



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CAGLIARI
DIPARTIMENTO DI CITOMORFOLOGIA

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE MORFOLOGICHE

CURRICULUM: MORFOLOGIA ULTRASTRUTTURA

E CITOCHIMICA DEI TESSUTI ED ORGANI

SEDE AMMINISTRATIVA: UNIVERSITA' DI CAGLIARI

SSD BIO/17

Studio ultrastrutturale e morfometrico degli effetti *in vitro*

di farmaci secretagoghi e relativi inibitori

sulle cellule sierose

delle ghiandole sottomandibolare e parotide umane.

Tutore:

Prof.ssa FRANCESCA TESTA RIVA

Tesi di Dottorato di Ricerca della:

Dott.ssa ANNA PERRA

Coordinatore:

Prof. ALESSANDRO RIVA

Anni Accademici 2003-2006

INDICE

Introduzione	pag 3
La ghiandola parotide	pag 3
La ghiandola sottomandibolare	pag 6
I nervi	pag 8
La secrezione salivare	pag 10
Scopo della Tesi	pag 15
Materiali e Metodi	pag 18
Risultati e Discussione	pag 21
Bibliografia	pag 32
Tabella 1	pag 41
Tabella 2	pag 42
Grafici, Figure	

INTRODUZIONE

Una linea di ricerca del laboratorio di microscopia elettronica del Dipartimento di Citomorfologia, presso il quale si è svolto il periodo del mio dottorato di ricerca, consiste nello studio, mediante la microscopia elettronica, dei processi di secrezione delle ghiandole salivari umane normali in condizioni di stimolazione in vitro con diverse sostanze in grado di interagire coi recettori cellulari.

Seguendo tale intento, abbiamo condotto questa ricerca prendendo in considerazione specificatamente gli adenomeri sierosi delle ghiandole salivari parotide e sottomandibolare umane.

La ghiandola parotide

La parotide, la più voluminosa delle ghiandole salivari umane, è una ghiandola sierosa pura che, nell'uomo, occupa interamente la loggia parotideale. Presenta un corpo di forma prismatico triangolare e due prolungamenti (talvolta assenti): un prolungamento anteriore, che si spinge in avanti sulla faccia laterale del muscolo massetere, e un prolungamento faringeo, che si estende lungo la parete laterale della faringe. Il suo dotto escretore principale, il dotto di Stenone, emerge dal margine anteriore della ghiandola e, portandosi in avanti lungo una linea ideale che dal lobulo dell'orecchio raggiunge l'ala del naso, sbocca nel vestibolo della cavità orale a livello del colletto del 2° molare superiore (Fig. 1) (Balboni et al., 2000).

Il microscopio luce (ML) ci consente di avere una panoramica completa della struttura di questa ghiandola. Essa possiede una capsula fibrosa, dalla quale si dipartono dei setti connettivali che suddividono il

parenchima in lobi e lobuli. Gli acini sono costituiti da cellule sierose, di forma triangolare prospicienti verso un lume centrale da cui si dipartono prolungamenti digitiformi detti *canalicoli intercellulari*. I canalicoli hanno la funzione di aumentare la superficie del plasmalemma coinvolto nei processi di secrezione. La saliva prodotta dagli acini (saliva primaria) è isotonica rispetto al plasma e con il suo passaggio attraverso i dotti viene modificata diventando ipotonica (Martinez, 1987; Riva et al., 1990). Negli stadi avanzati del processo di secrezione le cellule acinari sono ripiene di granuli di secreto che occupano gran parte del citoplasma (Fig. 2) e comprimono il nucleo verso la base. Saltuariamente in campioni non stimolati è possibile osservare immagini di secrezione: il lume dei canalicoli è dilatato e nel citoplasma vi sono pochi granuli di secreto.

Al microscopio elettronico a trasmissione (MET) le cellule acinari sono piramidali e il nucleo, sezionato, appare di forma ovale o irregolare ed è localizzato alla base della cellula (Fig. 3). Il reticolo endoplasmatico rugoso è molto esteso nella zona baso-laterale ed è costituito da cisterne parallele strettamente accollate. Anche l'apparato del Golgi è ben sviluppato e situato in prevalenza nella zona soprannucleare. La superficie basale delle cellule sierose mostra frequentemente una serie di corte lamelle citoplasmatiche sottili, prive di organelli e rivestite dalla membrana cellulare: esse poggiano sulla lamina basale e aumentano di circa 6 volte l'area della superficie esposta agli scambi (Riva, 1992).

Al MET i singoli granuli appaiono come entità distinte. Hanno un diametro di 1-3 μm , sono rivestiti da una sottile membrana e occupano la porzione centro apicale della cellula. I granuli *maturi* mostrano una struttura bipartita: una matrice principale, modestamente elettrondensa, contenente una o di rado due sferule (**core**) più elettrondense (Fig. 4).

In prossimità del Golgi sono presenti i granuli *immaturi* con una matrice pallida, o poco elettrondensa, e di dimensioni maggiori di quelle dei granuli maturi (Riva e Riva Testa, 1973; Riva et al., 1974; Riva et al., 1990). Hanno forma irregolare e talvolta mostrano processi di gemmazione di vescicole rivestite.

Al MET, il lume centrale (Fig. 5) e quello dei *canalicoli intercellulari* (Fig. 6) presenta numerosi e corti microvilli e rare invaginazioni a forma di Ω , dovute all'esocitosi di singoli granuli di secreto. Piccole fossette rivestite sono occasionalmente osservabili nelle aree prive di microvilli. Al MES, dopo la rimozione degli organuli cellulari, i canalicoli appaiono simili a dilatazioni tubulari la cui superficie citoplasmatica presenta numerosi buchi circolari, di ridotte dimensioni, che corrispondono alle basi dei microvilli privati del citoscheletro (Fig. 7). Tra le basi dei microvilli sono adese delle microvescicole sparse (Fig. 8), con diametro di circa 100-150 nm, corrispondenti come dimensioni alle fossette rivestite osservabili al MET (Riva, 1992; Riva et al., 1995; 1996).

L'aspetto istologico della ghiandola è variabile in relazione all'età dell'individuo. Tra gli acini sierosi sono presenti delle cellule adipose di grandi dimensioni; gli adipociti sono piuttosto rari nelle parotidi dei bambini piccoli, ma crescono di numero durante l'adolescenza, fino a costituire più del 25% del volume ghiandolare nei soggetti adulti (Riva, 1992).

La ghiandola sottomandibolare

La ghiandola sottomandibolare nell'uomo occupa la loggia sottomandibolare, spazio viscerale del collo corrispondente alla porzione postero-laterale della regione sopraiodea (Fig. 1). Il dotto principale, il dotto di Wharton, emerge dalla porzione superficiale della faccia mediale della ghiandola, decorre nel pavimento della bocca e si apre a livello della caruncola sottolinguale (Balboni et al., 2000).

È una ghiandola tubulo-acinosa composta, a secrezione mista. La porzione secernente è formata per il 90% da cellule a secrezione sierosa, e per il 10% da cellule a secrezione mucosa. Le cellule sierose possono essere organizzate in acini (Fig. 9), con un lume centrale, oppure formare delle strutture a semiluna (le semilune sierose o del *Giannuzzi*) che rivestono l'estremità dei tubuli mucosi. Gli adenomeri sono drenati da una serie ramificata di dotti a calibro crescente, che decorrono nei setti connettivali.

Al MET gli acini sierosi presentano una struttura generale simile a quella che si osserva nella ghiandola parotide. Le cellule acinari hanno forma più o meno piramidale, con il nucleo in posizione basale; il RER e l'apparato del Golgi sono ben rappresentati (Fig. 10). La base cellulare presenta una serie di sottili pieghe citoplasmatiche parallele, rivestite dalla membrana cellulare, che si interdigitano con quelle delle cellule adiacenti. Tale sistema di pieghe poggia sulla lamina basale ed è più sviluppato rispetto a quello della ghiandola parotide aumentando di circa 10 volte l'area della superficie basale coinvolta nel meccanismo di produzione della saliva primaria (Riva, 1992). Il citoplasma apicale negli stadi di secrezione più avanzati è ricco di granuli di secreto. I granuli maturi, a differenza di quelli della parotide, presentano una caratteristica

struttura tripartita (Fig. 11). Questa consiste di una sferula elettrondensa, situata in posizione più o meno centrale, sospesa in una matrice moderatamente elettrondensa; una terza componente di densità intermedia e forma spesso semilunare, aderisce al versante interno della membrana limitante il granulo (Riva et al., 1974; Testa Riva., 1977).

Il plasmalemma delle cellule contigue delimita il lume dei canalicoli intercellulari che si ramificano negli acini. Al MET la superficie luminale dei canalicoli appare orlata da fitti e corti microvilli (Figg. 12, 13); al MES, dopo rimozione degli organelli cellulari, la loro superficie citoplasmatica presenta numerosi buchi corrispondenti alla base microvilli privati del citoscheletro e tra questi microvescicole sparse, come quelle descritte nella parotide (Figg. 14, 15, 16, 17, 18).

Le cellule mucose, disposte a formare tubuli, appaiono più grandi di quelle sierose e al MET risultano ricolme di goccioline di muco, elettrondense al fascio elettronico. Il muco occupa gran parte del citoplasma tanto che gli organelli cellulari, compreso il nucleo, sono spinti verso la base della cellula (Riva, 1992; Riva et al., 1995; 1996).

Il sistema nervoso autonomo

Nell'uomo le ghiandole salivari maggiori producono, insieme, circa il 90% del volume della saliva (Schneyer, 1956; Dawes e Wood, 1973) sotto il controllo di entrambe le sezioni, simpatica e parasimpatica, del sistema nervoso autonomo (Young et al., 1987; Emmelin, 1967). Le due sezioni nervose agiscono in concerto ed insieme modulano l'attività delle cellule acinari modificando il volume e la composizione della saliva.

La noradrenalina, rilasciata dalle fibre simpatiche, si lega ai recettori β adrenergici, innescando un aumento dell'AMP ciclico intracellulare che promuove un'esocitosi massiva di granuli di secreto; il risultato è la produzione di una saliva particolarmente ricca di proteine.

Invece l'acetilcolina, liberata dalle fibre parasimpatiche, si lega ai recettori muscarinici (di tipo M3) e provoca un aumento del Ca^{2+} intracellulare che porta, a sua volta, alla secrezione di acqua ed elettroliti con produzione di una saliva piuttosto fluida, ma di ridotto contenuto proteico. La noradrenalina, liberata dalle fibre simpatiche, si lega anche ai recettori α adrenergici promuovendo il rilascio di elettroliti e acqua, seppur in modesta entità (Thaysen et al., 1954; Batzri et al., 1971; Butcher e Putney, 1980; Foskett e Melvin, 1989; Turner, 1993; Petersen e Maruyama, 1999).

NANC (sistema non adrenergico non colinergico)

Negli ultimi anni, diversi studi hanno confermato la frequente associazione, nelle fibre parasimpatiche che innervano vasi sanguigni e ghiandole esocrine, dell'acetilcolina con altri mediatori quali il VIP e la sostanza P. Il ruolo di questi neuropeptidi nell'ambito della secrezione parasimpatica della saliva è stato oggetto di numerosi studi (Lundberg et al., 1979; Lindh e Hokfelt, 1990; Ekström et al., 2000; Ekström e Ekström, 2001; Ekström, 2001; 2002). In ratti pretrattati con l'antagonista muscarinico atropina e con antagonisti α e β adrenergici si è visto che, dopo stimolazione elettrica delle fibre parasimpatiche che innervano la parotide, la secrezione salivare persisteva, anche se con un ritmo molto basso, e nelle cellule acinari della ghiandola diminuiva la quantità dei granuli di secreto. Inoltre, la composizione proteica di tale saliva era del tutto simile a quella della secrezione ottenuta in risposta alla stimolazione delle fibre parasimpatiche in assenza di blocchi adrenergici e muscarinici. Questi risultati hanno portato all'ipotesi che la secrezione salivare possa essere stimolata anche da meccanismi non adrenergici e non colinergici.

La secrezione salivare

La possibilità di modulare la composizione della saliva in relazione al variare delle esigenze fisiologiche è una caratteristica ben nota della secrezione salivare (Pangborn e Lundgren, 1977; Richardson e Feldman, 1986; Watanabe e Dawes, 1988; Mackie e Pangborn, 1990). In particolare si distinguono due tipi principali di secrezione, differenti per quantità e qualità della saliva secreta: una *secrezione regolata*, che si verifica durante l'alimentazione, e una *secrezione basale*, garantita tra un pasto e l'altro.

- la *secrezione regolata* è così definita perché si realizza in risposta ad una stimolazione muscarinico-colinergica e adrenergica (Gorr et al., 2005), ottenuta sia tramite il sistema rispettivamente parasimpatico e ortosimpatico, oppure per via farmacologia con analoghi dei neurotrasmettitori nor-adrenalina ed acetilcolina. Produce una massiva secrezione di saliva che ha la funzione di iniziare il processo digestivo e di facilitare il passaggio del cibo nel canale digerente. In questo tipo di secrezione il maggior volume di saliva viene fornito dalla ghiandola parotide (Mandel, 1987; Prinz e Lucas, 1995; Mattes, 1997; Kontis e Johns, 1998; Pedersen et al., 2002).

- la *secrezione basale*, ha la funzione di mantenere, tra un pasto e l'altro, lo stato di idratazione e di protezione antibatterica della cavità orale, lo stato di mineralizzazione dei denti e di lubrificare la mucosa orale per facilitare il linguaggio (Huang et al., 2001). Il volume di saliva prodotto dalla secrezione basale è fornito per il 69% dalla ghiandola sottomandibolare e per il 26% dalla parotide (Mattes, 1997; Kontis e Johns, 1998).

La secrezione basale

Questo tipo di secrezione comprende sia la cosiddetta “secrezione non-regolata o costitutiva” che la “secrezione regolata-minore” descritta da Castle e Castle (1996). Come sottintende il suo nome, la secrezione non-regolata non dipende da stimolazione nervosa né da agonisti muscarinici o adrenergici e neppure è influenzata dai relativi antagonisti (Kelly, 1985; Castle e Castle, 1998).

Studi condotti *in vitro* (Castle e Castle, 1998) hanno identificato 3 tipi di secrezione non-regolata:

- la *secrezione costitutiva* che si realizza in tempi brevissimi, e comporta la secrezione di proteine totalmente differenti da quelle immagazzinate nei granuli di secreto. Essa è responsabile del trasporto e dell’inserimento di proteine di membrana, come le AQP (*aquaporine*), e della secrezione di alcuni componenti della matrice extracellulare. Le proteine della secrezione costitutiva derivano direttamente dalla rete trans-Golgi mediante un processo di gemmazione di vescicole che raggiungono il lume o la membrana basolaterale (Lodish et al., 1983; Moore et al., 1983; von Zastrow e Castle, 1987; Gresz et al., 2004).

- la *secrezione costitutiva simile* (*constitutive-like*) che ha una composizione proteica simile a quella dei granuli di secreto, ma con differenze di tipo quantitativo. Si realizza mediante gemmazione dai granuli immaturi di piccole vescicole che migrano verso la membrana apicale e che trasporterebbero nel lume proteine neosintetizzate che probabilmente non sono in grado di condensarsi in maniera sufficiente nei granuli di secreto, come ad es. l’amilasi.

- Nelle cellule acinari si può realizzare anche un terzo tipo di secrezione non-regolata definita “*esocitosi non regolata*” di granuli di secreto.

Supporta la *secrezione costitutiva simile*, e avviene solo quando le cellule hanno immagazzinato nel citoplasma una quantità elevata di granuli di secreto, ad esempio in condizioni di digiuno (von Zastrow e Castle, 1987). La *secrezione regolata minore* viene così definita perché è causata da una stimolazione con basse dosi di agonisti muscarinici e produce un secreto molto minore sia come quantità che come importanza rispetto alla secrezione regolata detta “maggiore”. Si distingue da quella maggiore anche perché libera preferenzialmente proteine neosintetizzate (anziché accumulate a lungo nei granuli) e perché il suo prodotto ha una composizione più simile a quello della secrezione “constitutive-like” e inoltre, come quest’ultima, si forma con un processo di gemmazione dai granuli immaturi. Tuttavia, mentre le vescicole della secrezione regolata minore sono direttamente convogliate alla membrana luminale, le vescicole della secrezione costitutiva-simile si fondono prima con un compartimento endosomale (in cui arrivano anche le pro-idrolasi a destino lisosomale) e solo dopo, separatesi dalle pro-idrolasi, sono indirizzate alla superficie luminale. Qui, oltre che contribuire alla secrezione basale, fornirebbero (Castle et al., 2002) dei siti di membrana necessari per l’ancoraggio e la fusione dei granuli di secrezione durante il processo di esocitosi nella secrezione regolata maggiore (Tooze e Tooze, 1986; von Zastrow e Castle, 1987; Grimes e Kelly, 1992; Castle e Castle, 1996; Huang et al., 2001; Castle et al., 2002). Secondo questa ipotesi, quindi, i due meccanismi di secrezione regolata maggiore e minore sarebbero funzionalmente correlati.

La secrezione regolata

Si indica, in realtà, con questo termine la *secrezione regolata maggiore* caratterizzata da un'abbondante esocitosi di granuli di secreto accumulati nel citoplasma apicale (Mandel e Katz, 1968; Laurikainem et al., 1988; Jensen et al., 1991; Nederfos et al., 1994) e dalla secrezione di elettroliti ed acqua attraverso pompe ioniche e canali di membrana (Martinez, 1987). Tale tipo di secrezione è attivata da una intensa stimolazione dei recettori β -adrenergici e muscarinici attraverso l'azione dell'ortosimpatico e del parasimpatico o di analoghi secretagoghi. Naturalmente la secrezione regolata maggiore è anche sensibile all'azione di farmaci inibitori o antagonisti dei recettori adrenergici e muscarinici.

Essa sarebbe preceduta dalla secrezione regolata minore, più sensibile ai secretagoghi, che servirebbe a ricollocare nella membrana luminale, come più sopra anticipato, i siti di docking-fusion per la successiva esocitosi dei granuli di secreto.

Recenti studi sull'esocitosi, in cellule neuroendocrine e neuronali ma anche in cellule di ghiandole esocrine come il pancreas e la parotide di ratto, hanno dimostrato che questo processo è, infatti, particolarmente complesso e caratterizzato da una sequenza di fasi, che si concludono con la fusione dei granuli di secreto con il plasmalemma.

Le fasi principali sono: il *docking*, ossia il contatto tra il plasmalemma e il granulo di secreto, mediato da specifiche molecole, quali le SNAPs (N-ethylmaleimide-sensitive attachment proteins) e le SNAREs (soluble NSF attachment receptors); il *priming*, che precede la fusione del granulo di secreto con il plasmalemma e che comporta la riorganizzazione dei filamenti di actina del citoscheletro sottomembranario. La *fusion*, con la formazione di un poro attraverso il quale si ha il rilascio, promosso dal

Ca²⁺, del contenuto del granulo nel lume; infine la *endocitosis*, cioè il recupero della membrana del granulo secretorio mediante un'endocitosi di piccole vescicole rivestite di clatrina (Block et al., 1988; Segawa et al., 1991; Rothman e Orci, 1992; Sollner et al., 1993; Segawa e Riva, 1996; Segawa e Yamashina, 1998).

Come rivelato da immagini ultrastrutturali, i microfilamenti, che sarebbero responsabili delle forze motorie necessarie per il trasporto intracellulare dei granuli, costituirebbero una complessa rete in vicinanza della membrana apicale dove agirebbero formando una barriera che impedisce il contatto dei granuli con la membrana luminale durante la fase non esocitotica. L'esocitosi verrebbe così regolata anche dal disgregamento e dal riformarsi di questa rete actinica (Segawa e Yamashina, 1989; Muallem et al., 1995; Segawa et al., 1998a; Loy et al., 2005).

SCOPO DELLA TESI

In precedenti lavori sulla secrezione salivare nell'uomo (Segawa et al., 1998b) abbiamo studiato, al MES e al MET, le variazioni morfologiche, indotte dalla stimolazione *in vitro* con l'agonista β -adrenergico isoproterenolo, nel plasmalemma che delimita i canalicoli secretori degli acini sierosi della parotide e della sottomandibolare.

Al MET abbiamo osservato che il numero dei granuli di secreto nelle cellule sierose diminuiva mentre il lume dei canalicoli secretori era dilatato. Il plasmalemma luminale presentava pochi microvilli, numerose invaginazioni a forma di Ω (Ω -shaped) e piccole fossette rivestite. Al MES, dopo rimozione degli organuli cellulari, la superficie citoplasmatica dei canalicoli secretori appariva piuttosto irregolare, con delle protuberanze, corrispondenti alle forma a Ω osservate al MET, e di dimensioni simili, o più piccole, a quelle dei granuli di secreto. Tali protuberanze presentavano delle microvescicole, con un diametro di 100-150 nm, probabilmente corrispondenti alle fossette rivestite viste al MET e da noi interpretate come l'aspetto morfologico del riciclaggio di membrana dopo l'esocitosi dei granuli (Segawa e Yamashina, 1998; Segawa et al., 1998b). Poiché dai nostri studi è risultato, sia al MES che al MET, che, dopo stimolazione con alcuni secretagoghi (Segawa et al., 1998b), il numero dei microvilli nei canalicoli secretori diminuiva significativamente, rispetto ai campioni non trattati, mentre il numero delle microvescicole aumentava, tali variazioni possono essere considerate un significativo parametro per valutare l'azione di vari farmaci sul processo di secrezione.

Abbiamo pertanto proseguito le nostre ricerche sulla secrezione salivare stimolando *in vitro* con gli stessi secretagoghi e i relativi inibitori sia

frammenti di sottomandibolare che di parotide con il proposito di confrontare le modifiche morfologiche indotte nelle componenti sierose delle due ghiandole.

Sono stati utilizzati i secretagoghi e i corrispondenti inibitori qui sotto elencati.

Il **carbacolo**, estere carbamilico sintetico dell'acetilcolina, è un agonista muscarinico completo (Goodman e Gilman, 2006). In esperimenti *in vitro*, condotti su ghiandole salivari umane (Segawa et al., 1998b), si è dimostrato, al microscopio elettronico, che la stimolazione con carbacolo produce notevoli modificazioni morfologiche, a carico della membrana luminale, causando una diminuzione dei microvilli e un aumento delle microvescicole. Al MES i canalicoli appaiono aumentati di diametro probabilmente perché il carbacolo causa (Segawa e Riva, 1996; Segawa et al., 1998b; Murakami et al., 2000a; 2000b) un'abbondante secrezione di fluido; sulla loro superficie citoplasmatica sono inoltre visibili grosse protusioni, di diametro maggiore rispetto alla dimensione dei singoli granuli, le quali presentano scarse microvescicole. Altre modificazioni riguardano la comparsa di fossette rivestite visibili al MET e probabilmente corrispondenti alle microvescicole visibili al MES.

L'**SNI-2011** (cevimeline hydrochloride) è un agonista muscarinico che agisce sui recettori M3 delle ghiandole salivari, provoca un aumento intracellulare del Ca^{2+} e incrementa notevolmente la produzione di saliva. Pertanto si annovera tra le sostanze potenzialmente utili per il trattamento della Sindrome di Sjogren, malattia autoimmune che colpisce le ghiandole salivari, causando una grave xerostomia (Fife et al., 2002).

La **clozapina** è un antipsicotico atipico derivato dalla dibenzodiazepina che rappresenta una scelta obbligata nella schizofrenia resistente al

trattamento standard. È stato da noi utilizzato perché tra gli effetti collaterali (ipotensione, tachicardia, ipertermia, incontinenza, etc.) è di particolare rilievo l'ipersalivazione, la quale si presenta con una frequenza del 12%-40% dei casi (Ben-Aryeh et al., 1996; Davydov e Botts, 2000; Bai et al., 2001). L'azione della clozapina sulle ghiandole salivari non è stata ancora chiarita completamente.

In questo lavoro abbiamo studiato anche l'antagonista muscarinico completo **atropina**, un alcaloide largamente diffuso in natura, specialmente nella Solanacea *Atropa belladonna*, del quale è ben noto l'effetto inibente sulla salivazione e sulla secrezione delle ghiandole esocrine presenti nelle vie respiratorie (Goodman e Gilman, 2006).

Sono stati utilizzati anche gli inibitori **fentolamina** e **propranololo** antagonisti competitivi adrenergici, rispettivamente dei recettori α_1 e α_2 il primo e dei recettori β_1 e β_2 il secondo (Goodman e Gilman, 2006).

Per monitorare il processo di secrezione e quantificare la risposta alla stimolazione o all'inibizione abbiamo calcolato, in immagini ottenute al MES, il numero per μm^2 (densità) dei microvilli e delle microvescicole sulla superficie citoplasmatica dei canalicoli secretori.

MATERIALI e METODI

Per la nostra indagine sono state utilizzate biopsie delle ghiandole salivari umane, parotide e sottomandibolare, ottenute nel corso di interventi chirurgici per la rimozione di tumori della regione latero-cervicale e orale. Per ogni paziente è stato ottenuto il consenso informato e l'approvazione del comitato etico locale della ASL 8 di Cagliari.

I prelievi sono stati ottenuti da 60 pazienti (31 per la sottomandibolare e 29 per la parotide) di entrambi i sessi, e di età compresa tra 24 e 79 anni. Una parte di ciascun prelievo è stata sottoposta ad esame istologico allo scopo di accertare l'assenza di alterazioni patologiche.

I campioni sono stati immediatamente ridotti in frammenti e incubati in vitro, sotto costante agitazione, in un medium inorganico (contenente NaCl, KCl, MgCl₂, CaCl₂, TRIS, D-Glucose, HCl, NaHCO₃) acidificato con gorgogliamento di CO₂ e O₂ fino a raggiungere pH 7,4.

Nel medium è stato aggiunto carbacolo (Cch) (Sigma Aldrich S.r.l.) 10 µM per 30', oppure SNI-2011 (SNI) (Snow Brand Milk Products COLTD, Tokio, Japan) 10 µM per 10'. Alcuni campioni sono stati trattati con atropina (A) (Sigma Aldrich S.r.l.) 20 µM per 5-7', altri trattati prima con A 20 µM per 5-7' e successivamente con carbacolo 10 µM per 30' (A+Cch) oppure con SNI 10 µM per 10' (A+SNI).

I frammenti di sottomandibolare sono stati stimolati anche con clozapina (Cloz) (Sigma Aldrich S.r.l.) 10 µM per 30'. Alcuni campioni sono stati stimolati con carbacolo 10 µM e clozapina 10 µM (Cch+Cloz) insieme per 30'. In alcuni esperimenti, prima della stimolazione con Cloz, i frammenti sono stati incubati per 5-7' con A 20 µM (A+Cloz) o con propranololo (Sigma Aldrich S.r.l.) 100 µM assieme a fentolamina 20 µM (Pr+Phent+Cloz) (Sigma Aldrich S.r.l.) per 5'-7'.

Come campioni di riferimento sono stati usati frammenti di ghiandole non trattati (indicati come standard) e frammenti incubati nel medium privo di farmaci (indicati come controllo).

Al termine degli esperimenti, alcuni frammenti sono stati fissati e inclusi in resina epossidica per la microscopia elettronica a trasmissione; le sezioni ottenute all'ultramicrotomo sono state colorate con acetato di uranile e bismuto (Tabella 1) (Riva, 1974). Le sezioni semifini sono state colorate con blu di toluidina per l'osservazione al microscopio ottico (Leica DMR).

Un'altra parte dei frammenti è stata processata con la tecnica di macerazione osmica, perfezionata nel nostro laboratorio, per la microscopia elettronica a scansione ad alta risoluzione (Tabella 2) (Riva et al., 1998; 1999). Tale metodo consiste nel far soggiornare il tessuto in una soluzione diluita di OsO_4 (0,1% in PBS) al fine di denaturare ed estrarre le proteine del citoplasma e del citoscheletro. La macerazione osmica è fondamentale nell'allestimento dei preparati destinati al MES in quanto consente di visualizzare, in tre dimensioni, gli organuli cellulari e la loro topografia reciproca, con una panoramica completa dell'architettura della cellula.

L'agitazione delle sezioni tramite un agitatore a rulli, migliora l'estrazione delle proteine e consente non solo una rimozione più completa del citoscheletro ma anche degli organuli cellulari. Pertanto nei nostri esperimenti parte delle sezioni dei frammenti di sottomandibolare e parotide hanno soggiornato nella soluzione di OsO_4 (per circa 72 ore a 26 °C) e sono stati sottoposti ad agitazione durante i lavaggi in PBS. In tali condizioni è stato possibile, in alcuni punti delle sezioni, ottenere lo svuotamento completo delle cellule sierose in modo da poter osservare, al

MES, la superficie citoplasmatica del plasmalemma dei canalicoli intercellulari.

Su tali superfici abbiamo calcolato il numero di buchi, corrispondenti alla base dei microvilli, e il numero delle microvescicole, considerate come un aspetto morfologico del riciclaggio di membrana dopo l'esocitosi di granuli, per μm^2 (densità).

I dati quantitativi relativi alla densità dei microvilli e delle microvescicole sono stati normalizzati e le differenze statistiche tra gli esperimenti sono state determinate da un test non-parametrico (Mann-Whitney U-test). Tutti i dati sono indicati come media \pm ESM. Il livello di significatività è stato stabilito a $P < 0,05$.

Abbiamo esaminato 912 immagini per la sottomandibolare e 1027 immagini per la parotide. L'acquisizione delle immagini è stata ottenuta con il programma Quartz PCI (Quartz imaging, Vancouver, Canada). Le analisi statistiche sono state elaborate con Image Tool for Windows (University of Texas Health Science Center in San Antonio) e con Microsoft Excel 2000 .

RISULTATI E DISCUSSIONE

Controlli

Al ML, le cellule sierose nei campioni di controllo della sottomandibolare e della parotide, sono ricche di granuli di secreto e raramente si osservano immagini di secrezione (Figg. 19, 20). Al MET la membrana del lume centrale e dei canalicoli intercellulari presenta numerosi microvilli (Figg. 21, 22) e qualche piccola fossetta rivestita. Al MES, dopo la rimozione degli organelli cellulari (Riva et al., 1998; 1999), la superficie citoplasmatica della membrana luminale mostra numerosi buchi, corrispondenti alla base dei microvilli privati del citoscheletro, e delle piccole microvescicole di diametro compreso tra 100 e 150 nm (Figg. 23, 24), almeno in parte correlabili alle fossette rivestite visibili al MET.

Su tali immagini abbiamo quantificato la densità (n° per μm^2 di superficie) dei microvilli ottenendo, nelle due ghiandole, dei valori molto simili: $28,4 \pm 2$ nella parotide e $28,9 \pm 1$ nella sottomandibolare (grafico 1). Al contrario abbiamo rilevato una notevole discrepanza (grafico 2) tra la densità delle microvescicole che risulta decisamente più elevata nella parotide ($7,41 \pm 0,32$) rispetto a quella della sottomandibolare ($2,27 \pm 0,28$). La maggiore densità di microvescicole nella superficie citoplasmatica dei canalicoli intercellulari della parotide è evidente anche nelle immagini al MES (Fig. 24). Tale differenza nelle due ghiandole è stata riscontrata anche nei campioni fissati immediatamente (standard) e appare di difficile interpretazione. L'assenza di stimolazione e la scarsità di immagini di secrezione ci porterebbe, infatti, ad escludere che le microvescicole siano implicate nel riciclaggio delle membrane dei granuli

esocitati. Considerarle immagini delle secrezioni costitutiva e costitutiva simile è suggestivo, ma è un po' in contrasto con la considerazione che la secrezione basale è sostenuta soprattutto dalla sottomandibolare, che invece mostra nei controlli e nei campioni standard un numero di microvescicole decisamente inferiore alla parotide.

Una spiegazione possibile è che il maggior volume di saliva prodotta dalla sottomandibolare nella situazione di riposo ha una composizione più ricca di acqua (Mason e Chisholm, 1975) e quella, invece, prodotta dalla parotide un contenuto maggiore di proteine che sarebbero versate nei canali propri attraverso le microvescicole.

Atropina

Le cellule sierose della parotide e della sottomandibolare al ML, dopo trattamento con atropina (inibitore muscarinico completo), si presentano ricche di granuli di secreto (Figg. 25, 26). Al MET, i canalicoli di secrezione mostrano, come nei controlli, numerosi microvilli distribuiti uniformemente (Figg. 27, 28). Anche al MES, i canalicoli appaiono simili a quelli dei controlli; il loro versante citoplasmatico presenta numerosi buchi e, tra questi, poche microvescicole sparse (Figg. 29, 30). La densità dei microvilli e quella delle microvescicole nei campioni trattati con A non varia significativamente nelle due ghiandole, rispetto ai controlli ($P > 0,05$). Si noti che tra le due ghiandole rimane, comunque, la differenza di densità delle microvescicole (grafici 1, 2).

Tali risultati sono in accordo con l'azione inibitoria sulla secrezione posseduta dall'A. Infatti se l'A avesse un'azione stimolante, anche su recettori diversi da quelli muscarinici, avremmo dovuto rilevare una variazione del numero di microvilli o del numero delle microvescicole, dovuti ai processi di esocitosi/endocitosi. La corrispondenza tra gli aspetti morfologici ed i dati quantitativi, da noi osservati nei campioni trattati con atropina e quelli di controllo, sembrerebbe, quindi, indicare che l'A da sola non altera il quadro della secrezione basale nelle cellule sierose di entrambe le ghiandole.

Al ML, dopo trattamento con Cch le cellule sierose mostrano canalicoli intercellulari dilatati, una riduzione del numero dei granuli di secreto e occasionalmente vacuoli di grandi dimensioni (Figg. 31, 32, 33). Al MET, i lumi, molto ampi, presentano pochi microvilli e profili di esocitosi; sono anche evidenti grossi vacuoli di forma irregolare, in continuità con il lume, derivati da processi di esocitosi multipla (Figg. 34, 35). Al MES i canalicoli hanno un aspetto irregolare con caratteristiche protrusioni ovaliformi di varia dimensione. Queste ultime corrispondono, a seconda dei casi, o alle figure di esocitosi di singoli granuli di secreto (forme a Ω), o di più granuli contemporaneamente, correlabili ai vacuoli osservati al MET (Figg. 36, 37).

La densità dei microvilli, calcolata sulle immagini al MES, diminuisce significativamente rispetto a quella dei controlli ($P < 0,0001$), sia nella parotide che nella sottomandibolare (grafico 3). Mentre la densità delle microvescicole aumenta in entrambe le ghiandole, rispetto ai quella dei controlli, ma in percentuale maggiore nella sottomandibolare ($P < 0,0001$) che nella parotide ($P < 0,005$) (grafico 4). Resta comunque sempre più elevata la densità delle microvescicole della parotide rispetto a quella della sottomandibolare.

Nel processo di esocitosi la successione di fasi (docking, priming, fusion, endocytosis) si realizza sempre in aree sprovviste di microvilli, il cui citoscheletro actinico subisce in precedenza un processo di depolimerizzazione (Segawa e Yamashina, 1989; Muallem et al., 1995; Segawa et al., 1998a; Loy et al., 2005). La diminuzione del numero dei microvilli è quindi dovuta a queste modifiche dei microfilamenti actinici. Il parallelo aumento del numero delle microvescicole aderenti alla

superficie citoplasmatica dei canalicoli è stato da noi interpretato come segno morfologico del processo di recupero di membrana dei granuli esocitati.

Nei campioni trattati con A prima della stimolazione con Cch, la secrezione, al ML, sembra essere completamente inibita (Fig. 38) mentre al MET assieme ad immagini simili ai controlli (Fig. 39) si può osservare ancora qualche segno di esocitosi. Al MES il versante citoplasmatico dei canalicoli appare privo di protrusioni (Figg. 40, 41).

I risultati morfometrici indicano che la densità dei microvilli, dopo A+Cch, diminuisce significativamente in entrambe le ghiandole (grafico 3) sia rispetto a quella dei controlli ($P < 0,01$ nella sottomandibolare e $P < 0,001$ nella parotide) che a quella dei campioni trattati solo con A ($P < 0,001$ nella sottomandibolare e $P < 0,01$ nella parotide), mentre è significativamente più alta rispetto ai campioni trattati solo con Cch ($P < 0,005$ nella sottomandibolare e $P < 0,001$ nella parotide). Questi dati indicano che in entrambe le ghiandole il Cch, nonostante la presenza dell'A, sembra ancora in grado di esplicare la sua azione stimolante dando origine ai fenomeni collegati alle fasi iniziali della secrezione, come appunto viene interpretata la diminuzione dei microvilli qui osservata.

Di contro, per quanto riguarda l'analisi quantitativa delle microvescicole le due ghiandole mostrano un comportamento differente (grafico 4). La densità delle microvescicole nei campioni di sottomandibolare, non risulta essere significativamente diversa da quella dei controlli o da quella dei campioni trattati solo con A ($P > 0,05$), mentre è significativamente minore rispetto ai campioni trattati con Cch ($P < 0,0001$). Nella parotide, invece, la densità delle microvescicole nei campioni

incubati con A+Cch, è non solo significativamente maggiore sia rispetto a quella dei campioni di controllo che a quella dei campioni trattati solo con A, ma addirittura simile a quella dei campioni trattati con Cch.

La maggiore densità delle microvescicole nella parotide rispetto alla sottomandibolare dopo A+Cch, evidente anche nelle immagini al MES (fig. 40), potrebbe trovare spiegazione nella presenza sulla superficie canalicolare della prima ghiandola, di due popolazioni di vescicole: quelle correlabili al riciclaggio di membrana dopo l'endocitosi, altre collegate alla secrezione costitutiva e a quella regolata minore. E' possibile, cioè, che la nostra stimolazione con A, precedentemente ad alte dosi di Cch, abbia avuto nella parotide un effetto simile a quello ottenuto dopo stimolazione in vitro con basse dosi di agonisti muscarinici in esperimenti condotti su frammenti di parotide di ratto (von Zastrow e Castle, 1987; Castle e Castle, 1996; Huang et al., 2001; Castle et al., 2002). Ricordiamo che la parotide a differenza della sottomandibolare presenta nei controlli e anche nei campioni standard un numero molto più elevato di microvescicole, implicate forse nella secrezione basale formata da quella costitutiva e da quella costitutiva simile.

Al ML, al MET ed al MES, i campioni trattati con SNI, agonista muscarinico selettivo per i recettori M3 (il recettore muscarinico prevalente nelle ghiandole esocrine, Fife et al., 2002), mostrano segni di secrezione: riduzione nel numero dei granuli di secreto, dilatazione dei canalicoli, presenza di immagini di esocitosi (Figg. 42, 43, 44, 45, 46, 47).

La densità dei microvilli (grafico 5) diminuisce in maniera simile sia nella parotide che nella sottomandibolare ($P > 0,05$). In particolare appare significativamente molto diminuita rispetto ai controlli ($P < 0,0001$), ma in misura minore rispetto a quelli stimolati con Cch ($P < 0,05$). Tale dato sembrerebbe rispecchiare l'azione selettiva dell'SNI solo sui recettori muscarinici di tipo M3 rispetto al carbacolo che è, invece, uno stimolante muscarinico completo.

Anche il conteggio eseguito sulla densità delle microvescicole ha evidenziato un comportamento simile delle due ghiandole (grafico 6): la densità risulta significativamente maggiore dopo SNI, in confronto ai relativi controlli ($P < 0,0001$), e simile, per ogni ghiandola, a quella rispettivamente osservata dopo stimolazione con Cch ($P > 0,05$).

Dopo trattamento con A precedentemente all'SNI, le due ghiandole mostrano invece un comportamento differente.

Nella sottomandibolare abbiamo osservato, al ML, al MET e al MES (Figg. 48, 49, 50, 51) un parziale blocco della secrezione, confermato dalla densità dei microvilli (grafico 5) che risulta essere simile a quella dei controlli ($P > 0,05$). La densità delle microvescicole è aumentata significativamente (grafico 6), anche se di poco ($P < 0,01$), rispetto al controllo, ma non raggiunge i valori dei campioni stimolati con Cch o con SNI.

La parotide stimolata con A+SNI non evidenzia al ML (Fig. 52), al MET e al MES (Fig. 53) immagini di secrezione. I calcoli morfometrici riferiti ai microvilli hanno, invece, inaspettatamente messo in luce una diminuzione significativa, rispetto ai campioni di controllo, della loro densità che appare addirittura simile a quella dei campioni stimolati con SNI (grafico 5). Questo dato sembrerebbe indicare che, nonostante il blocco su tutti i recettori muscarinici (M3 compreso) operato dall'A, l'SNI nella parotide mantiene una qualche capacità di suscitare i fenomeni collegati alle fasi iniziali della secrezione (cioè la diminuzione significativa del numero dei microvilli). Anche i risultati morfometrici riguardanti le microvescicole appaiono in contrasto con l'assenza di secrezione rilevabile dalle immagini al microscopio. Infatti, la densità delle microvescicole (grafico 6) risulta, dopo A+SNI, non solo significativamente aumentata rispetto ai controlli ($P < 0,0005$) e ai campioni trattati solo con A ($P < 0,0001$), ma addirittura simile a quella dei campioni stimolati con SNI ($P > 0,05$) o con Cch ($P > 0,05$). Come già discusso precedentemente a proposito dei risultati nella parotide dopo A+Cch, anche questi risultati, sempre nella parotide, ma dopo A+SNI, potrebbero trovare una spiegazione interpretando le microvescicole come segno di una secrezione regolata minore.

Il differente comportamento delle due ghiandole, dopo il trattamento con A+SNI, sembrerebbe comunque indicare una diversa sensibilità della parotide e della sottomandibolare nei confronti di questi due farmaci.

Clozapina

Lo studio sugli effetti di questo farmaco nei confronti della salivazione è stato per il momento condotto solo sulle cellule sierose della sottomandibolare umana per cui in questa tesi riferiremo i nostri risultati in questa ghiandola, confrontandoli con quelli ottenuti dopo stimolazione con altri farmaci e relativi inibitori (grafico 7).

Al ML solo alcuni acini presentano una modesta risposta dopo stimolazione con Cloz (Figg. 54, 55). Questi, visti al MET (Figg. 56, 57) e al MES (Figg. 58, 59), presentano canalicoli dilatati con scarsi microvilli e alcune immagini di esocitosi a forma di Ω . La densità dei microvilli (grafico 7), calcolata al MES sulle superfici citoplasmatiche dei canalicoli, risulta diminuita non solo rispetto ai controlli ($P < 0,0001$) ma sorprendentemente anche rispetto ai campioni stimolati con SNI e con Cch. Al contrario, la densità delle microvescicole, sebbene aumentata significativamente rispetto ai controlli, risulta decisamente inferiore a quella dei campioni stimolati con SNI o con Cch. Ancora una volta, la differente intensità di risposta al farmaco (Cloz in questo caso) osservata tra i microvilli e le microvescicole, la cui diminuzione e aumento rispettivi non sono mai né direttamente né inversamente proporzionali, supportano la convinzione che il loro comportamento nel processo di secrezione sia sotto il controllo di meccanismi differenti.

Nei campioni trattati con A precedentemente alla Cloz, al ML la maggior parte degli acini non presenta segni di stimolazione (Fig. 60); al MET (Fig. 61) appaiono, invece, segni ben riconoscibili di secrezione, mentre al MES (Fig. 62) i canalicoli appaiono addirittura simili a quelli stimolati solo con Cloz. La densità dei microvilli risulta diminuita rispetto ai controlli ($P < 0,05$), mentre quella delle microvescicole è aumentata ed appare simile

a quella osservata nei campioni stimolati solo con Cloz. Questa attività antagonista parziale dell'A sulla Cloz, confermerebbe comunque una specifica azione della Cloz sui recettori muscarinici come suggerito da Olianas et al., (1999). Tuttavia la scarsa attività di esocitosi dopo stimolazione con Cloz, documentata anche dalle nostre immagini al MES (Figg. 58, 59), si spiegherebbe col fatto che tale farmaco è in grado di attivare il recettore M3 presente nelle ghiandole salivari umane, ma con una risposta corrispondente a circa il 6% di quelle suscitate dall'agonista muscarinico completo Cch (Olianas et al., 1997; 1999).

Dopo stimolazione con Cch e Cloz insieme abbiamo inaspettatamente osservato, al MET (Fig. 63) e al MES (Fig. 64), una sostanziale diminuzione delle immagini di secrezione, rispetto a quelle osservate nei campioni trattati singolarmente coi due stimolanti. Dai calcoli morfometrici la densità dei microvilli (grafico 7), seppure diminuita significativamente ($P < 0,05$) rispetto ai controlli, risulta significativamente più alta sia di quella calcolata dopo Cloz ($P < 0,0001$) che dopo Cch ($P < 0,001$), e simile a quella dopo A+Cloz ($P > 0,05$) e dopo A+Cch ($P > 0,05$).

La densità delle microvescicole (grafico 7) aumenta significativamente sia rispetto ai controlli ($P < 0,0005$) che a quella dei campioni trattati con A+Cch ($P < 0,0001$), mentre non differisce ($P > 0,005$) da quella dei campioni stimolati con clozapina, con A+Cloz, o con carbacolo. I risultati ottenuti sia sulla variazione di densità dei microvilli che su quella delle microvescicole indicano che i due secretagoghi Cloz e Cch usati insieme non potenziano affatto a vicenda la propria attività stimolante ma, anzi la Cloz blocca in gran parte l'azione del Cch, probabilmente legandosi ai recettori muscarinici e prevenendo così l'azione del Cch. Questi dati

confermerebbero quanto riportato da Olianas et al., (1997; 1999), che considerano la Cloz come un agonista parziale sui recettori muscarinici.

I campioni trattati con gli antagonisti α e β adrenergici, fentolamina e propranololo, prima della stimolazione con Cloz, mostrano al ML (Fig. 65), al MET (Fig. 66) e al MES (Fig. 67) morfologie simili a quelle osservate dopo stimolazione con Cloz: solo alcuni acini presentano segni di secrezione e molti canalicoli sono simili a quelli dei controlli. La constatazione che, in questo esperimento, la densità dei microvilli sia simile al controllo mentre quella delle microvescicole risulti aumentata rispetto al controllo e simile a quella dopo Cloz (grafico 7), suggerisce che la Cloz possa agire anche sui recettori adrenergici.

Il diverso comportamento presentato dai microvilli (che risultano inibiti) e delle microvescicole (che non risentono degli inibitori adrenergici) suggerisce, ancora una volta, che il controllo nella successione dei fenomeni che costituiscono il processo di secrezione sia molto articolato e complesso e più recettori, secondi messaggeri e mediatori chimici intervengano per regolarlo. A questo proposito occorre sottolineare che la residua attività secretiva presente nella sottomandibolare dopo stimolazione con A+Cloz e con Pr+Phent+Cloz, potrebbe essere ascritta ad una attività stimolante della clozapina attraverso un meccanismo non adrenergico non colinergico (Ekström et. al., 2000; Ekström e Ekström, 2001; Ekström, 2001; 2002).

BIBLIOGRAFIA

Bai Y.M., Lin C.C., Chen J.Y., Liu W.C. 2001. Therapeutic effect of pirenzepine for clozapine-induced hypersalivation: a randomized, double blind, placebo controlled, cross-over study. *J Clin Psychopharmacol* 21: 608-611.

Balboni G.C., Bastianini A., Brizzi E., Castorina S., Comparini L., Donato R.F., Filogamo G., Fusaroli P., Lanza G.G., Grossi C.E., Manzoli F.A., Marinozzi G., Miani A., Mitolo V., Motta P., Nesci E., Orlandini G.E., Passaponti A., Pizzini G., Reale E., Renda T., Ridola C., Ruggeri A., Santoro A., Tedde G., Zaccheo D. 2000. *Anatomia Umana*. Vol 2, ediz. ermes.

Batzri S., Selinger Z., Schramm M. 1971. Potassium ion release and enzyme secretion: adrenergic regulation by α and β receptors. *Science* 174: 1029-1031.

Ben-Aryeh H., Jungerman T., Szargel R., Klein E., Laufer D. 1996. Salivary flow-rate and composition in schizophrenic patients on clozapine: subjective reports and laboratory data. *Biol Psychiatry* 39: 946-949.

Block M.R., Glick B.S., Wilcox C.A., Wieland F.T., Rothman J.E. 1988. Purification of an N-ethylmaleimide-sensitive protein catalyzing vesicular transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 7852-7856.

Butcher F.R., Putney J.W. 1980. Regulation of parotid gland function by cyclic nucleotides and calcium. *Adv Cyclic Nucleotide Res* 13: 215-249.

Castle J.D., Castle A.M. 1996. Two regulated secretory pathways for newly synthesized parotid salivary proteins are distinguished by doses of secretagogues. *J Cell Sci* 109: 2591-2599.

Castle J.D., Castle A.M. 1998. Intracellular transport and secretion of salivary proteins. *Crit Rev Oral Biol Med* 9: 4-22.

Castle A.M., Huang A.Y., Castle J.D. 2002. The minor regulated pathway, a rapid component of salivary secretion, may provide docking/fusion sites for granule exocytosis at the apical surface of acinar cells. *Journal of Cell Science* 115: 2963-2973.

Davydov L., Botts S.R. 2000. Clozapine-induced hypersalivation. *Ann Pharmacother* 34: 662-665.

Dawes C., Wood C.M. 1973. The contribution of oral minor mucous gland secretions to the volume of whole saliva in man. *Arch Oral Biol* 18: 337-342.

Ekström J., Havel G.E., Reinhold A.C. 2000. Parasympathetic non-adrenergic, non-cholinergic induced protein synthesis and mitogenic activity in rat parotid glands. *Exp Physiol* 85: 171-176.

Ekström J. 2001. Gustatory-salivary reflexes induce non-adrenergic, non-cholinergic acinar degranulation in the rat parotid gland. *Exp Physiol* 86: 475-480.

Ekström J., Ekström P.F. 2001. Acinar degranulation in the rat parotid gland induced by neuropeptides. *Exp Physiol* 86: 733-738.

Ekström J. 2002. Muscarinic agonist induced non granular and granular secretion of amylase in the parotid gland of anaesthetized rat. *Exp Physiol* 87: 147-152.

Emmelin N. 1967. Nervous control of salivary glands. In: Handbook of Physiology. Sect. 6. The alimentary canal. Vol. II. Cooke C.F. editor. Baltimore, MD, Williams and Wilkins.

Fife R.S., Chase W.E., Dore R.K., Wiesenhutter C.W., Lockhart P.B., Tindall E., Suen J.Y. 2002. Cevimeline for the treatment of xerostomia in patients with Sjogren syndrome: a randomized trial. Arch Intern Med 162: 1293-1300.

Foskett J.K., Melvin J.E. 1989. Activation of salivary secretion: coupling of cell volume and Ca²⁺ in single cells. Science 244: 1582-1585.

Goodman A.G., Gilman L.S. 2006. The Pharmacological Basis of Therapeutics. 11th edition, Mc Graw-Hill, New York.

Gorr S.U., Venkatesh S.G., Darling D.S. 2005. Parotid secretory granules: crossroads of secretory pathways and protein storage. J Dent Res 84: 500-509.

Gresz V., Kwon T.H., Gong H., Agre P., Steward M.C., King L.S., Nielsen S. 2004. Immunolocalization of AQP5 in rat parotid and submandibular salivary glands after stimulation or inhibition of secretion in vivo. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 287: 151-161.

Grimes M., Kelly R.B. 1992. Intermediates in the constitutive and regulated secretory pathways released in vitro from semi-intact cells. J Cell Biol 117: 539-549.

Huang A., Castle A.M., Hinton B.T., Castle J.D. 2001. Resting (basal) secretion of proteins is provided by the minor regulated and constitutive-like pathways and not granule exocytosis in parotid acinar cells. J Biol Chem 276: 22292-22306.

Jensen J.L., Bordin P., Berg T., Aars H. 1991. Parotid secretion of fluid, amylase, and kallikrein during reflex stimulation under normal

conditions and after acute administration of autonomic blocking agents in man. *Acta Physiol Scand* 143: 321-329.

Kelly R.B. 1985. Pathways of protein secretion in eukaryotes. *Science* 230: 25-32.

Kelley B.M., Porter J.H. 1997. The role of muscarinic cholinergic receptors in the discriminative stimulus properties of clozapine in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 57: 707-719.

Kontis T.C., Johns Me. 1998. *Anatomy and Physiology of the Salivary Glands. Head and Neck Surgery-Otolaryngology.* Byron J. Barley editor. Philadelphia, PA, Lippincott-Raven Publishers.

Laurikainen K., Laurikainen E., Tenovuo J., Kaila T., Vilja P. 1988. Effects of a β -blocking agent, timolol maleate, on saliva in healthy volunteers. *Scand J Dent Res* 96: 121-127.

Lindh B., Hokfelt T. 1990. Structural and functional aspects of acetylcholine peptide coexistence in the autonomic nervous system. *Prog Brain Res* 84: 175-191.

Lodish H.F., Kong N., Snider M., Strous G.J.A.M. 1983. Hepatoma secretory proteins migrate from rough endoplasmic reticulum to Golgi at characteristic rates. *Nature* 304: 80-83.

Loy F., Puxeddu R., Isola M., Loffredo F., Riva A., Testa Riva F. 2005. Morphological alterations induced by cytochalasin D on serous cells of human submandibular gland in basal and stimulated conditions. *It J Anat Embriol* 110 : 65-70.

Lundberg J.M., Hokfelt T., Schultzberg M., Uvnas-Wallensten K., Kohler C., Said S.I. 1979. Occurrence of vasoactive intestinal polypeptide (VIP)-like immunoreactivity in certain cholinergic neurons of the cat:

evidence from combined immunohistochemistry and acetylcholinesterase staining. *Neuroscience* 4: 1539-1559.

Mackie D.A., Pangborn R.M. 1990. Mastication and influence on human salivary flow and alpha-amylase secretion. *Physiol Behav* 47: 593-595.

Mandel I.D., Katz R. 1968. The effect of pharmacologic agents on salivary secretion and composition. II. isoproterenol, alpha and beta adrenergic blockers. *J Oral Ther Pharmacol* 4: 260-269.

Mandel I.D. 1987. The functions of saliva. *J Dent Res* 66: 623-627.

Martinez J.R. 1987. Ion transport and water movement. *J Dent Res* 66: 638-47.

Mason D.K., Chisholm D.M. 1975. Salivary Glands. In: *Health and Disease*. W.B. Saunders Company Ltd.

Mattes R.D. 1997. Physiologic responses to sensory stimulation by food: nutritional implications. *J Am Diet Assoc* 97: 406-413.

Moore H.P., Gumbiner B., Kelly R.B. 1983. Chloroquine diverts ACTH from a regulated to a constitutive secretory pathway in AtT-20 cells. *Nature* 302: 434-436.

Muallem S., Kwiatkowska K., Yu X., Yin H.L. 1995. Actin filament disassembly is a sufficient final trigger for exocytosis in nonexcitable cells. *J Cell Biol* 128: 589-598.

Murakami M., Yoshimura K., Segawa A., Loffredo F., Riva A. 2000a. Relationship between amylase and fluid secretion in the isolated perfused whole parotid gland of the rat. *Eur J Morphol* 38: 243-247.

Murakami M., Yoshimura K., Sugiya H., Segawa A., Loffredo F., Testa Riva F., Riva A. 2000b. Fluid and amylase secretion by perfused

parotid gland: physio- morphological approach. *J Korean Med Sci* 15: 38-39.

Nederfos T., Ericsson T., Twetman S., Dahlöf C. 1994. Effects of the β -adrenoceptor antagonists atenolol and propranolol on human parotid and submandibular-sublingual salivary secretion. *J Dent Res* 73: 5-10.

Olianas M.C., Maullu C., Onali P. 1997. Effects of clozapine on rat striatal muscarinic receptors coupled to inhibition of adenylyl cyclase activity and on the human cloned M4 receptor. *Br J Pharmacol* 122: 401-408.

Olianas M.C., Maullu C., Onali P. 1999. Mixed agonist-antagonist properties of clozapine at different human cloned muscarinic receptor subtypes expressed in Chinese hamster ovary cells. *Neuropsychopharmacology* 20: 263-270.

Pangborn R.M., Lundgren B. 1977. Salivary secretion in response to mastication of crisp bread. *J Texture Stud* 8: 463-472.

Pedersen A.M., Bardow A., Beier Jensen S., Nauntofte B. 2002. Saliva and gastrointestinal functions of taste, mastication, swallowing and digestion. *Oral Dis* 8: 117-129.

Petersen O.H., Maruyama Y. 1999. Electrophysiology of salivary and pancreatic acinar cells. In: *Handbook of physiology*. Vol III. Salivary, gastric, pancreatic, and hepatobiliary secretion. Bethesda, MD, American Physiological Society.

Prinz J.F., Lucas P.W. 1995. Swallow thresholds in human mastication. *Arch Oral Biol* 40: 401-403.

Richardson C.T., Feldman M. 1986. Salivary response to food in humans and its effect on gastric acid secretion. *Am J Physiol* 250: 85-91.

Riva A., Riva Testa F. 1973. Fine structure of acinar cell of human parotid gland. *Anat Rec* 176:149-166.

Riva A. 1974. A simple and rapid staining method for enhancing the contrast of tissues previously treated with uranyl-acetate. *J Microsc* 19: 105-108.

Riva A., Motta G., Riva Testa F. 1974. Ultrastructural diversity in secretory granules of human major salivary glands. *Am J Anat* 139: 293-298.

Riva A., Lantini M. S., Testa Riva F. 1990. Normal human salivary gland. In: *Ultrastructure of the extraparietal glands of the digestive tract*. Riva A., Motta P.M. editors. Boston, MA, Kluwer Academic Publishers. ISBN.

Riva A. 1992. Microstruttura delle ghiandole salivari dell'uomo. *Atti della Società Italiana di Anatomia* 11-49.

Riva A., Congiu T., Lantini M.S., Puxeddu R., Testa Riva F. 1995. The intracellular structure of secretory and ductal epithelia of human major salivary glands. A scanning electron microscopic study. *Ital J Anat Embryol* 99: 367-374.

Riva A., Congiu T., Loffredo F., Testa Riva F. 1996. Further data on intracellular structures of human salivary glands. A SEM study. *Eur J Morphol* 34: 209-214.

Riva A., Loffredo F., Segawa A., Congiu T., Testa Riva F. 1998. Human salivary gland parenchymal cells seen by SEM from the cytoplasmatic side using a new osmium maceration method. *Eur J Morph* 36: 35-40.

Riva A., Faa G., Loffredo F., Piludu M., Testa Riva F. 1999. An improved OsO₄ maceration method for the visualization of internal

structures and surfaces in human bioptic specimens by high resolution scanning electron microscopy. *Scanning Microsc* 13: 111-122.

Rothman J.E., Orci L. 1992. Molecular dissection of the secretory pathway. *Nature* 355: 409-415.

Schneyer L.H. 1956. Source of resting total mixed saliva of man. *J Appl Physiol* 9: 79-81.

Segawa A., Yamashina S. 1989. Roles of microfilaments in exocytosis: a new hypothesis. *Cell Struct Funct* 14: 531-544.

Segawa A., Terakawa S., Yamashina S., Hopkins C.R. 1991. Exocytosis in living salivary glands: direct visualization by video-enhanced microscopy and confocal laser microscopy. *Eur J Cell Biol* 54: 322-330.

Segawa A., Riva A. 1996. Dynamics of salivary secretion studied by confocal laser and scanning electron microscopy. *Eur J Morphol* 34: 215-219.

Segawa A., Yamashina S. 1998. The dynamics of exocytosis of preformed secretory granules from acini in rat salivary glands. In: *Glandular mechanisms of salivary secretion*. Vol 10. *Frontiers of Oral Biology*. Garrett J.R., Ekström J., Anderson L.C. editors. Basel, Karger.

Segawa A., Riva A., Loffredo F., Congiu T., Yamashina S., Testa Riva F. 1998a. Cytoskeletal regulation of human salivary secretion studied by high resolution electron microscopy and confocal laser microscopy. *Eur J Morphol* 36: 41-45.

Segawa A., Loffredo F., Puxeddu R., Yamashina S., Testa Riva F., Riva A. 1998b. Exocytosis in human salivary glands visualized by high-resolution scanning electron microscopy. *Cell Tissue Res* 29: 325-336.

Sollner T., Bennett M., Whitheart S.W., Scheller R.H., Rothman J.E. 1993. A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell* 75: 409-418.

Testa Riva F. 1977. Ultrastructure of human submandibular gland. *J Submicr Cytol* 9: 251-266.

Thaysen J.H., Thorn N.A., Schwarz I.L. 1954. Excretion of sodium chloride and carbon dioxide in human parotid saliva. *Am J Physiol* 178: 155-159.

Tooze J., Tooze S.A. 1986. Clathrin coated vesicular transport of secretory proteins during the formation of ACTH-containing secretory granules in AtT-20 cells. *J Cell Biol* 103: 839-850.

Turner R.J. 1993. Ion transport related to fluid secretion in salivary glands. In: *Biology of the salivary glands*. Dobrosielski-Vergona K. editor. Boca Raton, FL, CRC Press.

von Zastrow M., Castle J.D. 1987. Protein sorting among two distinct export pathways occurs from the content of maturing exocrine storage granules. *J Cell Biol* 105: 2675-2684.

Watanabe S., Dawes C. 1988. A comparison of the effect of tasting and chewing foods on the flow rate of whole saliva in man. *Arch Oral Biol* 33: 761-764.

Young J.A., Cook D.I., van Lennep E.W., Roberts M. 1987. Secretion by the major salivary glands. In: *Physiology of the gastrointestinal tract*. Johnson L.R. editor. New York, NY, Raven Press.

Tabella 1.

Allestimento dei preparati per la microscopia elettronica a trasmissione.

- Prelievo dei campioni delle ghiandole sottomandibolare e parotide.
- Riduzione dei campioni in frammenti cubici di circa 1 mm³.
- Fissazione in una soluzione contenente l'1% di paraformaldeide e l'1,25% di glutaraldeide in tampone cacodilato 0,15 M, per 2h a temperatura ambiente (TA).
- Lavaggio in tampone cacodilato, per 2 h a 3-4 °C.
- Postfissazione in tetrossido di osmio al 2%, per 1h a 3-4 °C al buio.
- Lavaggi in acqua bidistillata, 3x10' a TA.
- Precolorazione in acetato di uranile, per 24h a 3-4 °C.
- Lavaggi in acqua bidistillata, 3x10' a TA.
- Disidratazione attraverso la scala ascendente degli acetoni a TA.
- Passaggi in toluolo, 2x30' a TA.
- Passaggio in soluzione 1:1 di toluolo e resina Epon per 24 h a TA in agitatore TAAB ROTATOR.
- Passaggio in resina Epon per 2h a TA in agitatore TAAB ROTATOR.
- Inclusione in resina Epon.
- Soggiorno in termostato a 50 °C per 24h.
- Taglio all'ultramicrotomo "SUPER NOVA" in fette di spessore 50-80 nm.
- Colorazione con acetato di uranile e bismuto a TA.

L'osservazione finale è stata compiuta utilizzando un microscopio elettronico a trasmissione Jeol 100S.

Tabella 2.

Allestimento dei preparati per la microscopia elettronica a scansione.

- Prelievo dei campioni delle ghiandole sottomandibolare e parotide.
- Riduzione dei campioni in frammenti prismatici di circa 1 mm di spessore e 2 mm di lunghezza.
- Fissazione in una soluzione contenente 0,2% di paraformaldeide e 0,25% di glutaraldeide in tampone cacodilato 0,1M, per 15' a temperatura ambiente (TA).
- Lavaggi in soluzione fisiologica tamponata (PBS), 3x10' a TA.
- 1^a Post-fissazione con una soluzione 1:1 di tetrossido di osmio al 2% e ferrocianuro di potassio al 2,5% per 2h a TA al buio.
- Lavaggi in soluzione fisiologica tamponata (PBS), 3x10' a TA.
- Se necessario i frammenti possono soggiornare in PBS contenente sodio azide 0,2% fino a un massimo di 3 gg.
- Inclusione in agarosio 1,75%.
- Taglio dei frammenti, con un sezionatore Sorvall TC2, in fette di 150 μm di spessore.
- 2^a Post-fissazione con una soluzione 1:1 di tetrossido di osmio al 2% e ferrocianuro di potassio al 2,5%, per 1h a TA al buio.
- Lavaggi in PBS, 3x15' a TA con agitazione meccanica dei campioni mediante un agitatore a rulli.
- Macerazione in tetrossido di osmio allo 0,1% in PBS per 72h a 26 °C al buio (con agitazione meccanica dei campioni per l'estrazione degli organelli cellulari).
- Lavaggi in PBS, 3x15' a TA con agitazione meccanica dei campioni.

- Disidratazione attraverso la scala ascendente degli acetoni a TA con agitazione meccanica dei campioni.
- Essiccazione al punto critico attraverso un Critical Point Drying.
- Montaggio su supporti in alluminio (stubs) e ricopertura con uno strato di Platino di 3 nm, per mezzo di un metallizzatore turbo Emitech K 575 ad alto vuoto.

L'osservazione finale è stata compiuta utilizzando un microscopio elettronico ad emissione di campo HRSEM Hitachi S4000.

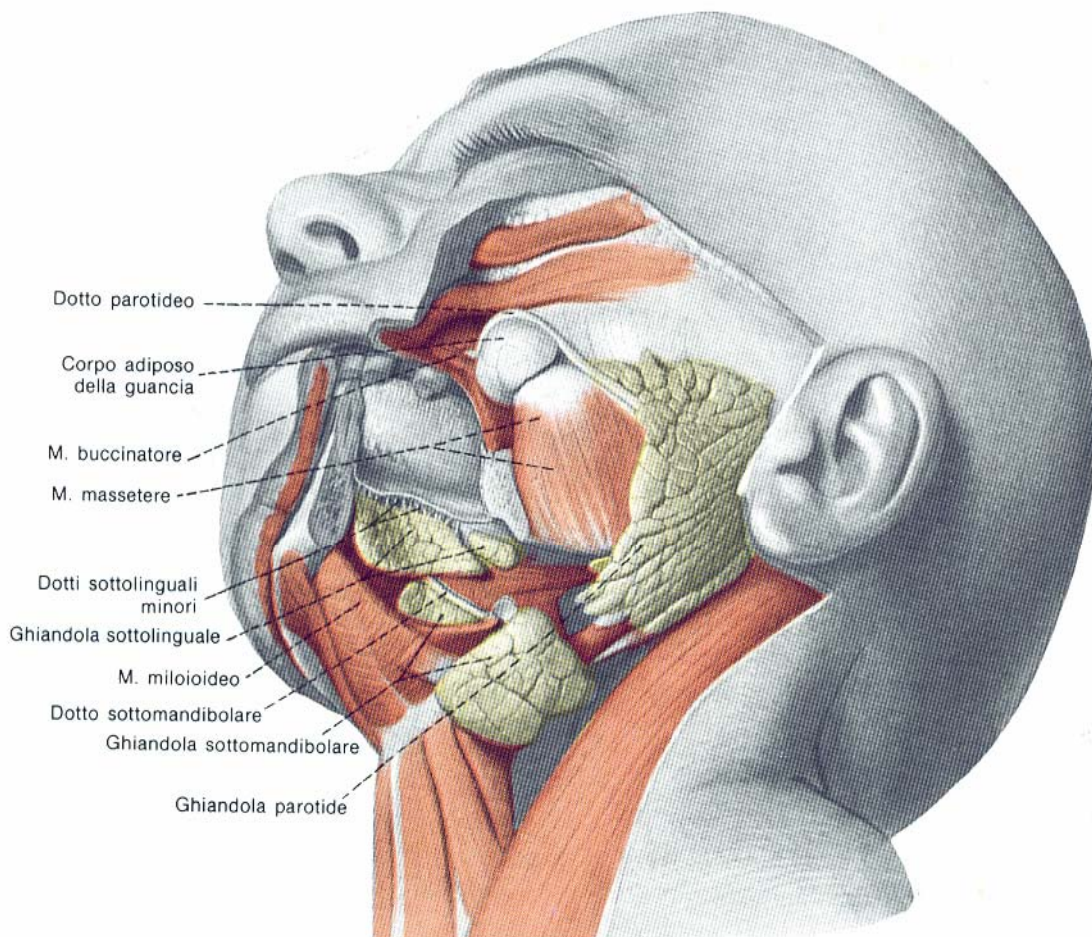


Fig. 1. Posizione e rapporti delle ghiandole salivari maggiori nell'uomo dopo rimozione di parte del pavimento della cavità orale e della mandibola. La ghiandola sottomandibolare appare parzialmente sezionata. Tratto da: Balboni et al., Anatomia Umana edi-ermes 2000.

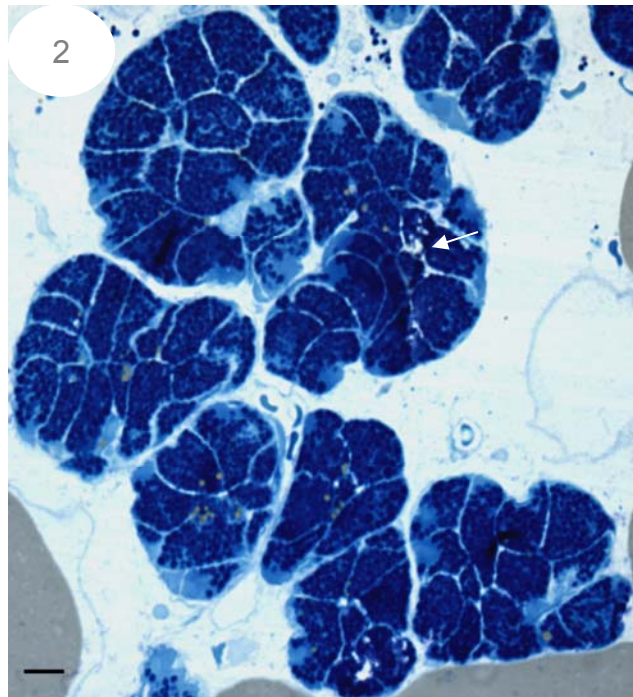


Fig. 2. ML. Ghiandola parotide umana. Le cellule acinari hanno forma triangolare e mostrano numerosi granuli di secreto. Sono visibili i lumi dei canalicoli intercellulari sezionati longitudinalmente (freccia). Bar: 10 μ m.

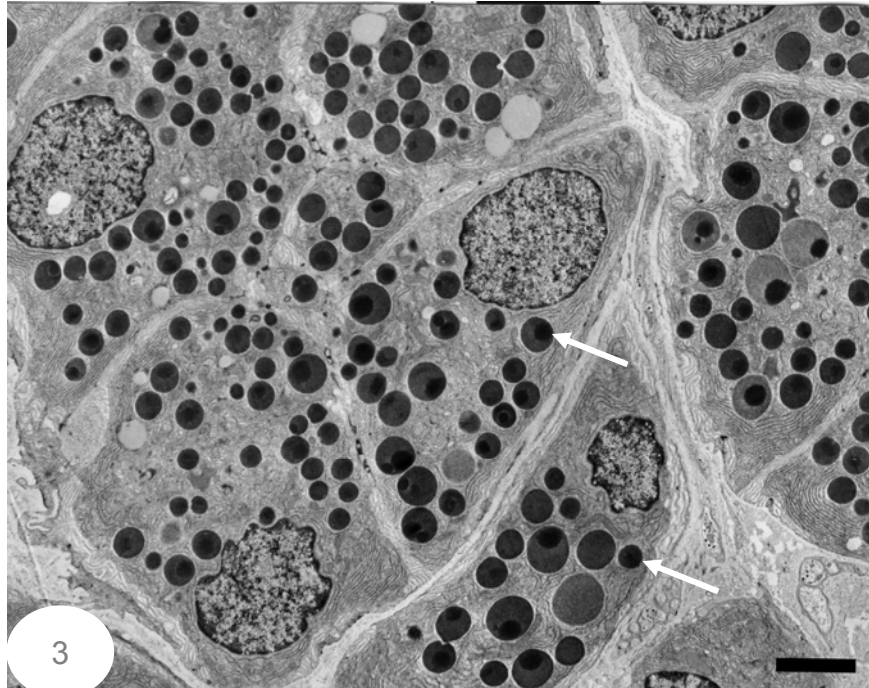


Fig. 3. MET. Ghiandola parotide. Le cellule sono ricche di granuli di secreto (freccie) che occupano la porzione centro-apicale. Il nucleo è situato nella porzione basale della cellula. Bar: 5 μ m.

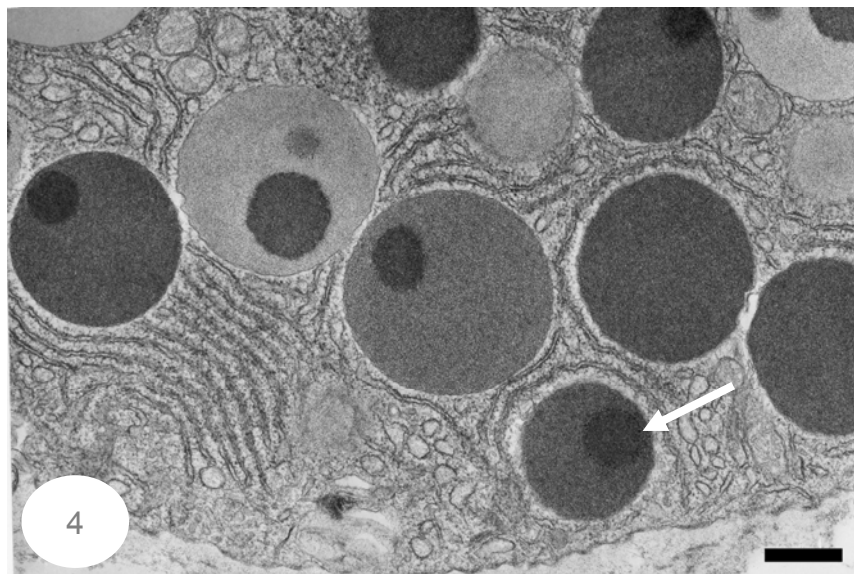


Fig. 4. MET. Ghiandola parotide. I granuli secretori presentano una struttura bipartita con una matrice principale moderatamente elettrodensa ed una sferula più elettrodensa (freccia). Bar: 500 nm.

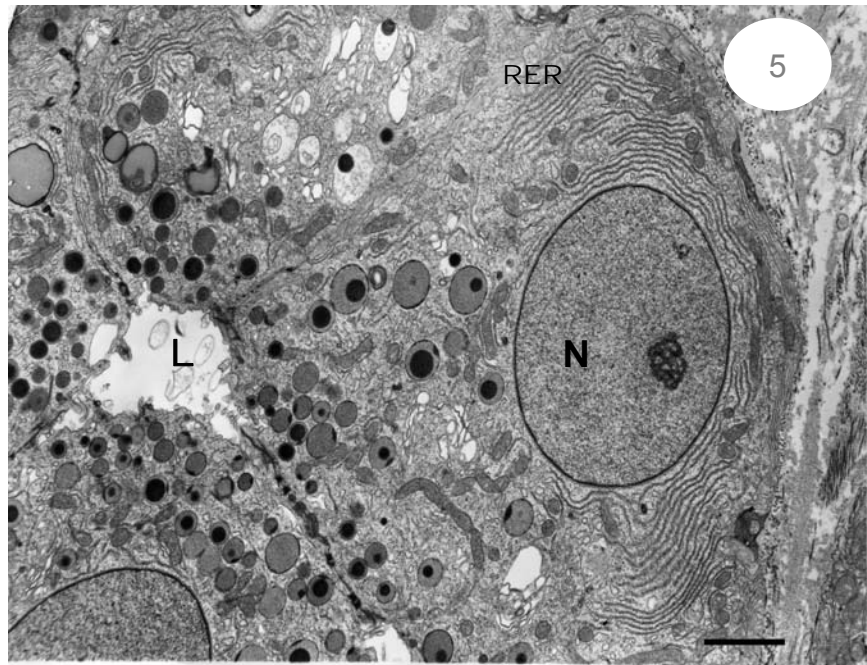


Fig. 5. MET. Acino della ghiandola parotide. Il lume centrale (L) presenta numerosi microvilli. Si osserva che il nucleo (N) e il RER si trovano nella porzione basale della cellula. Bar 1 μ m.

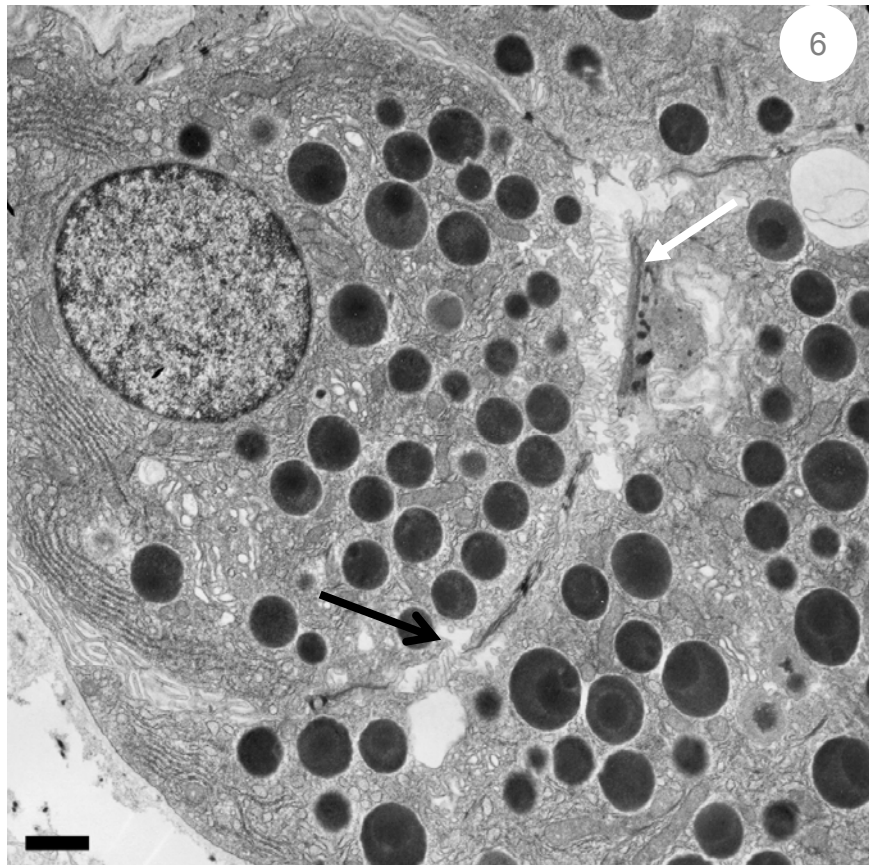
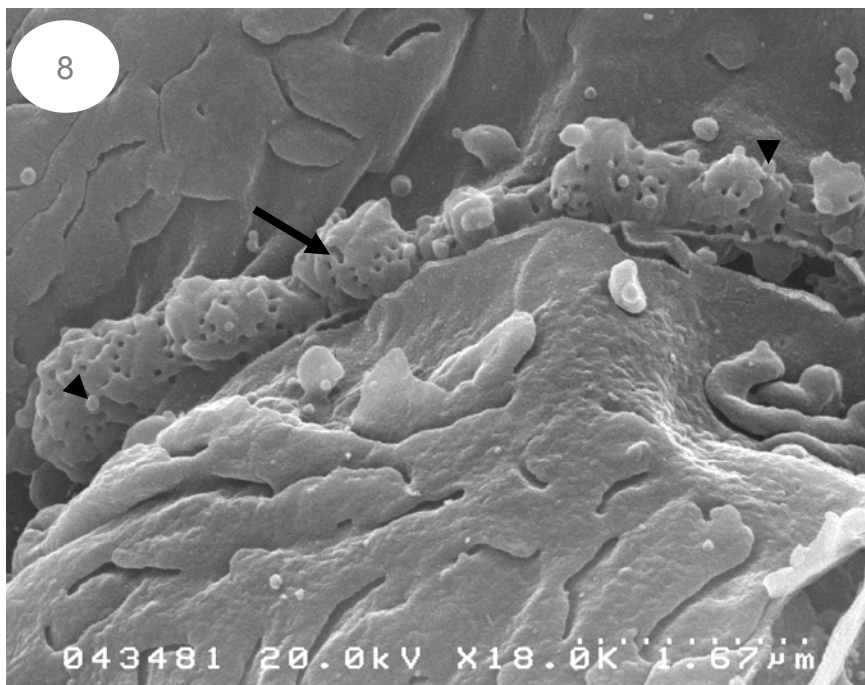
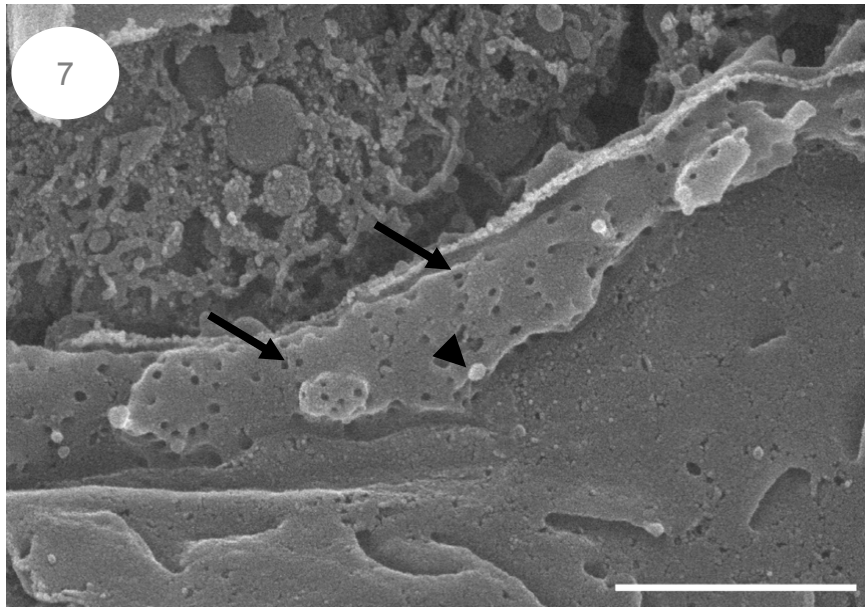


Fig. 6. MET. Ghiandola parotide. I canali secretori sezionati longitudinalmente (freccia bianca) e trasversalmente (freccia nera) presentano numerosi microvilli. Bar 1 μ m.



Figg. 7, 8. MES. Ghiandola parotide. Dopo rimozione di tutti gli organuli cellulari, è possibile osservare il versante citoplasmatico dei canali secretori che presenta numerosi buchi, corrispondenti alla base dei microvilli privati del citoscheletro (frecce), e alcune microvesicole sparse (punte di freccia). Fig. 7: bar 1 μm . Fig. 8: bar 1,67 μm .

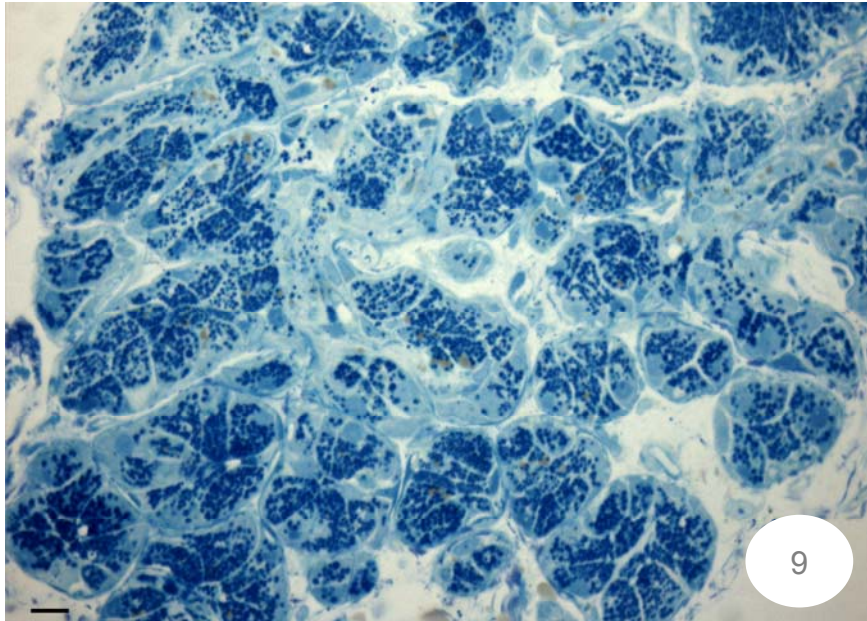


Fig. 9. ML. Ghiandola sottomandibolare. Adenomeri sierosi costituiti da cellule piene di granuli di secreto. Bar: 10 μ m.

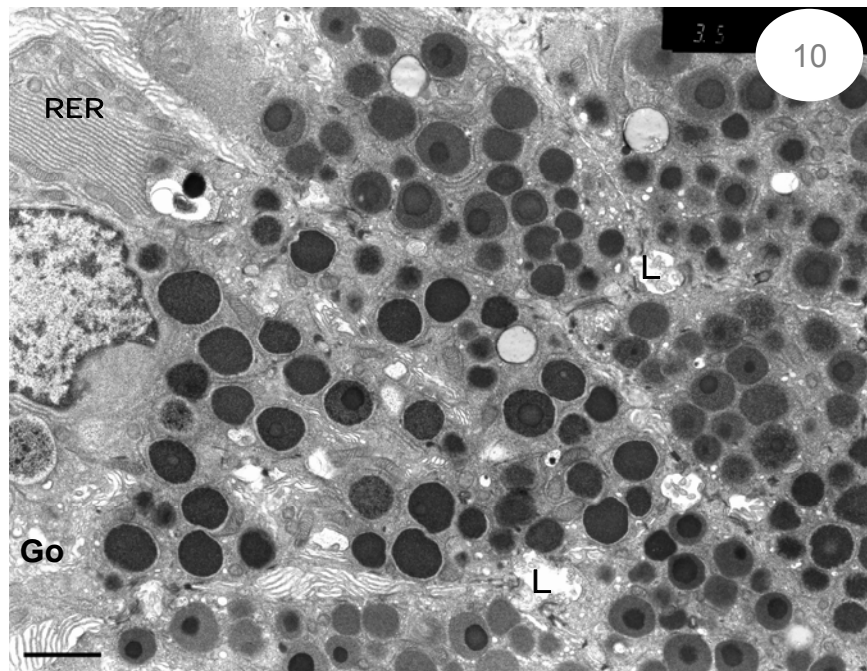


Fig. 10. MET. Ghiandola sottomandibolare. Le cellule sierose, nella porzione centro apicale, mostrano numerosi granuli di secreto. Il reticolo endoplasmatico rugoso (RER) e il nucleo sono localizzati nella porzione basale. Sono visibili diversi lumi di canali secretori sezionati trasversalmente (L). Go, apparato di Golgi. Bar: 1 μ m.

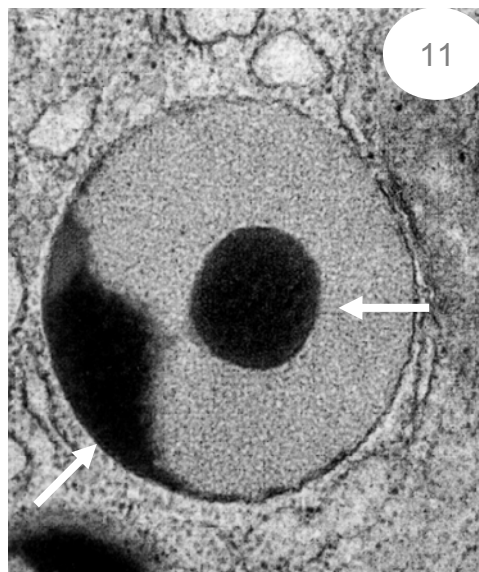
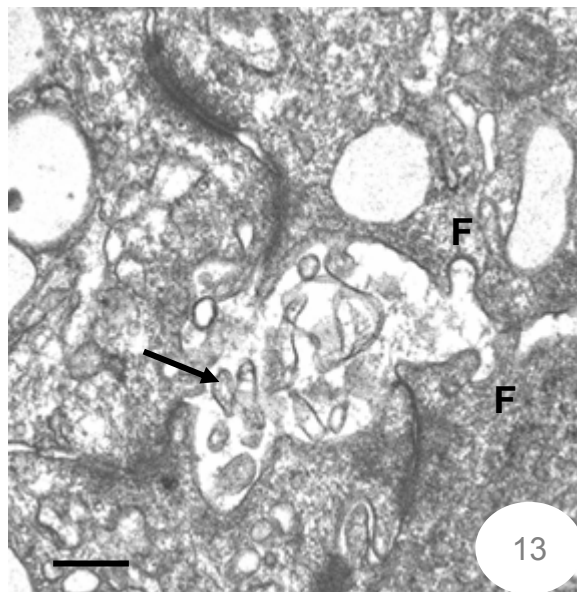
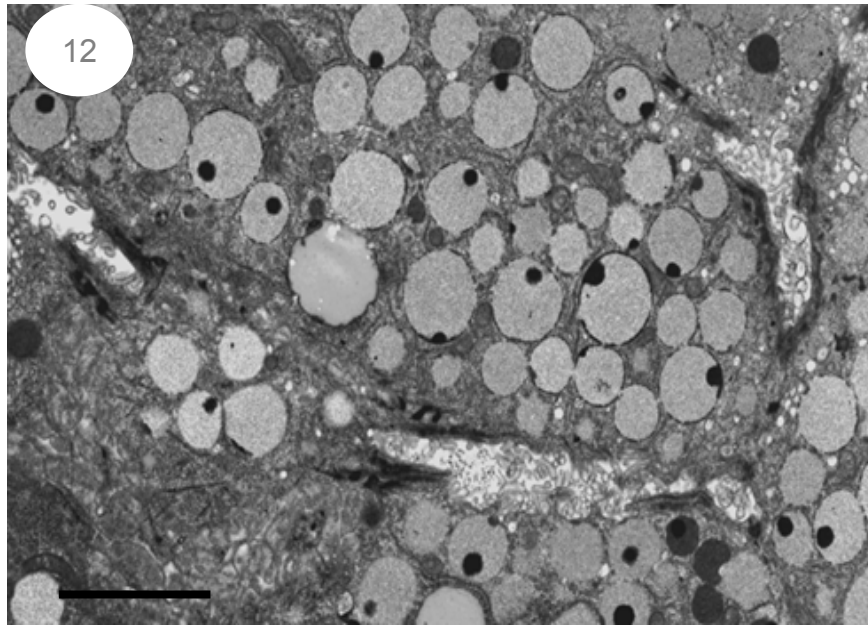


Fig. 11. MET. Ghiandola sottomandibolare. Il granulo di secreto mostra la tipica struttura tripartita con una sferula ed una porzione di forma semilunare elettrondense (freccie), immerse in una matrice più chiara. Bar: 250 nm.



Figg. 12, 13. MET. Ghiandola sottomandibolare. I canalicoli secretori mostrano numerosi microvilli (frecce) ed alcune fossette rivestite (F). Fig. 12: bar 1 μ m. Fig. 13: bar 500 nm.

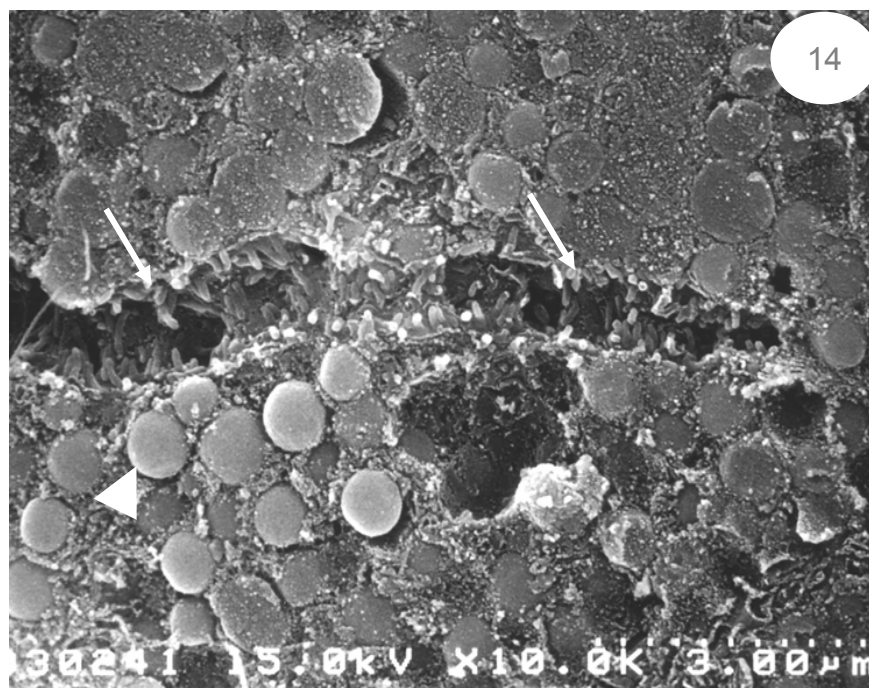


Fig. 14. MES. Ghiandola sottomandibolare. Immagine di un canalicolo sezionato longitudinalmente. Nel lume si osservano corti e fitti microvilli (frece). Sono visibili numerosi granuli di secreto (punta di freccia). Bar 3 μm .

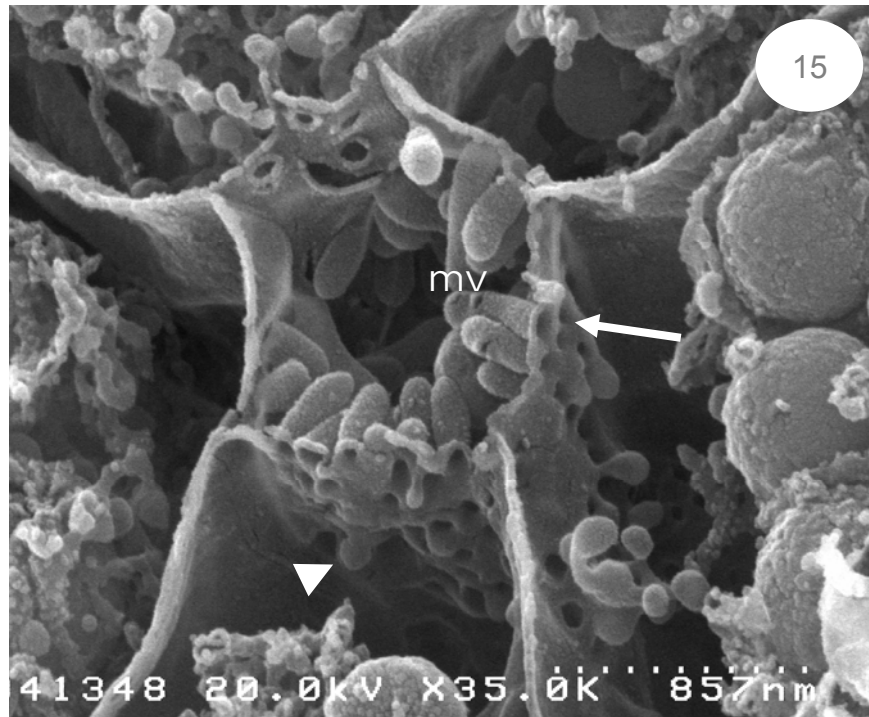
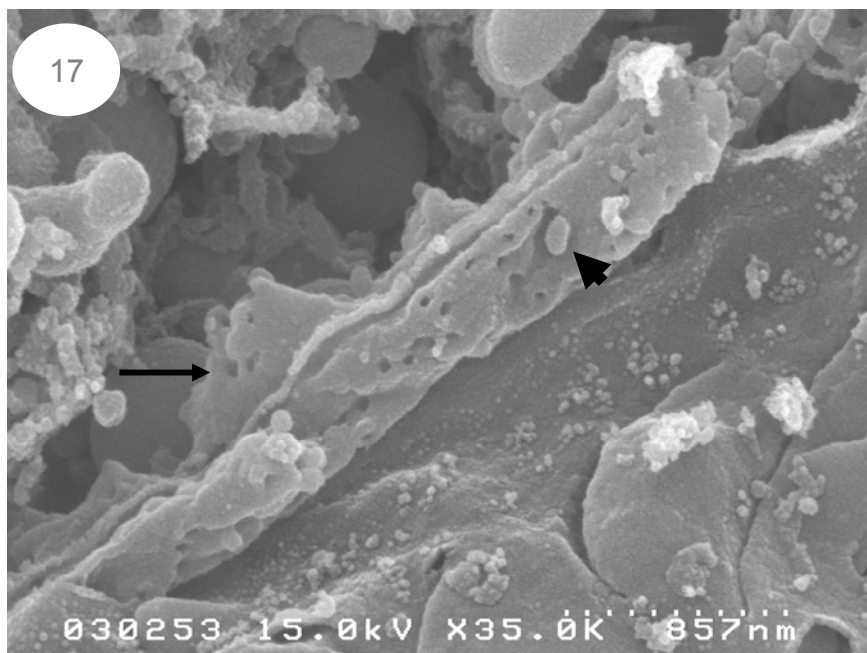
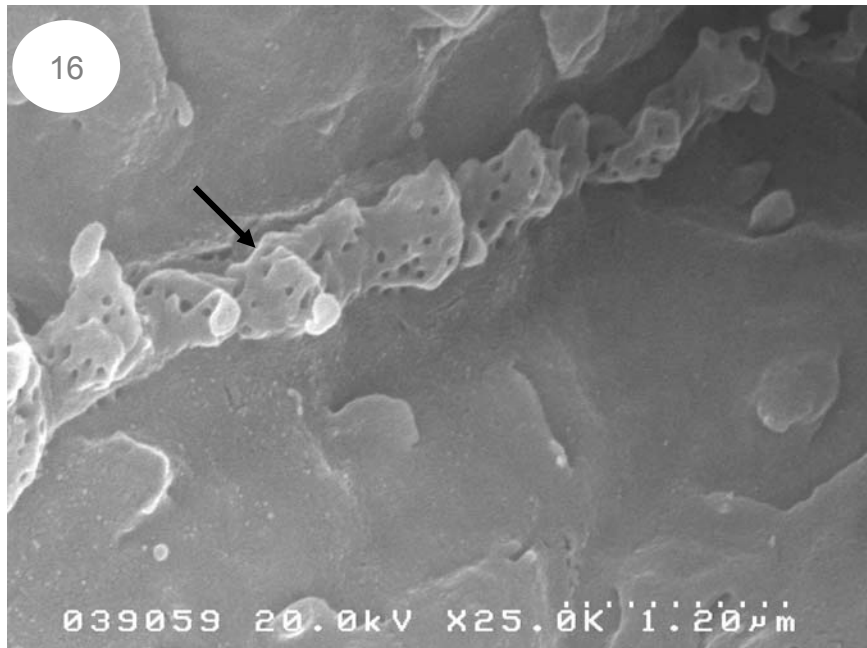


Fig. 15. MES. Ghiandola sottomandibolare. Sezione secondo un piano obliquo di un canalicolo di secrezione. Si nota la correlazione tra i microvilli (mv) nel lume del canalicolo e i buchi (freccia), corrispondenti alla loro base, sulla superficie citoplasmatica. Sono altresì visibili, sul versante citoplasmatico, microvesicole sparse (punta di freccia) da noi correlate alle fossette rivestite visibili al MET. Bar: 857 nm



Figg. 16, 17. MES. Ghiandola sottomandibolare. Dopo rimozione di tutti gli organuli cellulari è possibile osservare la superficie citoplasmatica dei canali secretori. Sono evidenti numerosi buchi (freccie) corrispondenti alla base dei microvilli privati del citoscheletro, e qualche microvescicola (punta di freccia). Fig. 16: bar 1,20 Fig. 17: bar 857 nm.

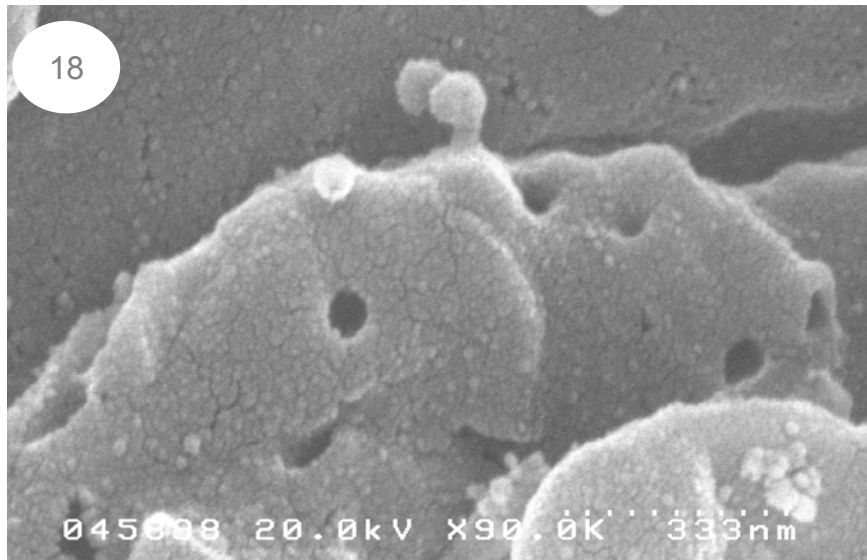


Fig. 18. MES. Ghiandola sottomandibolare. Particolare ingrandito dei buchi e di alcune microvescicola sul versante citoplasmatico di un canalicolo secretorio. Bar: 333 nm.

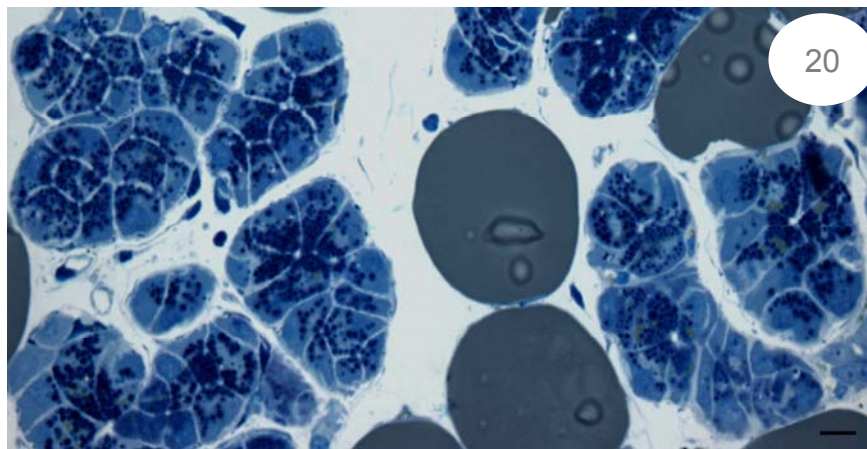
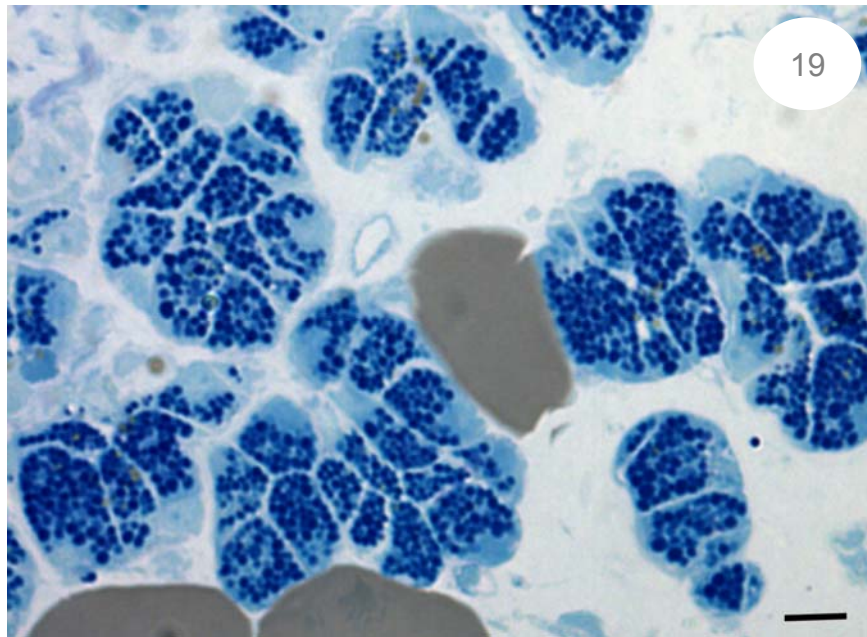


Fig. 19. Parotide. **Fig. 20.** Sottomandibolare. ML. Nei campioni di controllo le cellule sierose di entrambe le ghiandole si presentano piene di granuli di secreto. Non si osservano segni di esocitosi. Bar 10 μ m.

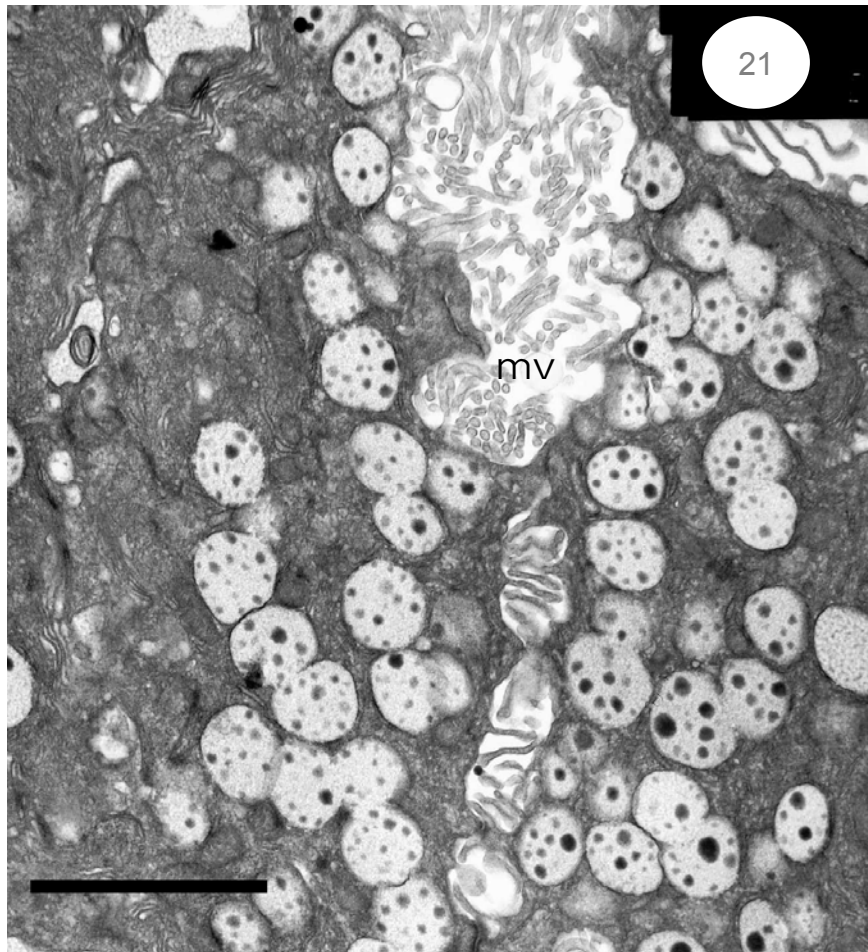
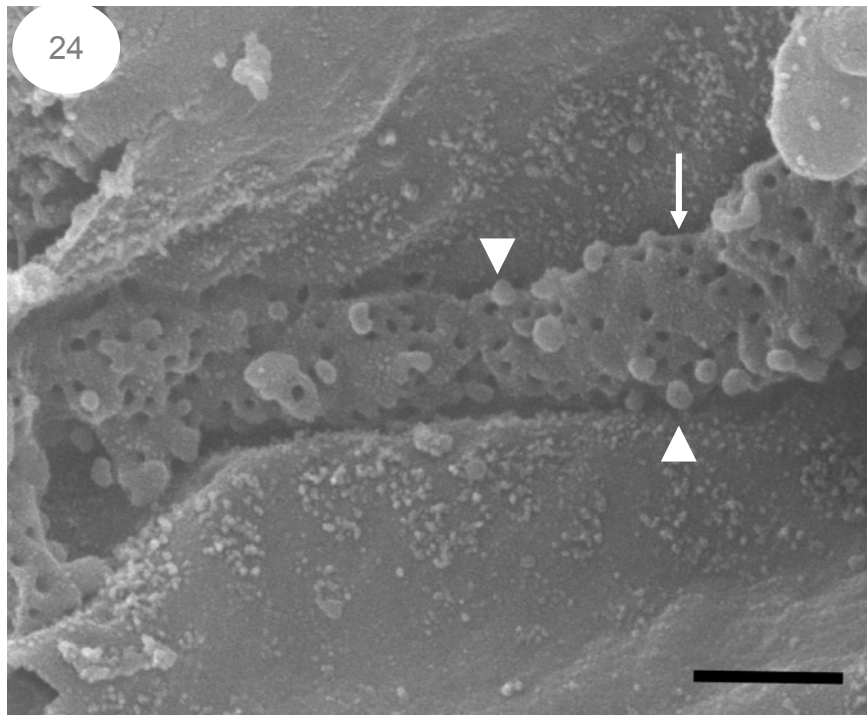
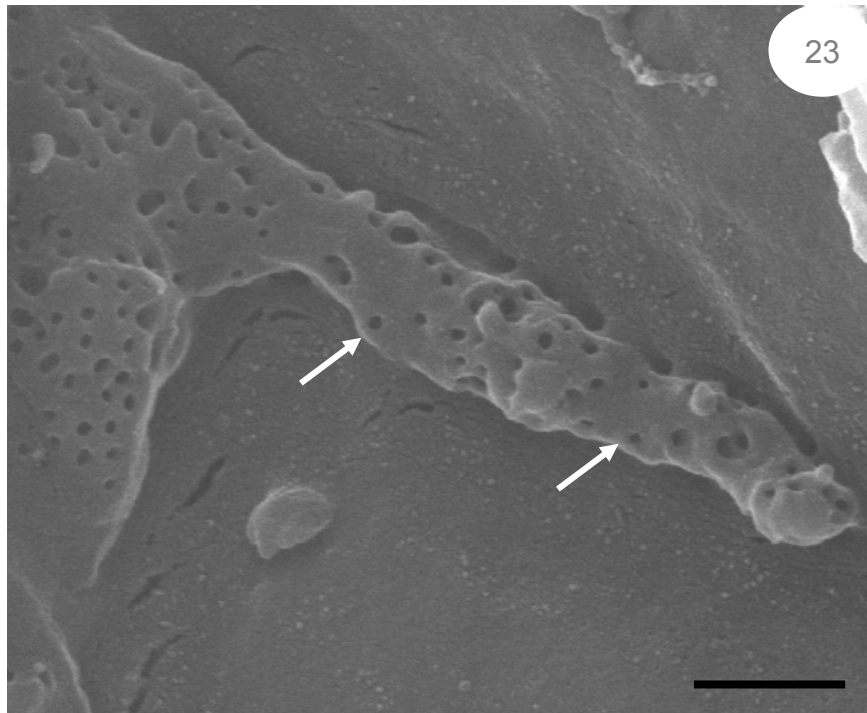


Fig. 21. MET. Sottomandibolare. Controllo. I canali presentano numerosissimi microvilli (mv). Bar 1 μ m.



Fig. 22. MET. Parotide. Controllo. Il canalicolo sezionato trasversalmente mostra evidenti microvilli (mv). Bar 500 nm



MES. Controllo. **Fig. 23.** Sottomandibolare. La superficie del canalicolo mostra numerosi buchi (freccie) corrispondenti ai microvilli. **Fig. 24.** Parotide. Oltre ai numerosi buchi sono qui evidenti microvescicole (punta di freccia) molto più numerose rispetto alla sottomandibolare. Bar 1µm.

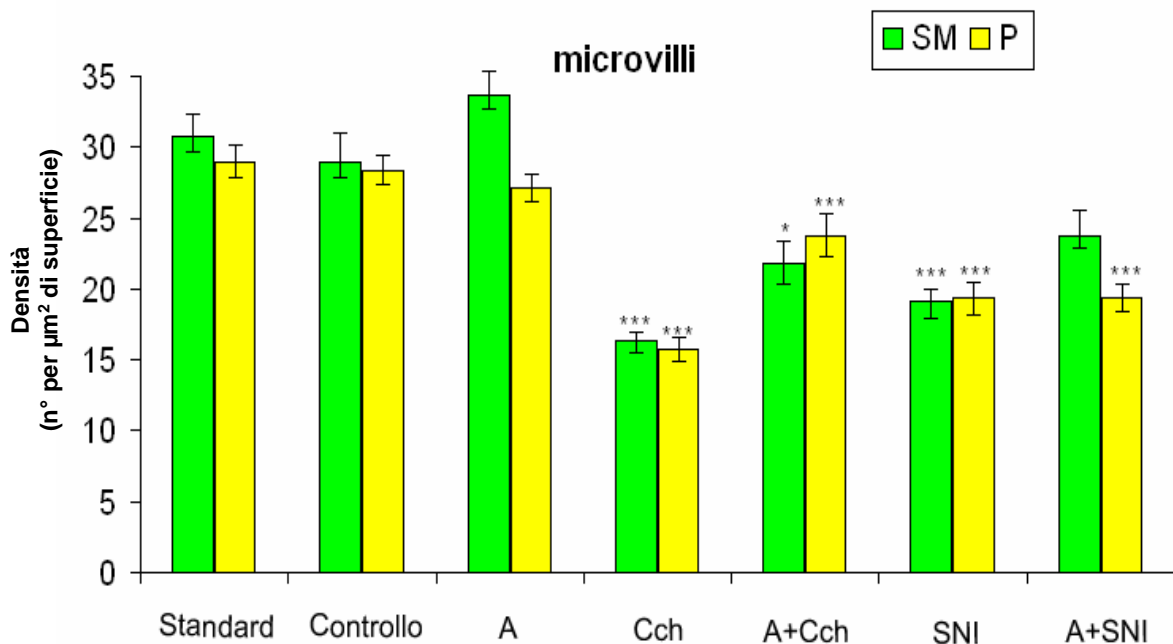


Grafico 1. Densità dei microvilli, calcolata nelle immagini al MES di parotide e sottomandibolare, nei preparati standard, di controllo e dopo trattamento in vitro con vari farmaci. A: atropina. Cch: carbacolo. SNI: SNI 2011. A+Cch: trattamento con atropina precedentemente alla stimolazione con carbacolo. A+SNI: trattamento con atropina precedentemente alla stimolazione con SNI 2011. I valori sono espressi come media \pm ESM. Il livello di significatività è stato stabilito a $P < 0,05$. Gli asterischi indicano il valore di significatività rispetto ai controlli: * $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0001$.

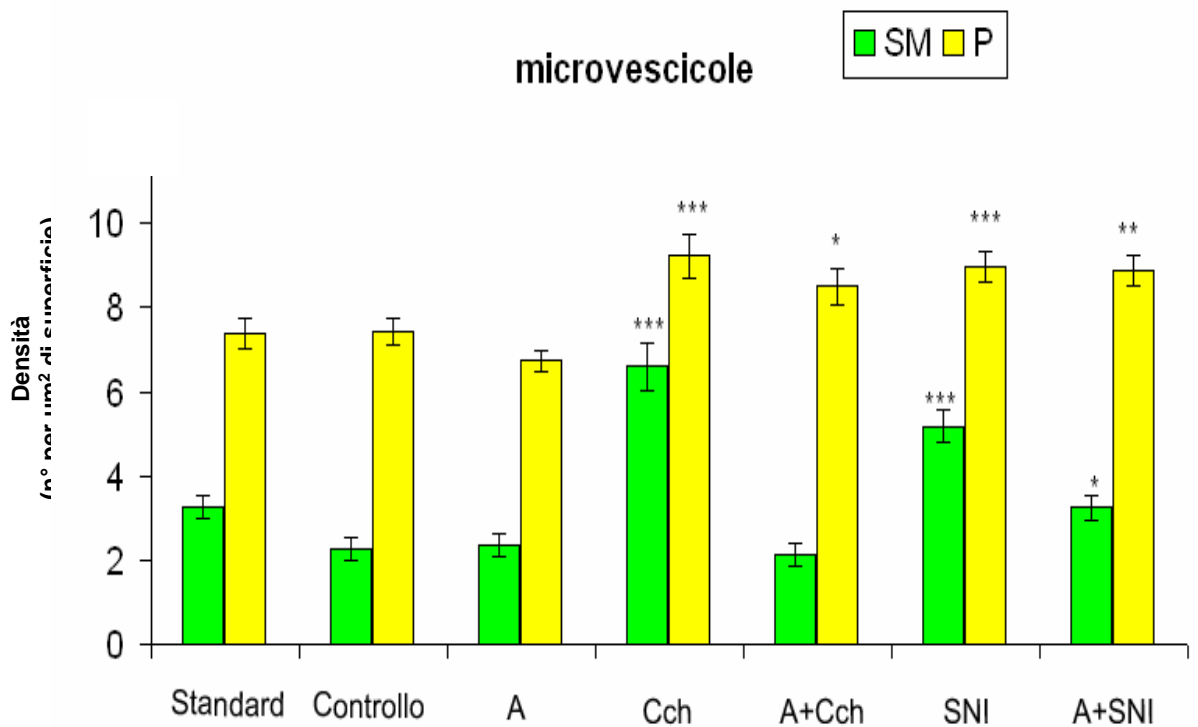


Grafico 2. Densità delle microvescicole, calcolata nelle immagini al MES di parotide e sottomandibolare, nei preparati standard, di controllo e dopo trattamento in vitro con vari farmaci. A: atropina. Cch: carbacolo. SNI: SNI 2011. A+Cch: trattamento con atropina precedentemente alla stimolazione con carbacolo. A+SNI: trattamento con atropina precedentemente alla stimolazione con SNI 2011. I valori sono espressi come media \pm ESM. Il livello di significatività è stato stabilito a $P < 0,05$. Gli asterischi indicano il valore di significatività rispetto ai controlli: * $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0001$.

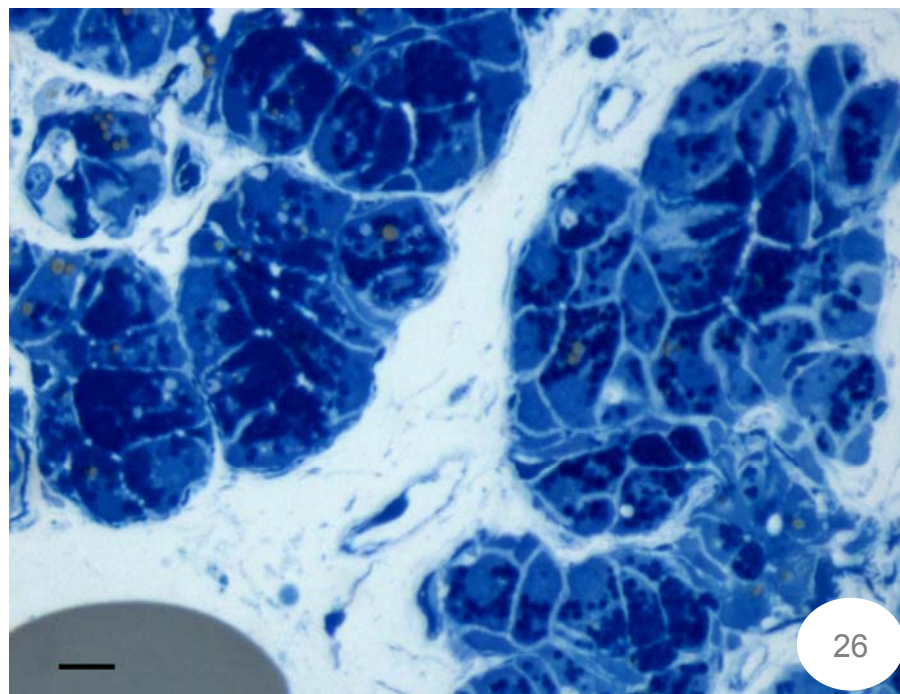
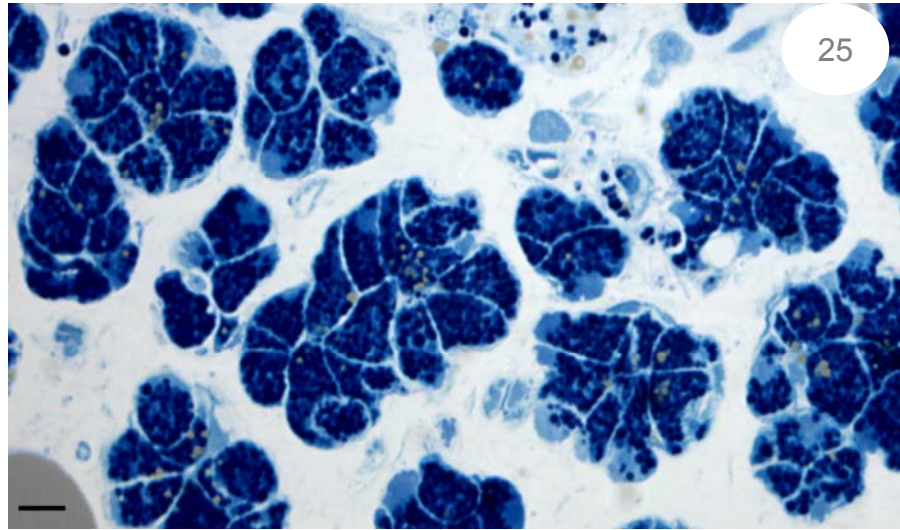


Fig. 25. Parotide. **Fig. 26:** Sottomandibolare. ML. Trattamento con atropina. Gli acini sierosi non mostrano alcun segno di secrezione; i lumi appaiono ristretti e le cellule sono ricche di granuli di secreto come nei campioni di controllo. Bar 10 μ m.

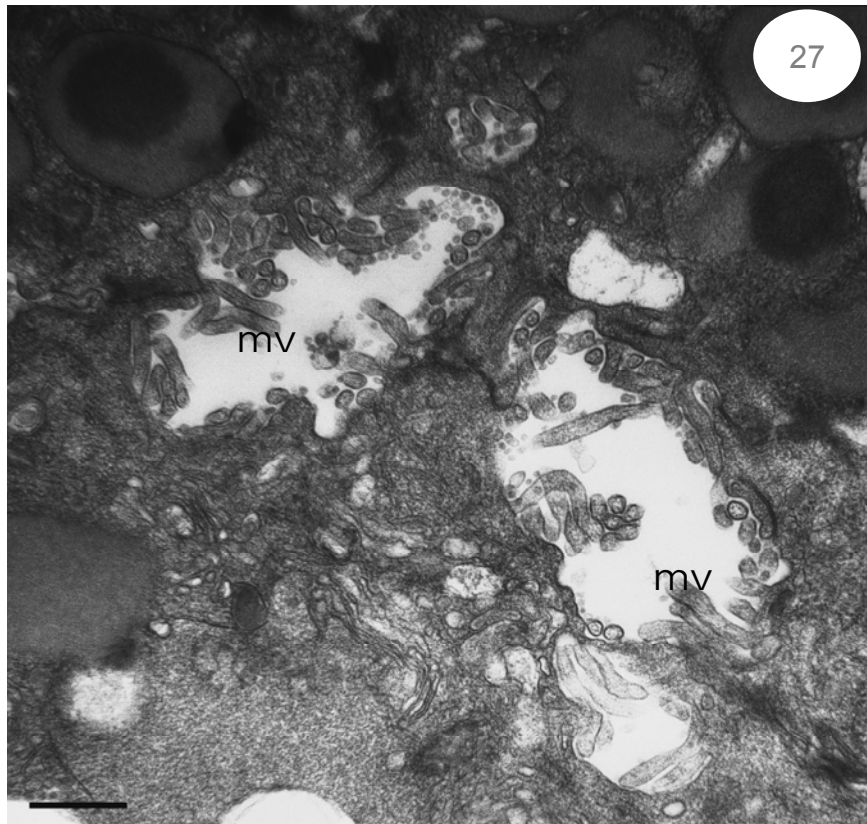


Fig. 27. MET. Ghiandola parotide incubata con A. I canalicoli intercellulari, sezionati trasversalmente, appaiono ricchi di microvilli (mv). Bar 500 nm.

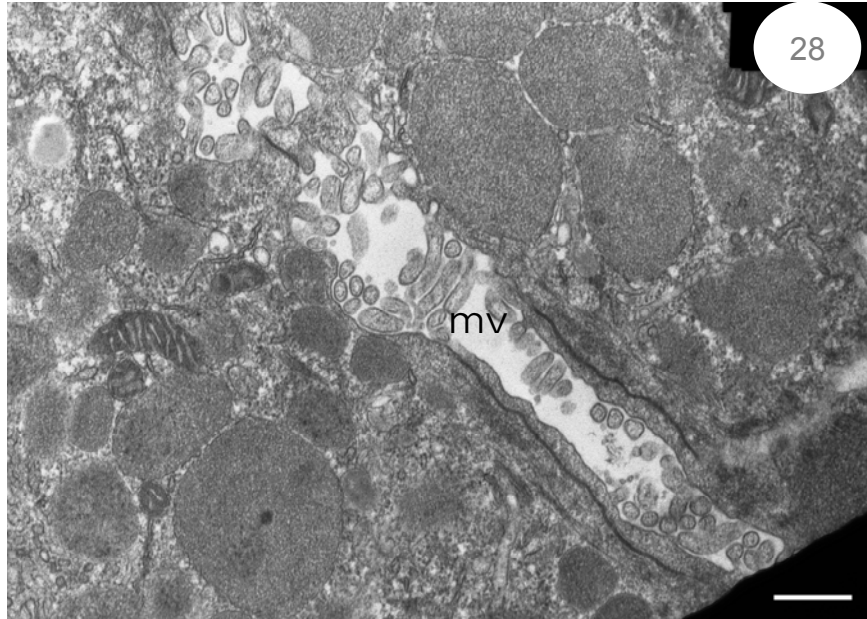


Fig. 28. MET. Ghiandola sottomandibolare dopo trattamento con A. Il canalicolo intercellulare sezionato longitudinalmente mostra numerosissimi microvilli (mv). Non si osservano profili di esocitosi. Bar 500 nm.

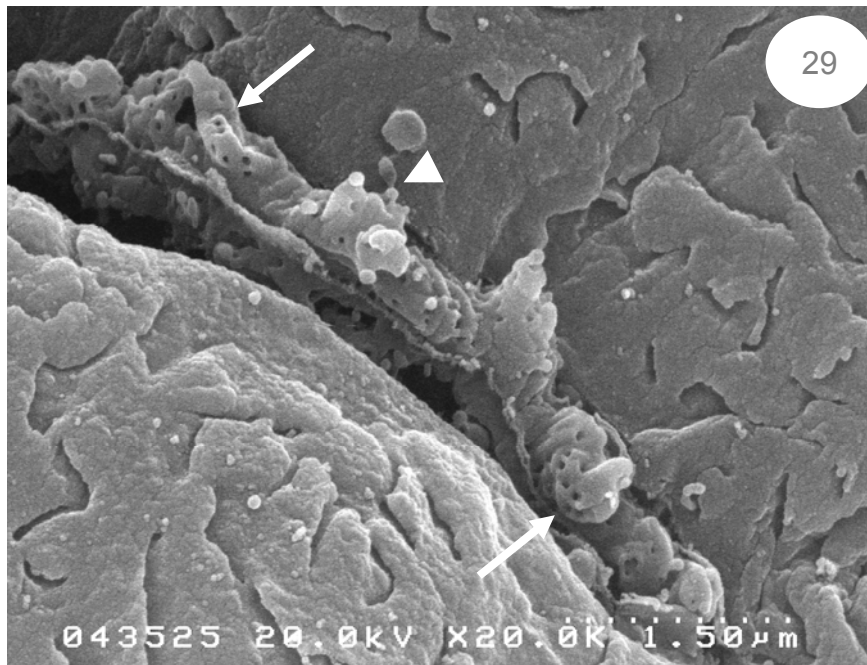


Fig. 29. MES. Ghiandola parotide trattata con atropina. Il canalicolo di secrezione mostra numerosi buchi (freccie) ed alcune microvescicole (punta di freccia). Bar 1,50 μm .

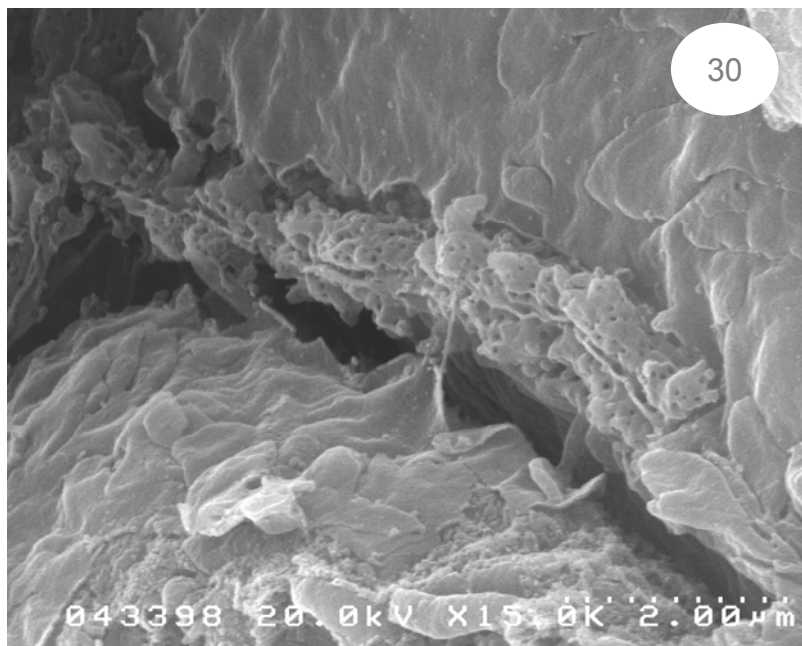
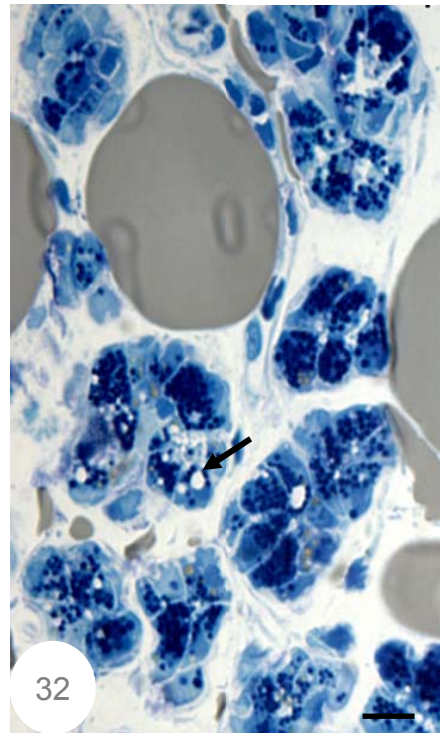
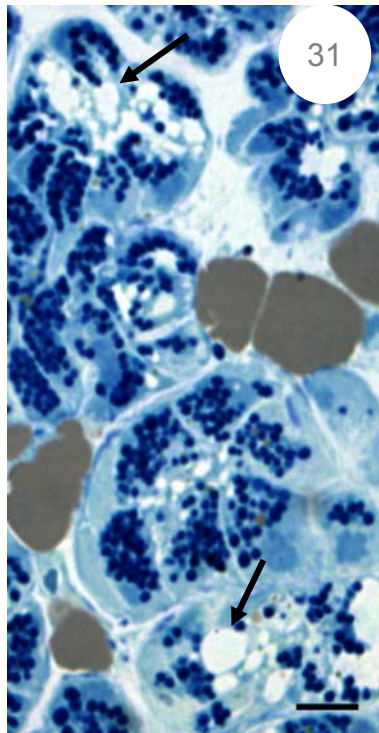


Fig. 30. MES. Ghiandola sottomandibolare trattata con A. Il canalicolo appare cosparso di buchi mentre le microvescicole sono rare. Bar 2 μm .



Figg. 31, 32. Ghiandola parotide. Al ML, dopo stimolazione con Cch, i canalicoli intercellulari sono dilatati. Grossi vacuoli sono indicati dalle frecce. Bar 10 μ m.

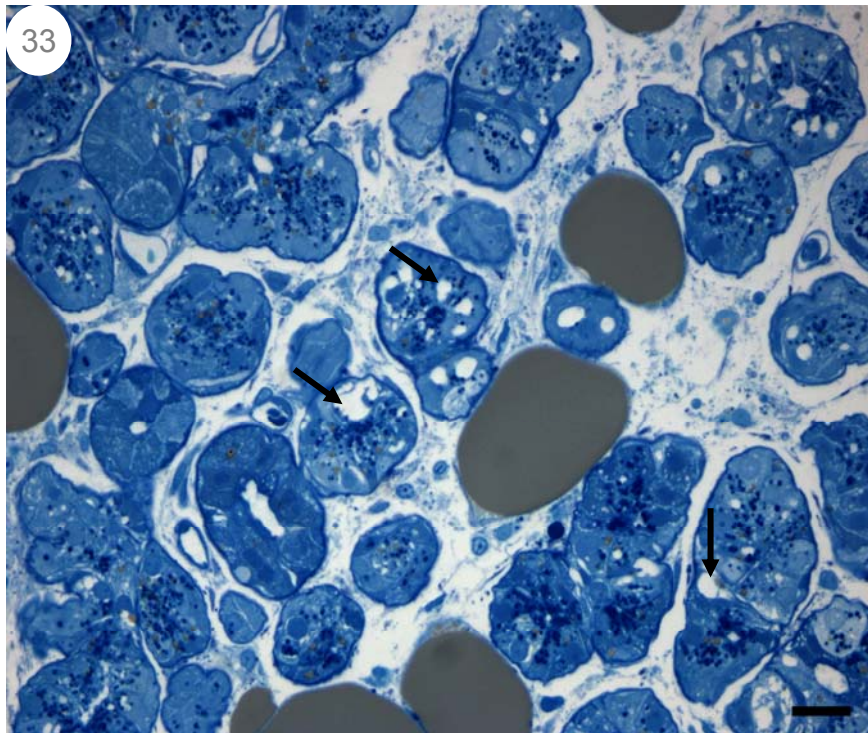


Fig. 33. Ghiandola sottomandibolare. Al ML, dopo trattamento con Cch, le cellule sierose presentano grandi vacuoli (freccia) e pochi granuli di secreto. Bar 10 μ m.

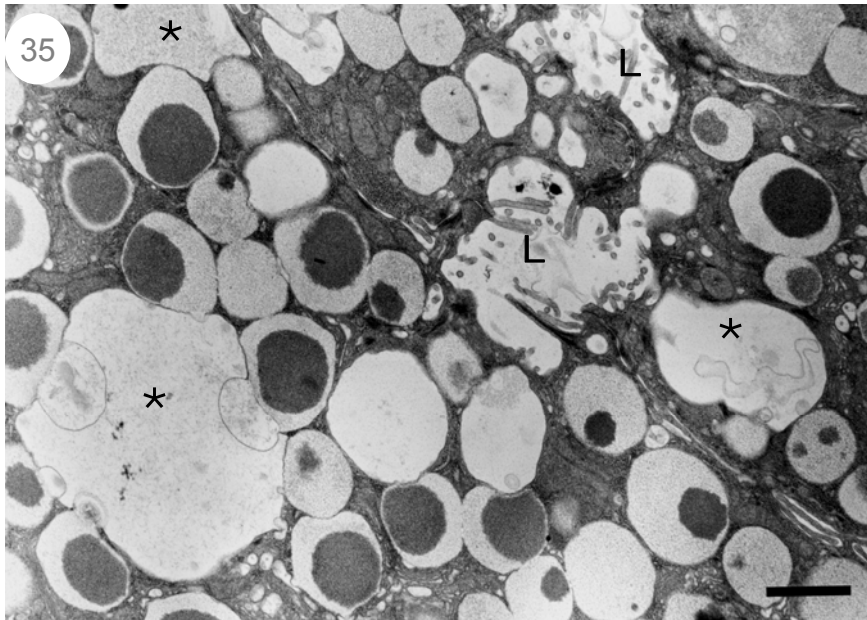
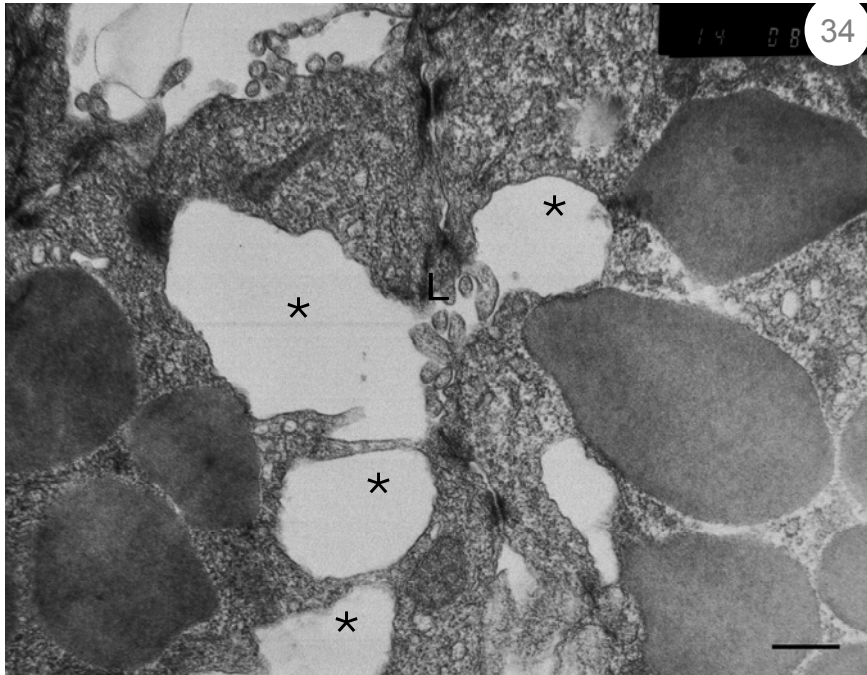
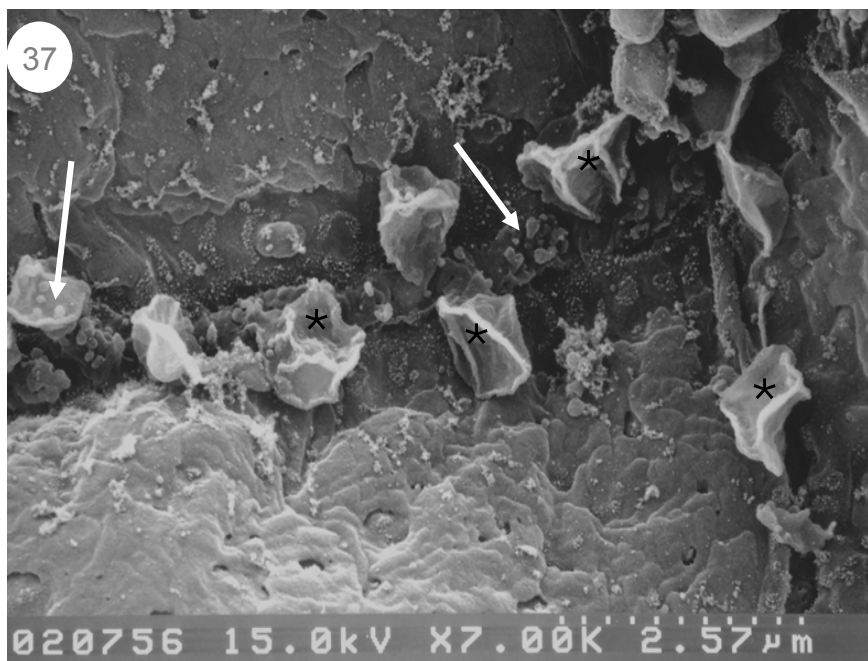
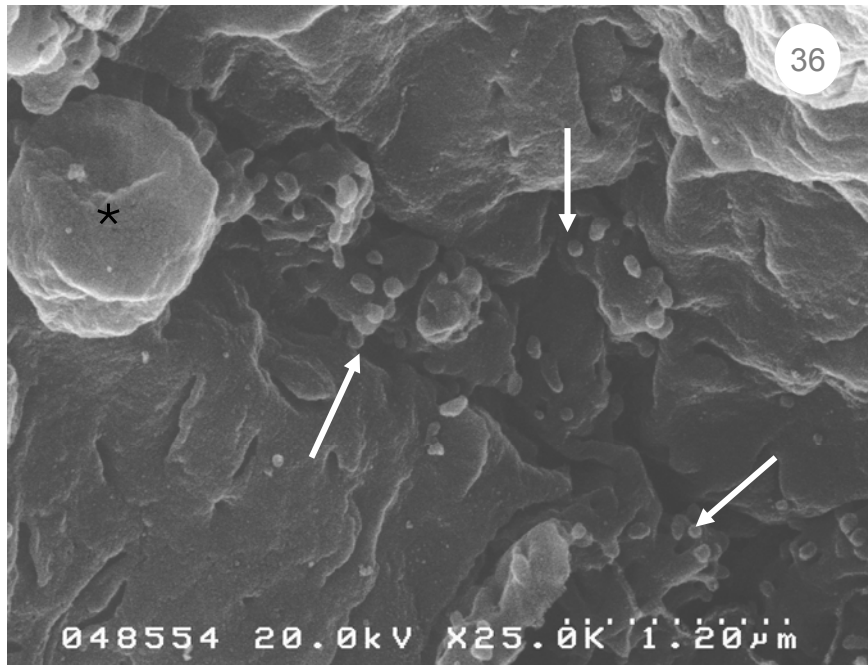


Fig. 34. Ghiandola parotide. **Fig. 35.** Ghiandola sottomandibolare. Al MET, dopo stimolazione con Cch, nelle cellule sierose si osservano grandi vacuoli (asterischi) spesso in continuità col lume dei canalicoli (L). Fig. 34: bar 300 nm. Fig. 35: Bar 500 nm.



MES. Cch. **Fig. 36.** Ghiandola parotide. **Fig. 37.** Ghiandola sottomandibolare. Sul lato citoplasmatico dei canalioli sono evidenti protrusioni di grandi dimensioni (asterischi) corrispondenti ai vacuoli osservati al MET. Le microvescicole (frecce) sono molto numerose. Fig. 36: bar 1,20 µm. Fig. 37: bar 2,57 µm.

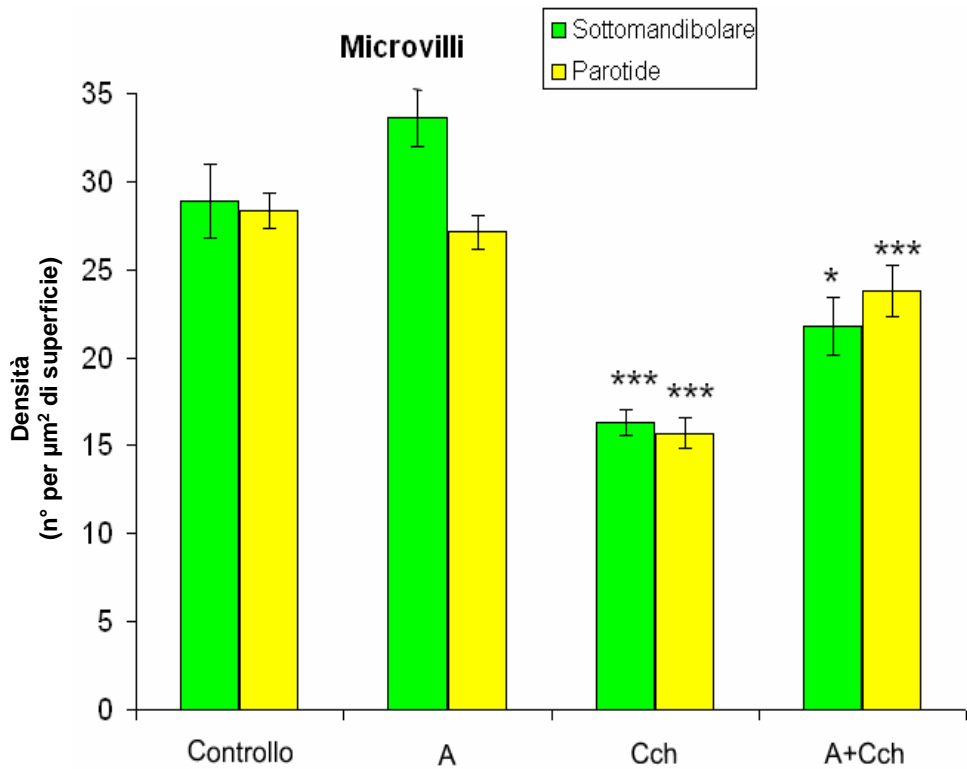


Grafico 3. Densità dei microvilli, calcolata nelle immagini al MES di parotide e sottomandibolare, nei preparati di controllo e dopo trattamento in vitro con vari farmaci. A: atropina. Cch: carbacolo. A+Cch: trattamento con atropina precedentemente alla stimolazione con carbacolo. I valori sono espressi come media \pm ESM. Il livello di significatività è stato stabilito a $P < 0,05$.

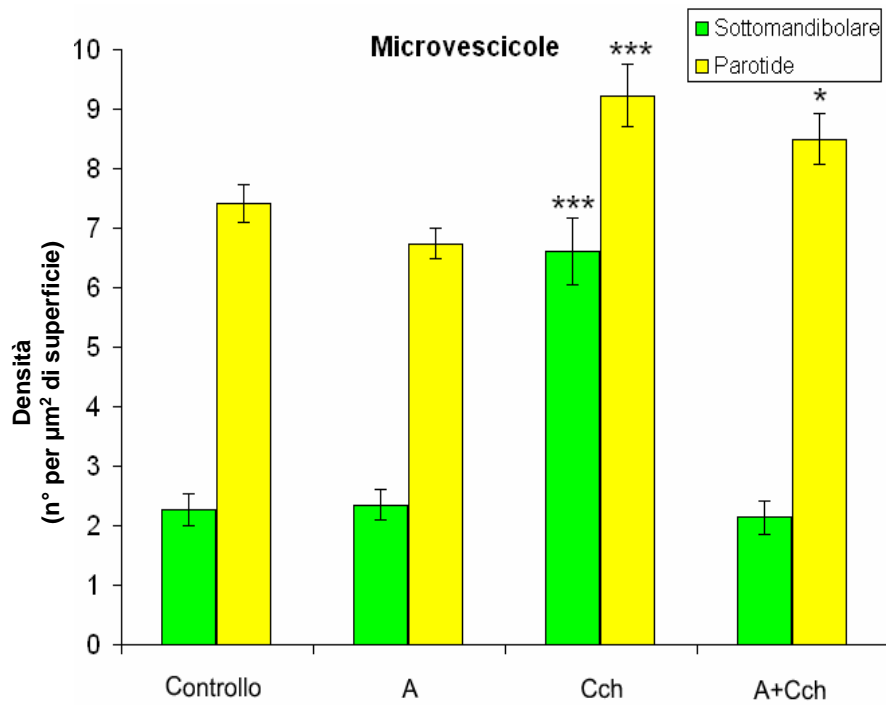


Grafico 4. Densità delle microvescicole, calcolata nelle immagini al MES di parotide e sottomandibolare, nei preparati di controllo e dopo trattamento in vitro con vari farmaci. A: atropina. Cch: carbacolo. A+Cch: trattamento con atropina precedentemente alla stimolazione con carbacolo. I valori sono espressi come media \pm ESM. Il livello di significatività è stato stabilito a $P < 0,05$.

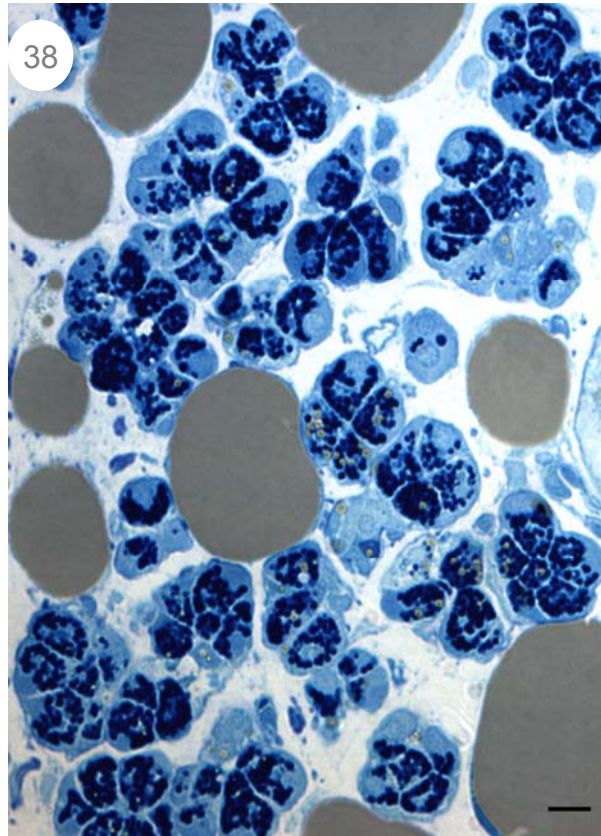


Fig. 38. ML. Ghiandola parotide. Dopo trattamento con A+Cch gli acini mostrano una morfologia simile quella dei controlli. Non si osservano vacuoli intracitoplasmatici. Bar 10 μ m.

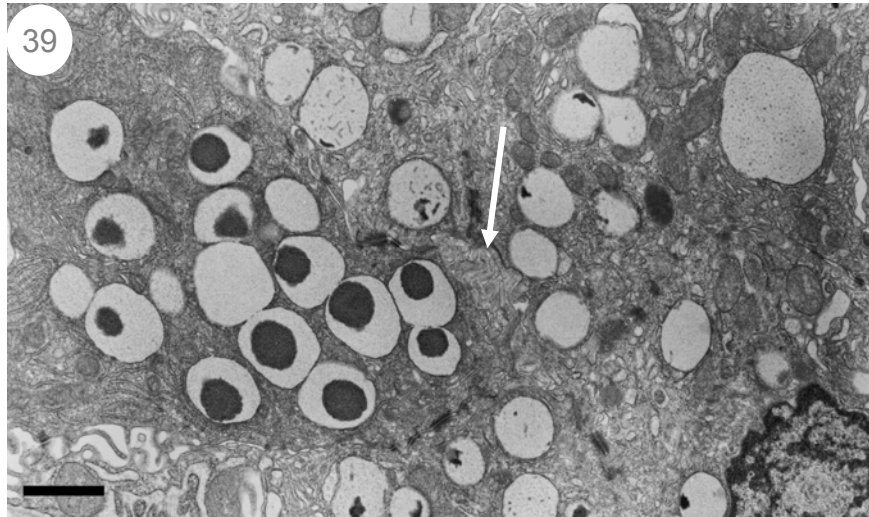
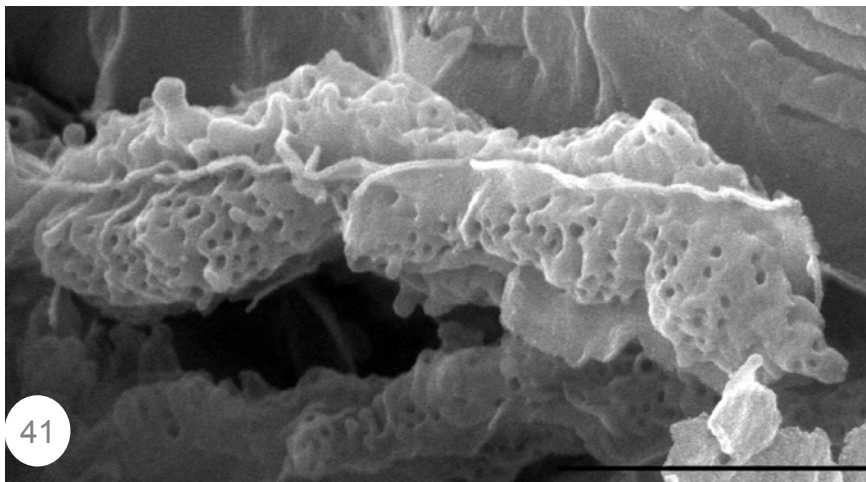
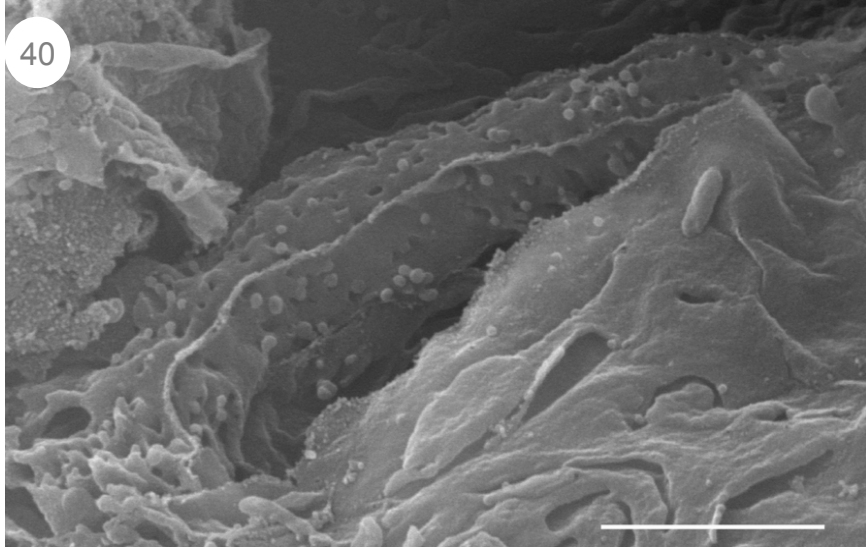
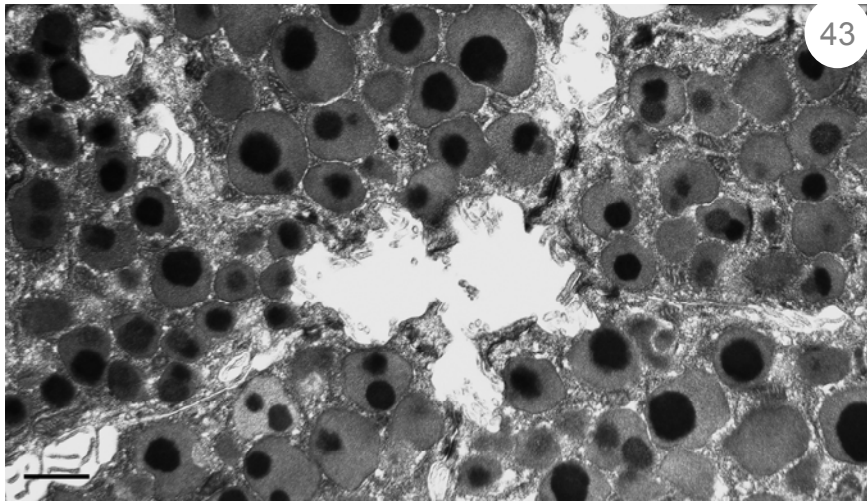
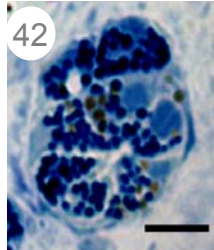


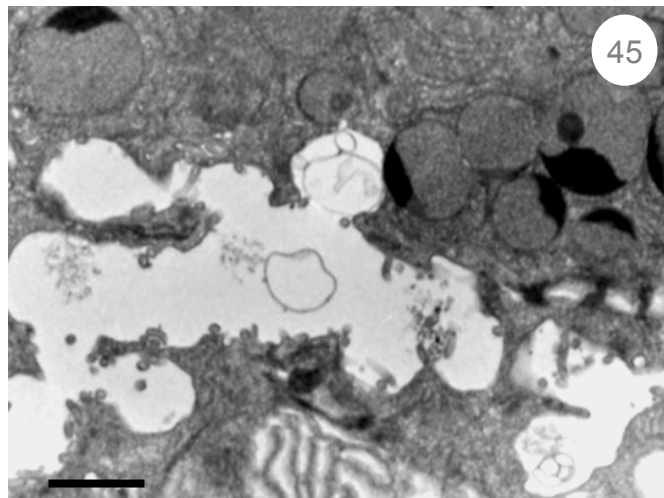
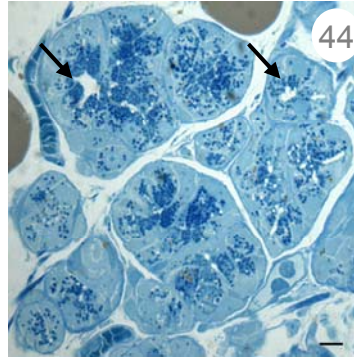
Fig. 39. MET. A+Cch. Ghiandola sottomandibolare. I lumi dei canalicoli presentano numerosi microvilli (freccia). Non si osservano profili di esocitosi. Bar 1 μ m.



MES. A+Cch. **Fig. 40.** Ghiandola parotide. **Fig. 41.** Ghiandola sottomandibolare. I canalicoli di secrezione non mostrano le protusioni osservate dopo il trattamento con Cch. Si osservi la maggiore quantità di microvescicole presenti nella parotide rispetto alla sottomandibolare. Fig. 40: bar 1,5 μm . Fig. 41: bar 1,5 μm .



SNI. Parotide. **Fig. 42.** ML. **Fig. 43.** MET. Il lume dei canalicoli appare dilatato. Non sono presenti i grandi vacuoli osservati dopo trattamento con Cch. Fig. 42: 10 μ m. Fig. 43: bar 1 μ m



SNI. Sottomandibolare. **Fig. 44.** ML. Il lume centrale (frece) e i canalicoli appaiono dilatati. **Fig. 45.** MET. Sono evidenti numerose invaginazioni a forma di Ω indicative di esocitosi di singoli granuli. Fig. 44 bar 10 μm . Fig. 45. bar 1 μm .

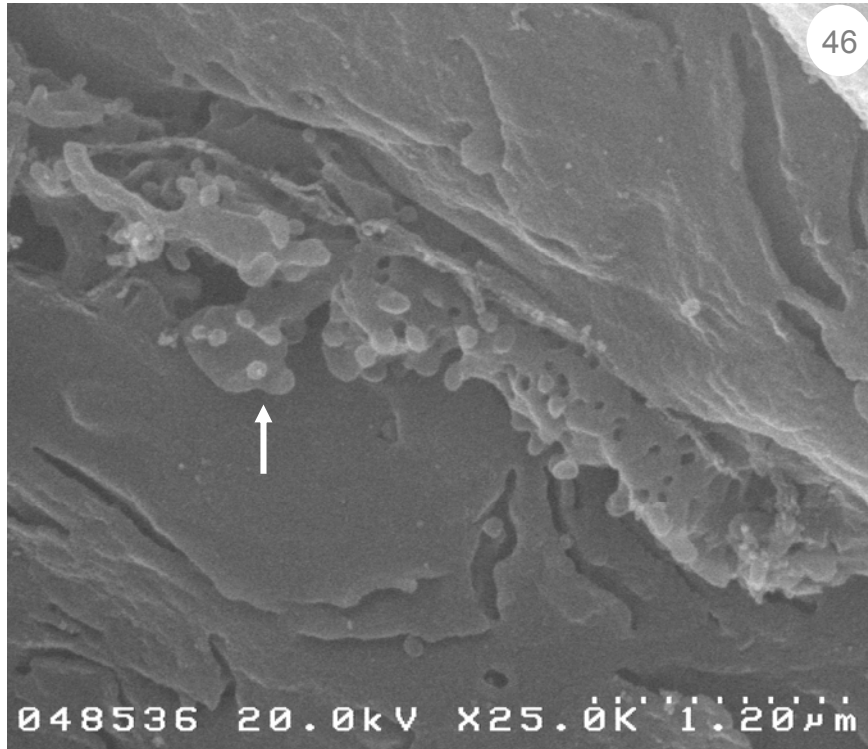


Fig. 46. MES. Parotide Trattamento con SNI. Canalicolo di secrezione con profili di esocitosi (freccia) e numerosissime microvescicole. Bar 1,20 μm .

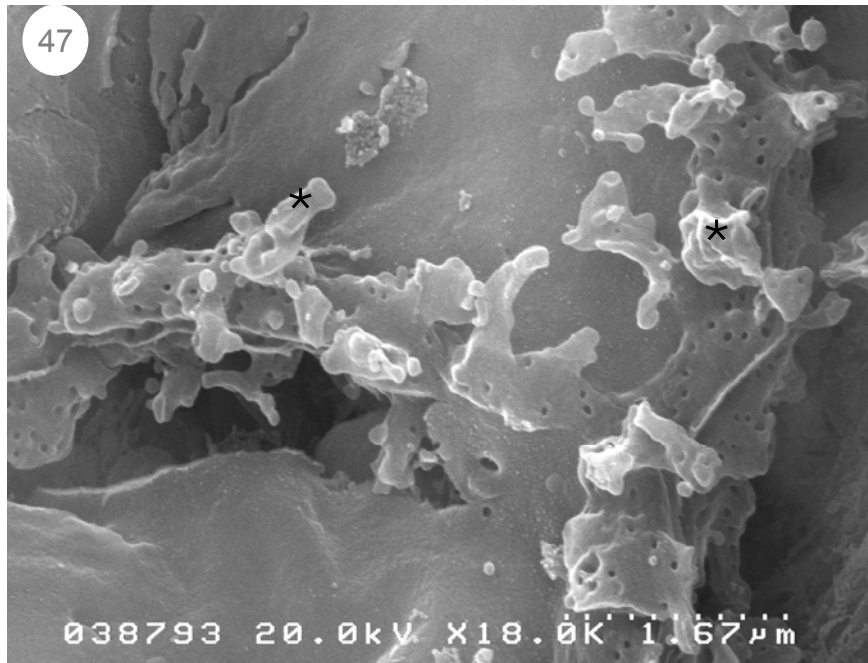


Fig. 47. MES. Sottomandibolare. Trattamento con SNI. I canalicoli secretori hanno forma irregolare con evidenti profili di esocitosi (asterischi) e numerose microvesicole sparse. Bar 1,67 μ m.

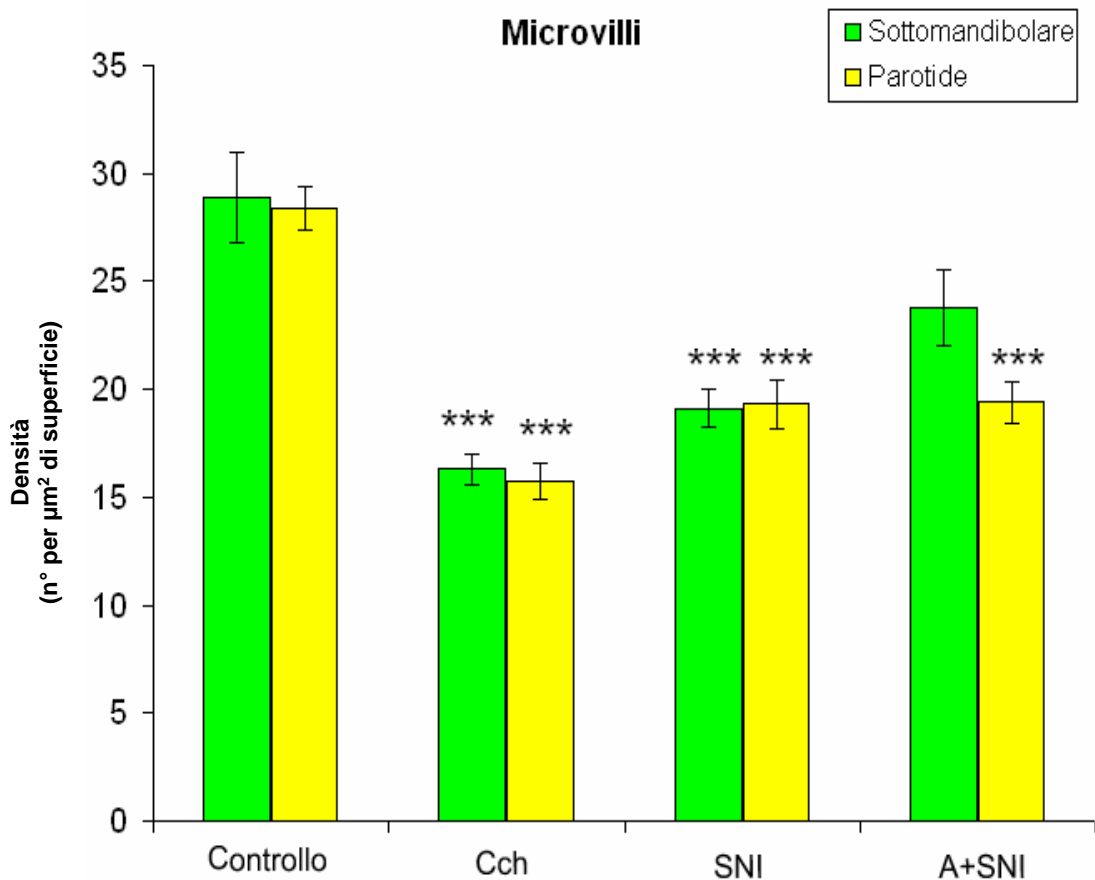


Grafico 5. Densità dei microvilli, calcolata nelle immagini al MES di parotide e sottomandibolare, nei preparati di controllo e dopo trattamento in vitro con vari farmaci. Cch: carbacolo. SNI: SNI 2011. A+SNI: trattamento con atropina precedentemente alla stimolazione con SNI 2011. I valori sono espressi come media \pm ESM. Il livello di significatività è stato stabilito a $P < 0,05$.

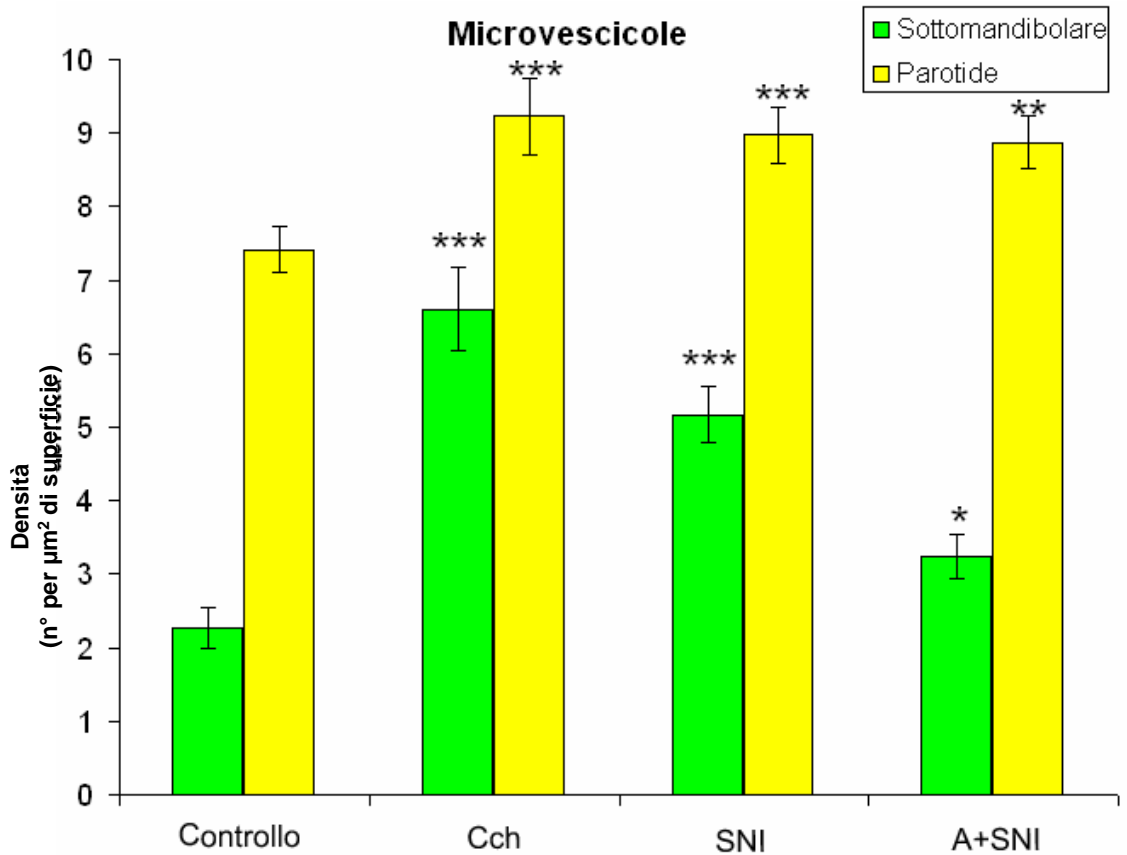


Grafico 6. Densità delle microvescicole, calcolata nelle immagini al MES di parotide e sottomandibolare, nei preparati di controllo e dopo trattamento in vitro con vari farmaci. Cch: carbacolo. SNI: SNI 2011. A+SNI: trattamento con atropina precedentemente alla stimolazione con SNI 2011. I valori sono espressi come media \pm ESM. Il livello di significatività è stato stabilito a $P < 0,05$.

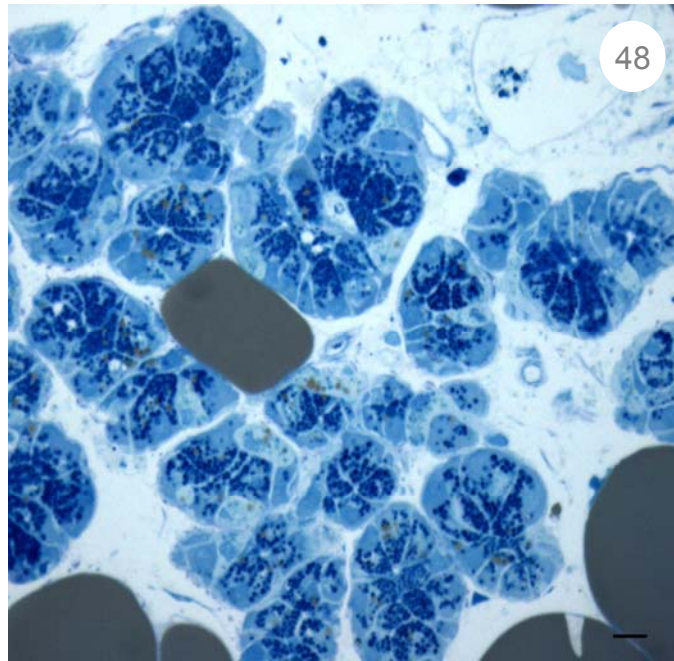


Fig. 48. ML. Ghiandola sottomandibolare. A+SNI. Gli acini sierosi non mostrano segni evidenti di secrezione. Bar 10 μ m.

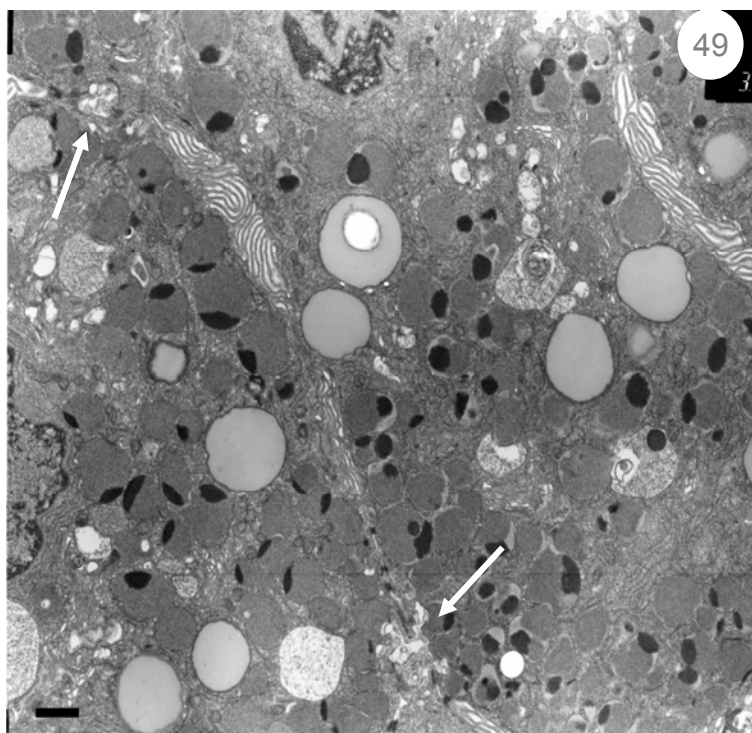
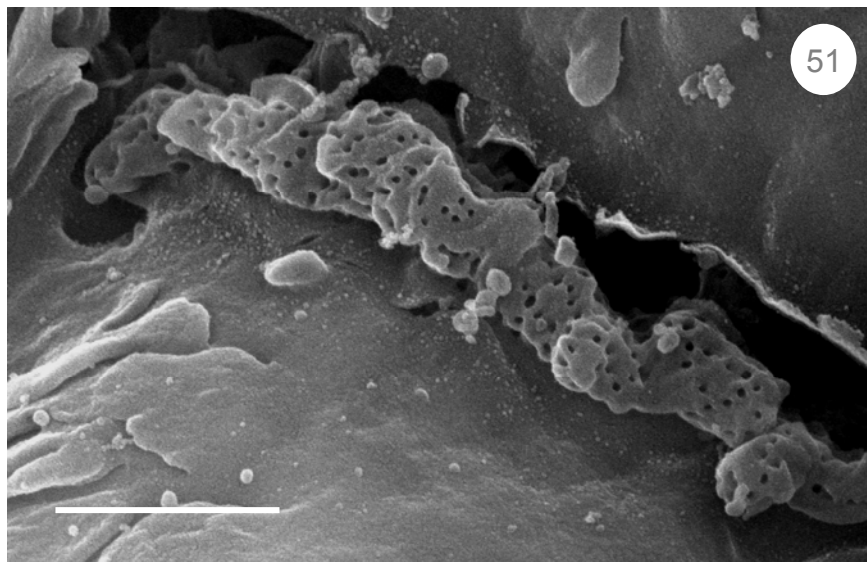
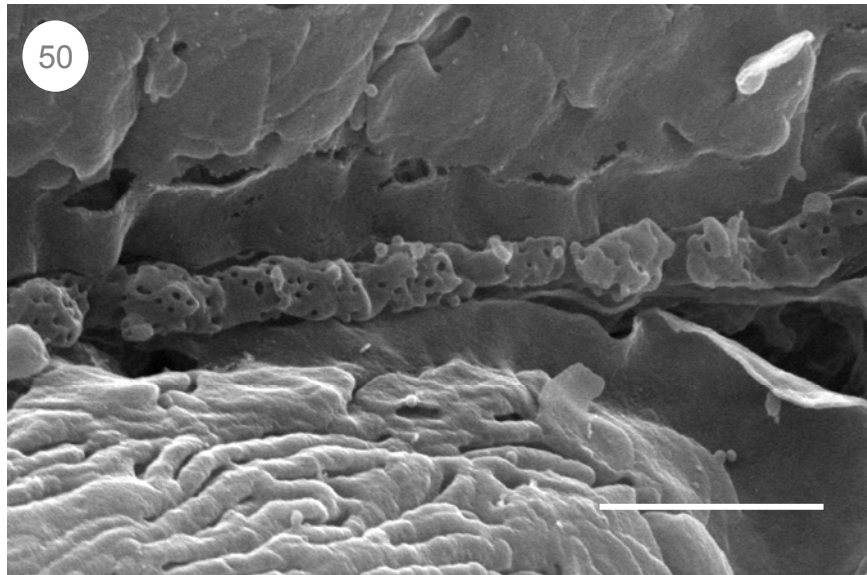


Fig. 49. MET. A+SNI. Ghiandola sottomandibolare. I canalicoli, qui sezionati trasversalmente, sono ricchi di microvilli e non presentano profili di esocitosi (freccie). Bar 1 μ m.



Figg. 50, 51: MES. Ghiandola sottomandibolare. A+SNI. La superficie citoplasmatica dei canalicoli di secrezione presenta numerosi buchi, corrispondenti alla base dei microvilli privati del citoscheletro. Non si osservano profili di esocitosi. Fig. 50: bar 1,5 μm . Fig. 51: bar 1,2 μm

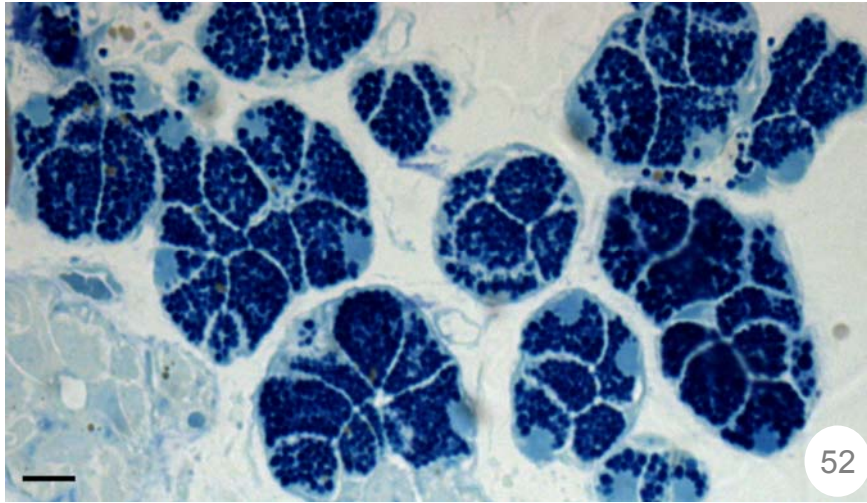


Fig. 52. ML. Ghiandola parotide. A+SNI. Le cellule appaiono stipate di granuli di secreto e i lumi appaiono ristretti. Bar 10 μ m.

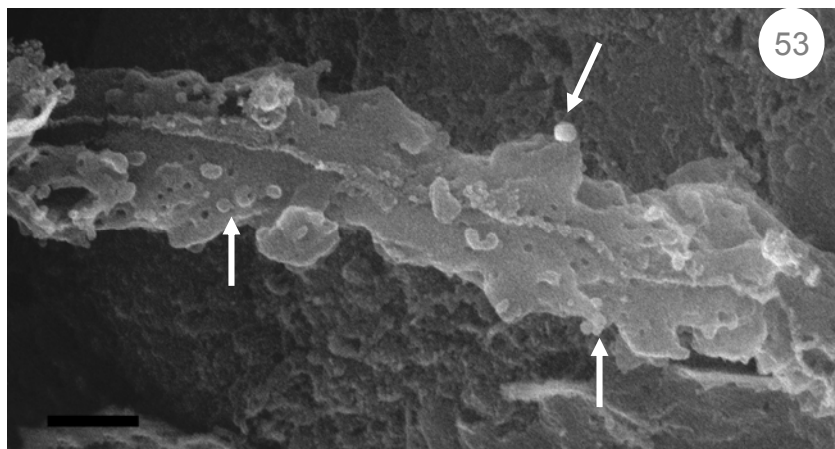
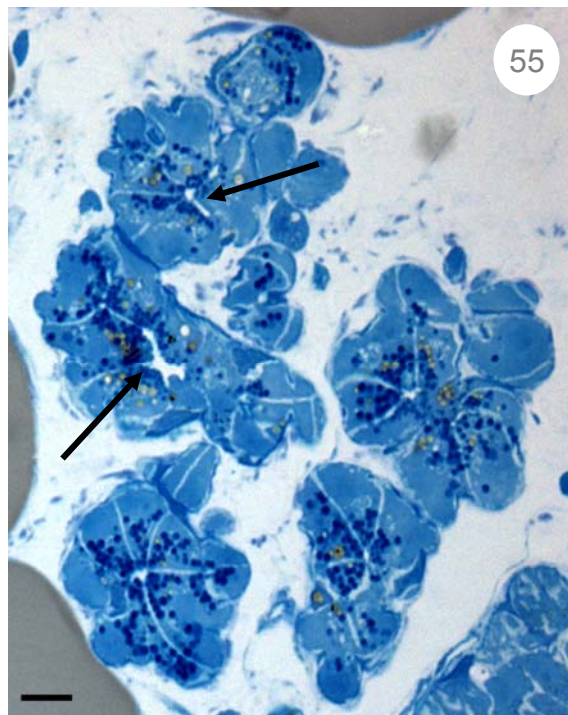
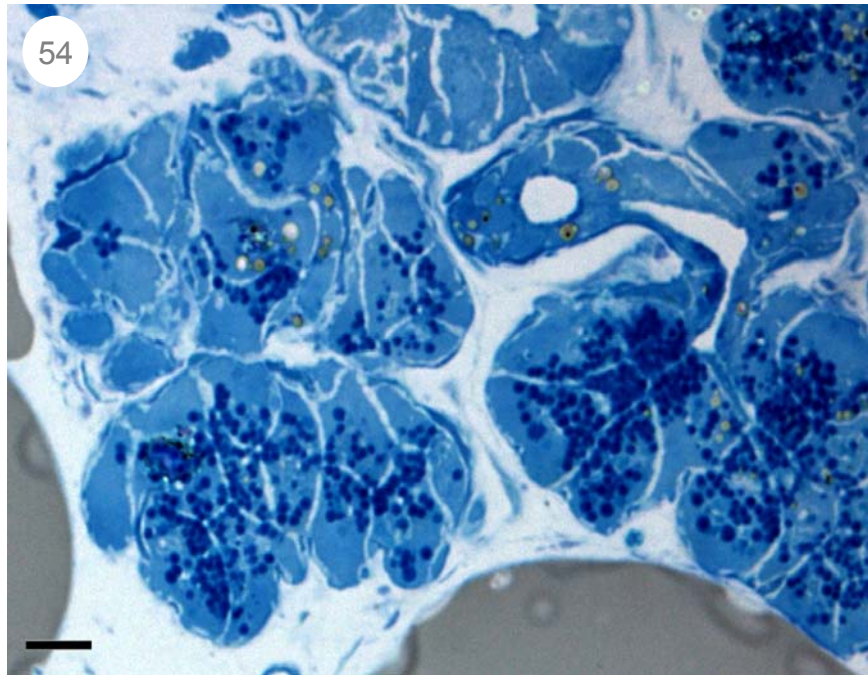
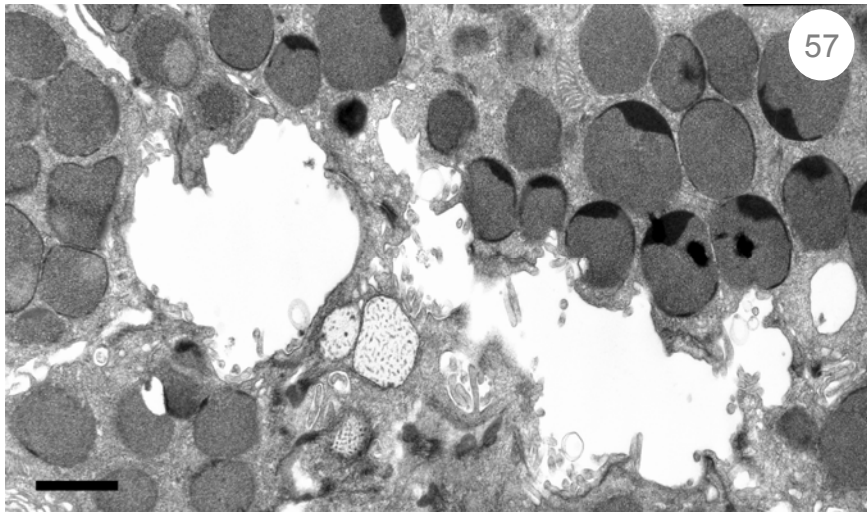
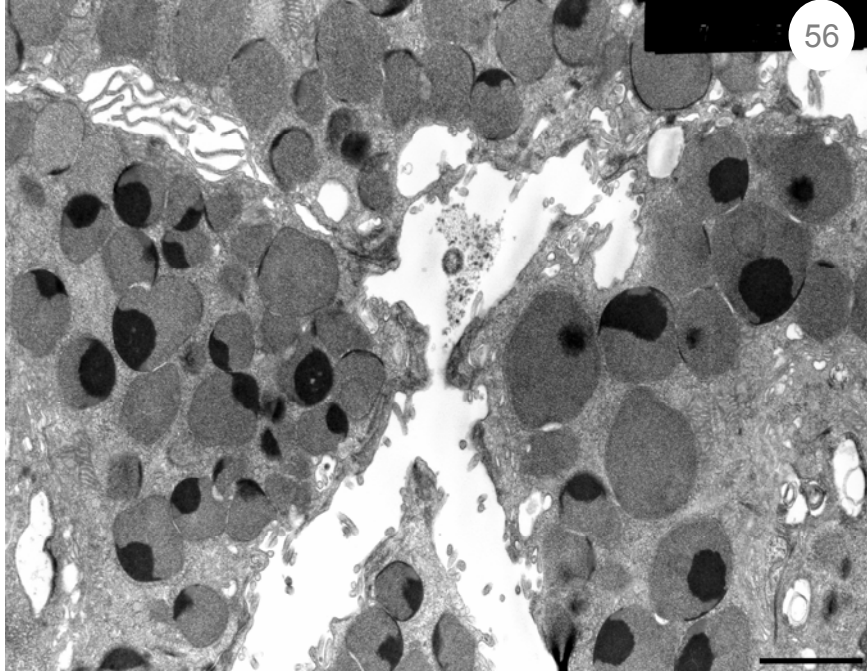


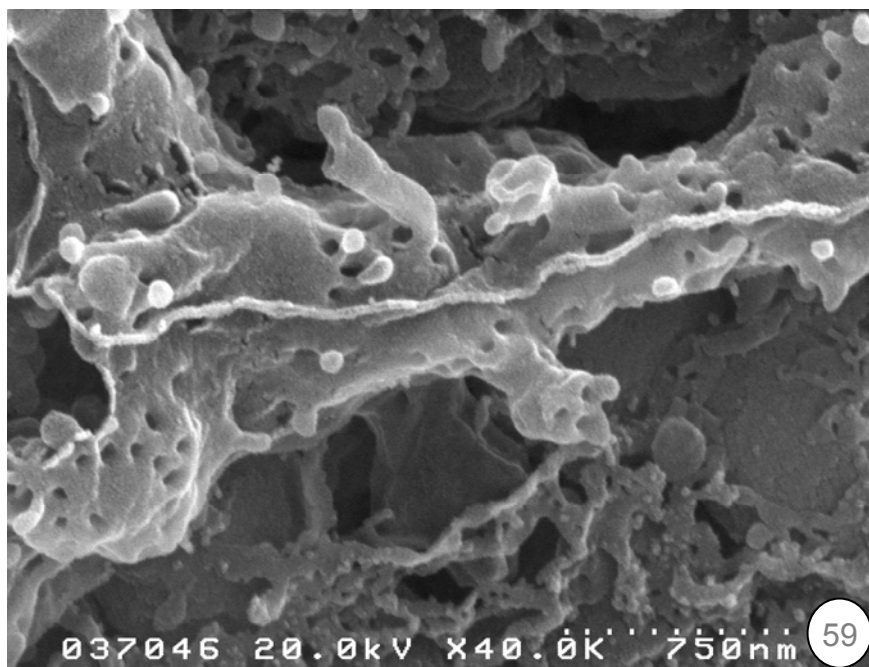
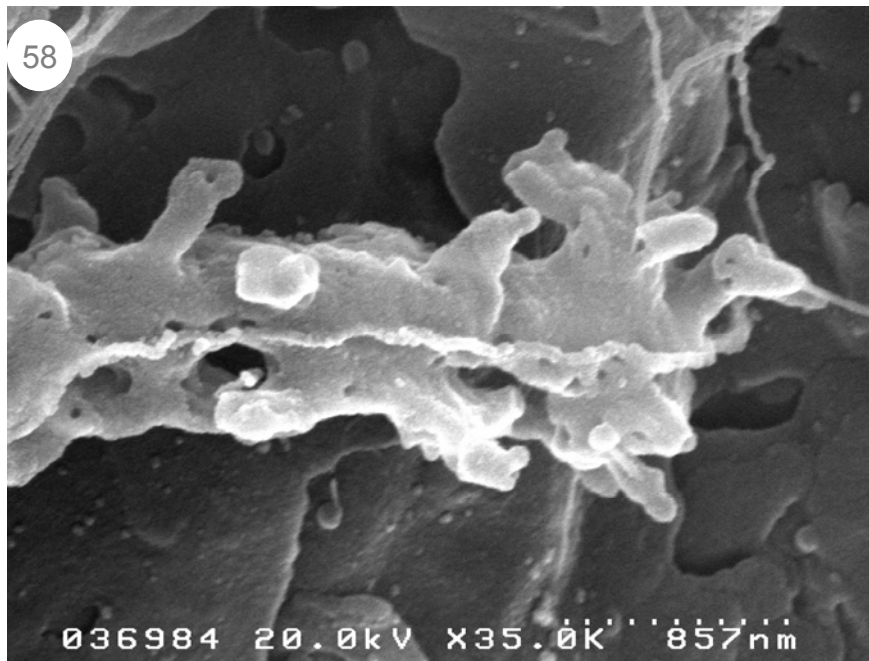
Fig. 53. MES. Ghiandola parotide. A+SNI. Nella superficie citoplasmatica dei canali i buchi corrispondenti alla base dei microvilli non sono numerosi. Tra questi sono visibili microvescicole sparse (frecce). Bar 500 nm.



Figg. 54, 55. ML. Ghiandola sottomandibolare. Clozapina. Solo pochi acini mostrano una modesta risposta al farmaco: i lumi di alcuni canalicoli sono dilatati (frecche) e il numero dei granuli di secreto appare ridotto. Non si osservano vacuoli. Bar: 10 μ m.



Figg. 56, 57. MET. Ghiandola sottomandibolare. Clozapina. In queste immagini le cellule appaiono stimulate e presentano canalicoli dilatati con pochi microvilli e alcune invaginazioni irregolari correlate al processo di secrezione. Bar: 1 μ m.



Figg. 58, 59. MES. Ghiandola sottomandibolare. Clozapina. I canali presentano espansioni irregolari diverse da quelle osservate dopo trattamento con Cch o SNI. Sono riconoscibili microvesicole sparse ed i buchi corrispondenti ai microvilli. Non sono evidenti immagini di esocitosi. Fig. 58: bar 857 nm. Fig. 59: bar 750 nm

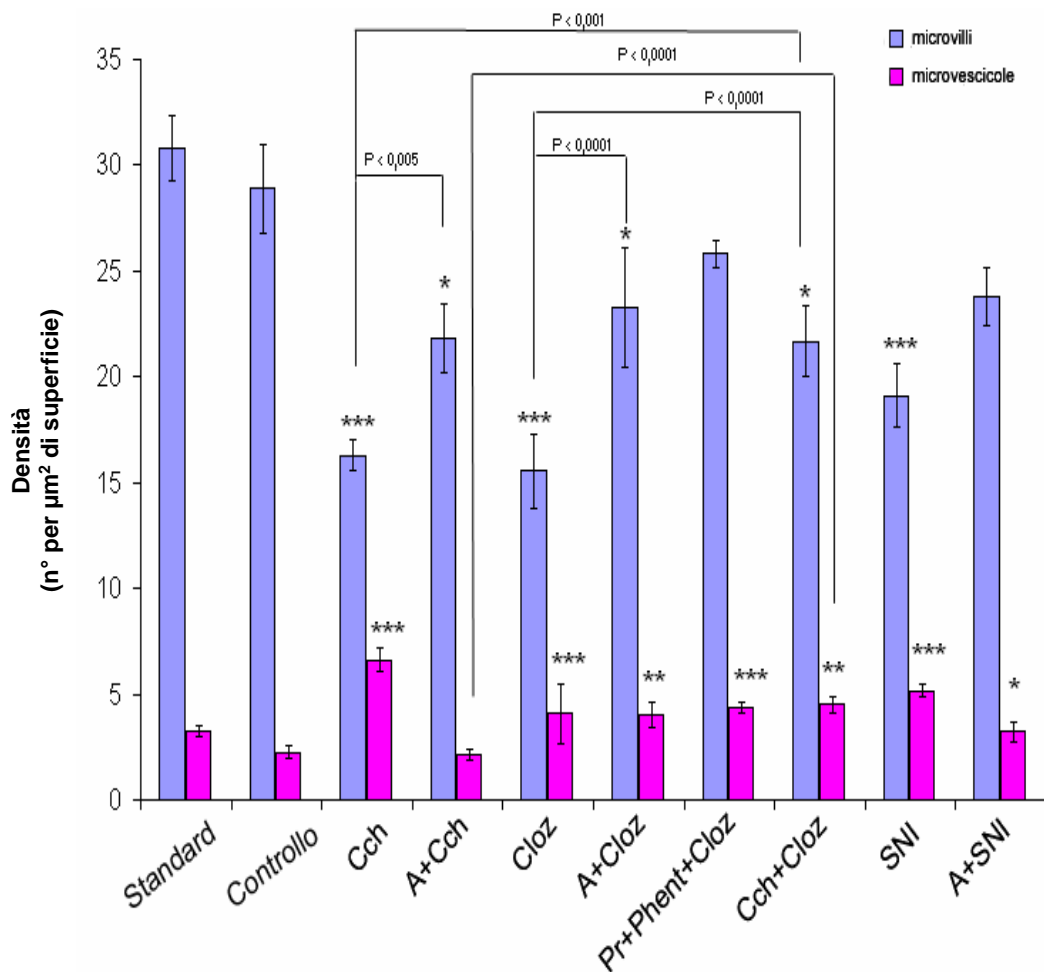


Grafico 7. Densità dei microvilli e delle microvescicole, calcolata nella sottomandibolare, dopo trattamento in vitro con vari farmaci. Cch: carbacolo. A+Cch: trattamento con atropina precedentemente alla stimolazione con carbacolo. Cloz: clozapina. A+Cloz: trattamento con atropina precedentemente alla stimolazione con clozapina. Pr+Phent+Cloz: trattamento con propranololo e fentolamina insieme, precedentemente alla stimolazione con clozapina. Cch+Cloz: stimolazione con carbacolo e clozapina insieme. SNI: SNI 2011. A+SNI: trattamento con atropina precedentemente alla stimolazione con SNI 2011.

I valori sono espressi come media \pm ESM. Il livello di significatività è stato stabilito a $P < 0,05$

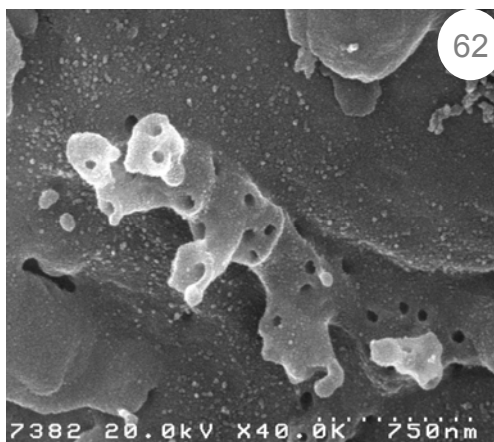
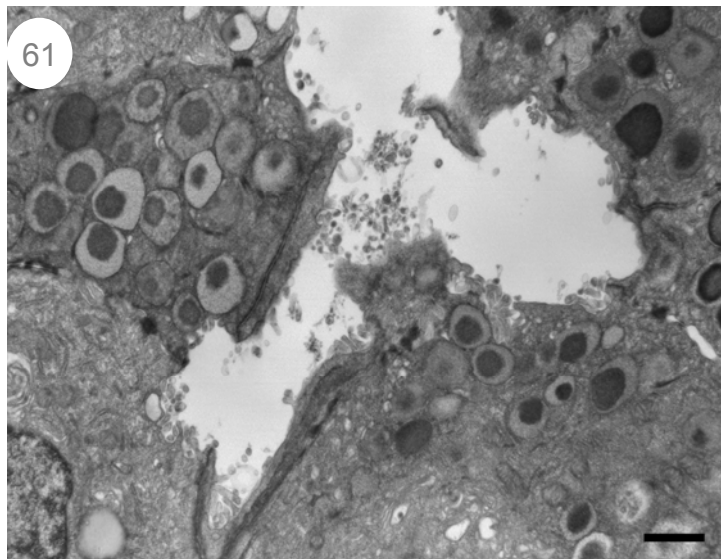
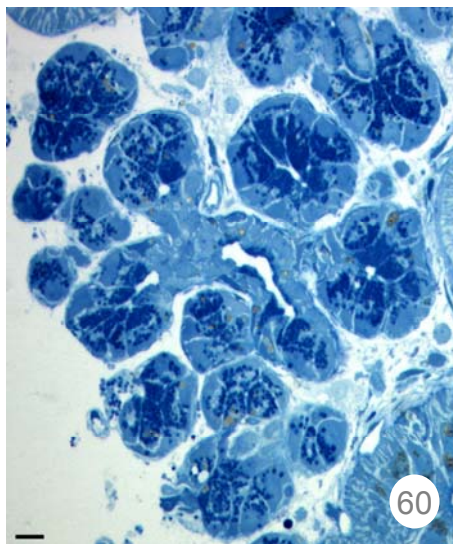


Fig. 60. ML. **Fig. 61.** MET. **Fig. 62.** MES. A+Cloz. Nonostante l'inibizione con A, le cellule sierose mostrano al MO ed al MET ancora qualche lume dilatato. Al MES la superficie citoplasmatica del canalicolo appare alquanto irregolare. Fig. 60: bar 10 μm . Fig. 61: bar 1 μm . Fig 62: 750 nm.

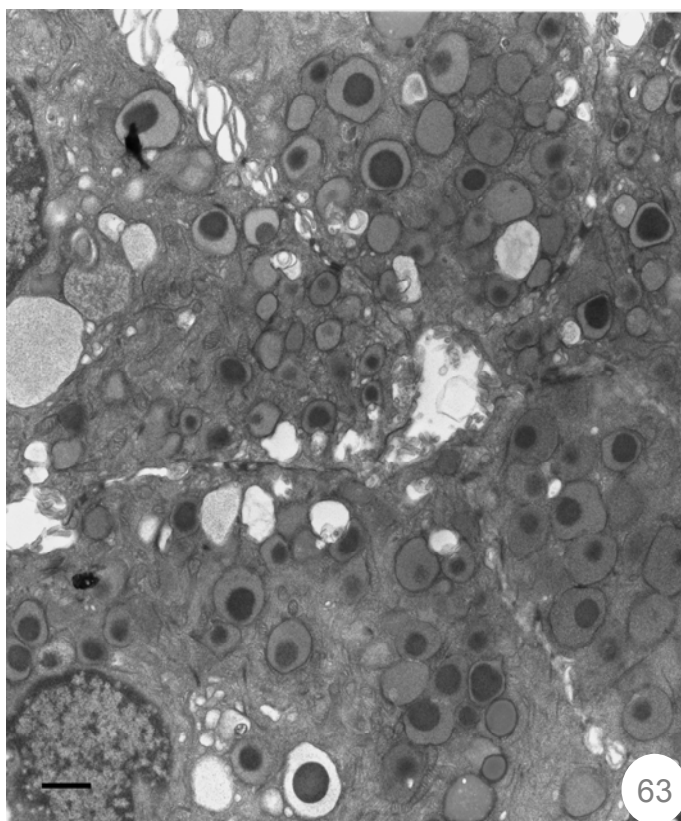


Fig. 63. MET. Cch+Cloz. Sottomandibolare. Le sezioni trasversali dei canalicoli qui presenti mostrano solo alcuni profili correlabili ai processi di esocitosi. Bar 1 μ m.

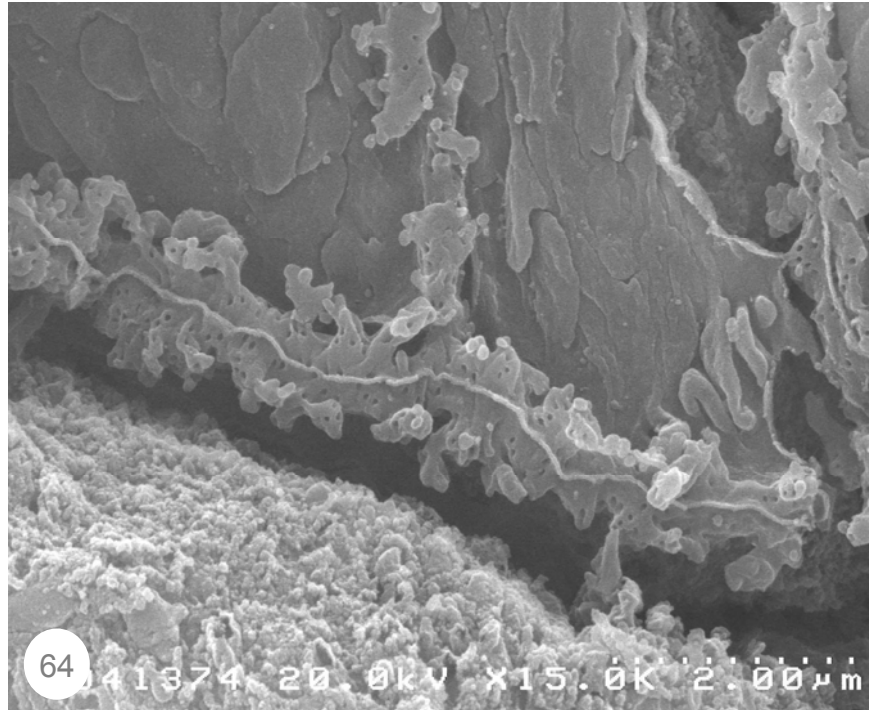


Fig. 64. MES. Cch+Cloz. Sottomandibolare. I canalicoli presentano irregolari espansioni simili a quelle osservate dopo Cloz, mentre le grosse protrusioni tipiche dei campioni stimolati con Cch sono qui assenti. Bar 2 µm.

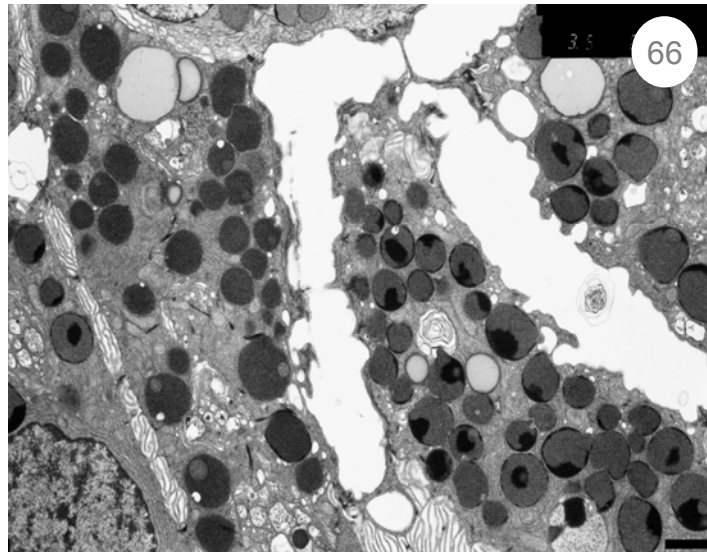
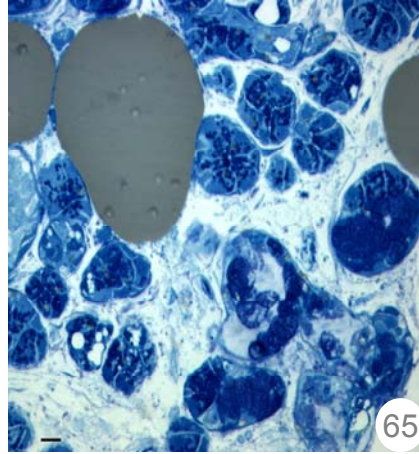


Fig. 65: ML. **Fig. 66:** MET. Ghiandola sottomandibolare. Pr+Phent+Cloz. Al ML solo alcuni acini appaiono stimolati. Al MET sono qui visibili alcuni canali dilatati con immagini di secrezione sul loro contorno. Fig. 65: bar 10 μ m. Fig. 66: 1 μ m

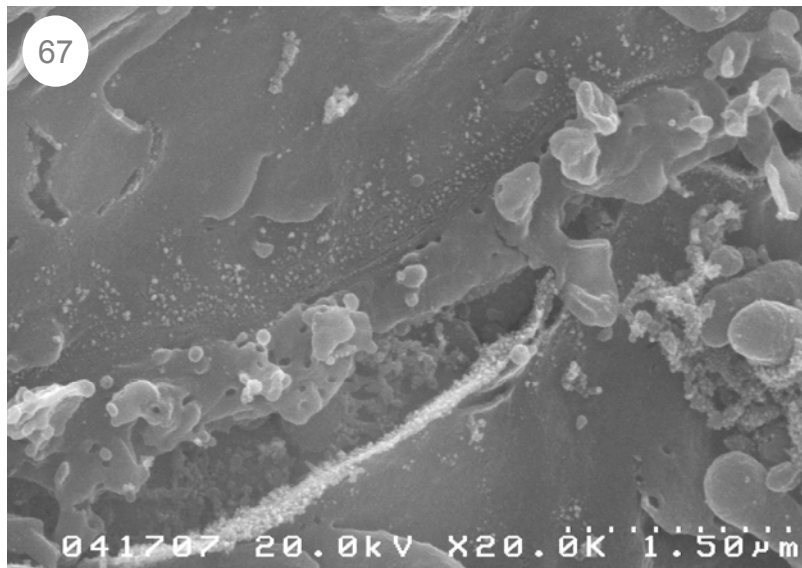


Fig. 67: MES. Ghiandola sottomandibolare. Pr+Phent+Cloz. I canalicoli dilatati mostrano, come al MET, evidenti immagini di secrezione sul loro contorno. Bar 1,5 µm