizzate prevalentemente agli angoli degli alveoli (Figura 13).

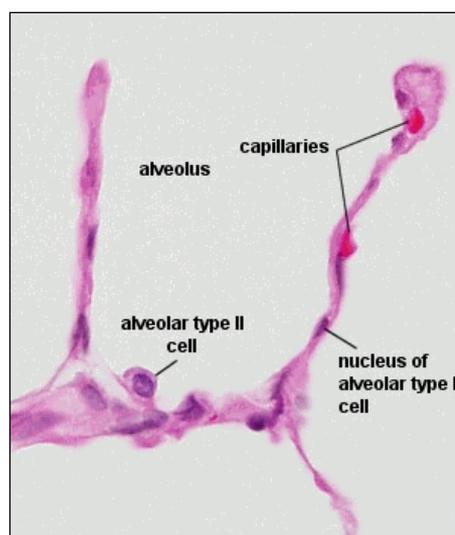


Figura 13. Architettura della parete alveolare di coniglio (microscopio ottico). Sono visibili parti di 4 spazi alveolari e dei relativi setti interalveolari. Sono evidenziati i due tipi di cellule epiteliali alveolari.

Le cellule alveolari (o pneumociti) di primo tipo (ATI) sono cellule di forma allungata ed estremamente piatta, con un nucleo ai lati del quale si estendono due o più sottili filamenti citoplasmatici, che vanno a ricoprire la membrana basale che separa l'epitelio dall'interstizio. Presentano un diametro di $\sim 50-100 \mu\text{m}$ e un volume di $\sim 3000 \mu\text{m}^3$ (Stone *et al.*, 1992); ricoprono più del 95 % della superficie dell'alveolo nonostante rappresentino solo l'8 % delle cellule totali di un polmone umano adulto (Crapo *et al.*, 1982). In passato si pensava che le cellule alveolari di primo tipo non fossero biologicamente attive ma costituissero semplicemente una barriera anatomica tra superficie alveolare e interstizio; studi più recenti hanno però messo in evidenza alcune caratteristiche di queste cellule che lascerebbero supporre una loro intensa attività metabolica e un loro ruolo nei processi di trasporto di acqua e soluti tra spazi aerei e interstizio polmonare (Vedi Liquido Alveolare).

Le cellule alveolari di secondo tipo (ATII, Figura 14) sono cuboidali, di diametro più piccolo (circa $10 \mu\text{m}$) e altezza molto maggiore delle ATI. Sono generalmente localizzate agli angoli degli alveoli. Rappresentano il 15-16 % della popolazione cellulare che costituisce la parete alveolare ma occupano meno del 5% della superficie interna del polmone. Da un punto di vista morfologico hanno caratteristiche di elementi impegnati in intensa attività metabolica. L'elemento più distintivo è la presenza al loro interno di corpi multilamellari, la riserva intracellulare di surfattante polmonare, del quale esse sono le esclusive produttrici (Figura 15). Inoltre, presentano al loro interno vari organelli, vescicole e, sulla superficie apicale, brevi microvilli, che tendono ad essere più numerosi alla periferia della cellula (Weibel *et al.*, 1976); ogni microvillo contiene filamenti longitudinali di actina. Per le loro caratteristiche morfologiche e biochimiche, riconosciute da tempo (a differenza di quelle delle ATI), fino a pochi anni venivano considerate le sole, tra i due tipi cellulari, dotate di significativa attività metabolica e capaci di attuare un trasporto di acqua e soluti attraverso la barriera alveolare. In realtà le funzioni specifiche delle cellule di secondo tipo comprendono:

1. sintesi, secrezione e reuptake di surfattante (Wright e Hawgood, 1989)
2. sintesi di numerose molecole effettrici della risposta immunitaria (Strunk, 1988; Vanderbilt, 2003)
3. riparazione dell'epitelio in seguito a lesione; fungono infatti da cellule progenitrici (Kim *et al.*, 2006).

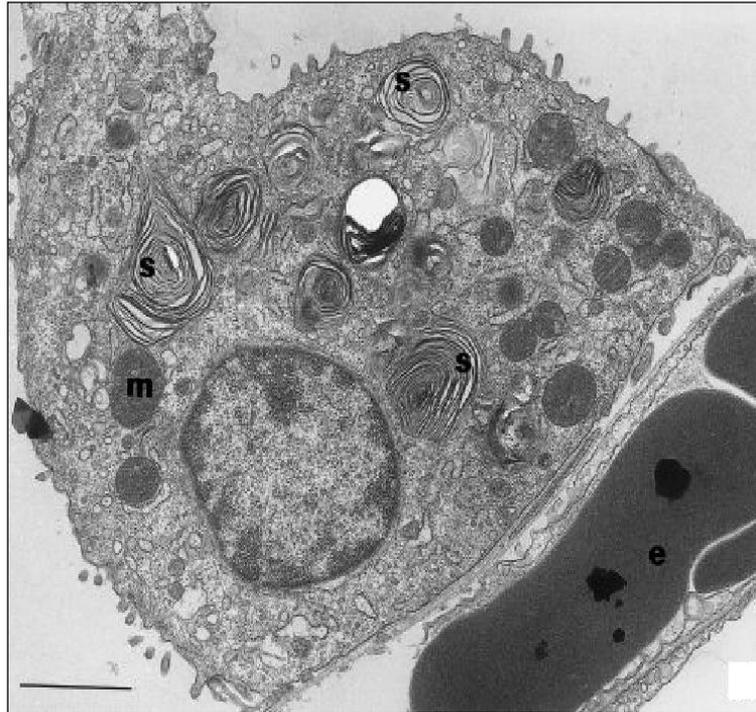


Figura 14. Cellula epiteliale alveolare di secondo tipo. Sono evidenziati corpi lamellari (s) e un mitocondrio (m); e, eritrocita. Barra, 10 μm .

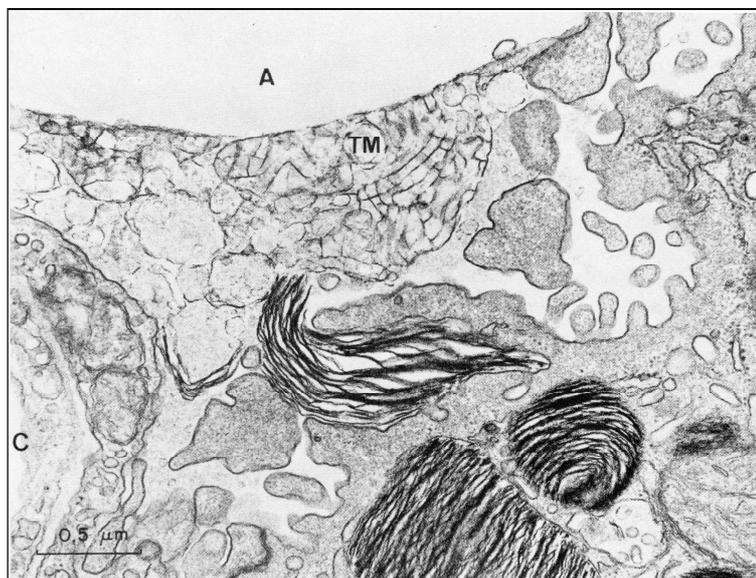


Figura 15. Rilascio di un corpo lamellare (LB) nel liquido alveolare (contenente altre strutture fosfolipidiche, LM) da parte di una cellula ETII. A, spazio aereo alveolare; C, lume capillare.

1.3.6 Liquido alveolare

La superficie apicale delle cellule alveolari è rivestita dal liquido alveolare, un sottile film fluido dello spessore medio complessivo di 0,2 μm , con valori che variano tra 0,1 e

0,9 μm (Bastacky *et al.*, 1995); basandosi su questi valori, è stato ipotizzato che i polmoni umani possano contenere circa 20-30 ml di liquido alveolare distribuiti su una superficie di circa 130 m^2 .

Nel polmone fetale si verifica una continua secrezione di liquido, trascinato da una secrezione di Cl^- (Olver and Strang, 1974). La distensione del polmone che ne risulta, a sua volta promuove la crescita e lo sviluppo polmonare. Durante la fase finale della gestazione, la maturazione delle cellule alveolari porta ad un graduale cambiamento, per cui diminuisce la secrezione di Cl^- e inizia ad aumentare l'assorbimento di Na^+ . Nell'età adulta, come si dirà in dettaglio più avanti, l'assorbimento di soluti attuato dalle cellule epiteliali, accompagnato da un riassorbimento isosmotico di acqua, mantiene ridotto il volume di liquido alveolare, contribuendo a mantenere sottile lo spessore della barriera che separa aria e sangue (Vedi Scambio dei gas respiratori attraverso l'epitelio alveolare).

Il liquido alveolare risulta essere costituito da due fasi sovrapposte (Figura 16); a contatto con la superficie si trova una subfase acquosa che ha il significato di assicurare una costante idratazione all'epitelio sottostante, evitando che si disidrati nonostante il continuo contatto con l'aria.

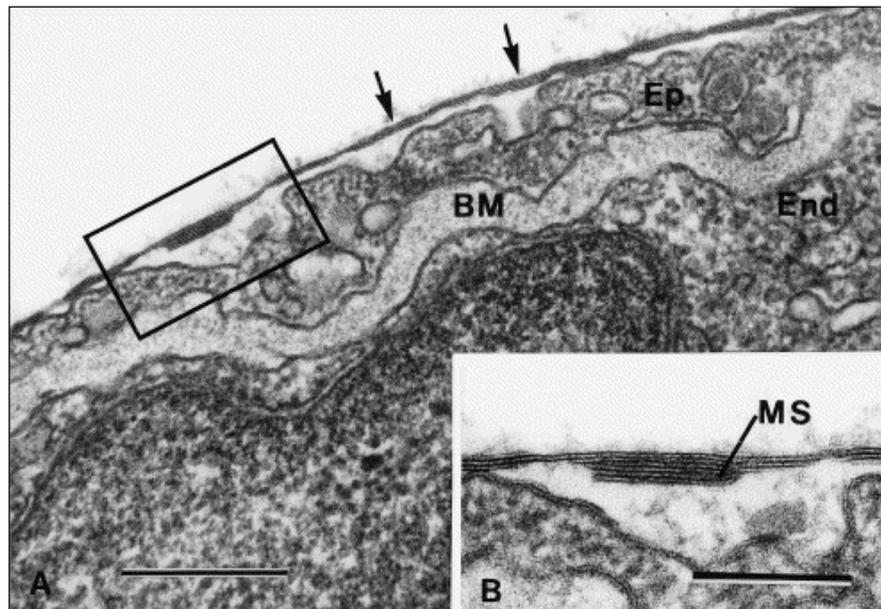


Figura 16. Il liquido alveolare polmonare si dispone in due fasi sovrapposte: la fase più superficiale (frece, e MS nell'inserto) è formata da strati di fosfolipidi (surfattante alveolare), lo strato più profondo è la fase acquosa. Ep, cellula epiteliale di primo tipo; BM, membrana basale; End, cellula endoteliale capillare. Barra, 1 μm .

Lo strato superiore è invece rappresentato dal surfattante, un complesso fosfo-lipo-proteico costituito per circa il 90 % da fosfolipidi (in particolare palmitoil-fosfatidilcolina e fosfatidilglicerolo) e per il restante 10% da proteine note come “surfactant proteins” (SP-A, SP-B, SP-C e SP-D). SP-A e SP-D sono lectine idrofiliche calcio-dipendenti che sembrano avere un ruolo di primaria importanza nell’immunità innata; SP-B e SP-C sono invece proteine idrofobiche strettamente legate ai lipidi del surfattante, che ne facilitano la diffusione sulla superficie alveolare. Il surfattante esercita un’importante azione tensioattiva che consente di ridurre la tensione superficiale all’interfaccia aria-liquido, riducendo così la forza che si oppone alla espansione degli alveoli ed evitando il loro collasso.

1.3.7 Scambio dei gas respiratori attraverso l’epitelio alveolare

La funzione principale del polmone, lo scambio dei gas respiratori, avviene attraverso la parete alveolare, definita anche membrana alveolo-capillare. Il movimento di ossigeno (O₂) e anidride carbonica (CO₂) tra l’aria alveolare e il sangue che scorre nei capillari polmonari si verifica per diffusione semplice attraverso la parete. La membrana alveolo-capillare è formata da vari strati (Figura 17): il film liquido che riveste la membrana apicale dell’epitelio alveolare, l’epitelio alveolare, la sua membrana basale e l’endotelio capillare. Inoltre, per entrambi i gas, trasportati prevalentemente all’interno dei globuli rossi, il percorso diffusionale prevede anche l’attraversamento della membrana eritrocitaria e dello strato di plasma che la separa dall’endotelio. In condizioni fisiologiche lo spessore dell’intera membrana è molto piccolo, dell’ordine del µm.

La velocità di diffusione (V) di ciascuno dei due gas dipende dal gradiente di pressione parziale per il gas tra i due ambienti, dalla superficie e dallo spessore della membrana attraverso cui avviene la diffusione, oltre che da fattori propri del gas (coefficiente di diffusione e coefficiente di solubilità). Il tutto è espresso dalla seguente equazione, che esprime l’applicazione al flusso diffusionale di un gas della legge di Fick:

$$V = \Delta P D \alpha A / x$$

dove ΔP : gradiente di pressione parziale (proporzionale a ΔC),

D: coefficiente di diffusione ($= RT / N_6 \pi \eta r$),

α : solubilità,

A: area di scambio,

x: spessore della barriera

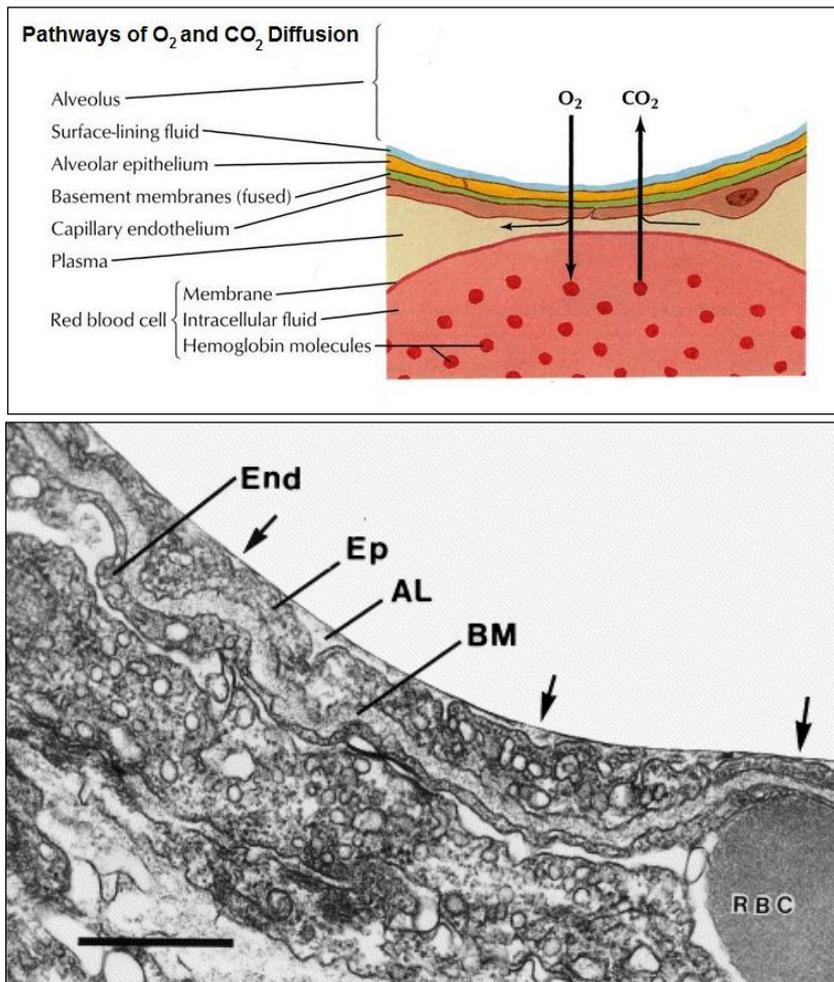


Figura 17. Membrana alveolo-capillare e diffusione dei gas respiratori. In alto: rappresentazione schematica della membrana alveolo-capillare e dei flussi di ossigeno e anidride carbonica (freccie). In basso: microfotografia rappresentante la reale struttura della membrana. Freccie: superficie del liquido alveolare; AL: liquido alveolare; Ep: cellula epiteliale alveolare; BM, membrana basale; End: cellula endoteliale; RBC, globuli rossi. Barra: 1 μm .

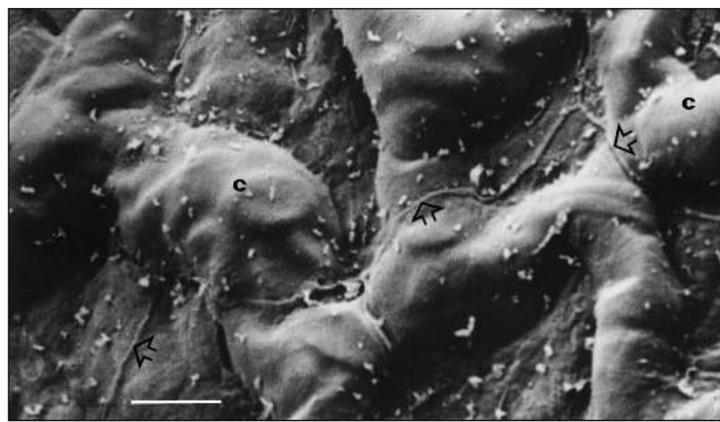


Figura 18. Le pareti dei capillari (c) della parete alveolare sporgono all'interno degli spazi alveolari. Le frecce indicano le giunzioni cellulari tra le cellule alveolari di tipo I. Barra 10 μm .

Nel polmone normale il rapporto A/x , che esprime le caratteristiche geometriche della membrana, è tale da favorire un'elevata velocità di diffusione per i gas: come si è già ricordato, l'area di scambio è estremamente ampia, e lo spessore della membrana assai limitato. L'area, inoltre, è amplificata dallo sporgere delle pareti dei capillari sanguigni dalla superficie alveolare verso l'interno delle cavità aeree (Figura 18).

Nell'aria atmosferica la pressione parziale di ossigeno (P_{O_2}) è pari a circa 160 mmHg e quella dell'anidride carbonica (P_{CO_2}) a 0,23 mmHg. Passando attraverso la zona di conduzione delle vie respiratorie l'aria inspirata viene umidificata e subisce un parziale rimescolamento con l'aria dello spazio morto (che ha già subito gli scambi dei gas). Quindi, le pressioni parziali dei gas contenuti nell'aria alveolare risultano modificate: P_{O_2} è 100 mmHg e P_{CO_2} è 40 mmHg. Il sangue che entra nei capillari polmonari è deossigenato, con P_{O_2} pari a 40 mmHg e P_{CO_2} pari a 46 mmHg. Mentre il sangue deossigenato scorre nei capillari alveolari, l'ossigeno e l'anidride carbonica si muovono seguendo i rispettivi gradienti di pressione parziale: l'ossigeno diffonde dall'aria al sangue, l'anidride carbonica dal sangue verso gli alveoli (Figura 17). Il processo di diffusione continua fino a quando non viene raggiunto un equilibrio, per cui il sangue che lascia i capillari per entrare nelle vene polmonari ha P_{O_2} di 100 mmHg e P_{CO_2} di 40 mmHg. L'equilibrio viene raggiunto molto velocemente; sono sufficienti circa 0,25 secondi, corrispondenti al tempo impiegato dal sangue a percorrere circa un terzo della lunghezza dei capillari. Questa rapidità dello scambio dei gas è importante in quanto fornisce un margine di sicurezza alla diffusione, poiché l'equilibrio dei gas può venire raggiunto anche nel caso in cui il sangue scorra ad una velocità tre volte superiore alla norma (come avviene, per esempio durante attività fisica intensa).

Se lo spessore della membrana alveolo-capillare aumenta, aumenta la distanza di diffusione e gli scambi di gas risultano più lenti. Se l'aumento di spessore è particolarmente marcato, può accadere che l'intero tempo di percorrenza del capillare alveolare da parte del sangue sia insufficiente per il raggiungimento dell'equilibrio. In queste condizioni, il sangue che lascia il capillare è ancora parzialmente deossigenato e contiene un eccesso di anidride carbonica. Poiché, come si è visto, il film liquido alveolare è un componente della membrana, l'eventuale accumulo di un eccesso di liquido sulla superficie alveolare aumenta lo spessore della membrana alveolo capillare, e riduce l'efficienza degli scambi gassosi. Per questo motivo, è necessario che il volume del liquido alveolare sia finemente regolato in modo da essere mantenuto al normale

valore. La regolazione del volume del liquido alveolare è basata sulla regolazione dei meccanismi di trasporto di soluti e acqua attraverso l'epitelio alveolare.

1.3.8 Ruolo delle cellule epiteliali alveolari nel trasporto di soluti e acqua

L'epitelio alveolare è responsabile del controllo del volume e della composizione del liquido alveolare. Nell'ambito di questa funzione riveste un duplice ruolo: da un lato costituisce una barriera fortemente selettiva tra lo spazio alveolare e il comparto interstiziale, dall'altro attua un trasporto vettoriale transepiteliale di soluti e acqua.

La bassa permeabilità della barriera epiteliale alveolare è stata dimostrata da lungo tempo: tra le cellule alveolari sono presenti tight junctions altamente selettive (Figura 19), inoltre i valori del coefficiente di permeabilità diffusionale del monostrato epiteliale ai piccoli soluti sono dell'ordine dei 10^{-8} cm/s (per esempio, quello al saccarosio è compreso tra 2 e 5×10^{-8} cm/s secondo i diversi studi; Wangesteen, 1994).

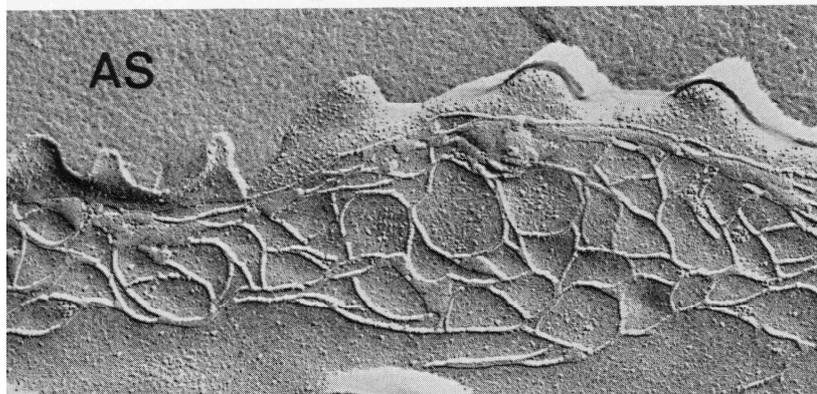


Figura 19. Immagine di tight junction tra cellule epiteliali alveolari di pecora viste in sezione trasversale (tecnica di freeze-fracture). E' evidente il fitto reticolo di strands giunzionali (x 48000). AS, spazio aereo alveolare (Scheeberger et al., 1978).

Studi in vivo e su polmoni isolati hanno dimostrato che un fluido somministrato per via intratracheale può essere trasportato dallo spazio alveolare a quello interstiziale del polmone (Matthay et al., 1982; Goodmann et al., 1987); il trasporto di fluido è inibito sia in presenza di amiloride (inibitore dei canali del sodio) nello spazio alveolare, sia in presenza di ouabaina (inibitore della ATPasi Na^+/K^+) nel letto vascolare (Olivera et al., 1994). A partire da queste osservazioni è stato possibile concludere che le cellule

dell'epitelio alveolare rappresentano importanti siti di assorbimento di sodio e di liquido nel polmone adulto.

Il fluido riassorbito è essenzialmente rappresentato da una soluzione di NaCl, che attraversa l'epitelio polmonare dal lume alveolare allo spazio interstiziale grazie ad un meccanismo di trasferimento (Figura 20) riconducibile ad un modello già noto in altri epitelii assorbenti. Il riassorbimento è fondato sull'intervento sinergico di tre diversi meccanismi di trasporto: l'ATPasi Na^+/K^+ situata a livello basolaterale, canali per Na^+ e canali per Cl^- localizzati a livello apicale (Dobbs e Johnson, 2007). Secondo questo modello l'intero processo si fonda sull'attività dell'ATPasi Na^+/K^+ basolaterale che estrude attivamente dalla cellula ioni Na^+ , determinando così l'instaurarsi a livello della membrana cellulare di un gradiente elettrochimico per il sodio favorevole al suo ingresso in cellula. Il movimento delle cariche positive dovuto al trasferimento degli ioni Na^+ viene bilanciato da un flusso, sempre in direzione lume-interstizio, di ioni Cl^- che avviene attraverso canali per il Cl^- presenti a livello apicale o, in alternativa, per via intercellulare. Infine, in seguito a questo riassorbimento di osmoliti attraverso l'epitelio alveolare, si realizza un movimento passivo di acqua secondo gradiente osmotico. Come dimostrato recentemente, entrambi i citotipi alveolari sembrano prendere parte al processo di riassorbimento e, contrariamente a quanto si pensava in passato, le cellule alveolari di primo tipo sembrano addirittura contribuire maggiormente rispetto alle ATII. Infatti, anche le ATI contengono microvilli, abbondanti mitocondri e reticolo endoplasmatico liscio e ruvido, tutte strutture compatibili con una funzione di attiva biosintesi. Anche la presenza di canali e trasportatori in queste cellule lascia supporre una loro funzione nel mantenimento del bilancio idrico del polmone: le cellule ATI di ratto in coltura esprimono, come le cellule di secondo tipo, canali cationici ENaC altamente selettivi e non selettivi (HSC e NSC), il canale CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) e canali CNG (cyclic nucleotide gated) (Johnson, 2006). Nelle cellule ATI è presente una quantità di proteine αENaC per mg di proteine totali tre volte superiore rispetto alla quantità presente per mg di proteine totali nelle ATII (Johnson et al., 2002); questo, unito al fatto che le cellule di primo tipo occupano circa il 95 % della superficie alveolare, permette di ipotizzare un loro maggior contributo relativo rispetto alle ATII nel riassorbimento di liquido alveolare.

Infine, entrambi i tipi cellulari, ma in particolar modo le cellule ATII (Gumbleton, 2001), contengono caveolae, strutture di membrana implicate nei processi di endocitosi

e trasporto vescicolare; quest'ultimo contribuisce, anche se in misura ancora ignota, al trasporto di acqua attraverso la parete alveolare.

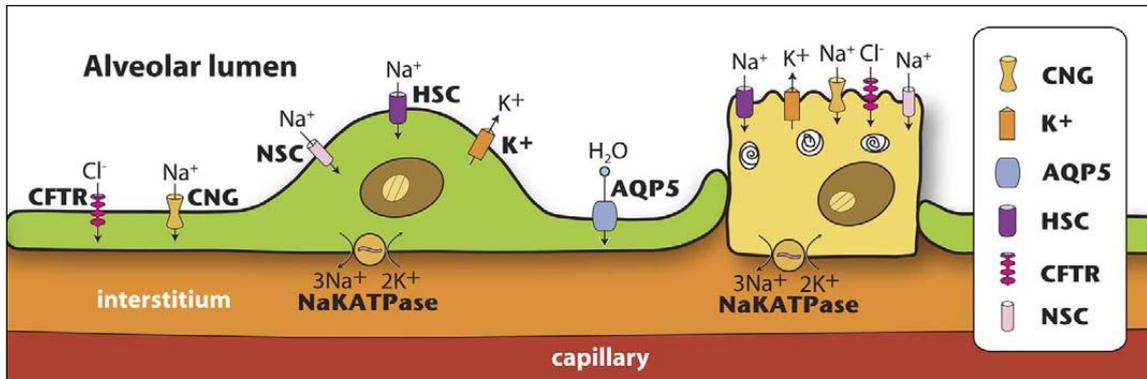


Figura 20. Modello schematico dei sistemi coinvolti nel trasporto di soluti e liquido alveolare nelle cellule di I e II tipo.

Tra le proteine trasportatrici presenti nelle cellule alveolari non è ancora stata documentata la presenza del cotrasportatore Na-glucosio, anche se un trasferimento lume-interstizio di glucosio è stato ipotizzato (*Basset et al., 1987*) e alcuni dati funzionali indicano una sua partecipazione all'assorbimento di liquido alveolare. Nel ratto è stato osservato che l'instillazione polmonare di amiloride, un inibitore dei canali epiteliali per il sodio, azzerava il riassorbimento di liquido alveolare in assenza di glucosio, mentre lo riduce soltanto di circa 2/3 se è presente glucosio nella soluzione instillata. Un azzeramento del trasporto da parte dell'amiloride si osserva anche in contemporanea presenza di glucosio e florizina, un tipico inibitore del cotrasportatore Na⁺-glucosio. Inoltre, la concentrazione di glucosio nell'instillato diminuisce in modo evidente in assenza di florizina, mentre non subisce rilevanti modificazioni in presenza di tale bloccante. Nel loro insieme questi dati indicano che a livello dell'epitelio alveolare sarebbe presente anche il cotrasportatore Na⁺-glucosio e che questo carrier, mediando il riassorbimento del glucosio dal lume alveolare (Figura 21), potrebbe contribuire alla rimozione del liquido e al mantenimento in esso di bassi livelli di concentrazione di glucosio (*Basset et al., 1987*). La possibilità di mantenere una ridotta concentrazione luminale di glucosio sarebbe molto importante, giacché risulterebbe utile nel contrastare la proliferazione di batteri eventualmente presenti a livello alveolare (*Strang, 1991; Baker et al., 2006*).

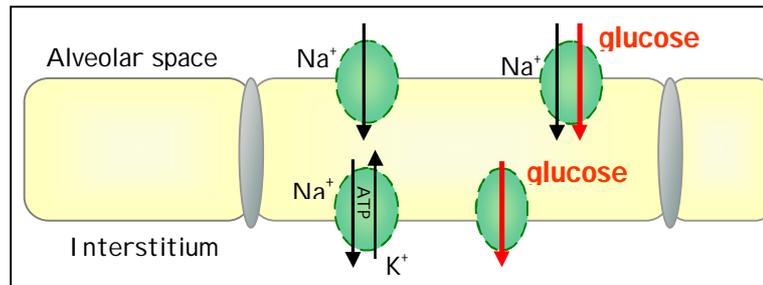


Figura 21. Modello schematico della funzione di SGLT1 nell'epitelio alveolare, che ipotizza un ruolo del cotrasportatore nel riassorbimento di sodio e glucosio dal lume alveolare.

D'altra parte, anche gli autori che sostengono la presenza del cotrasportatore Na^+ -glucosio nell'epitelio alveolare polmonare hanno finora ritenuto che esso fosse presente soltanto nelle cellule ATII, tanto che è stato ipotizzato che una parte del glucosio introdotto in cellula potesse essere utilizzato per la sintesi di surfattante (*Berthiaume et al., 1988*). L'assenza del trasportatore nelle cellule ATI, che ricoprono il 95 % della superficie assorbente dell'alveolo, limiterebbe notevolmente il suo contributo all'assorbimento di liquido alveolare.

1.3.9 Regolazione del trasporto di soluti nell'alveolo polmonare

E' noto che molti ormoni e mediatori chimici, in seguito all'interazione con specifici recettori di membrana, sono in grado di modulare i trasporti di soluti ed acqua che si realizzano a livello di epitelii diversi. Nell'apparato respiratorio è stato osservato che il riassorbimento di osmoliti ed acqua è regolato da sistemi recettoriali, ormoni e altri ligandi:

1. recettori purinergici. Dati sperimentali dimostrano che un aumento anche minimo della concentrazione extracellulare di ATP induce una riduzione dell'assorbimento di ioni Na^+ ed un aumento della secrezione di ioni Cl^- , con conseguente spostamento di fluido (*Lazarowski et al., 2004; Schwiebert e Zsembery, 2003*). Lo stesso processo viene innescato da un aumento della concentrazione extracellulare di adenosina, in seguito alla sua interazione con l'isoforma A_{2A} del recettore purinergico (*Button et al., 2007*);
2. recettori β -adrenergici. Nel sistema respiratorio, oltre a regolare il tono della muscolatura liscia delle vie aeree, intervengono in svariati processi: l'attività dei macrofagi alveolari, di cui riducono la motilità, la secrezione di surfattante da parte delle cellule alveolari di tipo II (*Kumar et al., 2000*) e il riassorbimento di

osmoliti ed acqua in diversi distretti dell'apparato. È stato riportato che gli agonisti dei recettori β -adrenergici sono in grado di stimolare i trasporti attivi di soluti a livello del mesotelio pleurico (*Zocchi e Agostoni, 1994*), dell'epitelio tracheale (*Al-Bazzaz e Cheng, 1979*) e di quello polmonare (*Saumon et al., 1987*), intervenendo così nel controllo omeostatico del volume di liquido presente nel cavo pleurico, sulla superficie delle vie aeree e degli alveoli;

3. recettori dopaminergici. La dopamina, un precursore delle catecolamine adrenalina e noradrenalina, stimola la clearance dell'edema polmonare in polmoni di ratti adulti (*Ridge et al., 2002*) modulando l'espressione dell'ATPasi Na^+/K^+ ;
4. ormoni. La stimolazione con glucocorticoidi determina un aumento della trascrizione delle proteine canale ENaC (*Chow et al., 1999*). Si è visto anche che il dexametasone in vivo aumenta i livelli di espressione delle subunità α -, β -, e γ ENaC (*Dagenais et al., 2001*); inoltre, il trattamento con dexametasone determina un aumento dell'espressione delle subunità α_1 - e β_1 - della ATPasi Na^+/K^+ e anche della sua attività di trasporto. Oltre ai glucocorticoidi, il riassorbimento di liquido alveolare è regolato anche da altri ormoni quali progesterone, estradiolo e l'ormone tiroideo 3,3',5-triiodo-tironina (T3) (*Folkesson et al., 2000; Sweezey et al., 1998*)
5. fattori di crescita. Il fattore di crescita KGF (keratinocyte growth factor) somministrato in vivo per via intratracheale causa un aumento della clearance di liquido alveolare in ratto (*Wang et al., 1999*). Anche l'EGF (epidermal growth factor), se instillato nelle vie respiratorie, stimola la rimozione di liquido dal lume alveolare (*Sznajder et al., 1998*). In entrambi i casi, il trattamento con il fattore di crescita sembrerebbe agire a livello dell'ATPasi Na^+/K^+ .

1.4 Cotrasporto Na⁺-glucosio

Crane e colleghi nel 1961 furono i primi ad ipotizzare che i trasporti attivi di soluti potessero sfruttare l'energia potenziale derivante da un gradiente chimico per il sodio attraverso la membrana plasmatica. Inizialmente si concentrarono sul trasporto attivo di glucosio attraverso la membrana apicale dell'epitelio intestinale, che ritenevano fosse guidato da un gradiente di sodio: lo definirono cotrasporto Na⁺-glucosio.

Il cotrasporto Na⁺-glucosio è un meccanismo di trasporto che si ritrova a livello della membrana luminale delle cellule epiteliali polarizzate. Le proteine carrier che mediano questo tipo di trasporto sono espresse soprattutto negli epitelii coinvolti nell'omeostasi dell'organismo (intestino, rene) dove risultano fondamentali per l'approvvigionamento corporeo di glucosio e, poiché il trasporto di sodio e glucosio mediato da questo meccanismo è accompagnato da assorbimento di acqua, per il riassorbimento dell'acqua temporaneamente uscita dal circolo (con le secrezioni digestive e per filtrazione glomerulare). Nelle cellule non polarizzate e sulla membrana basolaterale delle cellule polarizzate, l'apporto di glucosio è invece assicurato da un trasporto passivo facilitato Na⁺-indipendente.

Dal punto di vista molecolare il cotrasportatore Na⁺-glucosio si identifica con la proteina denominata SGLT (Sodium Glucose Liquid Transporter), di cui esistono diverse isoforme. L'isoforma SGLT1 risulta essere la più ampiamente diffusa, essendo espressa sia nell'epitelio intestinale (dove è responsabile dell'assorbimento di glucosio e galattosio dal lume), sia in tessuti di organi diversi quali trachea, prostata, cuore, mesotelio peritoneale e mesotelio pleurico di animali a pleura sottile (*Wright e Turk, 2003; Schröppel et al., 1998, Sironi et al., 2007*). Il cDNA di SGLT1 fu clonato per la prima volta da Wright e collaboratori, che riuscirono a far esprimere il trasportatore, isolato dalla mucosa intestinale di coniglio, in oociti di *Xenopus Laevis* (*Hediger et al., 1987*).

1.4.1 Famiglia genica SLC5

La proteina SGLT1 appartiene alla famiglia genica SLC5 (solute carrier) di cui fanno parte oltre 220 membri presenti in cellule animali o batteriche, dei quali 11 (Tabella 1) sono stati riconosciuti nel genoma umano e sono espressi in diversi tessuti come l'intestino tenue, il rene, il cervello, il tessuto muscolare e la tiroide. Essi codificano per numerose proteine, che comprendono le isoforme da 1 a 6 di SGLT, SMIT (Na⁺-

myoinositol transporter), SMVT (Na⁺-multivitamin transporter), CHT (choline transporter), AIT (apical iodide transporter) e NIS (Na⁺-iodide transporter).

Nome del gene	Nome della proteina	Substrati predominanti	Tipo di trasporto/ione accoppiato	Distribuzione tissutale
SLC5A1	SGLT1	Glucosio e galattosio (urea e acqua)	C/Na ⁺ , F/Na ⁺ (H ⁺) Canale: urea e acqua	Intestino tenue > trachea, rene e cuore
SLC5A2	SGLT2	Glucosio	C/Na ⁺	Corteccia renale
SLC5A3	SMIT	Mioinositolo (glucosio)	C/Na ⁺	Cervello, cuore, rene e polmone
SLC5A4	SGLT3	Na ⁺ (H ⁺)	Canale Na ⁺ (H ⁺) attivato da glucosio	Intestino tenue (neuroni colinergici), muscolatura scheletrica, rene, utero e testicoli
SLC5A5	NIS	I ⁻ (ClO ₄ ⁻ , SCN ⁻ , NO ₃ ⁻ , Br ⁻)	C/Na ⁺	Tiroide, colon e ovaie
SLC5A6	SMVT	Biotina, lipoato e pantotenato	C/Na ⁺ , F/Na ⁺ Canale: urea e acqua	Cervello, cuore, rene, polmone e placenta
SLC5A7	CHT	Colina	C/Na ⁺ /Cl ⁻	Midollo spinale e midollo allungato
SLC5A8	SGLT4			Intestino tenue, rene, fegato, polmone e cervello
SLC5A9	SGLT5			Rene
SLC5A10	SGLT6	Mioinositolo, chiroinositolo, glucosio e xilosio	C/Na ⁺	Intestino tenue, cervello, rene, fegato, cuore e polmone
SLC5A11	AIT	Ioduro		Tiroide

Tabella 1. Geni della famiglia SLC5 appartenenti al genoma umano.
C = cotrasporto, F = uniporto.

Pur essendo omologhi per il 21-70 % rispetto all'isoforma SGLT1, i geni presentano differenze strutturali; in otto dei dieci geni mappati (SGLT1-SGLT6, AIT, NIS) la sequenza codificante è stata trovata in 14-15 esoni (*Dunham et al., 1999; Roll et al., 2002; Smanik et al., 1997*), mentre per il trasportatore CHT gli esoni sono 8 e per il trasportatore SMIT ce n'è uno solo (*Mallee et al., 1997; Okuda et al., 2001*). Dagli studi di espressione di queste proteine è risultato che tutte (tranne SGLT3) svolgono molteplici attività di trasporto (*Wright e Turk, 2003; Wright et al., 2004*) quali funzioni di uniporto (per il glucosio), di canali (per l'acqua e per piccoli soluti, come l'urea) e di cotrasporto (sia per l'urea che per l'acqua).

SGLT2 è un trasportatore per il glucosio a bassa affinità (*Kanai et al., 1994*) espresso prevalentemente nella corteccia renale, a livello della membrana apicale dei segmenti S1 e S2 del tubulo prossimale, dove sembra essere responsabile del riassorbimento di glucosio dal filtrato glomerulare (*Wright, 2001*); è espresso anche nel sistema nervoso e nel fegato (*Wright et al., 2004*). Mutazioni nel gene che codifica per SGLT2 possono causare una patologia chiamata glicosuria renale famigliare.

SGLT3 si ritrova in diversi tessuti tra i quali il sistema nervoso autonomo intestinale, i muscoli scheletrici e l'encefalo. Nell'uomo si è visto che SGLT3 non si comporta da trasportatore ma da sensore del glucosio; funziona da glucosensore poiché, in seguito al legame con il glucosio, genera una corrente entrante di Na^+ che depolarizza la membrana dando il via ad una cascata di segnali (*Wright et al., 2004*).

SGLT4 e SGLT5 sono poco conosciuti dal punto di vista funzionale; SGLT4 sembra essere largamente diffuso in tutto l'organismo mentre l'espressione di SGLT5 è circoscritta al rene.

SGLT6 (detto anche SMIT2), così come SGLT4, è ampiamente espresso (*Coady et al., 2002; Nagata et al., 1999*); nell'intestino tenue risulta essere un trasportatore di glucosio a bassa affinità, mentre nell'encefalo e nel rene permette l'accumulo di inositolo.

SMIT è un cotrasportatore Na^+ -mioinositolo ampiamente espresso in encefalo, cuore, rene e polmone (*Berry et al., 1995*).

AIT e NIS si ritrovano prevalentemente a livello tiroideo, rispettivamente sulla membrana apicale e su quella basolaterale, dove NIS attuerebbe un cotrasporto Na^+ -iodio utile all'accumulo cellulare di iodio per la sintesi degli ormoni T_3 e T_4 (*De La Vieja et al., 2001; Rodriguez et al., 2002; Van Sande et al., 2003*).

SMVT è molto diffuso nel cervello, nel cuore, nel rene, nel polmone e nella placenta; sembrerebbe mediare un cotrasporto Na^+ -multivitamine, anche se gli aspetti funzionali sono poco conosciuti. Infine, CHT è un cotrasportatore Na^+ -colina espresso nel sistema nervoso centrale (*Okuda e Haga, 2001*).

Gli 11 geni umani codificano tutti per proteine il cui peso molecolare varia tra 60 e 80 kDa, con un numero di residui aminoacidici compreso tra 580 e 718. L'analisi della struttura secondaria suggerisce la presenza di 14 eliche transmembrana in tutte le proteine escluse NIS e AIT, nelle quali la quattordicesima elica è assente. Il loop idrofilico N-terminale è localizzato sul lato extracellulare della membrana e possiede un numero variabile di siti di glicosilazione, una modificazione post-traduzionale non necessaria per l'attività dei trasportatori (*Wright et al., 1997*).

Indipendentemente dalla famiglia d'appartenenza, tutti i cotrasportatori sembrano lavorare nello stesso modo, cioè secondo un modello d'accesso alternato in cui la direzione e la velocità del trasporto dipendono dalla concentrazione del ligando su ciascun lato della membrana e dalla differenza di potenziale elettrico transmembrana. Il trasporto avviene in modo ordinato ed il massimo turnover dei trasportatori oscilla tra 1 e 100 cicli s^{-1} a temperatura ambiente (*Wright e Turk, 2003*).

1.4.2 SGLT1

Struttura

Nell'uomo il gene codificante per questo trasportatore è localizzato sul cromosoma 22 (22q12.3) e codifica per una proteina di membrana di 73 kDa, costituita da 664 aminoacidi organizzati in 14 α -eliche (*Turk et al., 1996*), con le estremità carbossi- ed amino-terminale che si affacciano sul lato extracellulare della membrana plasmatica (Figura 22). Il modello relativo alla struttura secondaria è stato ipotizzato considerando i dati derivanti da studi di glicosilazione, tag con anticorpi, spettrometria di massa e altre metodologie (*Wright e Turk, 2003*).

Le ultime 5 eliche transmembrana della proteina (TM10-14) costituiscono il cosiddetto dominio C₅ e sono coinvolte nella traslocazione dello zucchero. L'overespressione in oociti di *Xenopus* della proteina umana tronca, costituita dal solo dominio C₅, dimostra che il carrier si comporta come uniporto di glucosio. Durante il legame e la traslocazione dello zucchero, la Gln⁴⁵⁷ sul TM 11 interagisce con l'ossigeno del carbonio 1 idrossilico e l'anello di piranosio del D-glucosio (*Diez-Sampedro et al.,*

2001). Wright (*Wright et al., 2004*) ha ipotizzato l'esistenza di due siti di legame per lo zucchero nel dominio C₅ dello SGLT1: uno sul lato esterno della membrana, ad alta affinità, l'altro sul lato interno, a minore affinità. I residui aminoacidici di questi siti di legame risultano conservati nei diversi cotrasportatori Na⁺-zucchero.

Come la maggior parte delle proteine che sono in grado di legare uno zucchero, SGLT1 possiede un'estesa rete di legami idrogeno tra i residui polari dello zucchero e le catene polari dei residui che costituiscono il sito di legame; inoltre sono presenti anche altre interazioni, tra residui aromatici e le porzioni apolari dell'anello di piranosio dello zucchero (*Quioco, 1986*).

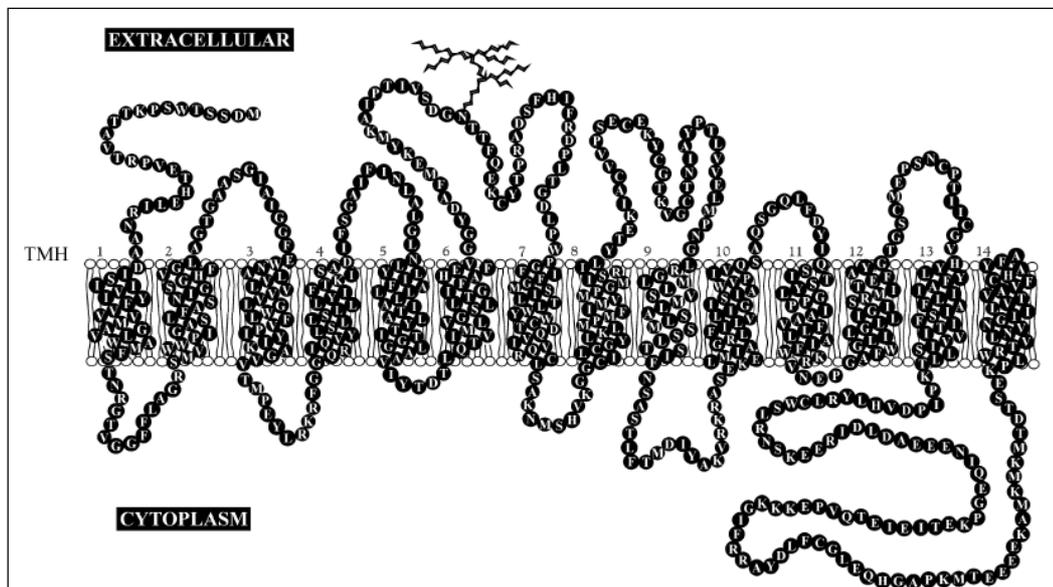


Figura 22. Modello molecolare del cotrasportatore Na⁺-glucosio.

SGLT1 presenta sul loop idrofilico extracellulare tra i domini transmembrana 6 e 7 un sito consenso per la glicosilazione; a differenza di GLUT1, la glicosilazione non è necessaria per l'attività di cotrasporto (*Wright e Turk, 2003*). A livello dei loop intracellulari sono invece presenti siti di fosforilazione ad opera della PKA (Ser⁴¹⁸) e della PKC (5 siti in uomo e ratto, 4 in coniglio).

Funzione

I substrati naturali per SGLT1 sono glucosio e galattosio, con affinità apparente (K_{0.5}) pari a circa 0,5 mM. Come già accennato, in condizioni fisiologiche SGLT1 media il cotrasporto Na⁺-glucosio, un trasporto attivo secondario che sfrutta il gradiente

elettrochimico del sodio per cotrasportare glucosio anche contro gradiente, permettendo così un accumulo dello zucchero all'interno della cellula. Questo è possibile perché, grazie all'ATPasi Na^+/K^+ presente sulla membrana basolaterale, lo ione Na^+ all'interno della cellula viene mantenuto a basse concentrazioni. Tuttavia, il cotrasporto potrebbe essere reversibile, essendo la direzione del trasporto dipendente proprio dalla direzione dei gradienti di potenziale elettrochimico delle molecole coinvolte. Bloccante specifico di questo trasporto è la florizina, un glucoside che agisce da inibitore competitivo ad alta affinità ($K_i \sim 0.2 \mu\text{M}$).

Molti studi riguardanti le caratteristiche funzionali di SGLT1 sono stati condotti utilizzando oociti di *Xenopus Laevis* iniettati con il cRNA di SGLT1; un esempio è il lavoro di *Lostao* e colleghi del 1994 (Figura 23). Essi hanno condotto esperimenti di voltage clamp a due elettrodi su oociti di *Xenopus*; il potenziale di membrana veniva mantenuto a -100 mV e venivano registrate le correnti di membrana in diverse condizioni sperimentali. L'aggiunta di glucosio 5 mM nella soluzione extracellulare provocava un immediato aumento della corrente entrante; tale effetto scompariva se veniva aggiunta florizina $100 \mu\text{M}$. La florizina riduceva la corrente al di sotto dei valori di base anche in assenza di glucosio; inoltre, né il glucosio né la florizina alteravano la corrente negli oociti di controllo.

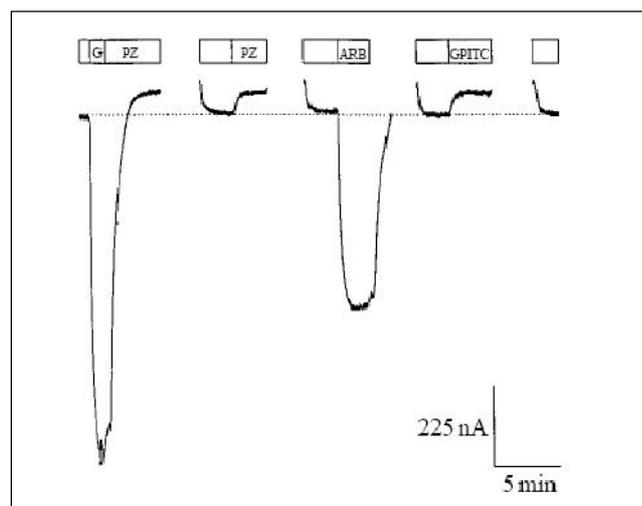


Figura 23. Corrente registrata in un oocita esprimente SGLT1; il voltaggio veniva mantenuto a -100 mV e la corrente veniva misurata in presenza e in assenza di glucosio 5 mM e/o florizina $100 \mu\text{M}$. G = D-glucosio; PZ = florizina; ARB = arbutina; GPITC = glucosiofenilisotiocianato (*Lostao et al., 1994*).

Per quanto riguarda la cinetica e la selettività di SGLT1, da studi di espressione in oociti e dalla ricostituzione in proteoliposomi di proteine ricombinanti purificate (Loo, 2001; Quick e Wright, 2002; Quick et al., 2003; Turk et al., 2000; Wright, 2001) è emerso che esso mostra una cinetica asimmetrica, dal momento che l'apparente affinità per il ligando è marcatamente diversa per il trasporto in una direzione rispetto a quella opposta. SGLT1, inoltre, si comporta come un trasportatore ad accoppiamento stretto per cui due ioni Na^+ sono trasportati simultaneamente ad una molecola di zucchero, determinando così la nota stechiometria di trasporto 2:1. Tuttavia, sebbene normalmente il cotrasporto sia guidato da Na^+ , anche i protoni sono in grado di mediare il trasporto dello zucchero; l'affinità apparente per i protoni risulta essere 500 volte maggiore di quella del sodio ($K_{0,5}=0.007$ vs. 4 mM), ma l'affinità apparente per lo zucchero risulta 25 volte più bassa per un cotrasporto H^+ -zucchero rispetto ad un cotrasporto Na^+ -zucchero (Hirayama et al., 1994).

Il cotrasportatore esiste in due possibili conformazioni spaziali, $[\text{C}]'$ e $[\text{C}]''$, con il sito di legame per il ligando rivolto rispettivamente verso il lato extra- o intracellulare. In condizioni fisiologiche, il potenziale di membrana favorisce la conformazione $[\text{C}]'$ e l'elevata concentrazione extracellulare di ioni sodio promuove il legame di due Na^+ per formare il complesso $[\text{CNa}_2]'$; il legame degli ioni Na^+ determina un cambiamento conformazionale del cotrasportatore, che aumenta la sua affinità per il glucosio ed è quindi in grado di legare una molecola di zucchero, passando così allo stato conformazionale $[\text{SCNa}_2]'$. Si verifica a questo punto un ulteriore cambiamento conformazionale ($[\text{SCNa}_2]''$), nel quale i ligandi si ritrovano rivolti verso il lato intracellulare. Lo zucchero e gli ioni sodio si dissociano dal cotrasportatore e diffondono nell'ambiente intracellulare; il cotrasportatore passa così allo stato $[\text{C}]''$ ma ritorna poi rapidamente alla conformazione $[\text{C}]'$, con i siti di legame verso il lato extracellulare (Figura 24). Si stima che a 37°C si ripetano circa 1000 cicli s^{-1} .

In assenza di zucchero, SGLT1 (come gli altri membri della famiglia) si comporta da uniporto, trasportando ioni Na^+ con una velocità di trasporto che varia dall'8 al 34 % della velocità massima del cotrasporto. Tale trasporto risulta anch'esso bloccato dalla florizina e segue una cinetica di saturazione, con una $K_{0,5}$ pari 4 mM ed un coefficiente di Hill pari a 2 (Loo et al., 1999).

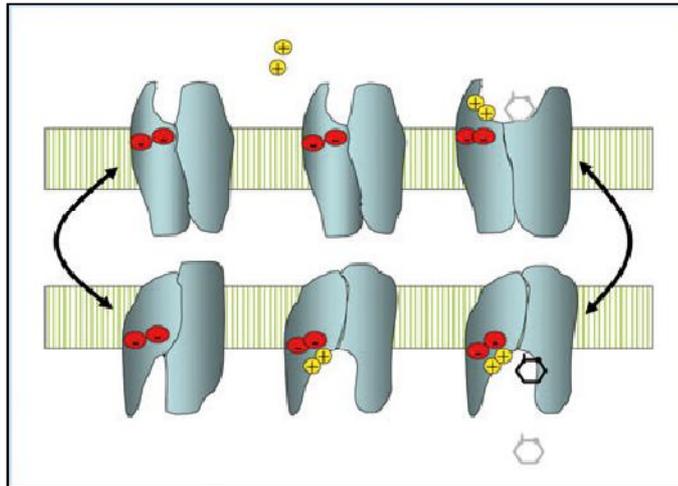


Figura 24. Modello di funzionamento del cotrasportatore Na^+ -glucosio.

SGLT1, quando espresso in oociti, si comporta inoltre da canale per l'acqua e per piccoli soluti idrofilici; anche in questo caso la florizina funziona da inibitore. Questa ipotesi è sostenuta anche da *Loo e collaboratori*, che nel 2002 hanno dimostrato come l'attivazione del cotrasporto (in seguito all'aggiunta di zucchero) inneschi anche un immediato uptake d'acqua. La relazione stechiometrica risulterebbe essere $2 \text{Na}^+ : 1 \text{glucosio} : \sim 260$ molecole d'acqua. Il trasporto accoppiato di acqua sembra essere indipendente dal gradiente osmotico e in grado di avvenire anche contro gradiente. Esistono diversi modelli che cercano di spiegare a livello molecolare in che modo si verifichi il trasporto di acqua associato a quello di glucosio e sodio; al momento la questione è ancora molto dibattuta ed esistono pareri discordanti a riguardo.

1.4.3 Regolazione del cotrasporto Na^+ -glucosio

Il cotrasporto Na^+ -glucosio può essere regolato da numerosi fattori quali ormoni, secondi messaggeri, attivatori o inibitori di proteine chinasi e anche dai livelli stessi di glucosio. SGLT1, così come anche altri carrier di membrana, viene generalmente regolato attraverso due differenti processi: la modulazione dell'attività del trasportatore stesso oppure la modificazione del numero di proteine trasportatrici presenti in membrana.

È stato osservato che processi di fosforilazione di siti specifici presenti nella struttura proteica del cotrasportatore ad opera di PKA e PKC sono in grado di modularne l'attività di trasporto. In particolare la fosforilazione ad opera della PKA provoca un aumento della V_{max} del cotrasporto del 27% circa; analogamente la fosforilazione

mediata dalla PKC provoca un aumento del 40% in uomo, mentre in ratto e coniglio induce una rapida riduzione del 62% circa (*Ishikawa et al., 1997*). Secondo studi condotti su intestino di ratto e ruminanti di pecora, questi stessi processi di fosforilazione sarebbero coinvolti anche nel determinare l'incremento dell'assorbimento di glucosio mediato da SGLT1 in seguito a stimolazione beta-adrenergica (*Ishikawa et al., 1997; Aschenbach et al., 2002*). In particolare, in seguito a stimolazione dei recettori β_2 AR con terbutalina è stato osservato sia un incremento florizina-sensibile dell'assorbimento di glucosio, sia un aumento dell'espressione in membrana di SGLT1. L'osservazione che entrambi questi effetti venivano annullati in seguito all'inibizione della PKA con il bloccante specifico H89 (*Aschenbach et al., 2002*), ha portato alla conclusione che la regolazione positiva di SGLT1 indotta da β_2 -agonisti sarebbe determinata (in seguito alla stimolazione β_2 -dipendente dell'adenilato ciclasi e all'aumento dei livelli citoplasmatici di cAMP) dall'attivazione della PKA, con conseguente fosforilazione del carrier e aumento della sua densità a livello del plasmalemma.

Esperimenti effettuati da *Kipp* e colleghi (*2003*) utilizzando cellule Caco-2 hanno dimostrato la presenza di un pool intracellulare di SGLT1, confinato in vescicole associate a microtubuli. Studi successivi (*Khoursandi et al., 2004*) hanno permesso di identificare queste vescicole, che sono risultate essere degli endosomi. È stato così ipotizzato che il cotrasportatore SGLT1 apicale possa inattivarsi ed andare incontro a fenomeni di endocitosi; il pool endosomiale di SGLT1, a sua volta, può essere attivato e tornare in membrana.

1.4.4 Patologie correlate a mutazioni di SGLT1

La patologia principale associata a SGLT1 è la GGM (glucose-galactose malabsorption), una malattia ereditaria caratterizzata dall'incapacità degli enterociti di trasportare all'interno della cellula glucosio e galattosio (*Melin et al., 1969*). I neonati affetti presentano diarrea cronica e disidratazione, sintomi che scompaiono se vengono eliminati dalla dieta il glucosio e il galattosio, mentre il fruttosio sembra non avere effetto. Studi in vitro (*Schneider et al., 1966; Stirling et al., 1972*) hanno evidenziato che le cellule epiteliali derivanti da pazienti non sono in grado di accumulare galattosio; inoltre in pazienti GGM è stata osservata una riduzione del legame della florizina alla membrana apicale dell'intestino tenue. Questi dati, insieme ad informazioni derivanti da altri studi, hanno dimostrato che alla base della GGM esiste un difetto nel trasporto

attivo di glucosio e galattosio, ma non di fruttosio; la proteina coinvolta sembra proprio essere quindi SGLT1, che ha appunto come unici substrati il glucosio e il galattosio. Studi di tipo biomolecolare hanno permesso di identificare 56 differenti mutazioni di SGLT1 in 82 pazienti appartenenti a 72 diverse famiglie (*Wright et al., 2002*); queste comprendono mutazioni missenso, nonsense, frameshift, in siti di splicing e nel promotore che portano a prodotti tronchi, non funzionali o che non sono in grado di raggiungere la membrana ed inserirsi correttamente.

1.4.5 Ruolo fisiologico del cotrasporto Na⁺-glucosio

SGLT1 è espresso prevalentemente nell'intestino, dove è responsabile del riassorbimento di glucosio e galattosio dal lume intestinale. Il processo di riassorbimento avviene in due fasi; inizialmente SGLT1 sulla membrana apicale degli enterociti permette l'ingresso di glucosio in cellula, sfruttando il gradiente di sodio generato e mantenuto dalla Na⁺/K⁺ ATPasi. Successivamente il glucosio esce dagli enterociti e passa nell'interstizio attraverso il trasportatore facilitato GLUT2. Nell'intestino il riassorbimento di glucosio è di notevole importanza anche perché funziona da stimolo per il riassorbimento di acqua.

A livello renale, di norma quasi tutto il glucosio che viene filtrato nel glomerulo è poi riassorbito nei tubuli contorti prossimali; il meccanismo di riassorbimento è simile a quello intestinale, cioè mediato da un processo attivo sulla membrana apicale e da un trasporto facilitato (passivo) basolaterale. Apicalmente prevale l'isoforma SGLT2 (ma in parte partecipa anche SGLT1) mentre GLUT2 ne permette la fuoriuscita nell'interstizio (*Wright, 2001*). A differenza dell'intestino, nel rene il glucosio gioca un ruolo meno importante nell'assorbimento di acqua attraverso il tubulo prossimale; il cotrasporto Na⁺-glucosio-acqua è responsabile solo del 2% del riassorbimento totale giornaliero di acqua, che ammonta a 150-180 litri.

Studi funzionali in vivo (Figura 25) hanno dimostrato il verificarsi di un riassorbimento netto di glucosio dal cavo pleurico attraverso il mesotelio pleurico. Data la sensibilità alla florizina di questo fenomeno, esso sarebbe mediato da un cotrasporto Na⁺-glucosio, probabilmente presente sulla membrana luminale delle cellule mesoteliali (*Zocchi et al., 1996*). Esperimenti di biologia molecolare (*Sironi et al., 2007*) hanno confermato questa ipotesi negli animali a pleura sottile, rivelando la presenza della proteina SGLT1 sulla membrana apicale delle cellule mesoteliali pleuriche di coniglio.

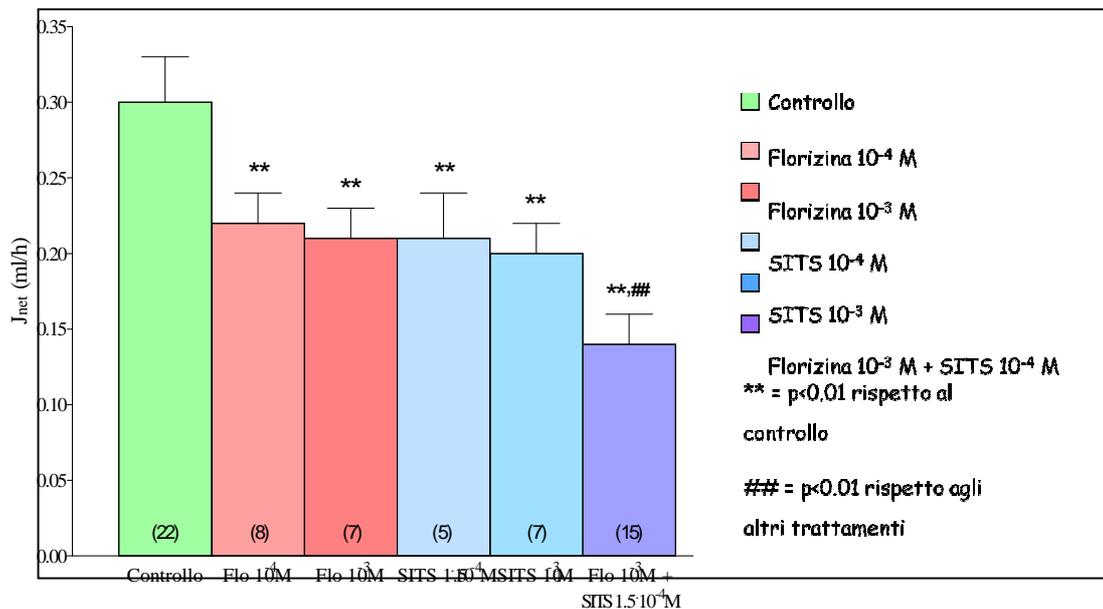


Figura 25. Effetto di alcuni inibitori di trasporti sul riassorbimento di liquido dal cavo pleurico.

SGLT1 sembra avere una funzione anche a livello polmonare dove, mediando il riassorbimento del glucosio dal lume alveolare, potrebbe contribuire alla rimozione del liquido alveolare e al mantenimento di basse concentrazioni di glucosio (*Basset et al., 1987*). La possibilità di mantenere una ridotta concentrazione luminale di glucosio sarebbe molto importante, giacché risulterebbe utile nel contrastare la proliferazione di batteri eventualmente presenti a livello alveolare (*Strang, 1991; Baker et al., 2006*).

Secondo studi autoradiografici condotti su sezioni di polmone di topo e coniglio, il cotrasportatore Na⁺-glucosio non sarebbe presente nelle cellule di tipo I e risulterebbe confinato sulla membrana apicale delle sole cellule alveolari di tipo II (*Boyd, 1990*). Tuttavia, poiché le cellule di tipo II rappresentano circa il 5% della superficie alveolare, rispetto al 95% circa di quelle del tipo I, è evidente che l'espressione di SGLT1 anche in quest'ultimo tipo di cellule garantirebbe un efficiente contributo alla rimozione del liquido e alla riduzione della concentrazione alveolare di glucosio. Per quanto riguarda il ruolo di SGLT1 a livello delle cellule alveolari di tipo II, oltre a contribuire al riassorbimento di liquido e a ridurre la concentrazione alveolare di glucosio, la sua presenza potrebbe anche essere correlata ad una delle funzioni principali di questa popolazione cellulare, la sintesi di surfattante (*Van Golde, 1976*). Tale sintesi infatti richiederebbe una notevole quantità di glucosio, che rappresenta un precursore della

fosfatidilcolina (*Bourbon et al., 1982*), uno dei principali costituenti del tensioattivo. I trasportatori facilitati per il glucosio (presenti in tutti i tipi cellulari) potrebbero non essere sufficienti per soddisfare le richieste di glucosio, non essendo in grado di accumularlo in cellula, al contrario del cotrasportatore Na⁺-glucosio.

1.5 Il recettore β -adrenergico (β AR)

Nell'uomo i recettori β -adrenergici (β AR) sono distribuiti in modo ubiquitario in tutti i tessuti e sono classificati in tre sottogruppi (β_1 , β_2 , β_3) in base alla loro localizzazione e funzione. A livello polmonare il 90% della popolazione dei recettori β -adrenergici si trova sulla superficie degli alveoli e, sebbene coesistano entrambi i sottogruppi β_1 e β_2 , questi ultimi predominano costituendo il 70% della popolazione totale.

1.5.1 Struttura

Il gene codificante per il recettore β_2 AR è localizzato a livello del braccio lungo del cromosoma 5 e codifica per una proteina costituita da 413 aminoacidi, con un peso molecolare di 67 kDa. La struttura di questo recettore (Figura 26) è quella tipica dei recettori associati a proteine G ed è caratterizzata dalla presenza di 7 α -eliche transmembrana (TM), connesse tra loro da 3 loops extracellulari e da altrettanti loops intracellulari. La porzione carbossi-terminale è rivolta verso il lato citoplasmatico della membrana, a differenza della porzione amino-terminale che si trova verso il lato extracellulare. Sebbene tutti i domini TM contribuiscano a formare il sito di binding del ligando, a livello del TM 5 sono stati identificati i residui aminoacidici più importanti nel determinare l'affinità per gli agonisti, che si identificano con gli aminoacidi Asp¹¹³, Ser²⁰⁴ e Ser²⁰⁷. Nella trasduzione del segnale sarebbero invece coinvolti i domini citoplasmatici e in particolare il III loop intracellulare, che risulta fondamentale nel determinare la specificità d'interazione con la proteina G (*Strosberg, 1993*).

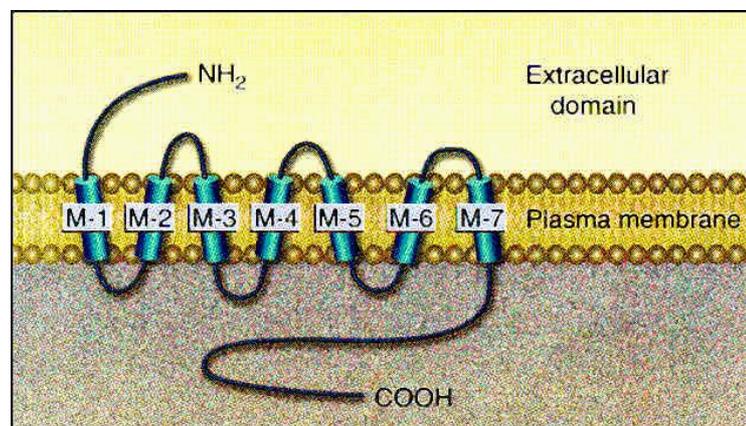


Figura 26. Recettore β_2 AR: modello molecolare.

1.5.2 Funzione

I recettori β_2 adrenergici presenti a livello della membrana plasmatica presentano due differenti conformazioni strutturali, attiva e inattiva, in equilibrio fra loro. Queste due forme del recettore differiscono per la loro abilità di associarsi a proteine G di tipo stimolatorio (Gs), a loro volta in grado di interagire con il GTP. In particolare, il trattamento con β_2 -agonisti (Figura 27) determina lo spostamento dell'equilibrio verso la forma attiva, causando il distacco della guanosina difosfato (GDP) dalla subunità α della proteina Gs ed il conseguente legame con la guanosina trifosfato (GTP). Avvenuto tale legame, la subunità $G\alpha$ si dissocia dal complesso $\beta\gamma$ e, in relazione al suo accoppiamento con l'adenilato ciclasi, ne determina l'attivazione. Complessivamente, quindi, la stimolazione del recettore β_2AR si traduce in un aumento della concentrazione intracellulare del nucleotide ciclico cAMP, che può quindi svolgere la sua funzione di secondo messaggero andando ad attivare la PKA e inibendo il rilascio di Ca^{2+} dai depositi intracellulari (Johnson, 2001). Viceversa, il trattamento con un β_2 -antagonista stabilizza il recettore nella sua forma inattiva (Liggett, 2002) e impedisce l'attivazione della cascata di eventi descritti.

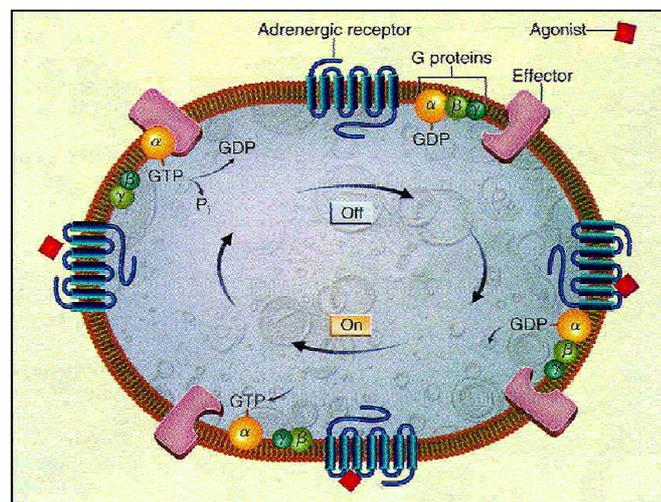


Figura 27. Modello di funzionamento del recettore adrenergico in seguito a stimolazione con agonista.

Come gli altri recettori β -adrenergici, anche l'isoforma β_2 è soggetta a un processo auto regolativo, che si attua mediante desensitizzazione e down-regulation. In seguito alla sua stimolazione e alla conseguente attivazione della PKA, si ha da parte di

quest'ultima la fosforilazione dell'enzima β AR-kinasi, che viene a sua volta attivato e può determinare la fosforilazione di residui di serina e treonina a livello della porzione carbossi-terminale del recettore, che viene così inattivato.

Inoltre, sempre in seguito alla sua attivazione, il recettore può venire fosforilato anche dalla proteina GRK2 (G Protein-coupled Receptor Kinase 2), con conseguente riduzione dell'interazione con la subunità α della proteina G (*Mutlu et al., 2004*). La fosforilazione del recettore ad opera della GRK2 interessa la già citata sequenza (posta a livello della porzione C-terminale) di serine e treonine che, quando fosforilate, rappresentano il sito di legame per l'arrestina. L'interazione con quest'ultima previene la riassociazione del recettore con la proteina G. Essendo in grado di legarsi alla clatrina, l'arrestina può inoltre determinare il reclutamento dei recettori β_2 AR fosforilati in vescicole ricoperte da clatrina, che mediano l'internalizzazione del recettore stesso, la successiva degradazione lisosomiale e, quindi, la sua down-regulation (*Gagnon et al., 1998*). Parallelamente a questo tipo di fenomeno, la fosforilazione dei β_2 AR promuove anche una via inibitoria $G_{i\beta\gamma}$, dalla quale ha inizio una differente cascata di eventi intracellulari con conseguente riduzione dell'attività dell'adenilato ciclasi e l'attivazione di ulteriori proteine chinasi (p44/p42).

1.5.3 Ruolo dei recettori beta adrenergici nell'epitelio alveolare

Le catecolamine endogene ed esogene, legandosi ai β AR, stimolano la rimozione di fluido dalla superficie alveolare; è stato dimostrato che agonisti aspecifici (isoproterenolo, epinefrina, dobutamina) o β_2 -specifici (procaterolo, salmeterolo, terbutalina) potenziano la clearance di fluido alveolare in ratto (*Jayr et al., 1994*), cane (*Berthiaume et al., 1988*), pecora (*Berthiaume et al., 1991*), topo (*Fukuda et al., 2000*) e tessuto polmonare umano (*Sakuma et al., 1997*). Questo si verifica perché i β_2 AR sono in grado di upregolare i canali epiteliali del sodio ENaC, il CFTR e la Na^+/K^+ ATPasi (Figura 28). L'effetto della beta stimolazione è mediato dalla PKA, che fosforila proteine del citoscheletro e promuove il trafficking dei canali ENaC verso la membrana cellulare (*Berdiev et al., 1996*); inoltre la PKA fosforila anche i canali stessi (subunità β e γ). Oltre ad agire sulla traslocazione dal pool intracellulare verso la membrana plasmatica, i beta recettori aumentano anche l'espressione (a livello di mRNA e proteina) della subunità α ENaC (*Minakata et al., 1998*) e l'attività del canale stesso (probabilità e tempo di apertura).

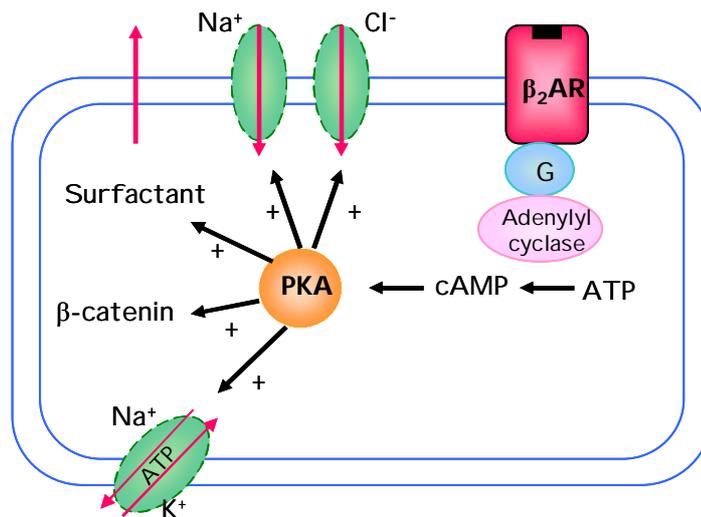


Figura 28. Effetti derivanti dalla stimolazione beta adrenergica in cellule alveolari.

Il trattamento con beta agonisti determina un aumento dell'attività cellulare della Na^+/K^+ ATPasi in vitro e in tessuto polmonare (*Berthiaume et al., 1987*); la regolazione può essere a breve termine, nel caso in cui vengano reclutate proteine già assemblate a partire da compartimenti intracellulari (*Lecuona et al., 2003*), o a lungo termine. La regolazione a tempi lunghi riguarda un potenziamento della trascrizione (*Minakata et al., 1998*) e della traduzione della subunità α della proteina stessa.

I recettori β_2 -adrenergici infine sono anche in grado di upregolare il riassorbimento di cloruro attraverso il canale CFTR (*Mutlu et al., 2005*), probabilmente in seguito all'aumento della concentrazione intracellulare di cAMP che si verifica dopo la stimolazione del recettore.

Non è noto se, nell'epitelio alveolare, il recettore β_2 sia in grado anche di modulare l'attività del cotrasportatore SGLT1; considerando però che nell'intestino di ratto e nell'epitelio del rumine di pecora il trattamento con beta agonisti accelera il riassorbimento di glucosio florizina-sensibile e contemporaneamente aumenta l'espressione della proteina in membrana (Vedi 1.4.3), si potrebbe ipotizzare un'azione simile anche a livello delle cellule alveolari.

1.6 Endocitosi e trafficking intracellulare

La presenza di numerose membrane all'interno della cellula rende possibile la compartimentalizzazione dei diversi processi biochimici che avvengono all'interno di essa, permettendo così l'accumulo di alcune proteine in aree specifiche (facilitando eventuali interazioni) e la creazione di barriere che impediscono la diffusione di sostanze tra lume e citosol. I cambiamenti nella distribuzione, nella composizione lipoproteica e nel contenuto luminale di queste membrane, che si verificano grazie ai continui processi di fissione e fusione esistenti tra questi compartimenti, rivestono un ruolo di notevole importanza nella regolazione di numerosi processi biologici extranucleari.

L'endocitosi consiste nella formazione di nuove membrane interne a partire dal doppio strato fosfolipidico della membrana plasmatica; in questo modo è possibile internalizzare nella cellula lipidi di membrana, proteine integrali e fluido extracellulare (*Doherty e McMahon, 2009*).

1.6.1 Endocitosi

Esistono diverse modalità di endocitosi (Figura 29) che possono essere messe in atto dalle cellule, la più nota delle quali è l'endocitosi clatrina-dipendente (CDE). Il meccanismo attraverso il quale le proteine coinvolte in questo processo vengono reclutate all'interno della cellula è stato molto studiato. Le proteine o le sostanze che devono essere internalizzate si dispongono in particolari aree della membrana plasmatica rivestite da clatrina; queste zone della membrana iniziano ad invaginarsi dando origine a delle "fossette" da cui poi derivano le vescicole, sempre rivestite dalla proteina clatrina (*Sorkin, 2004*). Appena formata, la vescicola perde il rivestimento di clatrina con la formazione di una vescicola non rivestita, che si fonderà successivamente con un endosoma a formare l'endosoma precoce. Nonostante quello clatrina-dipendente sia uno dei meccanismi di endocitosi più importanti della cellula, esistono anche numerose altre vie di ingresso per le sostanze, che vengono globalmente definite come endocitosi clatrina-indipendenti (*Kirkham e Parton, 2005*).

Una via alternativa ad esempio è quella mediata dalle caveolae, altre proteine che, come la clatrina, sono in grado di rivestire alcune aree della membrana plasmatica, dando origine a delle invaginazioni con diametro di 60-80 nm. Le caveolae si ritrovano soprattutto in alcuni citotipi, quali cellule muscolari (muscolatura liscia), cellule

alveolari di tipo I, fibroblasti, adipociti e cellule endoteliali (*Parton e Simons, 2007*).

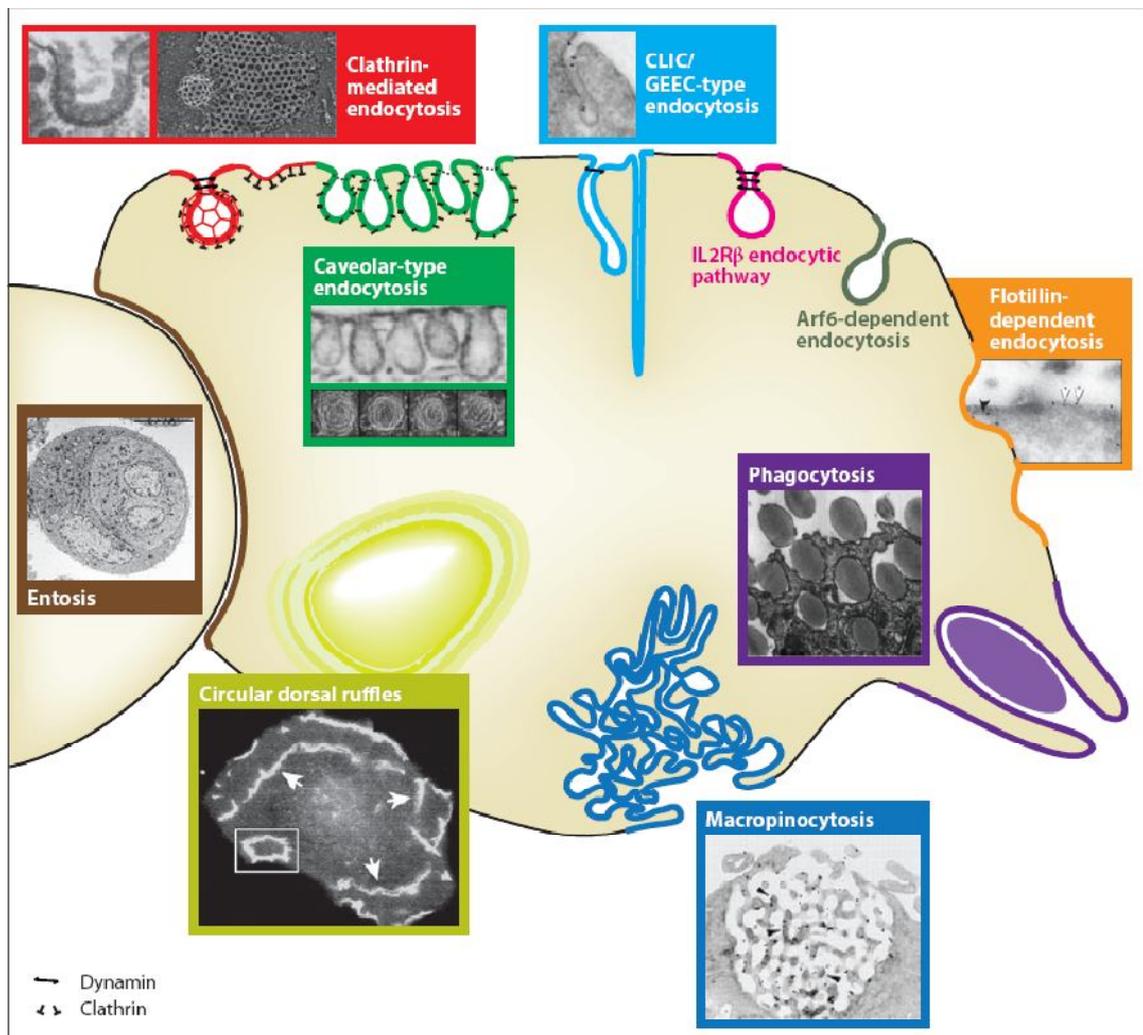


Figura 29. Schema riassuntivo delle diverse vie di endocitosi. Le immagini di microscopia elettronica o a fluorescenza illustrano le caratteristiche morfologiche delle diverse formazioni vescicolari che permettono l'internalizzazione di materiale extracellulare.

L'internalizzazione può avvenire anche in seguito a macropinosi, che rende possibile l'ingresso nel citosol di fluidi; generalmente si verifica a livello di zone di membrana plasmatica particolarmente ricche di inflessioni, che vanno a circondare una regione di fluido extracellulare per poi internalizzarlo.

Un'altra forma di endocitosi è la fagocitosi, che prevede la formazione progressiva di invaginazioni che vanno a circondare il materiale da fagocitare. Questo processo coinvolge l'uptake di elevate quantità di membrana plasmatica, decisamente maggiori rispetto ai meccanismi caveolina- o clatrina-dipendenti.

Infine, il processo di endocitosi può avvenire anche in seguito a meccanismi differenti, alcuni dei quali prevedono la formazione di compartimenti tubulari invece che vescicolari, privi di un rivestimento proteico (*Kirkham et al., 2005*).

1.6.2 Sorting delle proteine endocitate

Le proteine una volta internalizzate vengono convogliate, indipendentemente dal pathway di endocitosi, a livello di un particolare organello denominato endosoma precoce (early endosome), che rappresenta una “stazione di sorting” a partire dalla quale le proteine possono prendere diverse vie (*Jovic et al., 2010*) (Figura 30).

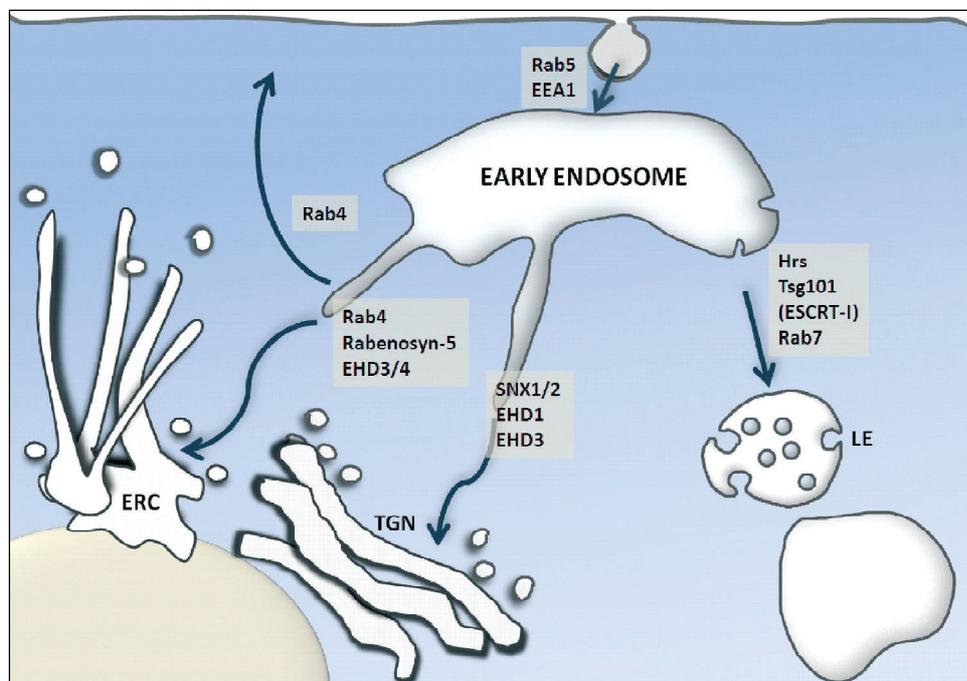


Figura 30. Schema riassuntivo delle diverse vie che possono prendere le proteine a partire dall'endosoma precoce (early endosome): riciclo in membrana, ritorno nelle cisterne del Golgi o degradazione nei lisosomi.

Spesso, le proteine e/o i recettori internalizzati vengono diretti nuovamente verso la membrana plasmatica, attraverso un pathway che viene denominato di riciclo. Esistono due possibili vie di riciclo con cinetiche differenti; la prima è la via rapida, che prevede il trasferimento delle proteine dall'endosoma precoce direttamente in membrana, attraverso strutture tubulari. La seconda via invece è quella lenta, nella quale il materiale endocitato viene prima condotto in un altro organello, denominato endosoma

di riciclo, a partire dal quale verrà successivamente indirizzato verso la membrana plasmatica, attraverso strutture generalmente associate a microtubuli.

In alternativa al riciclo in membrana si può verificare un trasporto retrogrado verso le cisterne del Golgi (*Bonifacino and Rojas, 2006*), dove le proteine possono subire eventuali modificazioni post-traduzionali.

Infine, se le proteine presenti nell'endosoma precoce dovessero presentare particolari sequenze segnale, potrebbero essere dirette verso gli endosomi tardivi (late endosome) e successivamente ai lisosomi, per la degradazione.

In letteratura non esistono molte informazioni riguardanti l'endocitosi e il trafficking intracellulare di SGLT1; solo *Kipp (2003)* e *Khoursandi (2004)* si sono occupati di questo argomento, utilizzando come modello sperimentale una linea cellulare intestinale umana (Caco-2). Dai loro studi è emerso che in queste cellule esiste anche un pool intracellulare di SGLT1, che sembra essere confinato in endosomi associati a microtubuli (vedi 1.4.3). Stimolando il trasportatore attraverso variazioni della concentrazione di glucosio extracellulare, si è visto che SGLT1 è in grado di essere internalizzato e successivamente di ritornare sulla membrana plasmatica. Non è noto se questo o altri tipi di stimolazione possano indurre variazioni della localizzazione subcellulare di SGLT1 anche a livello dell'epitelio respiratorio.

1.7 Obiettivi della ricerca

1.7.1 SGLT1 nel mesotelio pleurico

Studi funzionali in vivo (*Zocchi e al., 1991; Agostoni e Zocchi, 1993*) avevano suggerito che una parte del riassorbimento netto di liquido dal cavo pleurico fosse accoppiata ad un trasferimento di soluti, attuato dalle cellule del mesotelio pleurico. Considerata la parziale sensibilità di questo fenomeno al glucoside florizina, si ritiene che una frazione di tale trasferimento di liquido sia conseguente ad un assorbimento attivo di glucosio attraverso la pleura, probabilmente mediato da un cotrasporto Na^+ -glucosio localizzato livello della membrana luminale delle cellule del mesotelio pleurico (*Zocchi et al., 1996*). Attraverso l'utilizzo di tecniche di biologia molecolare (Western blot) è stata inoltre dimostrata la presenza della proteina SGLT1 nel mesotelio pleurico di coniglio (*Sironi et al., 2007*), ad ulteriore conferma di un possibile coinvolgimento di questo cotrasporto nel riassorbimento di liquido dal cavo pleurico negli animali a pleura viscerale sottile.

Il primo obiettivo di questa ricerca è stato quello di verificare se il cotrasportatore Na^+ -glucosio SGLT1 fosse espresso anche nel mesotelio pleurico delle specie a pleura viscerale spessa, nei quali questo aspetto non è mai stato indagato. La documentazione della presenza di un trasporto di soluti attraverso il mesotelio pleurico di animali a pleura spessa assumerebbe particolare valore ai fini della conoscenza del quadro generale dei meccanismi di turnover del liquido pleurico. Infatti, alcuni autori negano l'esistenza di un assorbimento di liquido attraverso la pleura viscerale in queste specie, sulla base di considerazioni legate alla presenza di una più elevata pressione capillare pleurica. D'altra parte, se anche in queste specie fosse presente un trasporto di liquido accoppiato a trasporto transmesoteliale di soluti, esso assicurerebbe un continuo apporto di liquido all'interstizio della pleura viscerale, creando le basi per un bilancio delle forze di Starling favorevole all'assorbimento. Per indagare la presenza del trasportatore, sono stati messi a punto saggi di immunoblot su proteine totali estratte da mesotelio parietale e viscerale di pecora, oltre a proteine totali ottenute da una linea cellulare di mesotelio umano (Met 5A). Inoltre, poiché non esistono evidenze funzionali di un cotrasporto Na^+ -glucosio in pecora, sono stati effettuati anche degli esperimenti di

immunofluorescenza su sezioni di mesotelio viscerale per verificare la localizzazione della proteina a livello della membrana apicale.

1.7.2 SGLT1 nell'epitelio alveolare polmonare

Studi fenomenologici volti ad indagare i meccanismi di trasporto coinvolti nel riassorbimento di liquido attraverso l'epitelio alveolare avevano dimostrato l'esistenza di un trasporto di glucosio florizina-sensibile; tale trasporto era stato attribuito ad un cotrasportatore Na^+ -glucosio, del quale si ipotizzava la presenza nelle cellule che costituiscono questo epitelio, (*Basset et al., 1987*). Successivamente è stata a lungo indagata la localizzazione della proteina in questione a livello della membrana plasmatica dei diversi tipi di cellule alveolari; in particolare, secondo indagini condotte mediante autoradiografia su polmone di topo e coniglio, il carrier sarebbe presente solo nelle cellule alveolari di tipo II (*Boyd, 1990*). Tuttavia, considerando che le cellule di tipo I rappresentano circa il 95% della complessiva superficie alveolare (contro il 5% circa di quelle del tipo II), l'espressione di SGLT1 sulla loro membrana plasmatica garantirebbe un efficiente contributo alla rimozione del liquido alveolare ed alla riduzione della concentrazione alveolare di glucosio.

Con la presente ricerca abbiamo voluto verificare se la localizzazione di SGLT1 fosse estesa ad entrambe le tipologie di cellule alveolari o circoscritta alle sole cellule di tipo II. A tale proposito, sono stati condotti saggi d'immunofluorescenza per SGLT1 su sezioni di parenchima polmonare di agnello e di ratto, oltre che su cellule alveolari isolate da polmone di ratto.

Per essere certi della specificità del segnale ottenuto, i saggi di immunostaining sono stati effettuati utilizzando due differenti anticorpi anti-SGLT1, diretti contro due epitopi diversi del carrier. Sempre allo scopo di individuare l'esatta localizzazione di SGLT1 a livello delle due diverse tipologie cellulari alveolari sono stati effettuati anche saggi di doppia marcatura, utilizzando un anticorpo anti-SGLT1 e marker specifici per i diversi citotipi presenti nell'epitelio.

1.7.3 Regolazione beta adrenergica di SGLT1

È noto che l'attivazione dei recettori β_2 adrenergici presenti a livello delle cellule dell'epitelio respiratorio promuove il riassorbimento di Na^+ e liquido dal lume alveolare; questo si verifica in seguito alla stimolazione dell'ATPasi Na^+/K^+ (*Minakata*

et al., 1998) e dei canali ENaC (*Berdiev et al., 1996*).

Secondo studi condotti su intestino di ratto e su ruminanti di pecora, l'attivazione dei β_2 AR sarebbe in grado di stimolare anche l'assorbimento transepiteliale di glucosio mediato da SGLT1 (*Ishikawa et al., 1997; Aschenbach et al., 2002*); questo effetto sarebbe conseguente ad un aumento dell'espressione in membrana di SGLT1. Poiché nel polmone non è noto un simile effetto su SGLT1 e sull'assorbimento di glucosio in seguito ad attivazione dei β_2 AR, sono stati condotti saggi di immunofluorescenza per SGLT1 su cellule alveolari umane appartenenti alla linea A549, allo scopo di valutare l'eventuale variazione dell'espressione e/o della localizzazione del carrier dopo trattamenti con l'agonista β -adrenergico isoproterenolo.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Colture cellulari

2.1.1 Cellule alveolari di ratto

Una serie di esperimenti riguardanti l'espressione di SGLT1 nell'epitelio alveolare è stata condotta su cellule alveolari isolate da polmone di ratto. Ratti maschi Sprague-Dawley (275-325 g), venivano anestetizzati mediante iniezione intraperitoneale di sodio pentobarbital (40 mg/kg) e cloralio idrato (170 mg/kg), posti in posizione supina e intubati. La gabbia toracica veniva esposta, mediante rimozione della cute e dei muscoli superficiali, e quindi aperta in modo da poter iniettare nel ventricolo sinistro una quantità di eparina pari a 500 UI, allo scopo di impedire la formazione di coaguli. Si procedeva quindi ad incannulare l'arteria polmonare, mentre i polmoni venivano ripetutamente espansi (ad una pressione di 10 cmH₂O, insufflando aria con una siringa attraverso la trachea incannulata) e successivamente lasciati sgonfiare naturalmente. Si potevano quindi perfondere i polmoni con soluzione di Ringer (in mM: Na⁺ 139, K⁺ 5, Ca²⁺ 1.25, Mg²⁺ 0.75, Cl⁻ 119, HCO₃⁻ 29, D-glucosio 5.6) addizionata di destrano al 2% e procaina allo 0,1%, per prevenire la contrazione della muscolatura liscia vascolare. La soluzione di perfusione, riscaldata a 37°C e gorgogliata con O₂ al 95% e CO₂ al 5%, era contenuta in un serbatoio posto 20-25 cm al di sopra del cuore dell'animale e defluiva dall'atrio sinistro, che veniva appositamente forato prima di iniziare la perfusione. Una volta osservato il verificarsi dello sbiancamento della superficie polmonare, si rimuoveva il cuore e quindi si isolavano i polmoni, che venivano immediatamente lavati con una soluzione di NaCl 150 mM; attraverso la trachea venivano instillati 6-8 ml della stessa soluzione salina a 37°C, successivamente rimossa per inversione dei polmoni. Questa procedura veniva ripetuta più volte, fino ad ottenere un liquido di lavaggio limpido. Successivamente, tenendo i polmoni immersi in un becker contenente buffer B (in mM: CaCl₂ 1.8, MgSO₄ 1.3, NaCl 133, KCl 5, Na₂HPO₄ 1.5, NaH₂PO₄ 1, HEPES 10, Glucosio 5.5) a 37°C, attraverso la trachea si perfondevano 40 ml di terreno di coltura RPMI addizionato con HEPES 25 mM, L-glutammina 2 mM ed elastasi 2 UI/ml, un enzima che promuoveva il distacco delle cellule alveolari. Dopo circa 20 minuti i polmoni e la soluzione in essi contenuta venivano posti in una piastra petri e trasferiti sotto cappa sterile dove, dopo aver rimosso la trachea e i bronchi, i lobi polmonari venivano sezionati in frammenti di circa 1-2 mm. Nella piastra venivano

quindi aggiunti 5 ml di FBS (Fetal Bovine Serum) a 37°C, per bloccare l'azione dell'elastasi, e 10 ml di buffer A (in mM: NaCl 133, KCl 5, Na₂HPO₄ 1.5, NaH₂PO₄ 1, HEPES 10, Glucosio 5.5) addizionato con DNasi (5000 UI), sempre a 37°C, per evitare la formazione di aggregati di cellule. La sospensione di cellule alveolari così ottenuta veniva filtrata in modo progressivamente più selettivo attraverso l'impiego di una garza, un filtro di nylon con pori del diametro di 140 µm e uno con pori di 30 µm. Al termine di questa serie di passaggi, il campione veniva centrifugato per 10 minuti a 850g e, eliminato il surnatante, il pellet (contenente le cellule alveolari) veniva risospeso in terreno RPMI completo per gli esperimenti di immunofluorescenza, o in un buffer di lisi per i saggi di Western Blot.

2.1.2 Cellule alveolari umane (linea A549)

Mantenimento in coltura

Per gli esperimenti riguardanti la regolazione beta adrenergica di SGLT1 sono state utilizzate cellule A549, una linea cellulare di epitelio alveolare umano. Queste cellule, caratterizzate da crescita a monostrato aderente, venivano coltivate in incubatore alla temperatura di 37 °C, in atmosfera di CO₂ al 5%. Veniva utilizzato terreno RPMI addizionato con gli antibiotici penicillina 100 U/ml e streptomycin 100 mg/ml, siero fetale bovino (FBS) al 15%, HEPES 25 mM e L-glutammina 2mM.

Per la propagazione della coltura cellulare, le cellule venivano seminate su piastre petri del diametro di 10 cm e lasciate crescere, sostituendo il terreno ogni due giorni fino al raggiungimento della confluenza; le cellule a confluenza venivano staccate dalla piastra mediante tripsinizzazione e riseminate. In particolare, il terreno veniva rimosso dalla piastra e le cellule adese erano lavate con PBS (in mM: NaH₂PO₄ 19.2, Na₂HPO₄ 80.7, NaCl 38.6), quindi si aggiungeva 1 ml di tripsina allo 0.05% in PBS. La tripsina veniva lasciata agire per alcuni minuti a 37°C, in modo da permettere la rottura dei complessi giunzionali tra cellule adiacenti e il loro distacco dal fondo della piastra, quindi ne veniva bloccata l'azione aggiungendo terreno di coltura contenente siero al 15%. Le cellule presenti in sospensione potevano essere quindi seminate su nuove piastre petri.

Trattamenti con isoproterenolo

Le cellule destinate al trattamento con il beta agonista isoproterenolo venivano seminate su 5 piastre petri del diametro di 3,5 cm, sul cui fondo erano stati precedentemente adagiati dei vetrini coprioggetto rotondi del diametro di 1 cm; una volta seminate, le

cellule venivano lasciate crescere per circa 48 ore, fino al raggiungimento di una confluenza pari al 60-70%. Prima dell'inizio del trattamento il terreno veniva rimosso dalle piastre e, previo lavaggio con PBS, veniva aggiunto terreno RPMI serum-free, per evitare eventuali interazioni tra isoproterenolo e componenti del siero. Ognuna delle cinque piastre costituiva un gruppo sperimentale e veniva incubata per un tempo specifico con isoproterenolo, in concentrazione finale 20 μ M. Oltre al gruppo di controllo, non trattato, sono stati considerati quattro differenti tempi di incubazione: 30 minuti, 60 minuti, 120 minuti e 180 minuti.

2.2 Western blot

2.2.1 Prelievo dei campioni tissutali

Campioni distinti di mesotelio pleurico viscerale e parietale di pecora sono stati ottenuti sottoponendo a raschiamento (scraping) la superficie delle pleure aderenti ai polmoni ed alla gabbia toracica. L'animale veniva anestetizzato per via endovenosa con una soluzione di tiopentale 15 mg/kg, quindi la trachea veniva incannulata per permettere, in caso di necessità, la ventilazione artificiale dell'animale. Successivamente si procedeva ad asportare la cute e i muscoli superficiali su entrambi i lati della gabbia toracica e, dopo il sacrificio dell'animale mediante iniezione endovena di un bolo di KCl, veniva rimossa la gabbia toracica e insufflata aria nei polmoni. Questa procedura consentiva di espandere i polmoni e, quindi, di aumentarne la superficie disponibile allo "scraping" (Vedi oltre). Durante queste manovre i polmoni e la gabbia toracica venivano messi a contatto con un'opportuna soluzione (Krebs-Henseleit Calcium-Free, in mM: NaCl 120, NaHCO₃ 25, MgSO₄ 5, KH₂PO₄ 1.2, KCl 4.7, Destrosio 11, EDTA 5), che favoriva il distacco delle cellule mesoteliali. Gli emitoraci isolati venivano posti in una piastra petri contenente la suddetta soluzione mantenuta a 4°C, per prevenire il deterioramento delle proteine; si procedeva quindi a prelevare un campione di tessuto mesoteliale mediante raschiamento ("scraping") della superficie della pleura parietale con una lama da microtomo dello spessore di 0,32 mm. L'intera procedura doveva essere eseguita delicatamente, in modo da asportare solo lo strato mesoteliale e non il tessuto connettivo sottostante, evitando così possibili contaminazioni con altri citotipi. Questo stesso procedimento di scraping veniva condotto anche sulla pleura viscerale; in questo caso veniva raschiata direttamente la superficie dei polmoni, che erano lasciati in situ e

mantenuti dilatati come descritto. I campioni di mesotelio parietale e viscerale così raccolti venivano quindi sottoposti ad estrazione proteica.

2.2.2 Estrazione delle proteine totali

Mesotelio parietale e viscerale

I campioni di mesotelio viscerale e parietale erano raccolti separatamente in provette eppendorf e sottoposti ad estrazione delle proteine totali. A tale scopo, il materiale ottenuto mediante scraping veniva trattato con 50 µl di RIPA buffer (in mM: NaCl 150, Tris HCl 20; Triton x-100 1%, Deossicolato 0.08%, SDS 0.1%) addizionato di inibitori delle proteasi (Roche). I campioni venivano lasciati 30 minuti in ghiaccio e successivamente sottoposti a centrifugazione a 4°C per 5 minuti a 13500 rpm, in modo da separare le proteine totali nel sovrantante.

Cellule

Per l'estrazione delle proteine totali, le cellule, precedentemente tripsinizzate e raccolte in Falcon da 15 ml, venivano centrifugate a 4000 rpm per 10 minuti a 4 °C; il surnatante veniva poi eliminato. Il pellet rimasto veniva lavato con 5 ml di PBS e centrifugato a 4000 rpm a 4°C per 10 minuti; anche in questa fase veniva poi eliminato il surnatante. Successivamente i pellet di cellule erano risospesi in 250 µl di buffer di lisi (in mM: Tris HCl pH 7.4 20, NaCl 150, EDTA 1, NP40 0.1%), addizionato di inibitori delle proteasi. Il lisato veniva poi trasferito in eppendorf da 1.5 ml e centrifugato a 13000 rpm per 30 minuti a 4 °C. Le proteine totali rimanevano nel surnatante, che veniva prelevato e trasferito in nuove eppendorf da 1,5 ml.

Le proteine totali della linea cellulare immortalizzata di uomo (Met 5A) provenivano da campioni preparati per una precedente ricerca.

2.2.3 SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

L'SDS-PAGE consiste in un'elettroforesi su gel di acrilamide in condizioni denaturanti, che permette la separazione delle proteine in base al peso molecolare; la corsa su gel veniva effettuata utilizzando un apparato elettroforetico montato secondo le istruzioni del produttore (Mini-Protean II, Biorad).

Preparazione del gel

Il gel di poliacrilamide utilizzato per l'elettroforesi verticale è costituito da due porzioni sovrapposte, denominate "stacking gel" (porzione superiore) e "running gel" (porzione inferiore). Lo "stacking gel" è caratterizzato dalla presenza di pozzetti in cui vengono caricati i campioni proteici; la sua funzione è quella di "impaccare" le proteine caricate, in modo che tutti i campioni inizino dallo stesso punto di partenza la loro migrazione nel sottostante "running gel", la cui funzione è quella di separare le proteine in base al loro peso molecolare. È noto che la percentuale di acrilamide/bisacrilamide presente nel gel è importante nella determinazione della larghezza delle maglie del gel stesso, per cui viene stabilita in relazione al peso molecolare della proteina oggetto della ricerca. Nel nostro caso specifico, avendo la proteina in esame (SGLT1) un peso molecolare intorno ai 72 kDa, è stato utilizzato un gel di poliacrilamide al 7,5%, la cui esatta composizione è riportata nella tabella 2.

Durante la preparazione della miscela del gel l'APS, che reagendo con il Temed catalizza la reazione di polimerizzazione, veniva aggiunto solo al momento di versare il composto nello stampo, per evitare che il gel si solidificasse prima del dovuto. La miscela veniva successivamente depositata, per mezzo di una pipetta, nel sottile spazio delimitato da due lastre di vetro, poste verticalmente, che costituiscono lo stampo. Per primo veniva depositato e fatto solidificare il "running gel". Avvenuta la polimerizzazione, si aggiungeva la miscela costituente lo "stacking gel". La caratteristica divisione in pozzetti veniva creata attraverso l'inserimento di un opportuno strumento simile ad un pettine. Terminata la preparazione, il gel era conservato a 4°C fino al momento dell'utilizzo.

Preparazione dei campioni

Gli estratti proteici potevano essere immediatamente utilizzati per l'SDS-PAGE oppure conservati a -20°C fino al momento dell'utilizzo. Prima di essere caricati nei pozzetti del gel, i campioni dovevano essere denaturati, per rompere i ponti disolfuro e far sì che venisse conservata solo la struttura primaria delle proteine, in modo da rendere accessibile all'anticorpo la sequenza proteica complementare. Per questo motivo, i campioni venivano trattati con "SDS loading buffer" (Tris-HCl 50 mM, SDS 2%, glicerolo 10%, Blu di bromofenolo 0.05%) addizionato di β -mercaptoetanololo e posti in un bagno termostato a 65°C per 10 minuti.

	RUNNING GEL 7.5%	STACKING GEL
Miscela acrilamide/bisacrilamide	3.75 ml	0.87 ml
Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	3.75 ml	-
Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	-	1.67 ml
H ₂ O	7.28 ml	4.07 ml
SDS 20%	75 μ l	33.3 μ l
APS 10%	75 μ l	33.3 μ l
Temed	7.5 μ l	6.7 μ l

Tabella 2. Composizione gel di poliacrilamide.

Elettroforesi

I campioni denaturati e un marker proteico a pesi molecolari noti (PageRuler Prestained Protein Ladder; Fermentas) erano caricati nei pozzetti dello “stacking gel”. La corsa elettroforetica veniva condotta ad un voltaggio costante di 120-130 V.

2.2.4 Trasferimento

Dopo la corsa elettroforetica, utilizzando l’apparato “Mini Trans-Blot cell” (Bio-Rad) (figura 31), le proteine venivano trasferite dai gel di acrilamide a membrane di PVDF (Immuno-Blot polyvinylidene difluoride membranes, Bio-Rad). Il trasferimento delle proteine dal gel alla membrana veniva condotto a tempo e voltaggio costanti, scelti in base al peso molecolare della proteina in esame. In particolare, nel caso di SGLT1 (73 kDa), i parametri utilizzati erano 2 ore e 30 minuti e 80 V.

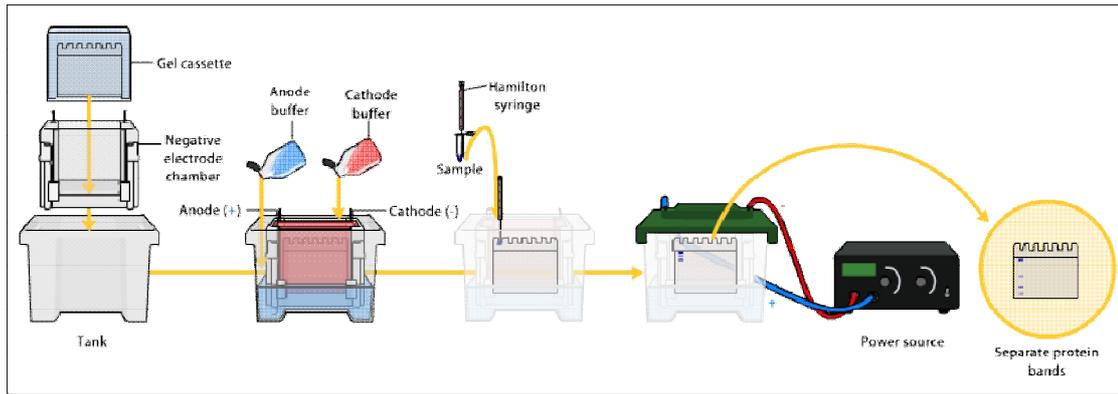


Figura 31. Schema del protocollo degli esperimenti di Western blot.

2.2.5 Blocco

Terminato il trasferimento era necessario bloccare i legami insaturi delle proteine ai quali avrebbe potuto legarsi l'anticorpo, dando origine a segnali aspecifici. La membrana veniva quindi incubata con una soluzione di TBST (in mM: Tris HCl 10, NaCl 150; Tween 0.1%) addizionata con polvere di latte al 5% per 1 ora e 30 minuti, a temperatura ambiente e sotto lenta agitazione.

2.2.6 Incubazione con anticorpi

Terminata la fase di blocco, la membrana veniva poi incubata, sempre in lenta agitazione, con l'anticorpo primario (rabbit anti-SGLT1 AB1352, Chemicon) diluito 1:4000 in TBST addizionato di polvere di latte al 5%, a 4°C overnight (Figura 32). Il giorno seguente la membrana veniva sottoposta ad opportuni lavaggi (in TBST e polvere di latte al 5%), utili a rimuovere la frazione di anticorpo primario non legata alla membrana.

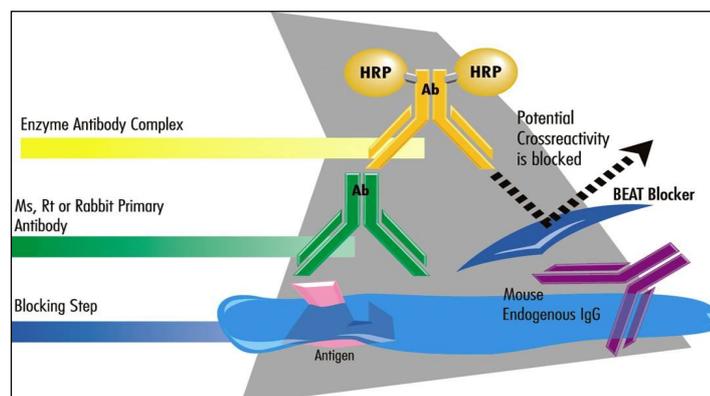


Figura 32. Incubazione della membrana di PVDF con gli anticorpi primario e secondario. Successivamente la membrana veniva nuovamente incubata, per un periodo di tempo di 2 ore a temperatura ambiente, con l'anticorpo secondario (goat anti-rabbit IgG-HRP, AP132P Chemicon) diluito 1:40000 in TBST e polvere di latte al 5%. Il passaggio successivo prevedeva altri 4 lavaggi, di cui due in polvere di latte al 5% in TBST e due in solo TBST. Anche in questo caso i lavaggi venivano condotti allo scopo di eliminare la quantità di anticorpo secondario non legata all'anticorpo primario. Gli ultimi due lavaggi avvenivano in assenza di polvere di latte, poiché quest'ultima interferisce con la soluzione di sviluppo.

2.2.7 Sviluppo

L'anticorpo secondario era coniugato alla perossidasi del rafano, enzima che permette di evidenziare visivamente gli eventuali legami dell'anticorpo primario all'antigene di interesse. Al momento dello sviluppo, le membrane venivano trattate per 5 minuti a temperatura ambiente con il "detection reagent" (contenente Lumigen PS-3 e perossido); la perossidasi dell'anticorpo reagiva con il perossido, dando origine ad un prodotto a sua volta in grado di interagire con il Lumigen PS-3, generando così un segnale chemiluminescente. Questo segnale luminoso veniva rilevato dopo l'esposizione di un'apposita pellicola (Polaroid film) in una mini-camera (Amersham).

2.3 Immunofluorescenza

I primi saggi di immunofluorescenza sono stati condotti su sezioni di pleura viscerale di pecora, per determinare se, come ipotizzato, SGLT1 fosse espresso a livello della membrana apicale delle cellule mesoteliali. Altri esperimenti sono stati eseguiti su sezioni di parenchima polmonare di ratto e pecora, oltre che su cellule alveolari isolate da polmone di ratto, per visualizzare l'eventuale presenza della proteina anche nelle cellule di primo tipo dell'epitelio alveolare. Infine, saggi di immunostaining sono stati messi a punto utilizzando cellule appartenenti alla linea A549, per studiare la regolazione beta adrenergica del cotrasportatore SGLT1 in cellule alveolari.

2.3.1 Preparazione dei campioni

Sezioni di pleura di pecora

L'animale veniva anestetizzato e preparato come descritto in precedenza (Vedi 2.2.1);

dopo aver aperto il torace, parte della gabbia toracica (3 spazi intercostali) veniva rimossa e fissata con paraformaldeide al 4% per 1 ora. Si procedeva quindi ad incannulare il bronco secondario del lobo intermedio del polmone che, dopo essere stato rimosso, veniva espanso con una pressione di circa 5 cmH₂O e fissato per 1 ora con paraformaldeide al 4%.

Campioni di tessuto mesoteliale (5 mm x 5 mm) venivano prelevati dalla superficie del lobo polmonare e dagli spazi intercostali, e puntati, con la porzione luminale rivolta verso l'alto, su uno strato di agar precedentemente fatto solidificare sul fondo di una piastra multiwell (Down Corning). Successivamente i campioni venivano lavati con PBS addizionato di glicina 0,2 M e permeabilizzati con Triton X-100 allo 0,1 % in PBS-glicina, per 3 minuti a temperatura ambiente; seguivano 3 ulteriori lavaggi in PBS-glicina.

Sezioni di parenchima polmonare

Le pecore (10-15 Kg) venivano anestetizzate con un'iniezione endovena di tiopentale (15 mg/kg), adagiate in posizione supina ed intubate. Dopo aver esposto i polmoni si procedeva con la rimozione del lobo medio del polmone destro, dopo averne incannolato il bronco. Una volta isolato, il lobo veniva immediatamente espanso a una pressione di 20 cmH₂O tramite infusione bronchiale del fissativo, costituito da paraformaldeide al 4 % in buffer fosfato 120 mM (in mM: NaH₂PO₄ 100, Na₂HPO₄ 20), e mantenuto in fissativo per 3 ore a una pressione di 10 cmH₂O. Al termine di questo periodo, il lobo veniva sezionato in frammenti delle dimensioni di alcuni mm che venivano immersi in PBS se destinati all'inclusione in paraffina, oppure in PBS e saccarosio al 30 %, se preparati per il taglio al criostato (vd. oltre).

Ratti maschi Sprague-Dawley (275-325 g) venivano anestetizzati mediante iniezione intraperitoneale di sodio pentobarbital (40 mg/kg) e cloralio idrato (170 mg/kg), posti in posizione supina e intubati. Una volta perfusi i polmoni e osservato il verificarsi dello sbiancamento della superficie polmonare, si procedeva con una perfusione di 20 minuti con il fissativo, costituito da paraformaldeide al 4 % in buffer fosfato 120 mM addizionato di destrano al 2 %. I polmoni venivano quindi rimossi e sezionati in frammenti di pochi mm, che venivano prima immersi per 30 minuti in paraformaldeide al 4 % in buffer fosfato e successivamente conservati in PBS se destinati all'inclusione in paraffina, o in PBS addizionato di saccarosio al 30 % se preparati per il taglio al criostato.

I frammenti di polmone di entrambe le specie animali venivano lavati in PBS e disidratati attraverso il passaggio in una serie di alcoli a concentrazione crescente. Il processo di disidratazione era seguito inizialmente da due passaggi di 60 minuti in toluolo, un solvente della paraffina, quindi da un passaggio di 1 ora in una miscela di toluolo e paraffina 1:1 a 60°C (temperatura di fusione della paraffina) ed infine da un passaggio overnight in sola paraffina a 60°C. Il giorno seguente i campioni venivano lasciati per 30 minuti in paraffina a temperatura ambiente per consentire la solidificazione del mezzo d'inclusione, e conservati a 4°C. I campioni inclusi venivano tagliati al microtomo in sezioni dello spessore di 10 µm, che venivano distese su vetrini rivestiti da poli-L-lisina e sottoposte ad un periodo di essiccazione alla temperatura di 37°C overnight, per facilitarne l'adesione. Le sezioni su vetrino potevano essere conservate a temperatura ambiente fino al momento dell'utilizzo per il saggio di immunofluorescenza. In preparazione di quest'ultimo, le sezioni di parenchima polmonare venivano in primo luogo sottoposte a rimozione della paraffina; a tale scopo i vetrini venivano posti in stufa a 60°C per 30 minuti, per permettere alla paraffina di sciogliersi completamente. Una volta sciolta, la paraffina veniva rimossa attraverso 2 lavaggi di 10 minuti ciascuno in xilene (un solvente della paraffina) e le sezioni venivano reidratate mediante passaggi sequenziali in una serie di alcoli a concentrazione decrescente.

Ulteriori sezioni sono state ottenute al criostato. Dopo la fissazione, i frammenti di polmone venivano sciacquati in PBS, messi a contatto con una soluzione di saccarosio al 30 % in PBS per 48 ore e successivamente immersi overnight in una soluzione costituita da pari volumi di soluzione di saccarosio al 30 % in PBS e di soluzione OCT (Cryo Embedding Matrix). Il campione veniva successivamente posto sul supporto del criostato (sulla cui superficie era stata precedentemente deposta una goccia di OCT), coperto interamente da OCT e così riposto all'interno del criostato, dove veniva mantenuto per alcuni minuti ad una temperatura di -20°C. A questo punto era possibile procedere con il taglio di sezioni dello spessore di 20-30 µm che, dopo essere state distese su vetrini rivestiti da poli-L-lisina, venivano mantenute a temperatura ambiente per 2-3 ore al fine di favorirne l'adesione. I vetrini potevano quindi essere conservati a -20°C.

Per tutte le sezioni, sia quelle incluse in paraffina sia quelle tagliate al criostato, veniva seguito il medesimo protocollo. I campioni erano prima sottoposti a 3 lavaggi di 5

minuti con PBS-glicina, quindi venivano permeabilizzati con Triton allo 0,1 % in PBS-glicina per 3 minuti a temperatura ambiente; seguivano 3 ulteriori lavaggi di 5 minuti.

Cellule alveolari di ratto

Dopo aver isolato le cellule secondo il protocollo già descritto, una goccia della sospensione di cellule veniva depositata su un vetrino rivestito da poli-L-lisina, successivamente trasferito in incubatore per qualche ora in attesa che le cellule aderissero. Le cellule su vetrino venivano poi fissate per 20 minuti con paraformaldeide al 4 % in buffer fosfato 120 mM e lavate con PBS-glicina.

Cellule alveolari umane (linea A549)

Al termine del trattamento con isoproterenolo, tutti i vetrini venivano lavati con PBS-glicina e fissati per 20 minuti con paraformaldeide al 4 % in buffer fosfato 120 mM; seguivano tre lavaggi della durata di cinque minuti ciascuno con PBS-glicina.

2.3.2 Incubazione con gli anticorpi

Terminati i lavaggi, tutti i campioni (sezioni di tessuto e cellule) venivano incubati per 1 ora a temperatura ambiente con BSA (Bovine Serum Albumin) al 3 % in PBS; questa fase di blocco era necessaria per saturare tutti i siti di legame aspecifico. Successivamente i campioni venivano incubati overnight a 4°C con l'anticorpo primario diluito in BSA allo 0,5 % in PBS-glicina. La mattina seguente venivano eseguiti tre lavaggi con PBS-glicina della durata di cinque minuti, per rimuovere l'eccesso di anticorpo primario non legato. A questo punto i campioni venivano incubati con l'opportuno anticorpo secondario, coniugato ad un fluoroforo, per 1 ora e 30 minuti a temperatura ambiente. Al termine di questa fase era necessario effettuare nuovamente tre lavaggi in PBS-glicina per eliminare l'anticorpo secondario in eccesso.

In caso di doppia marcatura, terminati i lavaggi si ripeteva il protocollo di incubazione, questa volta con l'anticorpo primario diretto contro un epitopo della seconda proteina che si intendeva marcare. In questo caso l'anticorpo veniva lasciato a contatto con il campione per 1 ora e 30 minuti a temperatura ambiente; dopo avere eseguito una serie di lavaggi con PBS-glicina si procedeva con l'incubazione con l'anticorpo secondario, coniugato ad un fluoroforo diverso rispetto al precedente.

Per la visualizzazione dei nuclei cellulari sono stati utilizzati due marcatori specifici: 4,6-diamidino-2-fenylindole (DAPI, Sigma) e TO-PRO 3, in grado di intercalarsi tra

le basi del DNA. Dopo l'incubazione con l'anticorpo secondario, prima di procedere con gli ultimi lavaggi in PBS-glicina, i campioni venivano incubati per 10 minuti a temperatura ambiente con DAPI diluito 1:1000 in PBS-glicina. Il TO-PRO 3 invece veniva aggiunto alla soluzione in cui era diluito l'anticorpo secondario, in concentrazione finale 1 μ M.

Le diluizioni degli anticorpi utilizzati sono riportate nella tabella 3.

<i>Anticorpo</i>	<i>Diluizione</i>
SGLT1 (AB1352, Chemicon)	1:150
SGLT1 (sc-20584, Santa Cruz Biotech)	1:150
SP-C (sc-22529 Santa Cruz Biotech)	1:50
Rab-11A (ab78337, Abcam)	1:50
Lectina (<i>Erythrina cristagalli</i>) (FL-1141, Vector Laboratories)	1:1000
Lectina (<i>Griffonia simplicifolia</i>) (Lifespan BioSciences)	1:50
Goat anti-rabbit IgG-FITC (AP132F, Chemicon)	1:100
Donkey anti-goat IgG-Texas Red (sc-2783, Santa Cruz Biotech)	1:100
Goat anti-mouse IgG-Texas Red (ab6787, Abcam)	1:1000

Tabella 3. Anticorpi utilizzati per gli esperimenti di immunofluorescenza e rispettive diluizioni.

I controlli negativi sono stati effettuati omettendo l'anticorpo primario, incubando le sezioni con siero pre-immune o infine (solo per SGLT1) preadsorbendo l'anticorpo al peptide corrispondente (AG661, Chemicon), in concentrazione finale 1mg/ml.

2.3.3 Visualizzazione del segnale

Al termine dell'incubazione con gli anticorpi, tutti i vetrini sono stati montati con una soluzione di PBS-glicerolo 2:1 ed osservati con un microscopio confocale a scansione laser (TCS NT, Leica Microsystems), dotato di obiettivi a immersione in olio 40x e 63x. Le osservazioni sono state condotte alle lunghezze d'onda di eccitazione di 488, 589, 358 e 633 nm rispettivamente per FITC, Texas Red, DAPI e To-PRO 3. Le immagini sono state acquisite con una risoluzione di 1024 x 1024 pixel.

2.3.4 Analisi densitometrica e statistica

Le immagini di immunofluorescenza, relative alle cellule A549 trattate con beta agonista, sono state analizzate con un software opportuno (ImageJ, National Institutes of Health, USA). In questo modo è stato possibile calcolare l'intensità media del segnale nelle diverse condizioni sperimentali; i valori ottenuti sono stati espressi in percentuale rispetto al corrispondente valore di controllo (100 %) e presentati come media \pm errore standard mediante istogrammi. La probabilità statistica veniva analizzata con il test del t di Student per dati non appaiati.

3. RISULTATI

3.1 Espressione di SGLT1 nel mesotelio pleurico di specie a pleura viscerale spessa

La presenza di un riassorbimento di liquido pleurico al seguito di un trasporto di soluti non è mai stata valutata negli animali a pleura viscerale spessa. D'altra parte, la sua presenza anche nella pleura di questi animali (tra i quali è compreso l'uomo) estenderebbe anche ad essi la validità del modello generalmente accreditato per la descrizione dei meccanismi di ricambio del liquido pleurico, già riconosciuta per le specie a pleura sottile. Per le specie a pleura spessa, invece, viene da alcuni (*Lai-Fook, 2004*) negata la possibilità che possa verificarsi un assorbimento di liquido attraverso la pleura viscerale, sulla base di considerazioni relative alle caratteristiche morfologiche e alle modalità di perfusione della pleura viscerale spessa (Vedi Introduzione, 1.2.1). Dato che tale tipo di assorbimento potrebbe verificarsi se un trasporto di liquido al seguito di trasporto mesoteliale di soluti operasse in serie con le forze di Starling dei capillari della pleura viscerale, si è studiata l'espressione del trasportatore SGLT1 (già documentata nel coniglio, specie a pleura sottile) nel mesotelio pleurico di animali a pleura spessa.

3.1.1 Western blot su mesotelio parietale e viscerale di pecora

I saggi di western blot per il cotrasportatore Na⁺-glucosio (isoforma SGLT1) sono stati condotti utilizzando proteine totali estratte da campioni distinti di mesotelio viscerale e parietale di agnelli e pecore adulte. Come si può osservare nelle figure 33 e 34, analogamente a quanto era stato rinvenuto nel mesotelio pleurico di coniglio (*Sironi et al., 2007*), anche nel mesotelio pleurico di pecora sono state rinvenute tre bande: una a 72 kDa, che corrisponde al peso molecolare di SGLT1, e altre due rispettivamente a 63 e 55 kDa. Diverse ipotesi sono state recentemente avanzate sulla natura di queste bande (Vedi Discussione). Tutti i segnali rilevati sono risultati essere specifici; infatti, in esperimenti paralleli nei quali l'anticorpo primario veniva preadsorbito con un eccesso di peptide di controllo, le tre bande scomparivano.

Confrontando i risultati ottenuti a partire dai campioni estratti dalle due pleure, si può notare una maggior intensità dei segnali nella pleura viscerale rispetto alla parietale. La

differenza non esprime necessariamente un maggiore livello di espressione della proteina nel primo tessuto, poiché i campioni non sono stati dosati e quindi non è assicurato l'equal loading.

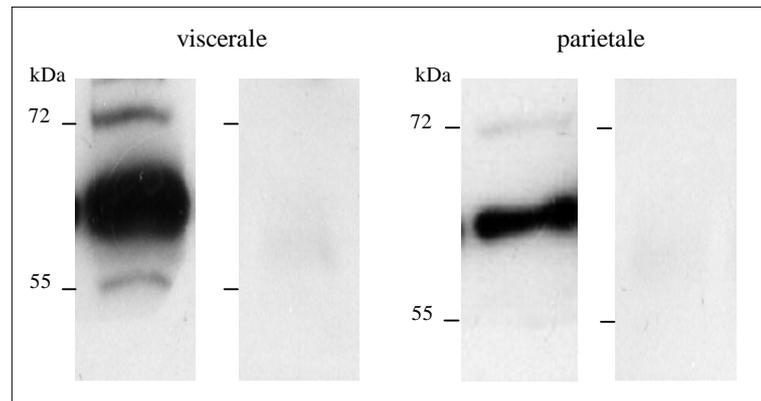


Figura 33. Western blot per SGLT1, condotto su preparati proteici estratti da campioni di mesotelio di agnello ottenuti mediante scraping. È stato utilizzato un anticorpo primario in grado di riconoscere la sequenza aminoacidica 402-420 di SGLT1. Il controllo negativo è stato ottenuto preadsorbendo l'anticorpo al peptide corrispondente.

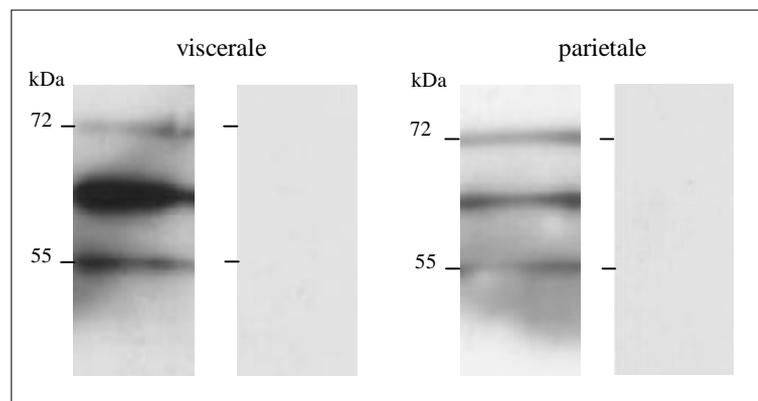


Figura 34. Western blot per SGLT1, condotto su preparati proteici estratti da campioni di mesotelio di pecora adulta ottenuti mediante scraping. È stato utilizzato un anticorpo primario diretto contro la regione 402-420 di SGLT1. Il controllo negativo è stato ottenuto preadsorbendo l'anticorpo al peptide corrispondente.

3.1.2 Western blot su linee cellulari di mesotelio umano

Dopo avere dimostrato la presenza del cotrasportatore Na^+ -glucosio nella pecora, si è pensato che fosse interessante ricercarlo anche nella specie umana (anch'essa caratterizzata da pleura viscerale spessa).

Non disponendo di campioni biotici di mesotelio umano, per estendere la ricerca a tale tessuto si è deciso di utilizzare la linea cellulare umana di mesotelio pleurico Met 5A, disponibile in commercio. Gli esperimenti di Western blot per SGLT1 condotti su tale linea cellulare hanno evidenziato (Figura 35) la presenza di una banda a 72 kDa, che risultava specifica poiché veniva silenziata dopo trattamento con l'anticorpo primario preadsorbito al peptide di controllo.

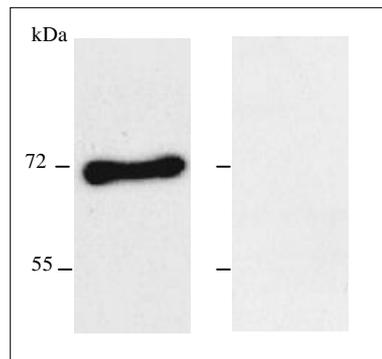


Figura 35. Western blot per SGLT1 eseguito su linea cellulare umana di mesotelio pleurico Met 5A.

3.1.3 Immunolocalizzazione di SGLT1 su mesotelio pleurico di pecora

Per le specie animali a pleura spessa, l'assenza di dati funzionali comporta la mancanza di un'indicazione, seppure indiretta, della localizzazione subcellulare del cotrasportatore Na^+ -glucosio. Poiché il modello proposto per il riassorbimento del liquido pleurico prevede una vettorialità dei trasporti ed una distribuzione asimmetrica dei trasportatori coinvolti sulle membrane apicali e basolaterali delle cellule, abbiamo messo a punto saggi di immunofluorescenza per verificare la precisa localizzazione del cotrasportatore Na^+ -glucosio; gli esperimenti sono stati condotti sia su pleura viscerale (Figura 36), sia su pleura parietale (dato non riportato).

In particolare, la presenza di SGLT1 è stata indagata valutando mediante microscopia confocale la presenza della specifica marcatura fluorescente (fluoresceina isotiocianato, FITC) su sezioni ottiche orientate parallelamente alla superficie dei campioni, acquisite a livelli diversi.

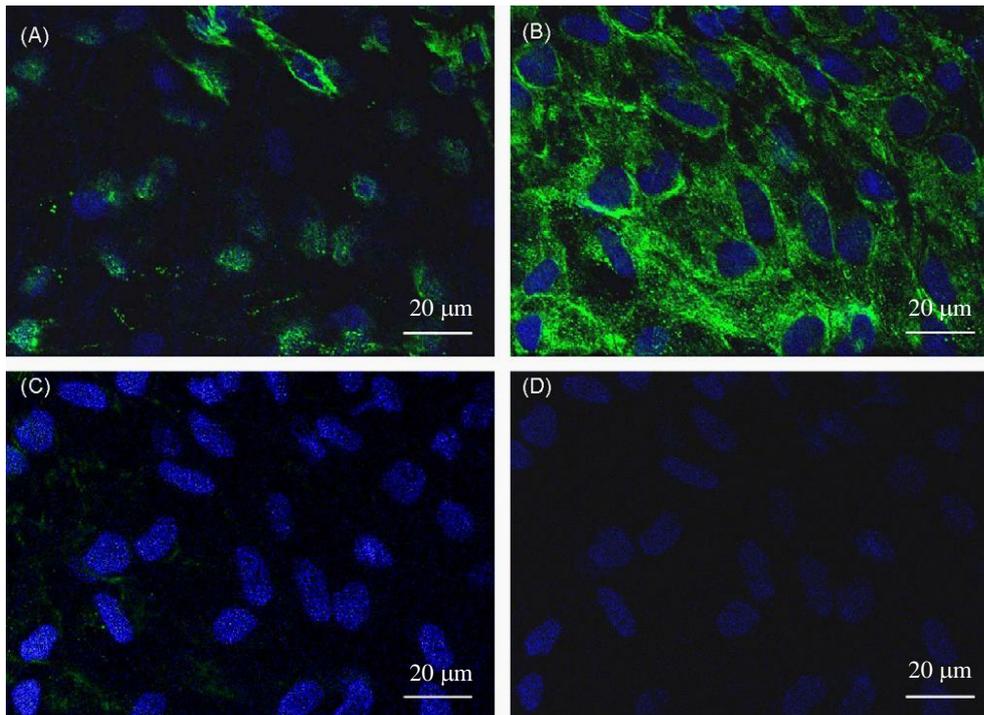


Figura 36. Immunolocalizzazione condotta su pleura viscerale di agnello. Sequenza di sezioni ottiche orientate parallelamente alla superficie dei campioni, acquisite al microscopio confocale ad intervalli di 1 μm . Pannelli A) e B): sezioni ottenute a livello della superficie apicale delle cellule mesoteliali. Pannelli C) e D): sezioni ottiche ottenute a livello del citoplasma. La fluorescenza verde (FITC) e quella blu (DAPI) rappresentano rispettivamente la marcatura per SGLT1 e per i nuclei.

Come si può osservare nella figura, la marcatura in verde relativa a SGLT1 era presente nelle sezioni acquisite a livello della superficie apicale delle cellule mesoteliali, mentre scompariva in quelle successive, acquisite a livello del citoplasma. In queste sezioni, si notava in parallelo la graduale comparsa dei nuclei, in blu (DAPI). La specificità della marcatura per SGLT1 è dimostrata dall'assenza di segnale fluorescente associato a FITC nei campioni in cui l'anticorpo per SGLT1 veniva omissso. I dati di immunofluorescenza dimostrano quindi che il cotrasportatore è localizzato a livello della membrana apicale delle cellule mesoteliali viscerali. Risultati analoghi sono stati ottenuti per la pleura parietale (dati non mostrati).

3.2 Immunolocalizzazione di SGLT1 nell'epitelio alveolare

Studi funzionali in vivo (*Basset et al., 1987*) avevano dimostrato che attraverso l'epitelio alveolare si verifica un trasporto di glucosio sensibile alla florizina, pertanto era stata ipotizzata la presenza del cotrasportatore Na^+ -glucosio nella membrana apicale delle cellule di questo epitelio. Altri autori, in seguito a indagini condotte su polmone di topo e coniglio mediante autoradiografia, avevano concluso che il carrier è espresso solo nelle cellule alveolari di tipo II (*Boyd, 1990*), che rivestono solo il 5% della superficie polmonare. Se così fosse, il contributo del trasportatore all'assorbimento di acqua dal fluido alveolare sarebbe trascurabile, e il suo ruolo si limiterebbe all'apporto a queste cellule del glucosio necessario per la sintesi di surfattante e ialuronano. D'altra parte, considerando che le cellule di tipo I rappresentano la quasi totalità della superficie alveolare, l'espressione di SGLT1 sulla loro membrana plasmatica conferirebbe al trasportatore un ruolo significativo nell'omeostasi del volume e della composizione del liquido alveolare, in particolare nella rimozione dell'eccesso di liquido alveolare e nella riduzione della concentrazione alveolare di glucosio. Si è quindi voluto indagare mediante immunofluorescenza la localizzazione di SGLT1 nell'epitelio alveolare, in modo da poter valutare se l'espressione del carrier fosse effettivamente circoscritta alle sole cellule di tipo II, o estesa ad entrambi i tipi di cellule alveolari. A tale scopo, sono stati condotti saggi d'immunofluorescenza per SGLT1 sia su sezioni di parenchima polmonare di pecora e di ratto, sia su cellule alveolari isolate da polmone di ratto.

Negli esperimenti di immunostaining sono stati utilizzati due differenti anticorpi in grado di riconoscere la proteina SGLT1. Il primo, l'anticorpo rabbit anti-SGLT1 (AB1352, Chemicon), è diretto contro la sequenza aminoacidica 402-420, mentre il secondo è l'anticorpo goat anti-SGLT1 (sc-20584, Santa Cruz Biotech.), in grado di legarsi alla sequenza aminoacidica 546-596, vicino alla porzione C-terminale.

Secondo una ricerca condotta utilizzando il database BLAST (BLAST2.2.10; National Center for Biotechnology Information, USA), nel ratto entrambi gli anticorpi presentano il 100 % di omologia per SGLT1 e una percentuale di omologia non significativa per SGLT2, SGLT3 e SGLT4. Per quanto riguarda gli esperimenti condotti su pecora, la specificità degli anticorpi non era garantita dalle ditte che li hanno forniti, in quanto mai testata; inoltre non esistono informazioni riguardanti l'omologia degli anticorpi per la proteina SGLT1 di pecora. Tuttavia, secondo quanto riportato da *Zhao (2005)*, l'omologia tra le due specie animali in questione è pari a circa il 95% per entrambi gli

epitopi contro i quali sono diretti gli anticorpi. La specificità dell'anticorpo AB1352 era stata precedentemente testata in saggi di western blot su estratti proteici derivanti da mesotelio pleurico di coniglio (*Sironi et al., 2007*) e pecora (vd. 3.1.1). La specificità dell'altro anticorpo diretto contro SGLT1 (sc-20584) è stata verificata attraverso esperimenti di western blot su proteine (60-80 µg) estratte da cellule alveolari di ratto appena isolate.

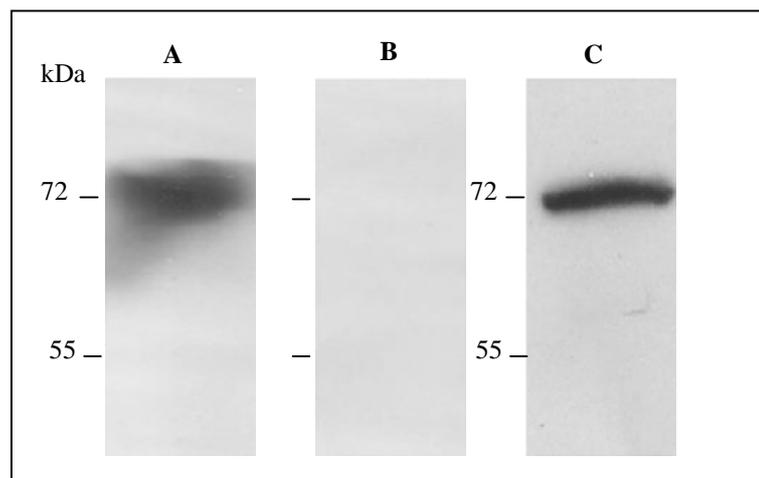


Figura 37. A) Saggio di immunoblot per SGLT1 condotto su proteine totali estratte da cellule alveolari appena isolate; il controllo negativo (B) è stato ottenuto facendo preadsorbire l'anticorpo primario al peptide corrispondente. Il controllo positivo (C) è stato realizzato in parallelo utilizzando proteine totali estratte da mucosa intestinale di ratto.

Come illustrato nella figura 37A, i saggi di western blot condotti su estratti proteici di cellule alveolari dimostrano la presenza di una banda all'altezza di 72 kDa, che corrisponde al peso molecolare di SGLT1. La figura 37B mostra che tale banda scompare quando l'anticorpo viene preadsorbito all'antigene corrispondente (1 mg/ml, Santa Cruz Biotech. sc-20584P). Nella figura 37C invece è possibile osservare il risultato ottenuto in parallelo su proteine totali (circa 40 µg) estratte da mucosa di digiuno di ratto (un tessuto in cui è nota la presenza della proteina SGLT1), considerate un controllo positivo. Un ulteriore controllo positivo è rappresentato dal saggio di immunostaining riportato nella figura 38, condotto su sezioni di mucosa di digiuno di ratto utilizzando l'anticorpo primario anti-SGLT1 in grado di riconoscere la sequenza aminoacidica 546-596 e un anticorpo secondario coniugato a Texas red. I nuclei cellulari, in blu (pseudocolore), sono stati messi in evidenza con TO-PRO 3.

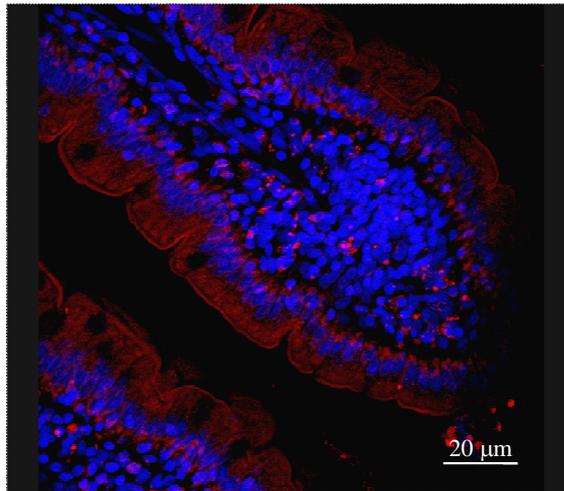


Figura 38. Immunolocalizzazione di SGLT1 su sezioni di epitelio intestinale (digiuno) di ratto. In rosso è visibile il segnale relativo alla presenza dell'anticorpo primario goat anti-SGLT1 (sc-20584, Santa Cruz Biotech.), in grado di legarsi alla sequenza aminoacidica 546-596 della proteina. I nuclei sono stati evidenziati con TO-PRO 3 (blu pseudocolore).

Infine, sono stati anche messi a punto esperimenti di doppia marcatura, nei quali venivano utilizzati un anticorpo primario diretto contro SGLT1 e altri anticorpi, in grado di legarsi a marker specifici dei diversi citotipi presenti a livello polmonare (cellule alveolari di tipo I, cellule alveolari di tipo II, cellule endoteliali).

3.2.1 Sezioni di parenchima polmonare di pecora

Nella figura 39 sono riportate le immagini in fluorescenza ottenute al microscopio confocale dai saggi di immunostaining per SGLT1, eseguiti su sezioni di parenchima polmonare di agnello (fissate con paraformaldeide, congelate e successivamente tagliate al criostato). In particolare, l'immagine riportata nel pannello A mostra una sezione in cui l'eventuale presenza di SGLT1 è stata indagata mediante l'utilizzo di un anticorpo primario rabbit anti-SGLT1 (AB1352), in grado di riconoscere la sequenza 402-420 del carrier, e di un anticorpo secondario (AP132F) coniugato con fluoresceina isotiocianato (FITC).

La maggior parte della superficie alveolare mostra il segnale fluorescente verde, che testimonia l'avvenuta marcatura con FITC e quindi il legame con l'anticorpo primario anti-SGLT1. Ciò suggerisce una localizzazione di SGLT1 anche a livello delle cellule alveolari di tipo I. La stessa sezione rappresentata nel pannello A è stata sottoposta anche a trattamento con TO-PRO3 (pannello B), in modo da poter visualizzare i nuclei

cellulari, marcati in blu (pseudocolore).

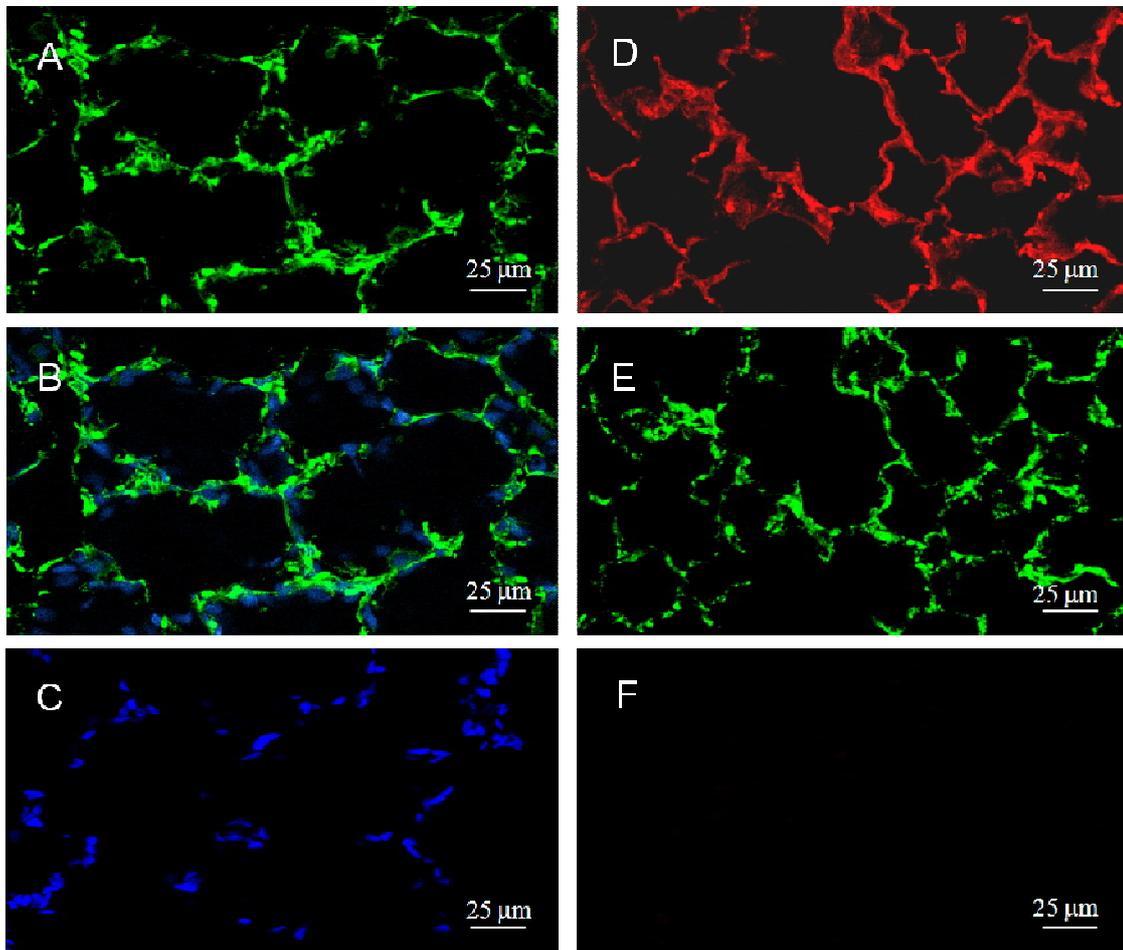


Figura 39. Immunolocalizzazione di SGLT1 su sezioni di parenchima polmonare di agnello. Nel pannello A è visibile, in verde, il segnale relativo all'anticorpo che riconosce la sequenza 402-420 di SGLT1. Il pannello B riporta la stessa immagine del pannello A ma evidenzia anche i nuclei cellulari, marcati con TO-PRO 3 e visibili in blu (pseudocolore). Nel pannello C vi è il controllo negativo, nel quale sono visibili solo i nuclei cellulari. I pannelli D e E rappresentano una stessa sezione marcata con due diversi anticorpi anti-SGLT1: goat anti-SGLT1 con anticorpo secondario coniugato a Texas red (pannello D) e rabbit anti-SGLT1 con anticorpo secondario coniugato a FITC (pannello E). Nel pannello F è riportato il controllo negativo, nel quale sono stati omessi gli anticorpi primari.

Il segnale fluorescente osservato per SGLT1 non è imputabile a reazioni aspecifiche dell'anticorpo secondario; infatti, come mostrato nel pannello C, in analoghe sezioni allestite in assenza dell'anticorpo primario (controllo negativo), la marcatura verde non è rilevabile ed è possibile osservare solo la disposizione dei nuclei cellulari. Risultati analoghi sono stati ottenuti ripetendo l'esperimento utilizzando sezioni di parenchima polmonare incluse in paraffina (dati non mostrati).

Per verificare ulteriormente la specificità del segnale ottenuto con l'anticorpo primario

utilizzato per SGLT1, su altre sezioni sono stati condotti saggi di immunofluorescenza che prevedevano, su una stessa sezione, una doppia marcatura per la proteina di interesse. In particolare, oltre alla coppia di anticorpi già descritta, sono stati impiegati in parallelo anche un anticorpo primario goat anti-SGLT1 (sc-20584), che riconosce una sequenza diversa del carrier, e un anticorpo secondario donkey anti-goat IgG coniugato con Texas red. Le immagini ottenute con le due differenti coppie di anticorpi sono mostrate, nella figura 39, rispettivamente nei pannelli E e D. Analogamente a quanto già osservato, in entrambi i casi la superficie alveolare appare marcata in modo uniforme, indipendentemente dall'anticorpo anti-SGLT1 impiegato per il saggio. Anche in questo caso i campioni allestiti omettendo l'incubazione con gli anticorpi primari (controllo negativo), non mostravano alcuna marcatura (pannello F); i segnali fluorescenti osservati non sono quindi dovuti a reazioni aspecifiche dell'anticorpo secondario.

In conclusione, considerando che negli esperimenti di doppia marcatura sono stati utilizzati anticorpi primari mirati verso epitopi distinti di SGLT1, l'osservata corrispondenza fra i patterns di marcatura ottenuti sembra indicare che i segnali fluorescenti osservati siano specifici per il cotrasportatore SGLT1. Inoltre, vista l'estensione della fluorescenza osservata alla maggior parte dell'epitelio alveolare, sembra che SGLT1 sia espresso non solo nelle cellule alveolari di tipo II, ma anche in quelle di tipo I.

3.2.2 Sezioni di parenchima polmonare di ratto

Un'analoga indagine è stata condotta anche su sezioni in paraffina di parenchima polmonare di ratto (Figura 40). Nel pannello A è mostrata una sezione marcata con l'anticorpo primario rabbit anti-SGLT1 (AB1352) e con l'anticorpo secondario coniugato con FITC (AP132F). Anche in questo caso, la superficie alveolare risulta quasi interamente marcata. Grazie al concomitante impiego di TO-PRO3, in questa stessa sezione sono stati anche evidenziati in blu (pseudocolore) i nuclei cellulari (pannello B). I controlli negativi, preparati in parallelo omettendo l'anticorpo primario (pannello C) oppure incubando le sezioni con il siero pre-immune, non presentavano la fluorescenza per SGLT1; il segnale osservato non sembra quindi imputabile a reazioni aspecifiche dell'anticorpo secondario.

Anche per il ratto sono stati condotti saggi di doppia marcatura che prevedevano l'utilizzo sia della coppia di anticorpi già descritta (pannello E), sia della coppia

costituita dall'anticorpo primario goat anti-SGLT1 (sc-20584) e dall'anticorpo secondario donkey anti-goat IgG coniugato con Texas red (pannello D). Come osservato precedentemente in sezioni di polmone di pecora, anche in ratto si sono ottenuti analoghi pattern di marcatura indipendentemente dall'anticorpo primario utilizzato, con un segnale esteso alla maggior parte della superficie dell'epitelio alveolare. Infine, non è stata osservata alcuna fluorescenza (pannello F) nelle sezioni allestite omettendo l'incubazione con gli anticorpi primari o preadsorbendo l'anticorpo primario all'antigene corrispondente (controllo negativo). I segnali osservati in relazione ad entrambi gli anticorpi primari, quindi, non sono imputabili a reazioni aspecifiche dell'anticorpo secondario ma, anche in ratto, risultano specifici per SGLT1.

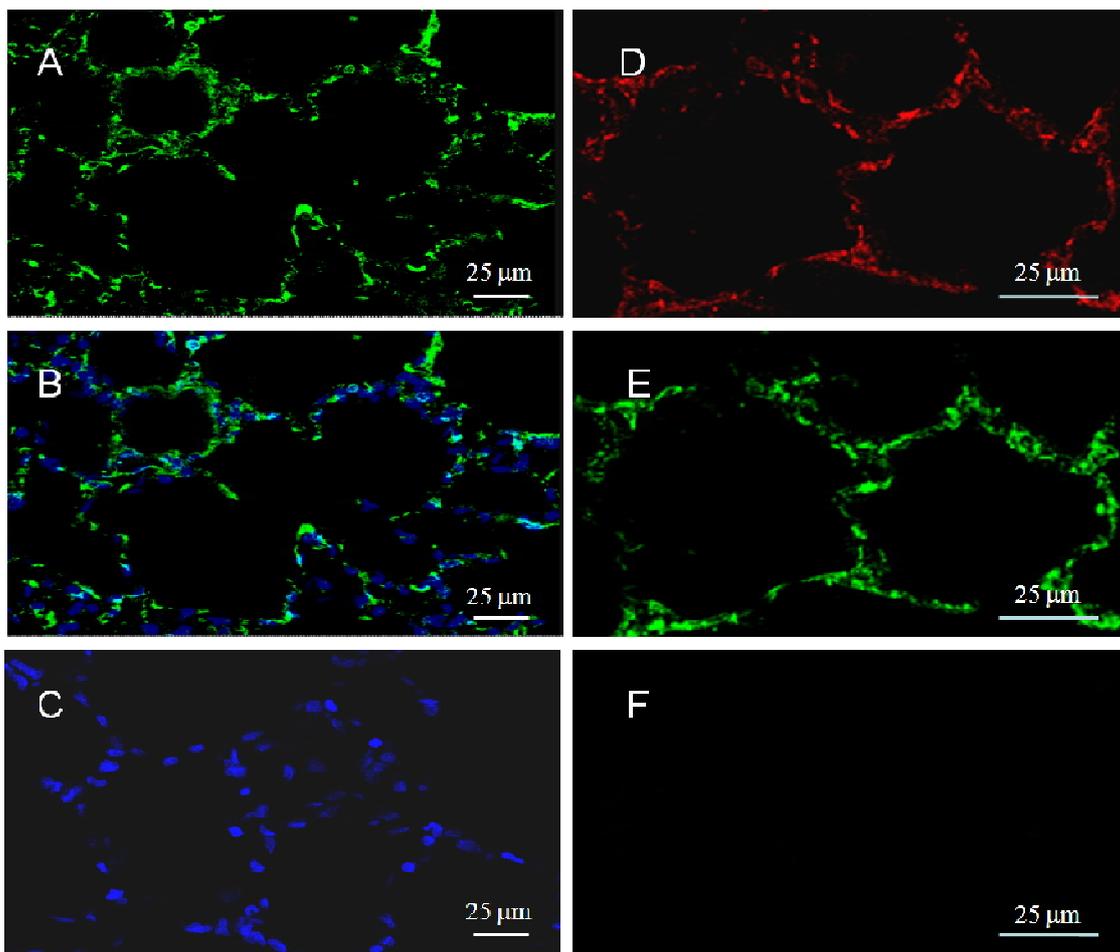


Figura 40. Immunolocalizzazione di SGLT1 su sezioni di parenchima polmonare di ratto. Nel pannello A è visibile, in verde, il segnale relativo all'anticorpo che riconosce la sequenza 402-420 di SGLT1. Il pannello B riporta la stessa immagine del pannello A ma evidenzia anche i nuclei cellulari, marcati con TO-PRO 3 e visibili in blu (pseudocolore). I pannelli D e E rappresentano una stessa sezione incubata con due diversi anticorpi anti-SGLT1: goat anti-SGLT1 con relativo anticorpo secondario coniugato a Texas

red (pannello D) e rabbit anti-SGLT1 con anticorpo secondario coniugato a FITC (pannello E). Nei pannelli C e F sono riportati i controlli negativi.

L'estensione della marcatura alla maggior parte dell'epitelio alveolare indica che anche in questa specie animale SGLT1 sembra essere espresso non solo nelle cellule alveolari di tipo II, ma anche in quelle di tipo I.

Risultati simili (dati non presentati) sono stati ottenuti anche utilizzando sezioni di epitelio alveolare di ratto tagliate al criostato.

3.2.3 SGLT1 e cellule alveolari di secondo tipo

Per indagare ulteriormente la localizzazione di SGLT1 a livello dell'epitelio alveolare è stato adottato un secondo approccio sperimentale che permettesse di distinguere le due differenti popolazioni di cellule alveolari e, allo stesso tempo, di individuare il carrier a livello dei due tipi cellulari identificati. A tale scopo, su cellule alveolari isolate da polmone di ratto sono stati condotti saggi di immunofluorescenza che prevedevano una doppia marcatura per SGLT1 e per SP-C (surfactant protein C), una proteina associata al surfattante e perciò utilizzata come marcatore delle cellule di tipo II. In particolare, sono stati utilizzati l'anticorpo primario per SGLT1 mirato contro la sequenza 402-420 (riconosciuto dall'anticorpo secondario coniugato con FITC) ed un anticorpo primario goat anti SP-C, rivelato grazie ad un anticorpo secondario coniugato con Texas red. Nella figura 41 si può osservare che il segnale per SGLT1 (verde) è presente a livello di tutte le cellule (pannello A), mentre solo alcune mostrano un'intensa marcatura per SP-C (pannello B). Le altre cellule che compongono il campione, di dimensioni leggermente maggiori, sono invece caratterizzate da una marcatura per SP-C decisamente meno accentuata. Nei pannelli C e D sono mostrate rispettivamente l'immagine risultante dalla sovrapposizione dei pannelli A e B e quella delle stesse cellule osservate in luce trasmessa. Le osservate differenze di dimensione e, soprattutto, di intensità del segnale rosso per SP-C permettono di identificare come cellule di tipo II gli elementi di dimensione minore e intensamente marcati, come cellule di tipo I quelli più grandi e debolmente marcati. Queste ultime, infatti, sono in grado di esprimere SP-C solo a livelli molto modesti (*Dobbs e Johnson, 2007*) ed inoltre sono caratterizzate da dimensioni maggiori, giacché quando isolate mostrano un diametro di circa 14-15 μm contro i 9-10 μm delle cellule alveolari di tipo II (*Weibel, 1985*). In ogni caso, entrambi i tipi cellulari sembrano essere in grado di esprimere SGLT1. Quindi, sebbene di per sé non conclusive, queste osservazioni condotte su cellule alveolari isolate di ratto

avvalorano l'ipotesi formulata.

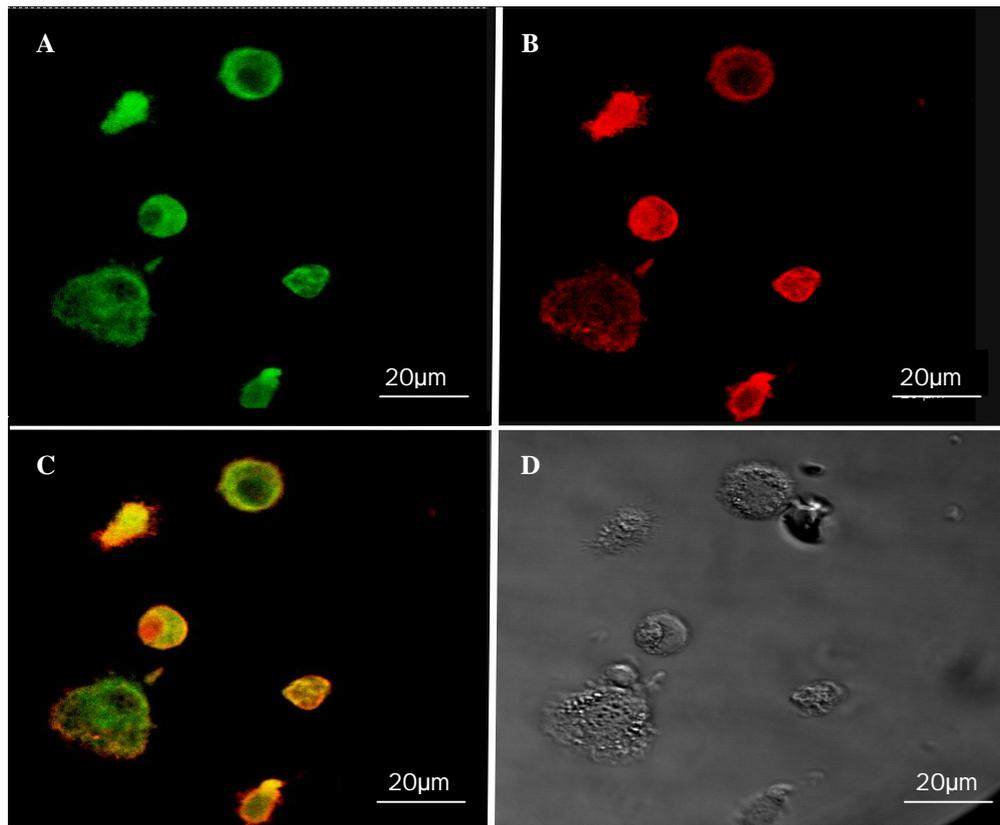


Figura 41. Immunostaining per SGLT1 (verde) ed SP-C (rosso) su cellule alveolari isolate da polmone di ratto. Nel pannello A si può osservare il segnale verde relativo alla proteina SGLT1; il pannello B mostra la marcatura dovuta alla presenza di SP-C. Mentre SP-C è espresso solo nelle cellule alveolari di secondo tipo (di dimensioni inferiori e con marcatura più intensa), SGLT1 è espresso in tutte le cellule. Nel pannello C è riportata la sovrapposizione delle sezioni rappresentate in A e B, mentre nel pannello D si osserva l'immagine delle cellule in luce trasmessa.

3.2.4 SGLT1 e cellule alveolari di primo tipo

Sempre allo scopo di individuare l'esatta localizzazione di SGLT1 a livello dei due diversi tipi di cellule alveolari, su parenchima polmonare di ratto sono stati condotti saggi di immunolocalizzazione che prevedevano l'utilizzo di un anticorpo anti-SGLT1 e della lectina derivante dall'arbusto *Erythrina cristagalli*, che si lega selettivamente alle cellule alveolari di tipo I. Questa lectina, infatti, riconosce in maniera specifica i residui di N-acetilglucosamina presenti sulla superficie della membrana delle cellule alveolari di tipo I, ma non su quella delle cellule di tipo II e delle cellule endoteliali (Taatzjes *et al.*, 1990). In particolare, le sezioni di parenchima polmonare di ratto sono state incubate con l'anticorpo primario per SGLT1 mirato contro la sequenza 546-596 (con il relativo anticorpo secondario coniugato con Texas red) e con la lectina *Erythrina*

crisagalli, coniugata con FITC. Il pattern di marcatura ottenuto con la lectina su una sezione così trattata si può osservare nel pannello A della figura 42.

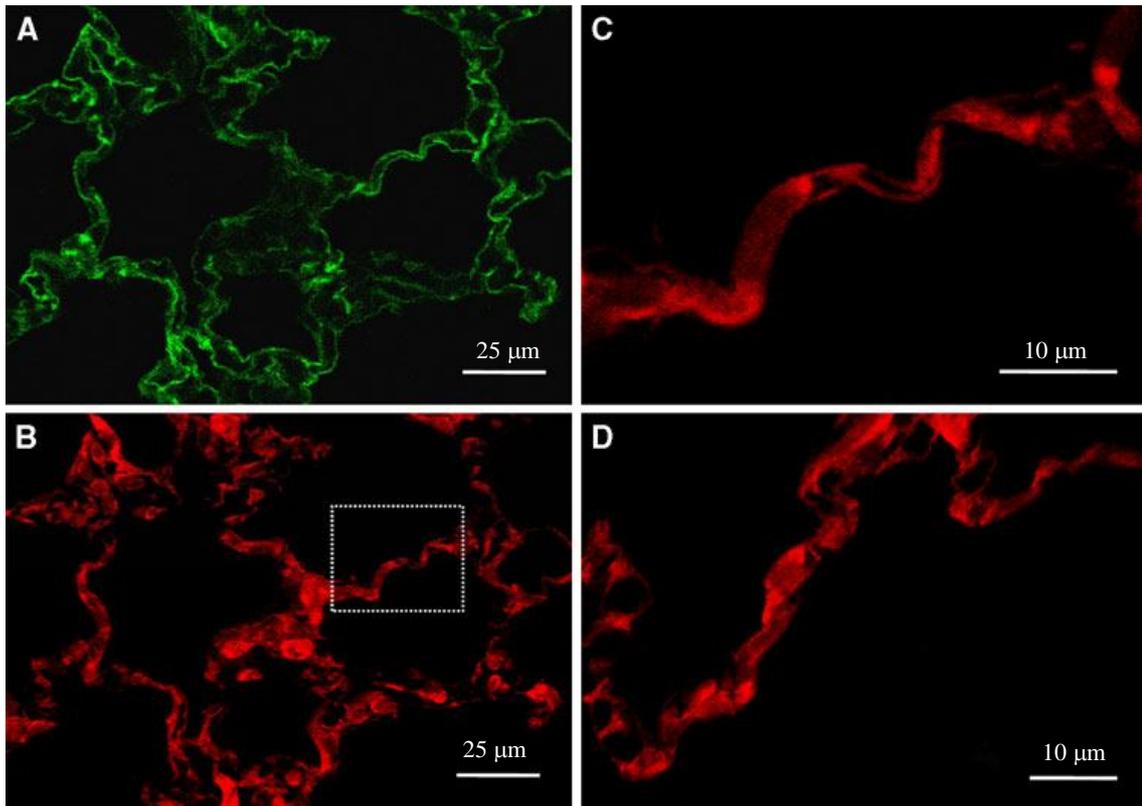


Figura 42. Immagini confocali di sezioni di alveoli polmonari di ratto. Nel pannello A sono visibili le cellule alveolari di tipo I riconosciute dalla lectina derivata da *Erythrina cristagalli* (verde). Nel pannello B si osserva la stessa sezione del pannello A, marcata con l'anticorpo primario anti-SGLT1 e il rispettivo anticorpo secondario, coniugato a Texas red. Una parte della sezione del pannello B è stata ingrandita maggiormente e riportata nel pannello C. Nel pannello (D) si osserva l'ingrandimento del setto alveolare di un'altra sezione.

È evidente che, come atteso dal momento che le cellule alveolari di tipo I rappresentano più del 95% della superficie alveolare, la marcatura interessa la maggior parte dell'epitelio alveolare. Il pannello B mostra il segnale rosso relativo a SGLT1 che, a sua volta, è esteso all'intera superficie alveolare; il carrier risulta essere prevalentemente in membrana ma in parte anche citoplasmatico, come già osservato in altri tessuti (ad esempio, negli enterociti la quantità di proteina SGLT1 presente all'interno del pool intracellulare è maggiore rispetto alla quantità espressa sulla membrana plasmatica; *Kipp et al., 2003; Khoursandi et al., 2004*).

Il pannello C mostra, con un maggiore ingrandimento, la parte della sezione del pannello B racchiusa dal rettangolo bianco; è possibile apprezzare come la marcatura relativa a SGLT1 lungo il bordo del setto alveolare sia continua. Un segnale di questo

tipo è quello che ci si attende quando sono coinvolte anche le cellule alveolari di primo tipo; infatti, se la proteina SGLT1 fosse presente solo in quelle di secondo tipo, lo staining sarebbe localizzato solo in pochi punti della superficie alveolare (Crapo *et al.*, 1982). Queste cellule, inoltre, sono generalmente localizzate alle intersezioni tra i setti alveolari (Weibel, 1985), quindi non contribuiscono alla fluorescenza presente lungo le parti lineari del setto. Inoltre, il segnale non può essere attribuito alle cellule endoteliali (nelle quali, peraltro, il trasportatore non sembra essere espresso, Vedi 3.2.5), poiché anche in questo caso la marcatura sarebbe di tipo discontinuo. Il pannello D mostra un setto alveolare di un'altra sezione, anch'esso caratterizzato dalla presenza del segnale rosso relativo a SGLT1, continuo su tutta la lunghezza del setto.

3.2.5 SGLT1 e cellule endoteliali

Ad oggi non esistono evidenze funzionali che giustifichino la presenza della proteina SGLT1 nelle cellule endoteliali, tuttavia non si può affermare con certezza che il carrier non sia espresso in queste cellule. Per escludere che il segnale relativo alla presenza di SGLT1 da noi osservato in sezioni di epitelio alveolare fosse dovuto solo alla sua espressione nelle cellule endoteliali, è stato messo a punto un esperimento di doppia marcatura, simile a quello precedentemente discusso ma nel quale è stato utilizzato, oltre all'anticorpo anti-SGLT1, un marker specifico delle cellule endoteliali (Figura 43).

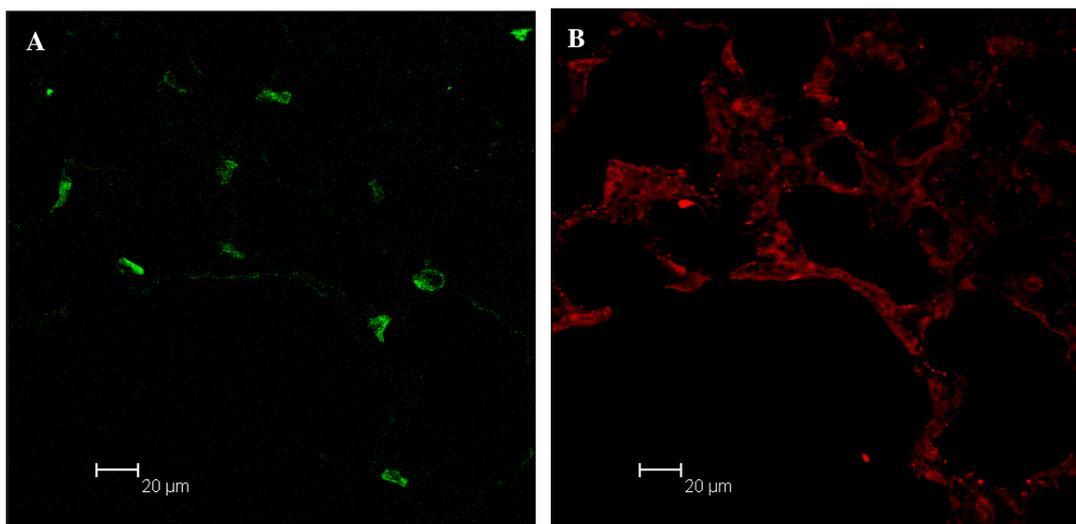


Figura 43. Immagini confocali di parenchima polmonare di ratto. In verde (pannello A) è visibile il segnale relativo alla lectina *Griffonia simplicifolia*, che lega in modo selettivo l'endotelio dei capillari alveolari. In rosso (pannello B) è possibile osservare l'espressione di SGLT1 nell'epitelio.

SGLT1 è stato messo in evidenza utilizzando l'anticorpo primario in grado di legarsi alla sequenza 546-596, riconosciuto da un anticorpo secondario coniugato a Texas red; per l'immunolocalizzazione delle cellule endoteliali è stata utilizzata una lectina derivata da *Griffonia simplicifolia*, coniugata a FITC, in grado di legarsi in modo specifico a residui di α -galattosio presenti sull'endotelio dei capillari alveolari (*Bankston et al., 1991*).

Nel pannello A della figura 43 è riportata una sezione di epitelio alveolare di ratto, nella quale è visibile in verde il segnale relativo alla presenza di endotelio capillare; il pannello B mostra la stessa sezione, marcata con l'anticorpo primario diretto contro SGLT1 e l'anticorpo secondario corrispondente, coniugato a Texas red. Come si può osservare, i segnali presenti nei due pannelli sono molto diversi, non comparabili tra di loro. Il labeling relativo a SGLT1, presente in quasi la totalità della superficie dell'epitelio, non può essere dovuto esclusivamente alla eventuale espressione della proteina nell'endotelio dei capillari alveolari, quindi è possibile asserire che essa deve essere espressa anche nelle cellule alveolari di primo tipo, citotipo che ricopre la quasi totalità della superficie degli alveoli.

3.3 Regolazione beta adrenergica di SGLT1 in cellule A549

È noto che l'attivazione dei recettori β_2 adrenergici (β_2 AR), presenti a livello delle cellule dell'epitelio respiratorio, permette di upregolare l'ATPasi Na^+/K^+ e i canali ENaC. Al contrario, non esistono prove in grado di dimostrare che la stimolazione β -adrenergica sia in grado di regolare l'attività del cotrasportatore Na^+ -glucosio nell'epitelio alveolare. Di fatto, dalla letteratura sono noti solo due casi in cui è stata accertata la stimolazione di SGLT1 in seguito ad attivazione β -adrenergica: nell'intestino di ratto (*Ishikawa et al., 1997*) e nel rumine di pecora (*Aschernbach et al., 2002*). Su questa base si è voluto indagare se anche a livello delle cellule alveolari l'attivazione β -adrenergica, ottenuta mediante trattamento con il beta agonista isoproterenolo, possa avere effetti sull'espressione o sulla localizzazione subcellulare di SGLT1.

3.3.1 Immunolocalizzazione dopo trattamento con isoproterenolo

Come modello sperimentale sono state scelte cellule alveolari umane, appartenenti alla linea A549; tali cellule, mantenute in coltura in condizioni standard, sono state rimosse dalla piastra petri di mantenimento tramite tripsinizzazione e suddivise in cinque gruppi sperimentali. Oltre al gruppo di controllo, che non veniva sottoposto a trattamenti, sono stati testati quattro diversi tempi di incubazione (30 minuti, 60 minuti, 120 minuti e 180 minuti) con il beta agonista isoproterenolo, in concentrazione finale 20 μM . Prima dell'inizio del trattamento, il terreno (RPMI) in cui erano immerse le cellule veniva sostituito con terreno serum-free, per evitare eventuali interazioni tra l'isoproterenolo e componenti del siero (FBS); successivamente i trattamenti venivano condotti in parallelo nei diversi gruppi, in modo che tutti i parametri fossero costanti e che l'unica variazione a cui erano sottoposte le cellule fosse il tempo di incubazione con il beta agonista. Al termine del trattamento le cellule venivano subito fissate con paraformaldeide e sottoposte a saggi di immunofluorescenza, utilizzando un anticorpo primario diretto contro la sequenza 402-420 di SGLT1 (AB1352) e un anticorpo secondario coniugato a FITC.

Nella figura 44 sono riportati i risultati di un esperimento di immunolabeling.

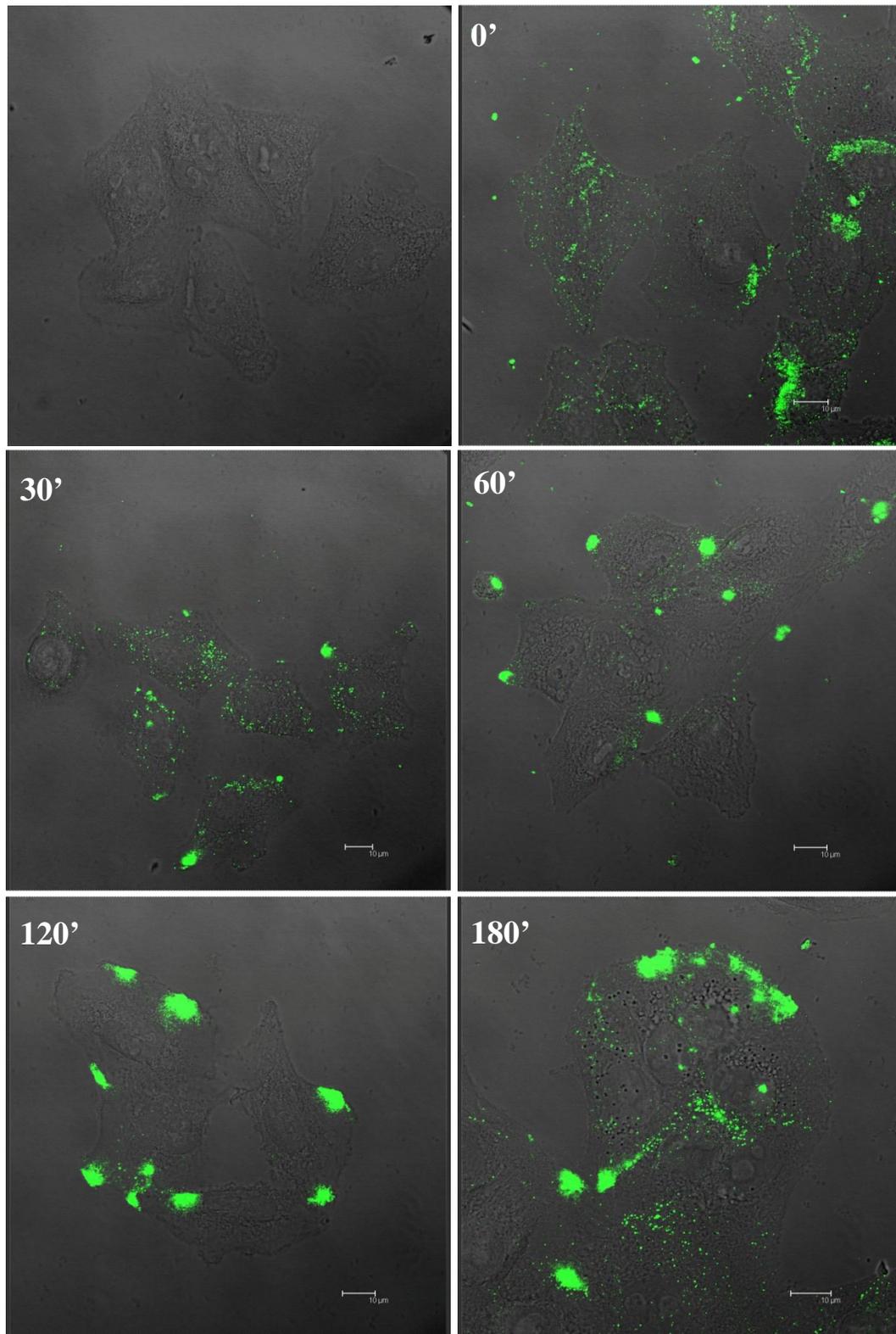


Figura 44. Immunofluorescenza su cellule trattate per tempi diversi con il beta agonista isoproterenolo. È stato utilizzato un anticorpo primario diretto contro la sequenza 402-420 di SGLT1, riconosciuto da un anticorpo secondario coniugato a FITC. Il controllo negativo è stato effettuato omettendo l'anticorpo primario (pannello in alto a sinistra).

Come si può osservare, nelle cellule non trattate SGLT1 sembra essere diffuso in tutta la cellula, senza concentrarsi in un particolare comparto. Dopo 30' minuti di stimolazione beta adrenergica con isoproterenolo la situazione resta invariata, mentre nelle cellule trattate per 1 ora si osserva una variazione della localizzazione subcellulare di SGLT1: il segnale tende a perdere la propria distribuzione originaria e si concentra in un punto della cellula. Questa nuova distribuzione del segnale è mantenuta anche in cellule trattate per 120 minuti, mentre dopo 180 minuti di incubazione si ha l'impressione che il pattern di marcatura inizi a tornare simile al controllo: esistono ancora zone in cui il segnale è più concentrato, ma si possono osservare anche spot diffusi in tutta la cellula. Dalla semplice osservazione delle immagini è molto difficile stabilire se si verifichi anche un aumento dell'intensità del segnale fluorescente (che sarebbe indice di un aumento dell'espressione della proteina SGLT1) poiché, nonostante la marcatura possa apparire più intensa, bisogna considerare il fatto che, rispetto al controllo, in seguito alla stimolazione con isoproterenolo la fluorescenza si concentra in un unico punto della cellula. Per questo motivo, utilizzando il software ImageJ è stata eseguita un'analisi quantitativa dell'intensità della fluorescenza; per ogni cellula veniva misurata l'intensità del segnale, normalizzandola successivamente per l'area della cellula stessa.

Nell'istogramma riportato nella figura 45 sono rappresentati i valori di fluorescenza nei diversi gruppi sperimentali, espressi in percentuale, del valore misurato nel gruppo di controllo. Dall'analisi statistica (t di Student per dati non appaiati) risulta che dopo 1 ora di incubazione con il beta agonista isoproterenolo si verifica un aumento significativo del segnale fluorescente collegato a SGLT1, che, quindi, riflette un aumento dell'espressione del trasportatore in cellula. Questo risultato è in accordo con i dati disponibili in letteratura: infatti, anche negli altri tessuti in cui era stata indagata la regolazione beta adrenergica del cotrasportatore Na⁺-glucosio era stato osservato che la stimolazione induceva un aumento della sua espressione (*Ishikawa et al., 1997; Aschernbach et al., 2002*).

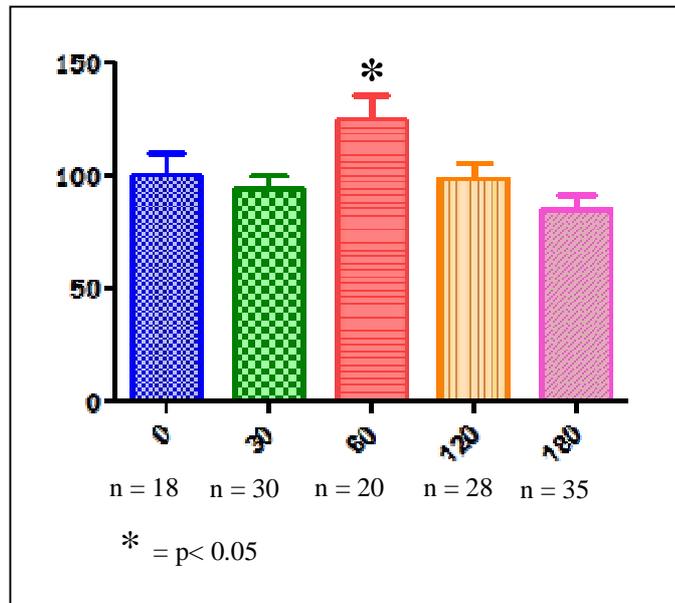


Figura 45. Analisi dell'intensità di fluorescenza, normalizzata per l'area cellulare e riportata in grafico sottoforma di percentuale.

Ciò che più ci ha sorpreso è stata la variazione della localizzazione subcellulare della proteina, fenomeno che non era stato osservato dagli autori che si erano già occupati della regolazione beta adrenergica di SGLT1 (*Ishikawa et al., 1997; Aschenbach et al., 2002*). L'ipotesi formulata per cercare di spiegare questa variazione della localizzazione della proteina all'interno della cellula è che SGLT1 possa andare incontro a fenomeni di internalizzazione. Come già riportato nel paragrafo 1.6, le proteine di membrana e altre sostanze possono in alcune situazioni andare incontro a endocitosi ed essere internalizzate nella cellula; nella fase iniziale di questo processo le proteine vengono convogliate in un endosoma precoce e, a partire da questo, possono prendere tre diverse vie: ai lisosomi per la degradazione, al complesso di Golgi per subire eventuali modifiche post traduzionali, oppure agli endosomi di recycling, per poi tornare sulla membrana plasmatica. La nostra ipotesi è che SGLT1, in seguito a stimolazione prolungata con isoproterenolo, venga internalizzato in cellula e che successivamente ritorni in membrana seguendo la via degli endosomi di recycling.

3.3.2 Doppia marcatura SGLT1 e Rab11A

Per verificare l'ipotesi dell'endocitosi e recycling in membrana di SGLT1, è stato messo a punto un esperimento di immunofluorescenza su cellule A549, precedentemente sottoposte a stimolazione β -adrenergica con isoproterenolo per 60 minuti. Al termine

del trattamento, le cellule sono state fissate con paraformaldeide e sottoposte a un saggio di immunofluorescenza con doppia marcatura: sono stati utilizzati un anticorpo anti-SGLT1 (AB1352) e un anticorpo diretto contro la proteina Rab11A (ab78337, Abcam), marker specifico degli endosomi di recycling.

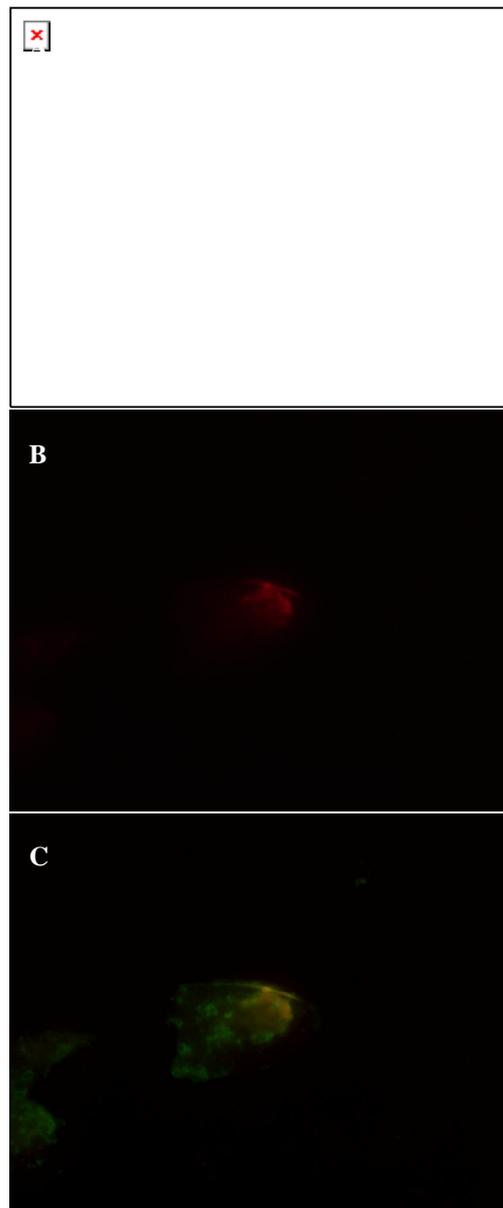


Figura 46. Immunofluorescenza su cellule trattate per 60 minuti con isoproterenolo in concentrazione finale 20 μ M. In verde è visibile il segnale relativo a SGLT1 (pannello A) mentre in rosso è stato marcato l'endosoma di recycling (pannello B). Nel pannello C si osserva la sovrapposizione delle due immagini.

Come si può osservare nel pannello A della figura 46, dopo un'ora di incubazione con isoproterenolo il segnale relativo a SGLT1 inizia a concentrarsi in un punto della

cellula, che riteniamo corrispondere alla localizzazione dell'endosoma di recycling. Questa ipotesi è confermata da quanto si osserva nel pannello B della stessa figura: il punto in cui si concentra il segnale verde presenta anche la marcatura rossa relativa alla proteina Rab11A. La colocalizzazione dei due segnali è visibile nel pannello C.

Il risultato, quindi, rappresenta una prima dimostrazione della nostra ipotesi, secondo cui SGLT1 può essere soggetto a regolazione beta adrenergica, associata ad un processo di endocitosi e recycling in membrana.

4. DISCUSSIONE

4.1 Espressione di SGLT1 nel mesotelio pleurico

Studi fenomenologici *in vivo* (Zocchi *et al.*, 1996) hanno fornito prove indirette della presenza di un cotrasporto Na^+ -glucosio nel mesotelio pleurico di coniglio, una localizzazione insolita per tale meccanismo di trasporto, generalmente coinvolto nel mantenimento della omeostasi del glucosio nell'intero organismo. La sua localizzazione tipica, infatti, è negli epitelii responsabili dell'approvvigionamento del glucosio dall'ambiente esterno (come quello dell'intestino tenue) o del recupero del monosaccaride temporaneamente uscito dal circolo (come l'epitelio del tubulo contorto prossimale renale), non a livello di barriere che separano ambienti interni all'organismo, come il mesotelio. D'altra parte, non va trascurato il ruolo del trasportatore nell'assicurare un assorbimento di acqua associato a quello di sodio e glucosio, ruolo quantitativamente molto rilevante nell'intestino tenue, ma prevedibilmente cruciale anche nei distretti corporei il cui contenuto di acqua deve essere mantenuto a un valore minimo, come lo spazio pleurico (per il mantenimento dell'accoppiamento meccanico tra polmone e parete toracica durante la respirazione) e l'alveolo polmonare (per il mantenimento della normale meccanica polmonare e del normale spessore della membrana attraverso cui avviene la diffusione dei gas). L'efficacia di questo cotrasporto nell'assorbimento di acqua potrebbe essere assai rilevante, nel caso in cui venisse confermata la sua funzione associata di potente trasportatore attivo di acqua, anche contro gradiente osmotico, con stechiometria $2 \text{Na}^+ : 1 \text{glucosio} : \sim 260 \text{H}_2\text{O}$ (Loo *et al.*, 2002).

In seguito, l'effettiva presenza della proteina SGLT1 nella pleura viscerale e parietale di coniglio, specie animale a pleura sottile, è stata documentata (Sironi *et al.*, 2007) attraverso esperimenti di biologia molecolare.

In questa ricerca sono stati messi a punto saggi di Western blot utilizzando campioni proteici estratti da pecora e agnello, per verificare se anche a livello del mesotelio pleurico di specie animali a pleura spessa sia espresso il cotrasportatore Na^+ -glucosio. La questione assume rilevanza nel contesto dello studio del quadro generale dei meccanismi che assicurano l'adeguato turnover del liquido pleurico. Infatti, l'assenza di un meccanismo di trasporto di soluti e acqua attraverso il mesotelio delle specie a pleura

spessa renderebbe inapplicabile a questi animali (che comprendono i più grandi mammiferi e, in particolare, l'uomo) il modello riconosciuto valido per i piccoli animali, a pleura sottile.

I risultati ottenuti indicano che SGLT1 è presente nel mesotelio parietale e viscerale di agnello e di pecora adulta, oltre che in cellule appartenenti ad una linea di mesotelio pleurico umano. In particolare, oltre alla banda a 72 kDa caratteristica per SGLT1, sono stati talora rinvenuti anche segnali specifici a 60 e/o 55 kDa. Quest'ultima banda è già stata descritta in letteratura e sono state avanzate diverse ipotesi sulla sua natura. È stato ipotizzato, infatti, che essa possa rappresentare il solo "core" glicosilato della proteina SGLT1, mentre la banda a 72 kDa coinciderebbe con la proteina completa glicosilata (*Panayotova-Heiermann et al., 1997*). In alternativa, le proteine SGLT1 da 72 e 55 kDa potrebbero differire tra loro in relazione a differenti livelli di glicosilazione e/o di fosforilazione in specifici siti aminoacidici, modificazioni post-traduzionali tra le più comuni nelle proteine di membrana (*Mate et al., 2006*). Analogo significato potrebbe essere attribuito anche alla presenza del prodotto che forma una banda a circa 60 kDa. Inoltre, l'espressione del segnale a 55 kDa potrebbe essere spiegata con la presenza di due siti d'inizio della traduzione (*Zhao et al., 2005*); in base a ciò si verrebbero ad avere due prodotti proteici entrambi funzionanti, che formano bande, rispettivamente a 72 e a 55 kDa. In particolare, nel bovino questo secondo sito di inizio della traduzione coinciderebbe con il residuo di Metionina in posizione 211 (*Zhao et al., 2005*).

Grazie all'utilizzo di inibitori selettivi per determinati carriers di membrana, in analogia a quanto compiuto negli epitelii assorbenti, vari studi funzionali (condotti utilizzando come modello animale il coniglio) avevano dimostrato l'esistenza di un riassorbimento isoosmotico di liquido dal cavo pleurico, al seguito di un trasporto attivo di soluti mediato dalle cellule del mesotelio pleurico. Come negli epitelii assorbenti, questo processo sembrerebbe realizzarsi grazie all'attività di trasporto coordinata di un'ATPasi Na^+/K^+ , un doppio scambio $\text{Na}^+/\text{H}^+, \text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ e di un cotrasporto Na^+ -glucosio (*Agostoni e Zocchi, 1993; Zocchi et al., 1996*).

Per quanto riguarda il mesotelio pleurico, la localizzazione dei trasportatori coinvolti sembrerebbe in accordo col modello proposto, che prevede una distribuzione asimmetrica dei carriers coinvolti: basolaterale per l'ATPasi Na^+/K^+ , apicale per il doppio scambio $\text{Na}^+/\text{H}^+, \text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ e per il cotrasporto Na^+ -glucosio. Nel coniglio, infatti, il riassorbimento isoosmotico di liquido dal cavo pleurico risultava ridotto (*Agostoni e Zocchi, 1993; Zocchi et al., 1996*) solo se il trattamento con amiloride o

florizina (inibitori tipici rispettivamente del doppio scambio $\text{Na}^+/\text{H}^+, \text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ e del cotrasporto Na^+ -glucosio) avveniva apicalmente, oppure se quello con ouabaina (inibitore dell'ATPasi Na^+/K^+) avveniva dal lato interstiziale. A conferma di ciò, i dati ora ottenuti con gli esperimenti di immunofluorescenza condotti su mesotelio pleurico di pecora indicano che SGLT1 è localizzato sulla membrana apicale delle cellule mesoteliali.

In conclusione i risultati sperimentali ottenuti nella pecora e nell'uomo rappresentano una prova a sostegno del coinvolgimento del cotrasportatore Na^+ -glucosio nel processo di assorbimento del liquido pleurico anche nelle specie animali a pleura spessa, avvalorando l'ipotesi in base alla quale una frazione sostanziale del riassorbimento di acqua è conseguente ad un riassorbimento di osmoliti, secondo il modello noto per gli epitelii assorbenti. Il risultato ottenuto contribuisce a risolvere la controversa questione sull'esistenza di un assorbimento di liquido attraverso la pleura viscerale anche negli animali a pleura spessa (*Lai-Fook, 2004*). Infatti, l'assorbimento di acqua accoppiato al trasporto di soluti attuato dal trasportatore opererebbe in serie con le forze di Starling dei capillari sottomesoteliali, creando anche nella pleura spessa (perfusa da capillari con pressione più elevata di quelli che perfondono la pleura sottile) le condizioni necessarie per causare assorbimento in questi capillari.

La presenza del liquido pleurico garantisce anche un'azione lubrificante, con conseguente riduzione dell'attrito dovuto allo scorrimento delle strutture coinvolte nell'atto respiratorio. Tale azione lubrificante si realizza non solo per la semplice presenza del film di liquido, ma anche grazie a costituenti come l'acido ialuronico ed il surfattante, prodotti dalle cellule mesoteliali e poi esocitati nel cavo pleurico (*Hills, 1992; Agostoni et al., 1999; Zocchi, 2002; D'Angelo et al., 2004*). Sulla base di alcune analogie che accomunano le cellule del mesotelio pleurico e gli pneumociti di tipo II degli alveoli polmonari, è possibile ipotizzare che la presenza di SGLT1 a livello del mesotelio pleurico possa essere correlata anche alla sintesi di surfattante (*Michailova, 2004*) da parte delle cellule mesoteliali. Le cellule del mesotelio pleurico potrebbero utilizzare il glucosio accumulato in cellula da SGLT1 anche per la sintesi di acido ialuronico (un polimero di unità disaccaridiche ripetute di acido D-glucuronico e N-acetil-D-glucosammina), che a sua volta riduce l'attrito durante i movimenti respiratori (*Laurent e Fraser, 1989*). A livello di queste cellule, quindi un possibile ruolo del cotrasportatore Na^+ -glucosio sarebbe quello di garantire livelli di glucosio adeguati per tali sintesi. Infatti, sebbene sulla membrana delle cellule mesoteliali siano espressi

carrier che mediano trasportati passivi facilitati di glucosio (GLUT1 e GLUT3; *Schröppel et al., 1998*), l'apporto di glucosio da essi sostenuto potrebbe non essere sufficiente per le sintesi descritte.

Un'osservazione clinica rimasta finora senza spiegazione (*Sahn, 1985*) può essere interpretata sulla base della presenza del cotrasporto sodio-glucosio nella pleura umana, e, allo stesso tempo, permette di apprezzare l'efficacia del trasportatore. Nei pazienti con artrite reumatoide, la concentrazione di glucosio nel liquido pleurico è circa 10 volte inferiore a quella fisiologica (che è simile a quella plasmatica, circa 100 mg/dl) ed è relativamente indipendente da quella plasmatica, non aumentando all'aumentare della glicemia (*Sahn, 1985*). Ciò è presumibilmente dovuto alla bassa permeabilità della pleura ai soluti (per motivi non del tutto noti ma verosimilmente legati alle diffuse alterazioni connettivali tipiche della malattia), e, pertanto, alla riduzione della quantità di glucosio filtrata attraverso la pleura parietale. In questi pazienti, la concentrazione del glucosio nel liquido pleurico si riduce rapidamente dopo l'iniezione di glucosio nel cavo pleurico, ma la riduzione non si verifica *in vitro*, se glucosio viene aggiunto al liquido pleurico prelevato dagli stessi pazienti (*Sahn, 1985*). Ciò indica che essa non è causata da degradazione ad opera di batteri o a consumo da parte di cellule presenti nel liquido, ma può essere attribuita all'attività del trasportatore. La rapidità con cui la concentrazione si riduce dopo l'iniezione del carico di glucosio e in presenza di un ridotto ingresso dello zucchero fornisce una indicazione della notevole potenza del trasportatore, anche se, purtroppo, dai dati riportati non è possibile trarre conclusioni quantitative sul carico di glucosio trasportato.

4.2 Espressione di SGLT1 nell'epitelio alveolare polmonare

La presenza del cotrasportatore Na⁺-glucosio a livello dell'epitelio alveolare è stata a lungo indagata. Le prime indicazioni a sostegno della sua presenza in questa sede si ottennero da prove funzionali condotte su polmone di ratto *in situ*. In particolare, studi fenomenologici, condotti allo scopo di analizzare i meccanismi di trasporto coinvolti nel riassorbimento di liquido alveolare, avevano dimostrato che attraverso l'epitelio polmonare si realizzava un trasporto di glucosio sensibile alla florizina, riconducibile alla presenza del cotrasportatore Na⁺-glucosio a livello delle cellule dell'epitelio alveolare (*Basset et al., 1987*). Tale carrier, quindi, parteciperebbe sia alla rimozione di osmoliti (Na⁺ e glucosio) e acqua dalla superficie alveolare, sia al mantenimento di una

bassa concentrazione di glucosio nel liquido alveolare. Ciò sarebbe opportuno per ostacolare eventuali proliferazioni batteriche a livello polmonare (*Baker et al., 2006*).

Nonostante la dimostrazione funzionale della presenza del cotrasportatore Na⁺-glucosio nell'epitelio alveolare, rimane ancora da stabilire con certezza in quale dei citotipi alveolari il carrier sia espresso. Infatti, indagini condotte su polmone di topo e coniglio mediante autoradiografia avevano indicato che il cotrasportatore sarebbe espresso solo nelle cellule alveolari di tipo II (ATII) (*Boyd, 1990*). Tuttavia, dai primi esperimenti svolti per valutare in modo più approfondito l'espressione di SGLT1 a livello alveolare, avevamo ottenuto indicazioni della sua presenza anche a livello delle cellule alveolari di tipo I (ATI). Ciò non esclude che SGLT1 sia espresso anche sulla membrana plasmatica delle cellule alveolari di tipo II, dove può svolgere molteplici ruoli. Infatti, anche se in misura modesta considerata la scarsa densità di queste cellule (5% circa della complessiva superficie dell'epitelio alveolare), può in primo luogo contribuire al riassorbimento di liquido alveolare e al mantenimento di una ridotta concentrazione alveolare di glucosio. Inoltre, la sua presenza potrebbe essere correlata alla principale funzione delle cellule alveolari di tipo II (ATII): la sintesi di surfattante. Tale sintesi, infatti, richiede una notevole quantità di glucosio che rappresenta un precursore della fosfatidilcolina (*Bourbon et al., 1982*), uno dei principali costituenti del tensioattivo. Del resto, i trasportatori facilitati per il glucosio (presenti in tutti i tipi cellulari) potrebbero non essere sufficienti per soddisfare le richieste di glucosio, non essendo in grado di accumularlo in cellula, al contrario del cotrasportatore Na⁺-glucosio. La presenza di SGLT1 sulla membrana delle ATII permetterebbe un maggiore accumulo intracellulare di glucosio da utilizzare per la sintesi di fosfatidilcolina.

La presente ricerca, grazie a saggi di immunostaining per SGLT1 condotti su sezioni di parenchima polmonare, ha permesso di osservare a livello dell'alveolo di ratto e di pecora un'estesa marcatura, diffusa in tutto l'epitelio alveolare, che sembra specifica per il carrier. Infatti, sottoponendo le sezioni a doppia marcatura con due differenti anticorpi anti-SGLT1, suscitati in specie animali differenti e in grado di interagire con due distinti epitopi del carrier, sono state ottenute immagini fluorescenti ampiamente sovrapponibili. Inoltre, l'utilizzo di differenti tecniche per la preparazione dei campioni istologici, quali l'inclusione e il taglio al microtomo, oppure il congelamento e il taglio al criostato, hanno dato come risultato immagini del tutto paragonabili.

Quindi, considerando che le cellule alveolari di tipo II costituiscono solo il 5% della complessiva superficie dell'epitelio polmonare, il pattern di marcatura ottenuto (esteso a

tutta la superficie degli alveoli) indica che SGLT1 dovrebbe essere localizzato anche a livello delle cellule alveolari di tipo I che invece, come già riportato, rappresentano il 95% dell'intera superficie alveolare (Weibel, 1985).

Un'ulteriore prova a sostegno di questa ipotesi è stata fornita da saggi di immunostaining condotti sottoponendo le sezioni di parenchima polmonare di ratto a doppia marcatura; oltre all'anticorpo in grado di riconoscere SGLT1 è stata utilizzata la lectina derivata da *Erythrina Cristagalli*. Questa lectina riconosce e lega in maniera specifica i residui di N-acetilglucosamina presenti sulla superficie di membrana delle cellule alveolari di tipo I, ma non su quelle di tipo II e sulle cellule endoteliali (Taatjes et al., 1990). I segnali fluorescenti ottenuti per SGLT1 e per la lectina sono ampiamente sovrapponibili, a conferma della localizzazione di SGLT1 anche a livello delle cellule alveolari di tipo I oltre che in quelle di tipo II.

Risultati compatibili con quanto ipotizzato sono stati ottenuti su cellule alveolari isolate da polmone di ratto; anche in questo caso è stata realizzata una doppia marcatura, con anticorpi specifici per SGLT1 ed SP-C, una proteina associata al surfattante e perciò utilizzata come marcatore delle cellule di tipo II. Sebbene di per sé non conclusivi, poichè l'assenza di una risposta "tutto-o-nulla" della marcatura per SP-C consente solo un'approssimativa discriminazione delle cellule alveolari, anche questi saggi hanno evidenziato la presenza di SGLT1 su elementi cellulari che potrebbero identificarsi con cellule alveolari sia di tipo II, sia di tipo I.

Ulteriori prove a favore dell'espressione di SGLT1 anche nelle cellule alveolari di tipo I sono state ottenute con altri esperimenti di immunofluorescenza, effettuati su sezioni di epitelio alveolare di ratto; oltre all'anticorpo diretto contro SGLT1 è stata utilizzata la lectina derivata da *Griffonia simplicifolia*, in grado di legarsi selettivamente ai residui di α -galattosio presenti sulla membrana delle cellule endoteliali. Le immagini ottenute hanno evidenziato un tipo di marcatura completamente diversa per SGLT1 e per l'endotelio, indicando che il segnale relativo a SGLT1 non può dipendere solo dalla sua eventuale espressione nelle cellule endoteliali ma anche dalla sua presenza nelle cellule alveolari di primo tipo.

La dimostrazione della presenza del cotrasporto Na^+ -glucosio nelle cellule alveolari di primo tipo permette di approfondire le conoscenze relative al quadro generale dei meccanismi di controllo del volume del liquido alveolare. In particolare, permette di attribuire al trasporto vettoriale transepiteliale di soluti e, quindi, all'assorbimento di liquido dagli spazi alveolari, una rilevanza ben maggiore di quanto precedentemente

ipotizzato sulla base di un supposto confinamento del trasportatore alle cellule di secondo tipo. La presenza di SGLT1 in tutte le cellule dell'epitelio alveolare, inoltre, contribuirebbe in misura quantitativamente più rilevante alla riduzione della concentrazione alveolare di glucosio, in modo da contrastare la proliferazione batterica a livello della superficie.

4.3 Regolazione β -adrenergica di SGLT1 in cellule alveolari

L'isoforma β_2 dei recettori adrenergici (β_2 AR) è ampiamente distribuita a livello del sistema respiratorio, essendo stata rinvenuta sia nel mesotelio pleurico sia negli epitelii di rivestimento delle vie aeree e dei polmoni, in particolare a livello delle cellule alveolari di tipo I e di tipo II (*Johnson et al., 2001*). In queste sedi essi intervengono nella regolazione di svariati processi, quali la secrezione di surfattante da parte delle cellule alveolari di tipo II (*Kumar et al., 2000*) ed il riassorbimento di osmoliti ed acqua in diversi distretti dell'apparato. È noto, infatti, che gli agonisti dei β_2 AR sono in grado di stimolare il riassorbimento di soluti ed acqua attraverso il mesotelio pleurico (*Zocchi e Agostoni, 1994*), l'epitelio tracheale (*Al-Bazzaz e Cheng, 1979*) e quello polmonare (*Saumon et al., 1987*), intervenendo così nel controllo del volume e della composizione del liquido presente nel cavo pleurico, sulla superficie delle vie aeree e degli alveoli.

In particolare, a livello dell'epitelio respiratorio i β_2 AR intervengono nella regolazione della clearance alveolare stimolando il riassorbimento di fluido dagli spazi aerei a seguito di un aumento del trasporto attivo di Na^+ (*Mutlu et al., 2004*). Secondo le conoscenze già disponibili, questo effetto dipende dalla capacità dei β_2 AR di modulare positivamente l'attività dell'ATPasi Na^+/K^+ e dei canali ENaC e di promuovere l'espressione di questi ultimi a livello delle cellule dell'epitelio respiratorio (*Yue et al., 1994*). Nelle cellule alveolari di tipo II è stato infatti dimostrato che, in seguito a stimolazione del β_2 AR con terbutalina, si verifica un incremento del tempo di apertura dei canali ENaC ed un aumento dell'espressione dell'mRNA codificante per il canale, con conseguente incremento del numero dei canali inseriti in membrana (*Yue et al., 1994*).

A tutt'oggi non esistono invece prove di una regolazione β -adrenergica di SGLT1 a livello degli epitelii del sistema respiratorio in genere e dei polmoni in particolare. Di fatto, in letteratura esistono solo due studi a riguardo, nei quali è stata accertata la stimolazione di SGLT1 in seguito ad attivazione β -adrenergica nell'intestino di ratto

(*Ishikawa et al., 1997*) e nel ruminante di pecora (*Aschermann et al., 2002*). A livello degli epitelii di rivestimento di questi tratti del canale alimentare è stato osservato che la stimolazione dei β_2 AR determina una serie di eventi che portano all'incremento dell'assorbimento transepiteliale di glucosio, associato ad un aumento dell'espressione del cotrasportatore stesso.

Su questa base si è indagato se anche nelle cellule alveolari l'attivazione dei β_2 AR potesse avere effetti sull'espressione di SGLT1, indagata mediante saggi di immunofluorescenza. Per questo studio sono state utilizzate cellule alveolari umane appartenenti alla linea A549, sottoposte a trattamenti di diversa durata con l'agonista beta adrenergico isoproterenolo. La durata minima dell'incubazione è stata di 30 minuti, poiché negli esperimenti condotti da *Ishikawa e collaboratori (1997)* una stimolazione di questa durata era già più che sufficiente per osservare un effetto sull'assorbimento di glucosio. Oltre a questo sono stati testati anche tempi di incubazione più lunghi, fino a tre ore, per poter registrare eventuali effetti più a lungo termine sull'espressione di SGLT1. Le immagini di immunofluorescenza ottenute nei diversi gruppi sperimentali sono state analizzate da due diversi punti di vista: quantitativo (intensità media della fluorescenza) e qualitativo (localizzazione subcellulare del segnale).

L'analisi dell'intensità media della fluorescenza ha messo in evidenza come, dopo un'ora di stimolazione dei β -AR, si verifici un aumento dell'espressione della proteina SGLT1. Tale dato è in accordo con le informazioni presenti in letteratura, anche se per ottenere un effetto significativo è stato necessario stimolare le cellule per un tempo maggiore rispetto a quello precedentemente utilizzato per l'intestino. Il risultato che ci ha maggiormente stupito è stato però quello riguardante la variazione della localizzazione subcellulare di SGLT1 conseguente alla stimolazione. Infatti, mentre nel controllo e in seguito a un trattamento di 30 minuti la proteina sembra essere diffusa in tutta la cellula, dopo 60 minuti di incubazione con il β -agonista la marcatura verde relativa a SGLT1 risulta meno diffusa e si concentra in un punto della cellula. Dopo due ore di incubazione, tutto il segnale fluorescente sembra raccogliersi in un particolare comparto cellulare, mentre in seguito ad un trattamento della durata di tre ore la situazione sembra tornare ad avvicinarsi a quella di controllo: il segnale verde è ancora più concentrato in un punto, ma cominciano anche a comparire spot più diffusi. Un fenomeno di questo genere non era stato osservato dagli altri autori che si erano occupati di regolazione beta adrenergica della proteina SGLT1, molto probabilmente perché non avevano preso in considerazione l'utilizzo di tecniche di

immunolocalizzazione. Negli anni scorsi (*Kipp et al., 2003; Khoursandi et al., 2004*) è stato dimostrato che in cellule Caco-2 (modello per enterociti), oltre alle proteine SGLT1 inserite all'interno della membrana plasmatica, esiste anche un pool intracellulare del carrier; il pool intracellulare di SGLT1 è risultato essere presente all'interno di vescicole (presumibilmente endosomi) associate a microtubuli. Inoltre Khoursandi e collaboratori (*2004*) hanno osservato che il cotrasportatore Na⁺-glucosio può essere internalizzato in cellule Caco-2, attraverso un processo reversibile che può poi permettere alle proteine di tornare in membrana.

Basandoci su queste informazioni abbiamo formulato un'ipotesi per spiegare la variazione della localizzazione subcellulare della proteina nelle cellule alveolari dopo stimolazione con isoproterenolo. Ciò che abbiamo ipotizzato è che dopo una stimolazione acuta dei β -AR si verifichi un aumento dell'espressione di SGLT1 seguito, nel caso in cui la stimolazione venga prolungata nel tempo, da un processo di endocitosi e successivo recycling in membrana. Una prima verifica dell'attendibilità di questa ipotesi è stata ottenuta grazie agli esperimenti di immunofluorescenza con doppia marcatura, nei quali sono stati messi in evidenza sia la proteina SGLT1 che un marker specifico degli endosomi di recycling (Rab11A). Dai saggi di immunolabeling è emerso che, in cellule stimulate per 60 minuti con il beta agonista, il punto in cui inizia a concentrarsi la marcatura per SGLT1 coincide con l'endosoma di recycling (i due segnali colocalizzano). Per poter verificare in modo più accurato questa teoria saranno necessari ulteriori esperimenti, in modo da definire anche il pathway esatto seguito dalla proteina in questo processo di regolazione.

Resta da chiedersi perché si verifichi l'internalizzazione di SGLT1, poiché quello che ci si aspetta dalla stimolazione con beta agonisti è semplicemente un aumento del riassorbimento di Na⁺ e glucosio, in modo da incrementare il riassorbimento di fluido associato a quello di soluti. Possono essere formulate varie ipotesi nel tentativo di spiegare perché la cellula abbia la necessità di dare il via ad un fenomeno di endocitosi e internalizzazione. Una di queste, puramente speculativa, riguarda la necessità, in seguito a stimolazione prolungata nel tempo, di riportare i livelli di espressione di SGLT1 ai valori fisiologici. Per questo motivo le proteine potrebbero venire internalizzate e, successivamente, in parte degradate e in parte ridirette in membrana attraverso gli endosomi di recycling. Per poter comprendere meglio la complessa regolazione a cui va incontro SGLT1 a livello dell'epitelio alveolare sarà anche necessario mettere a punto esperimenti funzionali, per esempio, diretti a ottenere

informazioni sulle variazioni del riassorbimento di glucosio e, quindi, dell'attività del cotrasportatore, oltre che della sua espressione e localizzazione.

5. BIBLIOGRAFIA

Adamson I.Y.R. and Bowen D.H.

Derivation of type I epithelium from type II cells in the developing rat lung
Lab. Invest. 32:736-746, **1975**.

Agostoni E., Miserocchi G., Bonanni M.V.

Thickness and pressure of the pleural liquid in some mammals
Respir Physiol. 6(2):245-56, **1969**.

Agostoni E.

Mechanics of the pleural space
Physiol. Rev.; 52: 57-128, **1972**.

Agostoni E.

Mechanics of the pleural space
In: Macklem P.T., Mead J. Eds., Handbook of Physiology: The respiratory system, Mechanics of Breathing. Baltimore, American Physiological Society; pp. 531-559, **1986**.

Agostoni E., Zocchi L.

Solute-coupled liquid absorption from the pleural space
Respir. Physiol.; 81: 19-27, **1990**.

Agostoni E., Zocchi L.

Active Na⁺ transport and coupled liquid outflow from hydrothoraces of various size
Respir.Physiol. 92: 101-113, **1993**.

Agostoni E., Zocchi L.

Mechanical coupling and liquid exchanges in the pleural space
Clin. Chest Med.;19: 241-260, **1998**.

Agostoni E., Bodega F., Zocchi L.

Equivalent radius of paracellular "pores" of the mesothelium
J. Appl. Physiol. 87: 538-544, **1999**.

Agostoni E., Bodega F., Zocchi L.

Albumin transcytosis from the pleural space
J. Appl. Physiol.; 93: 1806-1818, **2002**.

Agostoni E., Zocchi L.

Pleural Liquid and its exchanges
Respir. Physiol. Neurobiol., 159: 311-323, **2007**.

Al-Bazzaz F., Cheng E.

Effect of catecholamines on ion transport in dog tracheal epithelium
J. Appl. Physiol. 47: 397-403, **1979**.

Albertine K.M., Wiener-Kronish J.P., Roos P.J., Staub N.C.

Structure, blood supply, and lymphatic vessels of the sheep visceral pleura

Anat. Rec., 165: 277-294, **1982**.

Aschenbach J.R., Borau T., Gabel G.

Glucose uptake via SGLT1 is stimulated by β_2 -adrenoreceptors in the ruminal epithelium of sheep

J. Nutr. 132(6): 1254-7, **2002**.

Baker E.H., Wood D.M., Brennan A.L., Clark N., Baines D.L., Philips B.J.
Hyperglycemia and pulmonary infection

Proc. Nutr. Soc. 65: 227-235, **2006**.

Balboni G., Bastianini A. et al

Anatomia Umana, Edi-Ermes, 2: 346-349, **1998**.

Bankston P.W., Porter G.A., Milici A.J., Palade G.E.

*Differential and specific labeling of epithelial and vascular endothelial cells of the rat lung by *Lycopersicon esculentum* and *Griffonia simplicifolia* I lectins*

Eur J Cell Biol 54:187-195, **1991**.

Basset G., Crone C., Saumon G.

Fluid absorption by rat lung in situ: pathways for sodium entry in the luminal membrane of alveolar epithelium

J. Physiol. 384: 325-345, **1987**.

Bastacky J., Lee C.Y., Goerke J., Koushafar H., Yager D., Kenaga L., Speed T.P., Chen Y., Clements J.A.

Alveolar lining layer is thin and continuous: low-temperature scanning electron microscopy of rat lung

J. Appl. Physiol. 79, 1615-1628, **1995**.

Berdiev B.K., Prat A.G., Cantiello H.F., Ausiello D.A., Fuller C.M., Jovov B., Benos D.J., Ismailov I.L.

Regulation of epithelial sodium channels by short actin filaments

J Biol Chem 271:17704-17710, **1996**.

Bernaudin J.F. and Fleury J.

Anatomy of the blood and lymphatic circulation of the pleural serosa

In: Chrétien J., Bignon J., Hirsch A. Eds. The Pleura in Health and disease. New York, Dekker; pp.23-42, **1985**.

Berry G.T., Mallee J.J., Kwon H.M., Rim J.S., Mulla W.R., Muenke M., Spinner N.B.

The human osmoregulatory Na^+ /myoinositol cotransporter gene (SLC5A3): molecular cloning and localization to chromosome 21

Genomics 25: 507-513, **1995**.

Berthiaume Y., Broaddus V.C., Gropper M.A., Tanita T., Matthay M.A.

Alveolar liquid and protein clearance from normal dog lungs

J Appl Physiol 65:585-593, **1988**.

Berthiaume Y., Staub N.C., Matthay M.A.

Beta-adrenergic agonists increase lung liquid clearance in anesthetized sheep
J Clin Invest 79:335–343, **1987**.

Berthiaume Y., Staub N.C., Matthay M.A.

Beta-adrenergic agonists increase lung liquid clearance in anesthetized sheep
J. Clin. Invest.; 79: 335-343, **1991**.

Bodega F., Zocchi L., Agostoni E.

Albumin transcytosis in mesothelium
Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. Jan;282(1):L3-11, **2002**.

Bonifacino J.S. and Rojas R.

Retrograde transport from endosomes to the trans-Golgi network
Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 7: 568-579, **2006**.

Bourbon J.R., Rieutort M., Engle M.J., Farrell P.M.

Utilization of glycogen for phospholipid synthesis in fetal rat lung
BBA 712: 382-9, **1982**.

Boyd C.A.R.

Cellular basis of active D-glucose transport in mouse and rabbit lung
J. Physiol. 422: 44P, **1990**.

Button B., Picher M., Boucher R.

Differential effects of cyclic and constant stress on ATP release and mucociliary transport by human airway epithelia
J Physiol. 580 (2): 577-592, **2007**.

Chow Y.H., Wang Y., Plumb J., O’Brodivich H., Hu J.

Hormonal regulation and genomic organization of the human amiloride-sensitive epithelial sodium channel alpha subunit gene
Pediatr. Res. 46: 208-214, **1999**.

Coady M.J., Wallendorff B., Gagnon D.G., Lapointe J.Y.

Identification of a novel Na⁺/myoinositol cotransporter
J. Biol. Chem. 277: 35219-35224, **2002**.

Crane R.K., Miller D., Bihler I.

The restrictions on possible mechanism of intestinal active transport of sugars
In: Membrane Transport and Metabolism, edited by Kleizeller A. and Kotyk A., London: Academic, 439-449, **1961**.

Crapo J.D., Barry B.E., Gehr P., Bachofen M., Weibel E.R.

Cell number and cell characteristics of the normal human lung
Am Rev Respir Dis.; 126:332–337, **1982**.

Dagenais A., Denis C., Vives M.F., Girouard S., Masse C., Nguyen T., Yamagata T., Grygorczyk C., Kothary R., Berthiaume Y.

Modulation of alpha-ENaC and alpha1-Na⁺-K⁺-ATPase by cAMP and dexamethasone in alveolar epithelial cells
Am J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 281: L217-L230, **2001**.

D'Angelo E., Heisler N., Agostoni E.
Acid-base balance of pleural liquid in dogs
Respir. Physiol.; 37: 137-149, **1979**.

D'Angelo E., Loring S.H., Gioia M.E., Pecchiari M., Moscheni C.
Friction and lubrication of pleural tissues
Resp. Physiol. & Neurobiol. 142: 55-68, **2004**.

De La Vieja A., Dohan O., Levy O., Carrasco N.
Molecular analysis of the sodium/iodide symporter: impact on thyroid and extrathyroid pathophysiology
Physiol. Rev. 80: 1083-1105, **2001**.

Diez-Sampedro A., Wright E.M., Hirayama B.A.
Residue 457 controls sugar binding and transport in the Na⁺/glucose cotransporter
J. Biol. Chem. 276: 49188-49194, **2001**.

Dobbs L.G., Johnson M.D.
Alveolar epithelial transport in the adult lung
Respir. Physiol. Neurobiol. 159: 283-300, **2007**.

Doherty G.J., McMahon H.T.
Mechanisms of Endocytosis
Annu. Rev. Biochem. 78:857-902, **2009**.

Dunham I. et. al.
The DNA sequence of human chromosome 22
Nature 402: 489-495, 1999.

Engelberg J., Radin J.
Tracheal-vascular and vascular-pleural potential in the rat lung
Respir. Physiol.; 30: 253-263, **1977**.

Folkesson H.G., Norlin A., Wang Y., Abedinpour P., Matthay M.A.
Dexamethasone and thyroid hormone pretreatment upregulate alveolar epithelial fluid clearance in adult rats
J. Appl. Physiol. 88: 416-424, **2000**.

Fukuda N., Folkesson H.G., Matthay M.A.
Relationship of interstitial fluid volume to alveolar fluid clearance in mice: ventilated vs. in situ studies
J Appl Physiol 89:672-679, **2000**.

Gagnon A.W., Kallal L., Benovic L.J.
Role of clathrin-mediated endocytosis in agonist-induced down-regulation of the β_2 -adrenergic receptor

Jour. Biol. Chem. 273:6976-6981., **1998**.

Goodman B.E., Kim K.J., Crandall E.D.

Evidence for active sodium transport across alveolar epithelium of isolated rat lung
J. Appl. Physiol. 62: 2460–2466, **1987**.

Gumbleton, M.

Caveolae as potential macromolecule trafficking compartments within alveolar epithelium
Adv. Drug Deliv. Rev. 49: 281–300, **2001**.

Hediger M.A., Coady M.J., Ikeda T.S., Wright E.M.

Expression cloning and cDNA sequencing of the Na⁺/glucose co-transporter
Nature 330: 379-81, **1987**.

Hills BA.

Graphite-like lubrication of mesothelium by oligolamellar pleural surfactant
Journal of Applied Physiology, 73: 1034-1039, **1992**.

Hirayama B.A., Loo D.D.F., Wright E.M.

Protons drive sugar transport through the Na⁺-glucose cotransporter (SGLT1)
J. Biol. Chem. 269, **1994**.

Ishikawa Y., Eguchi T., Ishida H.

Mechanism of β -adrenergic agonist-induced transmural transport of glucose in rat small intestine. Regulation of phosphorylation of SGLT1 controls the function
BBA 1357:306-318, **1997**.

Jaurand M.C., Fleury-Feith J., Bernaudin J.F., Bignon J.

Pleural mesothelial cells

In: Crystal R.G., West J.B. eds. *The Lung: Scientific Foundations*. Philadelphia, Raven; pp. 961-969, **1997**.

Jayr C., Garat C., Meignan M., Pittet J.F., Zelter M., Matthay M.A.

Alveolar liquid and protein clearance in anesthetized ventilated rats
J Appl Physiol 76:2636–2642, **1994**.

Johnson M.

β_2 -adrenoceptors: mechanisms of action of beta₂-agonists
Paediatr. Respir. Rev.2: 57-62, **2001**.

Johnson M.D., Widdicombe J.H., Allen L., Barbry P., Dobbs L.G.

Alveolar type I cells contain transport proteins and transport sodium, supporting an active role for type I cells in regulation of lung liquid homeostasis
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99: 1966-1971, **2002**.

Johnson M.D., Bao H.F., Helms M.N., Chen X.J., Tigue Z., Jain L., Dobbs L.G., Eaton D.C.

Functional ion channels in pulmonary alveolar type I cells support a role for type I cells in lung ion transport

Proc. Natl. Acad. Sci. USA;103:4964–4969, **2006**.

Jones L.M., Gardner M.J., Catterall J.B., Turner G.A.

Hyaluronic acid secreted by mesothelial cells: A natural barrier to ovarian cancer cell adhesion

Clinical and Experimental Metastasis, 13, 373–380, **1995**.

Jovic M., Sharma M., Rahajeng J., Caplan S.

The early endosome: a busy sorting station for proteins at the crossroads

Histol Histopathol. 25:99-112, **2010**.

Kanai Y., Lee W.S, You G., Brown D., Hediger M.A.

The human kidney low affinity Na⁺/glucose cotransporter SGLT2

J. Clin. Invest. 93: 397-404, 1994.

Kanazawa K.

Exchanges through the pleura. Cells and particles

In: Chrétien J., Bignon J., Hirsch A. Eds., *The Pleura in Health and Disease*, New York, Dekker, pp. 195-231, **1985**.

Kim K.K., Kugler M.C., Wolters P.J., Robillard L., Galvez M.G., Brumwell A.N., Sheppard D., Chapman H.A.

Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103: 13180–13185, **2006**.

Kipp H., Khoursandi S., Scharlau D., Kinne R.K.H.

More than apical: distribution of SGLT1 in Caco-2 cells

Am J Physiol Cell Physiol 285:737-749, **2003**.

Kirkham M., Parton R.G.

Clathrin-independent endocytosis: new insights into caveolae and noncaveolar lipid raft carriers

Biochim. Biophys. Acta 1746:349–63, **2005**.

Kirkham M., Fujita A., Chadda R., Nixon S.J., Kurzchalia T.V. et al.

Ultrastructural identification of uncoated caveolin-independent early endocytic vehicles

J. Cell Biol. 168:465–76, **2005**.

Khoursandi S., Scharlau D., Herter P., Kuhnen C., Martin D., Kinne R.K.H., Kipp H.

Different modes of sodium-D-glucose cotransporter-mediated D-glucose uptake regulation in Caco-2 cells

Am J Physiol Cell Physiol 287:1041-1047, **2004**.

Kumar V.H., Christian C., Kresch M.J.

Effects of salmeterol on secretion of phosphatidylcholine by alveolar type II cells

Life Sci. 66(17):1639-46, **2000**.

Lai-Fook S.J.

Pleural mechanics and fluid exchange

Physiol. Rev.; 84: 385-410, **2004**.

Langston C., Kida K., Reed M., and Thurlbeck W.M.
Human lung growth in late gestation and in the neonate
Am Rev Respir Dis 129: 607–613, **1984**.

Laurent T.C., Fraser J.R.E.
Turnover and metabolism of hyaluronan
In: Evered, D., Whelan, J. (Eds.). *The biology of hyaluronan*, Wiley, Chichester, pp. 41-59, **1989**.

Lazarowski E.R., Tarran R., Grubb B.R., van Heusden C.A., Okada S., Boucher R.C.
Nucleotide release provides a mechanism for airway surface liquid homeostasis
J Biol Chem. 279(35):36855-64, **2004**.

Lecuona E., Ridge K., Pesce L., Batlle D., Sznajder J.I.
The GTP-binding protein RhoA mediates Na,K-ATPase exocytosis in alveolar epithelial cells
Mol Biol Cell 14:3888–3897, **2003**.

Liggett S.B.
Update on current concepts of the molecular basis of β_2 -adrenergic receptor signalling
J Allergy. Clin. Immunol. 110: S223-S228, **2002**.

Loo D.D.
A kinetic model for secondary active transport
In: *Membrane Transport and Renal Physiology, The IMA Volumes in Mathematics and its Applications*, edited by Layton HE and Weinstein AM. New York: Springer, 129: 65-83, **2001**.

Loo D.D., Hirayama B.A., Meinild A.K., Chandy G., Zeuthen T., Wright E.M.
Passive water and ion transport by cotransporters
J. Physiol., 518 (Pt 1):195-202, **1999**.

Loo D.D., Wright E.M., Zeuthen T.
Water pumps
J. Physiol. 42: 53-60, **2002**.

Lostao M.P., Hirayama B.A., Loo D.D.F., Wright E.M.
Phenyl glucosides and the Na^+ -glucose cotransporter (SGLT1): analysis of interactions
J. Membr. Biol. 142, **1994**.

Low F.N.
The pulmonary alveolar epithelium of laboratory mammals and man
Anat. Rec. 117:241, **1953**.

Madison L.D., Bergstrom-Porter B., Torres A.R., Shelton E.
Regulation of surface topography of mouse peritoneal cells
J. Cell. Biol.; 82: 783-797, **1979**.

Mallee J.J., Atta M.G., Lorica V., Rim J.S., Kwon H.M., Lucente A.D., Wang Y., Berry G.T.

The structural organization of the human Na⁺/myoinositol cotransporter (SLC5A3) gene and characterization of the promoter
Genomics 46: 459-465, **1997**.

Mate A., Barfull A., Hermosa A.M., Gómez-Amores L., Vázquez C.M., Planas J.M.

Regulation of sodium-glucose cotransporter SGLT1 in the intestine of hypertensive rats
Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol 291: 760-767, **2006**.

Matthay M.A., Landolt C.C., Staub N.C.

Differential liquid and protein clearance from the alveoli of anesthetized sheep
J. Appl. Physiol. 53:96–104, 1982.

Mc Laughlin R.F., Tyler W.S., Canada R.O.

A study of the subgross pulmonary anatomy of various mammals
Am. J. Anat. 108, 149–159, **1961**

Melin K., Meeuwisse G.W.

Glucose-galactose malabsorption. A genetic study
Acta Paediatr Scand 188: 19, **1969**.

Michailova K.N.

Mesothelial lamellar bodies in norm and experimental conditions. Transmission and scanning electron microscopic observations on the peritoneum, pleura and pericardium
Anat. Embriol. 208: 301-309, **2004**.

Minakata Y., Suzuki S., Grygorczyk C., Dagenais A., Berthiaume Y.

Impact of beta-adrenergic agonist on NaI channel and NaI-KI-ATPase expression in alveolar type II cells
Am J Physiol 275:L414–L422, **1998**.

Murray J.F.

The structure and function of the lung
Int. J. Tuberc. Lung Dis 14(4):391–396, **2010**.

Mutlu G., Koch W., Factor P.

Alveolar epithelial β 2-adrenergic receptors. Their role in regulation of alveolar active sodium transport
Am. J. Respir. Crit. Care. Med. 170: 1270-1275, **2004**.

Mutlu G.M., Adir Y., Jameel M., Akhmedov A.T., Welch L., Dumasius V., Meng F.J., Zabner, Koenig C., Lewis E.R., et al.

Interdependency of beta-adrenergic receptors and CFTR in regulation of alveolar active Na⁺ transport
Circ Res 96:999–1005, **2005**.

Mutsaers E.

Mesothelial cells: their structure, function and role in serosal repair
Respirology 7: 171-191, **2002**.

Nagata K., Hori N., Sato K., Ohta K., Tanaka H., Hiji Y.
Cloning and functional expression of an SGLT-1-like protein from the Xenopus laevis intestine
Am. J. Physiol. 276: G1251-G1259, **1999**.

Negrini D., Mukenge S., Del Fabbro M., Gonano C., Miserocchi G.
Distribution of diaphragmatic lymphatic stomata
J. Appl. Physiol., 70(4):1544-9, **1991**.

Negrini D., Venturoli D., Townsley M.I., Reed R.K.
Permeability of parietal pleura to liquid and proteins
J. Appl. Physiol.; 76: 627-633, **1994**.

Noppen M., De Waele M., Li R., Gucht K.V., D'Haese J., Gerlo E., Vincken W.
Volume and cellular content of normal pleural fluid in humans examined by pleural lavage
Am. J. Respir. Crit. Care Med.; 162; 1023-1026, **2000**.

Okuda T., Haga T.
Functional characterization of the human high-affinity choline transporter
FEBS Lett. 484: 92-97, **2001**.

Okuda T., Haga T., Kanai Y., Endou H., Ishihara T., Katsura I.
Identification and characterization of the high-affinity choline transporter
Nat. Neurosci. 3: 120-125, **2001**.

Olivera W., Ridge K., Wood L.D., Sznajder J.I.
Active sodium transport and alveolar epithelial Na-K-ATPase increase during subacute hyperoxia in rats
Am. J. Physiol. 266: L577-L584, **1994**.

Olver R.E., Strang L.B.
Ion fluxes across the pulmonary epithelium and the secretion of lung liquid in the foetal lamb
J. Physiol. 241, 327-357, **1974**.

Pace E., Profita M., Melis M., Bonanno A., Paterno A., Mody C.H., Spatafora M., Ferraro M., Siena L., Vignola A.M., Monsignore G., Gjomarkaj M.
LTB4 is present in exudative pleural effusions and contributes actively to neutrophil recruitment in the inflamed pleural space
Clin. Exp. Immunol.; 135: 519-527, **2004**.

Panayotova-Heiermann M., Eskandari S., Turk E., Zampighi G.A., Wright E.M.
Five transmembrane helices form the sugar pathway through the Na⁺-glucose cotransporter
The Journal of Biological Chemistry 272: 20324-20327, **1997**.

Parton R.G., Simons K.
The multiple faces of caveolae

Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 8:185–94, **2007**.

Payne D.K., Kinasewitz G.T., Gonzalez E.
Comparative permeability of canine visceral and parietal pleura
J Appl Physiol. 65(6):2558-64, **1988**.

Quick M., Wright E.M.
Employing Escherichia coli to functionally express, purify, and characterize a human transporter
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 8597-8601, **2002**.

Quick M., Tomasevic J., Wright E.M.
Functional asymmetry of the human Na⁺/glucose transporter (hSGLT1) in bacterial membrane vesicles
Biochemistry 42: 9147-9152, **2003**.

Quioco F.A.
Carbohydrate-binding proteins: tertiary structures and protein-sugar interactions
Annu Rev Biochem 55:287–315, **1986**.

Rennard S.I., Jaurand M.C., Bignon J., Kawanami O., Ferrans V.J., Davidson J., Crystal R.G.
Role of pleural mesothelial cells in the production of the submesothelial connective tissue matrix of lung.
American Reviews of Respiratory Diseases, 130, 267–274, **1984**.

Ridge K.M., Dada L., Lecuona E., Bertorello A.M., Katz A.I., Mochly-Rosen D., Sznajder J.I.
Dopamine-induced exocytosis of Na, K-ATPase is dependent on activation of protein Kinase C -epsilon and -delta
Mol. Biol. Cell 13: 1381-1389, **2002**.

Rodriguez A.M. I., Perron B., Lacroix L., Caillou B., Leblanc G., Schlumberger M., Bidart J.M., Pourcher T.
Identification and characterization of a putative human iodide transporter located at apical membrane of thyrocytes
J. Clin. Endocrinol. Metab. 87: 3500-3503, **2002**.

Roll P., Massacrier A., Pereira S., Robaglia-Schlupp A., Cau P., Szepetowski P.
New human sodium/glucose cotransporter gene (KST1): identification, characterization, and mutation analysis in ICCA (infantile convulsions and choreoathetosis) and BFIC (benign familial infantile convulsions) families
Gene 285: 141-148, **2002**.

Sahn, S.A.
Pathogenesis and clinical features of diseases associated with a low pleural fluid glucose
In: Chrétien, J., Bignon, J., Hirsch, A. (Eds.), The Pleura in Health and Disease, Dekker, New York, pp. 267-285, **1985**.

Sakuma T., Folkesson H.G., Suzuki S., Okaniwa G., Fujimura S., Matthay M.A.
Beta-adrenergic agonist stimulated alveolar fluid clearance in ex vivo human and rat lungs
Am J Respir Crit Care Med 155: 506–512, **1997**.

Saumon G., Basset G.
Electrolyte and fluid transport across the mature alveolar epithelium
J. Appl. Physiol.; 74: 1-15, **1993**.

Saumon G., Crone C., Basset G.
Significance of active ion transport in transalveolar water absorption: a study on isolated rat lung
J. Physiol. 384: 311-324, **1987**.

Schneeberger E.E., Walters D.V., Olver R.E.
Development of intercellular junctions in the pulmonary epithelium of the fetal lamb
J. Cell Sci. 32: 307-423, **1978**.

Schneider A.J., Kinter W.B., Stirling C.E.
Glucose-galactose malabsorption: report of a case with autoradiographic studies of a mucosal biopsy
N. Engl. J. Med. 274: 305-312, **1966**.

Schroppel B., Fischereder M., Wiese P., Segerer S., Huber S.
Expression of glucose transporters in human peritoneal mesothelial cells
Kidney Int.; 53: 1278-1287, **1998**.

Schwiebert E.M., Zsembery A.
Extracellular ATP as a signaling molecule for epithelial cells
Biochim Biophys Acta.1615(1-2):7-32, **2003**.

Sironi C., Bodega F., Porta C., Zocchi L., Agostoni E.
Expression of Na⁺-Glucose cotransporter (SGLT1) in visceral and parietal mesothelium of rabbit pleura
Resp. Physiol. Neurobiol. 159: 68-75, **2007**.

Smanik P.A., Ryu K.Y., Theil K.S., Mazzaferri E.L., Jhiang S.M.
Expression, exon-intron organization, and chromosome mapping of the human sodium iodide symporter
Endocrinology 138: 3555-3558, **1997**.

Sorkin A.
Cargo recognition during clathrin-mediated endocytosis: a team effort
Curr. Opin. Cell Biol. 16:392–99, **2004**.

Stirling C.E., Schneider A.J., Wong M.D., Kinter W.B.
Quantitative radioautography of sugar transport in intestinal biopsies from normal humans and a patient with glucose-galactose malabsorption
J. Clin. Invest. 51: 438-451, **1972**.

Stone K.C., Mercer R.R., Freeman B.A., Chang L.Y., Crapo J.D.
Distribution of lung cell numbers and volumes between alveolar and nonalveolar tissue
Am. Rev. Respir. Dis. 146, 454–456, **1992**.

Strang L.B.
Fetal lung liquid: secretion and reabsorption
Physiol. Rev. 71: 991-1016, **1991**.

Strosberg A.
Structure, function, and regulation of adrenergic receptors
Protein Sci. 2: 1198-1209, **1993**.

Strunk R.C., Eidlen D.M., Mason R.J.
Pulmonary alveolar type II epithelial cells synthesize and secrete proteins of the classical and alternative complement pathways
J. Clin. Invest. 81, 1419–1426, **1988**.

Swezey N., Tchepichev S., Gagnon S., Fertuck K., O’Brodivich H.
Female gender hormones regulate mRNA levels and function of the rat lung epithelial Na channel
Am. J. Physiol. 274: C379-L386, **1998**.

Sznajder J.I., Ridge K.M., Yeates D.B., Ilekis J., Olivera W.
Epidermal growth factor increases lung liquid clearance in rat lungs
J. Appl. Physiol. 85: 1004-1010, **1998**.

Taatjes D.J., Barcomb L.A., Leslie K.O., Low R.B.
Lectin binding patterns to terminal sugars of rat lung alveolar epithelial cells
J. Histochem. Cytochem. 38 (2):233-244, **1990**.

Tenney S.M. and Remmers J.E.
Alveolar dimensions in the lungs of animals raised at high altitude
J Appl Physiol 21:1328–1330, **1966**.

Turk E., Kerner C.J., Lostao M.P., Wright E.M.
Membrane topology of the human Na⁺/glucose cotransporter SGLT1
J Biol Chem., 271(4):1925-34, **1996**.

Turk E., Kim O., le Coutre J., Whitelegge J.P., Eskandari S., Lam J.T., Kreman M., Zampighi G., Faull K.F., Wright E.M.
Molecular characterization of Vibrio parahaemolyticus vSGLT: a model for sodium-coupled sugar cotransporters
J. Biol. Chem. 275: 25711-25716, **2000**.

Valle M.T., Degl’Innocenti M.L., Bertelli R. et al.
Antigen presenting function of human peritoneum mesothelial cells
Clin. Exp. Immunol.; 101: 172-176, **1995**.

Vanderbilt J.N., Mager E.M., Allen L., Sawa T., Wiener-Kronish J., Gonzalez R.F., Dobbs L.G.

CXC chemokines and their receptor are expressed in type II Cells and upregulated by injury

Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., **2003**.

Van Golde L.M.

Metabolism of phospholipids in the lung

Am. Rev. Respir. Dis. 114: 977-1000, **1976**.

Van Sande J., Massart C., Beauwens R., Schoutens A., Costagliola S., Dumont J.E., Wolff J.

Anion selectivity by the sodium iodide symporter

Endocrinology 144: 247-252, **2003**.

von Hayek H.

The Human Lung. Hafner, New York, **1960**.

Wang N.S.

Anatomy of the pleura

Clin. Chest. Med. 19: 229-240, **1998**.

Wang Y., Folkesson H.G., Jair C., Ware L.B., Matthay M.A.

Alveolar epithelial fluid transport can be simultaneously upregulated by both KGF and beta-agonist therapy

J. Appl. Physiol. 87: 1852-1860, **1999**.

Wangesteen O.D.

Nonselective solute transport across the pulmonary epithelium

In Fluid and solute transport in the airspaces of the lungs, pp. 375-398. Eds Effros RM and Chang HK. Marcel Dekker, New York, **1994**.

Weibel E.R.

Lung cell biology

In: Fishman, A.P. (Ed.) Handbook of Physiology, Section 3: The Respiratory System, vol. I: Circulation and Nonrespiratory Functions, American Physiological Society, Washington, DC, pp. 47-91, **1985**.

Weibel E.R., Gehr P., Haies D., Gil J., Bachofen M.

The cell population of the normal lung

In Lung Cells in Disease. Edited by A. Bouhuys. Amsterdam, Elsevier/North Holland, pp.3-16, **1976**.

Wright J.R., Hawgood S.

Pulmonary surfactant metabolism

Clin. Chest. Med. 10, 83-93, **1989**.

Wright E.M.

Renal Na⁺/glucose cotransporters

Am. J. Physiol. 280: F10-F18, **2001**.

Wright E.M., Hirsch J.R., Loo D.D., Zampighi G.A.

Regulation of Na⁺/glucose cotransporters
The Journal of Experimental biology 200: 287-293, **1997**.

Wright E.M., Loo D.D., Hirayama B.A., Turk E.
Surprising versatility of Na⁺-Glucose cotransporters: SLC5
Physiol. 19: 370-376, **2004**.

Wright E.M., Turk E.
The sodium/glucose cotransport family SLC5
Eur J Physiology 447: 510-518, **2003**.

Wright E.M., Turk E., Martin G.M.
Molecular basis for glucose-galactose malabsorption
Cell. Biochem. Biophys. 36:115-121, **2002**.

Yue G., Shoemaker R.L., Matalon S.
Regulation of low-amiloride-affinity sodium channels in alveolar type II cells
Am J Physiol. 267: L94-100, **1994**.

Zhao F.Q.
Cloning and expression of bovine sodium-glucose cotransporters
J Dairy Sci 88:182-194, **2005**.

Zocchi L., Agostoni E., Cremaschi D.
Electrolyte transport across the pleura of rabbits
Respir. Physiol.; 86: 125-138, **1991**.

Zocchi L. e Agostoni E.
Effects of β_2 -adrenergic blockade or stimulation on net rate of hydrothorax absorption
Respir. Physiol. 97: 347-356, **1994**.

Zocchi L., Agostoni E., Raffaini A.
Effect of phloridzin on net rate of liquid absorption from the pleural space of rabbits
Exp. Physiol.; 81: 957-967, **1996**.

Zocchi L., Raffaini A., Agostoni E.
Effect of adrenaline and alpha-agonists on net rate of liquid absorption from the pleural space of rabbits
Exp. Physiol.; 82: 507-520, **1997**.

Zocchi L.
Physiology and pathophysiology of pleural fluid turnover
Eur. Respir. J., 20: 1545-1558, **2002**.