

## **PRESENZA E DISTRIBUZIONE DELLE AQUAPORINE (AQPs) NEL PICCOLO E GROSSO INTESTINO DEL VITELLO BUFALINO**

### **PRESENCE AND DISTRIBUTION OF AQUAPORINS (AQPs) IN SMALL AND LARGE GUT OF NEONATAL BUFFALO CALF**

Vassalotti G, Pelagalli A, De Luca A, Pero ME, Squillacioti C, d'Angelo D, Mastellone V, Ciani F, Mirabella N, Cestaro A, Lombardi P, Avallone L *Dipartimento di Strutture, Funzioni e Tecnologie Biologiche – Università degli Studi di Napoli Federico II, NAPOLI*

**Parole chiave:** aquaporine, vitello bufalino, western blotting

**Key words:** aquaporins, buffalo calf, western blotting

**SUMMARY** – Aquaporins (AQPs) are membrane water channel proteins that selectively transport water or water solutes across the cell. The possible activities of these proteins in the gut of the newborn calf is unknown, although the mechanisms of neonatal absorption are particularly crucial in this species. For this reason, the aim of this research was to assess the presence and the different distribution of AQPs (AQP1, AQP4, AQP5) in the intestinal tracts of newborn calf before and after a week of food intake (colostrum/milk). The analysis performed through studies of expression and cellular localization showed the presence of these proteins in many of the examined tracts. In addition, it was observed that in all the portions of the intestinal tract, AQPs were more expressed after colostrum injection.

**INTRODUZIONE** – Le aquaporine (AQPs) e le aquagliceroporine (GLpF) sono canali proteici di membrana direttamente coinvolti nei meccanismi di trasporto rapido e selettivo di acqua e di soluti attraverso la membrana cellulare (1, 2). Sono differenzialmente distribuite nel regno vegetale e animale. Nell'uomo si conoscono oltre 10 tipi di AQPs ed è noto che alcune patologie, come il diabete insipido o la cataratta congenita, sono collegate ad alterazioni della loro corretta funzionalità (3). La maggior parte delle aquaporine e delle aquagliceroporine presenta una struttura quaternaria e sono formate da 4 catene polipeptidiche, costituendo così dei tetrameri. In seguito alla loro scoperta, relativamente recente, numerosi studi sono stati condotti nel topo, nel ratto e nell'uomo stesso ed hanno evidenziato il potenziale ruolo svolto da tali proteine nel regolare il passaggio transmembrana di fluidi e sostanze di varia natura. In particolare, alcune aquaporine tra cui la ben nota AQP1, la prima ad essere stata scoperta e sequenziata, la AQP4 e la AQP5, sono state evidenziate a livello di differenti tratti dell'apparato gastro-intestinale del ratto (4) e recentemente nel pollo (5) dove sembra possano esplicare attività di regolazione dell'omeostasi dei fluidi (sintesi di sostanze es. HCl a livello gastrico).

In considerazione di tali attività, è possibile ipotizzare che le aquaporine svolgano un ruolo importante anche nel complesso meccanismo di regolazione di processi di assorbimento nel vitello bufalino, in particolar modo durante l'assunzione di alimento. Nel bufalo, la mortalità del vitello neonato arriva fino al 30%, rappresentando una importante perdita economica per le aziende. Pertanto, l'obiettivo della presente ricerca è stato lo studio dell'espressione di tali proteine a livello del piccolo e grosso intestino del vitello bufalino al fine di identificarne la possibile presenza, la distribuzione ed il possibile ruolo nei meccanismi di assorbimento. Ciò è particolarmente interessante tenendo in considerazione che l'allevamento del bufalo è una realtà di notevole interesse, sia economico che scientifico, per la produzione di carne e latte. L'attitudine alla produzione è fondamentalmente legata alla quantità e qualità delle proteine presenti nel latte durante tutte le fasi della lattazione. Nel periodo neonatale le immunoglobuline colostrali rappresentano la fonte principale per l'acquisizione dell'immunità passiva (6), mentre le caseine, per il loro alto potere nutrizionale, risultano fondamentali per l'accrescimento del vitello. Numerosi studi sono stati condotti sull'argomento ed è stato accertato che il contenuto anticorpale del colostro risulta ottimale solo nelle prime 12 ore dopo il parto e la capacità di assorbimento delle immunoglobuline a livello intestinale è massima fino a 6 ore dalla nascita e si riduce progressivamente fino ad essere praticamente nulla dopo 48-72 ore. Nonostante ciò, i meccanismi che regolano tali tempi di secrezione ed assorbimento sono tutt'ora sconosciuti e le ricerche svolte sinora sono state volte soprattutto alla ottimizzazione dell'immunizzazione

passiva tramite interventi tecnico-manageriali (banche del colostro, anticorpi sintetici, integratori alimentari) più che alla comprensione dei meccanismi scientifici responsabili di tale peculiarità fisiologica.

**MATERIALI E METODI-** La ricerca è stata condotta impiegando vitelli bufalini appartenenti ad un'azienda della regione Campania. Gli animali in numero di 15 soggetti erano distinti in 3 gruppi (n. 5 soggetti per gruppo): 1) vitelli bufalini a tempo 0; 2) vitelli bufalini ad una settimana dall'assunzione di colostro; 3) vitelli bufalini ad una settimana dall'assunzione di solo latte vaccino. È stato, inoltre, aggiunto un gruppo di bufali adulti al fine di ottenere uno standard di riferimento per la specie. Tutti gli animali sono stati sacrificati al macello e da essi è stato prelevato il tratto intestinale. A ciò ha fatto seguito la dissezione dei segmenti che sono stati immediatamente divisi in aliquote e trattati diversamente in funzione della tecnica impiegata.

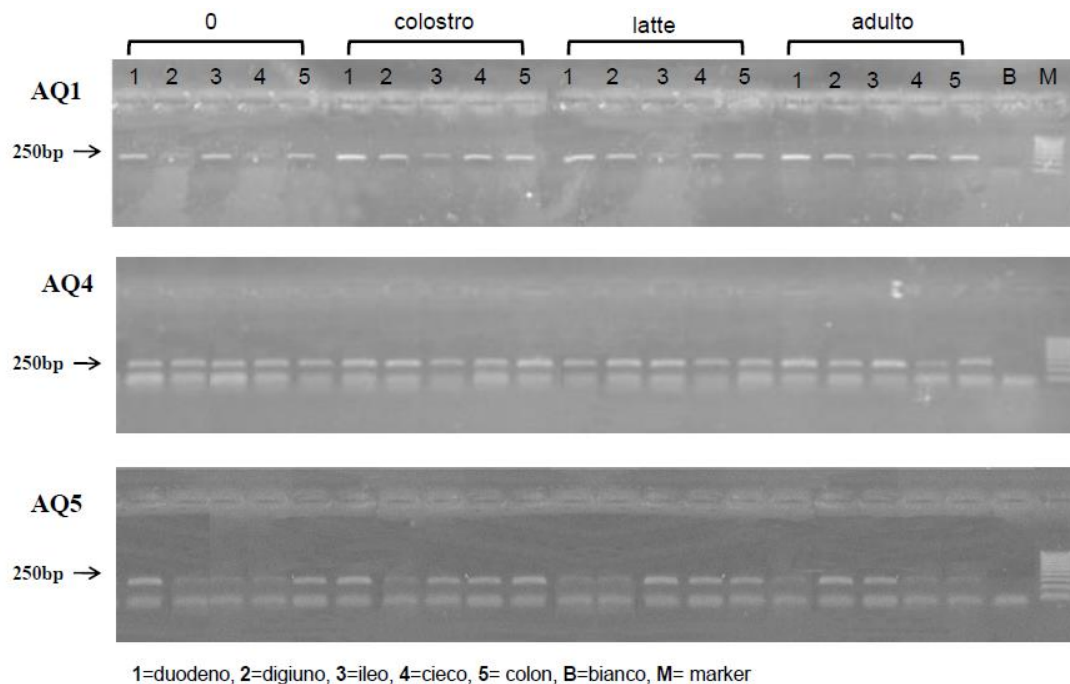
Analisi immunoistochimica: I campioni, fissati in Bouin per 16-24 h, sono stati disidratati e inclusi in paraffina. Si è proceduto, quindi, ad ottenere sezioni seriate. Per le reazioni immunoistochimiche sono stati utilizzati gli opportuni anticorpi primari, seguiti da un anticorpo secondario biotinilato e dal complesso avidina-biotina-perossidasi per l'osservazione al microscopio ottico.

RT-PCR: Sono stati impiegati frammenti di tessuto opportunamente congelati e conservati a -80°C. L'estrazione dell'mRNA è stata effettuata omogeneizzando i tessuti in Trizol. Dopo l'estrazione dell'RNA totale, i campioni sono stati retrotrascritti utilizzando random esameri come primers. I campioni di cDNA sono stati amplificati utilizzando Kit commerciali di PCR e primers specifici per Aquaporine del bovino, disegnati con il software Primer Express™ (PE Applied Biosystems). Come controllo negativo è stato utilizzato un campione senza cDNA. Gli amplificati sono stati separati su gel di agarosio e sequenziati.

Western blotting: Tessuti opportunamente congelati a -80°C, sono stati omogenizzati in RIPA buffer a 4°C e sottoposti ad analisi e determinazione del contenuto proteico mediante metodica Bradford (7). 50 µg di proteine sono state analizzate su gel al 12% (SDS poliacrilamide). Dopo la separazione delle frazioni proteiche mediante SDS-page, le stesse sono state trasferite su filtro di nitrocellulosa. Per l'evidenziazione della proteina di interesse (AQP1-AQP4-AQP5), dopo incubazione del filtro con milk (non-fat dry) in tampone TRIS a T° ambiente overnight, il filtro è stato incubato con anticorpo 1°, seguito, dopo opportuno lavaggio, da incubazione con anticorpo 2° coniugato con perossidasi. Al termine, l'evidenziazione della proteina di interesse è stata realizzata mediante un metodo di chemiluminescenza.

**RISULTATI-** L'analisi mediante western blotting ha permesso di rilevare la presenza delle tre aquaporine a livello di tutti i tessuti esaminati, con un incremento notevole dell'espressione in quelli ad una settimana dall'assunzione del colostro, per cui l'espressione è risultata poco intensa nei tratti dei soggetti alimentati con latte vaccino e di poco superiore a quest'ultima nei soggetti adulti, ma mai raggiungendo i livelli di espressione del colostro. Inoltre, il western blotting ha evidenziato, per le tre aquaporine, in molti dei tratti presi in considerazione un aspetto particolare legato alla comparsa di bande ulteriori a quella normale (27-30 kDa) con pesi molecolari rispettivamente di 32-35 kDa, 55-58 kDa ed in alcuni casi anche 75 kDa. Tale evidenza indica che la proteina è presente anche in forme diverse come una possibile forma glicosilata spesso indicata in letteratura come forma M1 ed M23 (8). La presenza di tali bande è risultata, anche in questo caso, più evidente nei soggetti che avevano assunto colostro.

L'immunoistochimica ha evidenziato una differente distribuzione e localizzazione delle AQPs, mostrando un'immunoreattività dell'AQP1 a livello dell'endotelio dei vasi sanguigni e linfatici e raramente nelle cellule delle cripte, dell'AQP4 a livello dell'epitelio ghiandolare e dei villi intestinali ed infine dell'AQP5 a livello delle cellule endocrine e raramente nei vasi sanguigni. Nella medesima analisi, nei soggetti che avevano assunto colostro, si osserva una maggiore attività a livello dell'ileo (AQP1) con positività nel tessuto linfoide e, a livello del digiuno (AQP4), con positività dei neuroni del sistema nervoso enterico. L'analisi dell'RT-PCR conferma la presenza delle tre AQPs in tutti i tessuti degli animali esaminati (figura 1).



**Figura 1**

**DISCUSSIONE-** La presenza di aquaporine a livello dei tratti intestinali nel vitello bufalino conferma i risultati riportati sia nell'uomo che nel ratto per i quali si è parlato di compartimentalizzazione di esse (9). Tali studi hanno permesso di evidenziarne alcune specifiche peculiarità suggerendo, tra l'altro, che tali meccanismi di assorbimento sarebbero realizzati anche mediante altre strutture coinvolte. La particolare espressione delle aquaporine nei tratti dell'intestino dell'animale che ha assunto colostro potrebbe indicare, diversamente dagli altri gruppi di animali, quindi, una attivazione di tali complessi molecolari dal momento che tali proteine risulterebbero organizzarsi sotto forma di dimeri, trimeri o tetrameri. Il significato funzionale di questa organizzazione spaziale non è stato ancora chiarito, ma potrebbe fare ipotizzare una modificazione del canale poro di membrana e, quindi, un differente coinvolgimento delle stesse proteine nei meccanismi di trasferimento di acqua e soluti. D'altro canto, studi condotti su vitelli bovini hanno evidenziato un ruolo specifico del colostro quale promotore di numerose attività a livello intestinale ed in particolare di modificazione dell'assetto morfo-istologico, nonché della proliferazione di attività enzimatiche (10). Ciò può essere confermato dalla differente immunoreattività osservata in strutture diverse che potrebbe essere riconducibile, come riportato da altri autori, ad una specificità di attività (es. meccanismi di secrezione di ormoni, passaggio diretto di sostanze nel circolo ematico).

La co-espressione e diversa distribuzione delle tre AQP nei tratti del piccolo e grosso intestino rende difficile poter, comunque, chiarire il significato intrinseco di ciascuna di esse.

In conclusione, è possibile affermare che le aquaporine giochino un ruolo nei meccanismi di assorbimento di acqua e di numerosi soluti, ma resta ancora molto da indagare in merito al differente coinvolgimento di esse, allo specifico ruolo assunto e alla probabile compresenza di altri meccanismi esistenti.

**BIBLIOGRAFIA-** 1) Agre P (2006) Proc Am Thorac Soc, 3, 5-13. 2) Rai T et al (2006) Am J Physiol Cell Physiol, 290, C298-C304. 3) Asai T et al (2003) Kidney Int, 64, 2-10. 4) Matsuzaki et al (2003) Arc Histol Cytol, 66(4), 307-315. 5) Yoshimura K et al (2011) Cell Tissue Res, 344, 51-61. 6) Lombardi P et al (2001) J. Food Protec, 64, 1265-1267. 7) Bradford MM (1976) Anal Biochem, 72, 48-54. 8) Nicchia GP et al (2010) Neurosci, 168, 903-914. 9) Cohly HHP et al (2008) J Environ Res Public Health, 5(2), 115-19. 10) Blatter U et al (2001) J Nutr, 131, 1256-1263.

*Ricerca eseguita con contributo Progetto F.A.R.O. (Finanziamenti per l'avvio di ricerche originali) 2010 – dott.ssa Pero Maria Elena.*