



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI PEDIATRIA

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA

IN MEDICINA DELLO SVILUPPO E SCIENZE DELLA PROGRAMMAZIONE

INDIRIZZO GENETICA E BIOCHIMICA MOLECOLARE

XX CICLO

POSSIBILE IMPIEGO DELLE CELLULE STAMINALI DEL FLUIDO AMNIOTICO PER LA RIPARAZIONE DEL DANNO POLMONARE IN UN MODELLO ANIMALE PER BRONCODISPLASIA: VALUTAZIONE *IN VITRO* E *IN VIVO*

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Giuseppe Basso

Coordinatore: Dr. Maurizio Scarpa

Supervisori: Dr.ssa Rosella Tomanin

Dr.ssa Patrizia Zaramella

Dottorando: Davide Grisafi

Indice	Pag. 2
Riassunto	Pag. 4
Abstract	Pag. 6
1 INTRODUZIONE	Pag. 8
1.1 Respirare e' vita.	Pag. 8
1.2 La Broncodisplasia Polmonare (BPD)	Pag. 10
1.3 Terapie Disponibili per il trattamento della BPD	Pag. 11
1.4 I modelli animali di studio della BPD	Pag. 12
1.5 Le cellule staminali	Pag. 14
1.6 Le cellule staminali del Fluido Amniotico (hAFS)	Pag. 15
1.7 Il trasferimento genico e i vettori Adenovirali	Pag. 17
1.7.1.Gli Adenovirus	Pag. 18
2 SCOPO DELLA RICERCA	Pag. 20
3 MATERIALI E METODI	Pag. 21
3.1 Infezione delle cellule staminali del fluido amniotico (hAFS) con vettori adenovirali	Pag. 21
3.1.1.Espansione <i>in vitro</i> delle cellule hAFS	Pag. 21
3.1.2.Espansione e purificazione degli stock di Adenovirus AdHCMVLacZ e AdHCMV.EGFP	Pag. 21
3.1.3 Infezione dose-effetto delle cellule hAFS	Pag. 22
3.1.4.Valutazione qualitativa dell'attivita' Beta galattosidasi e dell'espressione della EGFP	Pag. 22
3.1.5.Valutazione quantitativa dell'attivita' Beta galattosidasi	Pag. 22
3.1.6.Sorting cellulare	Pag. 23
3.1.7 Differenziazioni delle cellule hAFS dopo infezione con AdHCMV.EGFP	Pag. 23
3.2 Messa a punto del modello animale di BPD mediante iperossia al 60% di O₂	Pag. 24
3.2.1 Esposizione dei ratti neonati all'ossigeno	Pag. 24
3.2.2 Valutazione dell'effetto dell'esposizione all'iperossia nei polmoni e negli altri organi	Pag. 25
3.3 Trapianto di cellule hAFS negli animali esposti al 60% di O₂	Pag. 26
3.3.1 Disegno sperimentale	Pag. 26
3.3.2 Infezione delle cellule hAFS con il vettore adenovirale AdHCMVsp1LacZ	Pag. 27
3.3.3 Procedura chirurgica	Pag. 27
3.3.4 Allestimento dei preparati istologici	Pag. 28
3.3.5 Valutazione molecolare dell'homing delle hAFS su preparati polmonari	Pag. 28
4 Risultati	Pag. 29
4.1 Infezione delle cellule hAFS per valutazione dose-effetto	Pag. 29
4.2 Valutazione quantitativa dell'espressione della Beta-galattosidasi trasdotta	Pag. 30

4.3 Effetto dell'infezione sulle cellule hAFS	Pag. 30
4.4 Trapianto di hAFS e valutazione dell' "Homing"	Pag. 31
4.5 Valutazione di un possibile effetto terapeutico	Pag. 33
5 Discussione	Pag. 44
6 Bibliografia	Pag. 50
7 Ringraziamenti	Pag. 55

Riassunto

Introduzione.

La conoscenza delle capacità di replicazione e differenziamento nell'albero respiratorio è ancora limitata, così risulta in gran parte inesplorato il potenziale terapeutico in questo apparato. La malattia respiratoria in età pediatrica riguarda attualmente diverse patologie di varia complessità fra le quali, le più studiate a causa della prognosi spesso infausta e della diffusione fra la popolazione pediatrica, sono la Broncodisplasia Polmonare nel neonato e nel prematuro, l'Asma e la Fibrosi Cistica. In questi ultimi anni sono stati pubblicati diversi studi riguardanti l'impiego di cellule staminali per la rigenerazione tissutale che hanno messo in evidenza, seppure mediante impiego di staminali embrionali, la validità di questo tipo di approccio nell'ambito del differenziamento verso linee cellulari polmonari. La recente caratterizzazione delle cellule staminali del fluido amniotico e il consolidamento delle tecniche di trapianto cellulare intratracheale hanno aperto nuove prospettive di terapia cellulare e genica. Il fluido amniotico rappresenta, infatti, una fonte di cellule pluripotenti meno controverse dal punto di vista etico e che potrebbero essere utilizzate in fase pre-clinica in animali modello delle più gravi e diffuse patologie respiratorie.

Scopo

Il presente progetto di dottorato muove dalla necessità di valutare in vivo l'efficacia terapeutica delle cellule staminali, e possibili ulteriori innovazioni terapeutiche per il danno polmonare come quello presente nella patologia respiratoria cronica ovvero in condizioni di broncodisplasia polmonare, fibrosi polmonare o fibrosi cistica.

Materiali e Metodi

La **fase *in vitro*** ha valutato l'infettabilità delle cellule umane derivate dal fluido amniotico (hAFS) con vettori adenovirali, la possibilità che esse mantengano staminalità e capacità differenziativa anche dopo essere state trasdotte con sequenze geniche estranee.

La **fase *in vivo*** del progetto consisteva in uno studio volto a verificare l'*homing* polmonare, e l'eventuale attecchimento di queste cellule staminali una volta somministrate per via intratracheale in un modello animale. Modello costituito da ratti presentanti un quadro di patologia respiratoria simile a quella osservata in pazienti con polmoni displasici o da fibrosi cistica. I sintomi sono stati riprodotti con l'impiego di un *OXYCYCLER*, strumento costituito da due camere pressurizzate nelle quali viene introdotto l'animale in presenza di percentuali

controllate di ossigeno, ossido di azoto o anidride carbonica. In questa fase le cellule staminali sono state trasdotte con un particolare gene marcatore mediante l'impiego di vettori adenovirali.

Risultati

Le cellule hAFS sono state infettate con vettori adenovirali di prima generazione, esprimenti due geni marcatori LacZ ed EGFP, a varie molteplicità di infezione (MOI), da 1 a 200 pfu/cell. Le valutazioni qualitative si sono protratte fino a 17 giorni post-infezione. Le cellule sono state saggiate da un lato per la loro vitalità post-infezione con analisi degli antigeni di adesività, dall'altro per la capacità di mantenere la capacità differenziativa. Dal punto di vista qualitativo, abbiamo potuto constatare un'elevata efficienza di infezione delle cellule, anche a MOI piuttosto basse, la conservazione della vitalità e dell'impalcatura cellulare anche a MOI discretamente elevate. Per quanto riguarda l'adesività cellulare abbiamo osservato il mantenimento degli antigeni specifici. Il fatto che, contrariamente a quanto osservato nelle cellule staminali embrionali, le cellule staminali del fluido amniotico si infettino con efficienza elevata potrebbe rappresentare un'ottima base di partenza per eventuali studi di terapia genica nei quali un'espressione transiente sia una condizione necessaria o comunque sufficiente per l'approccio terapeutico.

La fase preclinica *in vivo* è stata messa a punto con una procedura di trapianto di cellule hAFS per via intratracheale utilizzando un animale modello generato mediante esposizione per due settimane di ratti neonati al 60% di O₂, riproducendo in questo modo il danno cronico riscontrabile nei pazienti affetti da broncodisplasia. I risultati ottenuti mostrano che è stato implementato il modello di danno cronico; dopo valutazione immunoistochimica è stato possibile trovare le cellule hAFS a livello alveolare, interstiziale e bronchiolare. Quattro settimane post-trapianto sono state evidenziate cellule hAFS in sede alveolare e importanti fenomeni di riparazione e di ripresa della componente tissutale se paragonati ai controlli.

Abstract

Introduction.

Since our knowledge on the replication and differentiating capability of the respiratory tract is still limited, the therapeutic potential of this system is quite unexplored. The respiratory disease in pediatric age concerns several pathologies among which broncopulmonary dysplasia (BPD) in neonate and premature newborns, asthma and cystic fibrosis are the most studied because of their diffusion among children and their infaust prognosis.. In the last few years some studies have shown the possibility of deriving progenitors with various potential from the amniotic fluid. Amniocentesis is a widely accepted method for prenatal diagnosis; it is associated with low risk both for the mother and the fetus and overcomes the ethical problems commonly associated to other sources. Recently, it has been described that amniotic fluid stem (hAFS) cells, for their ability to differentiate to various lineages, could represent a good candidate for therapeutic applications. The recent characterization of hAFS and the consolidation of the techniques for intratracheal transplantation have shown new perspectives for gene and cell therapy applications. In particular, for these purposes hAFS cells should be genetically modified with a therapeutic gene and delivered systematically or injected directly into the tissue of interest.

Materials and methods

The *in vitro* phase has evaluated for the first time the possibility to infect hAFS with first generation E1-deleted adenoviral vectors, and the maintenance of the stemness and differentiating capability even after transduction with foreign gene sequences.

In the *in vivo* phase of the project we verified the pulmonary homing and the eventual engraftment of hAFS cells, after intratracheal administration, in a 60% O₂ rat model presenting a respiratory disease similar to the one observed in human patients affected by broncopulmonary dysplasia (BPD) and cystic fibrosis. The symptoms were reproduced by using OXYCYCLER, with two pressurized rooms in which animals are exposed at controlled percentages of O₂ and CO₂. In this trial, hAFS cells have been infected AdHCMVsp1LacZ, a first generation E1 deleted viral vector transducing LacZ, the β -gal specific gene used as marker.

Results

At first, we investigated the feasibility of transducing hAFS cells with adenoviral vectors and to determine whether transduced stem cells retain the ability to differentiate into different

lineages. Herein, we showed that hAFS cells could be efficiently infected by first generation adenovirus vectors. In addition, we demonstrated that infection and expression of two different marker genes, LacZ and EGFP, have no effect on cells phenotype and differentiation potential. In particular, on undifferentiated status, hAFS cells continued to express both the transgenes and stemness cell markers OCT4 and SSEA4 (stage-specific embryonic antigen 4). When cultured under mesenchymal conditions, infected cells could still differentiate into osteocytes and adipocytes expressing lineage specific genes.

Differently to what observed in embryonic stem cells, the amniotic fluid stem cells easily infect very efficiently. This could represent an excellent starting point for gene therapy studies in which a transient expression would be a necessary condition to the therapeutic approach.

In the *in vivo* phase we transplanted hAFS cells with an intratracheal administration in a rat model generated exposing newborns at 60% O₂ for two weeks, reproducing in this way the chronic damage that can be seen in human patients affected by BPD. The results show that the model for chronic lung damage has been properly implemented; specific staining for lacZ performed three weeks post-transplant confirmed for hAFS cells a bronchiolar homing. After four weeks transplantation LacZ positive cells have been detected inside alveolis. Finally, an important phenomenon of damage repair was observed in the treated animals as compared to untreated controls.

1. INTRODUZIONE

1.1 Respirare e' vita.

Respirare e' essenziale per vivere. Negli ultimi cento anni il peggioramento della qualita' dell'aria atmosferica e i progressi compiuti dalla medicina in termini di prolungamento della sopravvivenza in eta' adulta, riduzione della mortalita' infantile e affinamento delle tecniche di indagine e di diagnosi hanno messo la nostra civiltà di fronte ad una serie di patologie e disfunzioni respiratorie prima sconosciute o raramente descritte. In Italia le malattie che colpiscono il polmone causano 61.591 casi di ricovero ordinario pari al 1,2% di tutte le dimissioni e costano al Sistema Sanitario Nazionale circa 150 milioni di euro l'anno. [Fonte: Istituto superiore Sanita']. Purtroppo, a dispetto di questi dati si puo' ben dire che l'ammontare dei finanziamenti destinati a ricerche nell'ambito generico delle malattie respiratorie rimane basso evidenziando una consistente disproporzione rispetto ad altri *target* di ricerca. Forse, anche per questa ragione, molti meccanismi che regolano l'evoluzione di queste patologie rimangono ancora sconosciute. A questo va ricordato lo scoraggiante quadro rappresentato dall'ambito trapiantologico che a fronte di uno straordinario miglioramento della tecnica chirurgica e di contenimento dei fenomeni di rigetto, non vede invece il consolidamento della pratica di donazione del Polmone implicando per i pazienti estenuanti e lunghe attese di mesi compromettendo o limitando in molti casi il successo di un approccio terapeutico di questo tipo.

Restringendo il campo di osservazione alle malattie che coinvolgono pazienti in eta' pediatrica, nella Fibrosi Cistica, la malattia rara piu' diffusa nella popolazione caucasica con una incidenza di 1 caso ogni 2500 nati vivi e di 1:4.238 in Italia con notevoli differenze regionali [Societa' Italiana di Studio Fibrosi Cistica], il meccanismo eziogenetico risiede in una o piu' mutazioni a carico del gene CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) [Riordan JR, et al.1989]. La mancanza in tutto o in parte di questo fattore induce delle gravi alterazioni a carico di quegli organi che hanno una consistente componente secretoria e vede nella compromissione della funzionalita' respiratoria la causa di morte in assenza di un intervento terapeutico, in grado di prolungare la sopravvivenza dei pazienti per qualche decennio ma comunque non in grado di cambiare la prognosi infausta della malattia. L'asma rappresenta una vera e propria emergenza. Nonostante non sia una patologia mortale, questa e' in grado di limitare la qualita' della vita sia in eta' pediatrica che adulta, fungendo in molti casi da catalizzatore nell'eziogenesi di altre patologie come ad esempio l'ipertensione

polmonare indotta dall'interazione fra NO endogeno, scatenato dall'evento di tipo asmatico, e recettori presenti a livello vasale e diffusi in ambito polmonare [Abman, 2007].

Di sicuro interesse clinico sono le patologie che riguardano il neonato e il prematuro. Vale la pena di ricordare le alterazioni delle proteine del surfattante, le cui cause solo recentemente sono state individuate in mutazioni dei geni che trascrivono per le proteine SFPD, SFPC e SFBP [Whitsett et al. 2005 e la proteina ABCA3 [Shulenin et al. 2004]. Queste alterazioni impediscono la produzione normale di surfattante. Solo la mancanza di SFPB puo' essere contenuta con un un approccio di tipo sostitutivo, prevedendo somministrazione intratracheale di ingenti quantita di surfattante porcino. Nei casi di alterazione di altre proteine che inducono patologia polmonare di tipo interstiziale la terapia riguarda l'instillazione di idrossichinolina e corticosteroidi.. Anche in questi casi il trapianto di polmone rimane comunque l'unico tentativo di stabilizzazione a lungo termine soprattutto quando i soggetti diventano refrattari agli approcci terapeutici farmacologici descritti. E' importante ricordare come il trasferimento rapido del neonato ad un centro trapiantologico giochi un ruolo fondamentale nell'aumento della sopravvivenza che comunque si attesta tra il 30% e il 40% a 5 anni dall'intervento. .

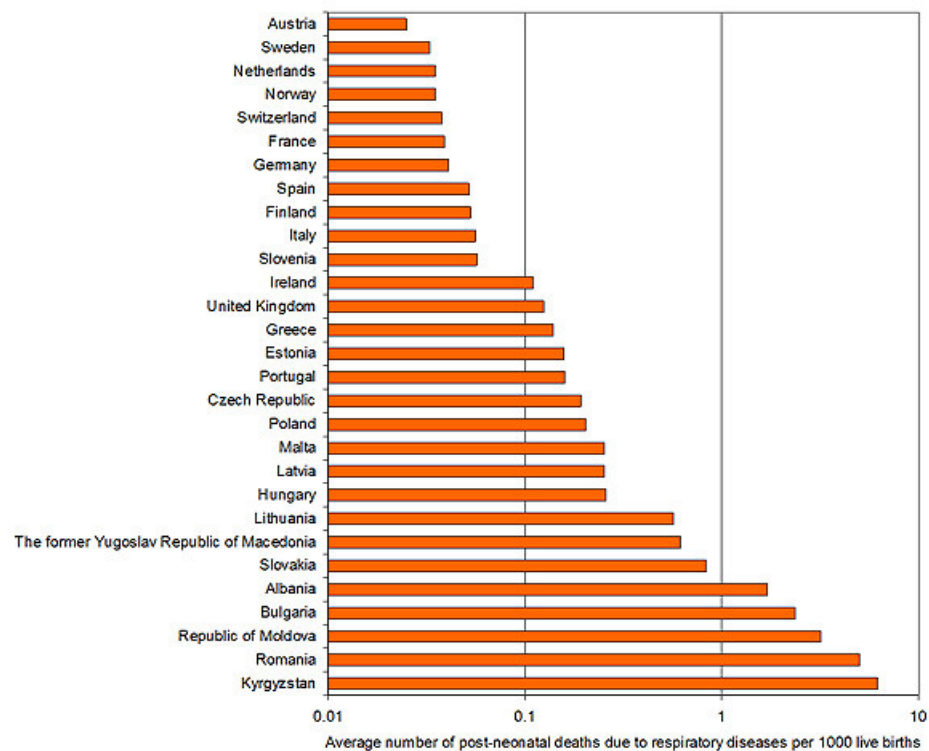


Figura I: decessi nei paesi europei per malattia respiratoria per 1000 nati vivi.

Fonte: *European Environment and Health Information System, www.enhis.org*

Altre patologie presentano dei meccanismi eziologici molto piu' complessi come ad esempio l'ipertensione polmonare persistente (PPHN) caratterizzata dalla mancanza o dalla disfunzione della circolazione polmonare che induce poi una caduta della resistenza vascolare alla nascita [Levin et al. 1976]. Sembra che l'alterazione nell'espressione del fattore di crescita endoteliale (VEGF) possa in qualche modo contribuire alla patogenesi della PPHN [Grover et al. 2005]. Sono stati messi a punto dei modelli animali che mimano in modo fedele la mancanza o la riduzione di VEGF e che hanno dimostrato in parte il ruolo di questo fattore nell'affermazione della PPHN e che potrebbero rendere possibile il disegno di trial pre clinici di terapia genica o cellulare nei confronti del gene codificante per VEGF.

La disponibilita' di nuovi modelli animali, di cellule staminali esenti da problemi etici e di molecole farmacologiche innovative che facilitino la *compliance* del paziente, potrebbero prolungare la speranza di sopravvivenza dei neonati e dei bambini e in molti casi anche essere risolutive riducendo allo stesso tempo i costi e quindi la sostenibilita' delle spese a carico del Sistema Sanitario Nazionale.

1.2 La Broncodisplasia Polmonare (BPD)

Nel 1889 Alexander Graham Bell durante la presentazione di uno speciale respiratore a pressione negativa utilizzato in neonatologia faceva notare come *“molti bambini, specialmente i prematuri, muoiono per la loro incapacita' ad espandere sufficientemente i loro polmoni durante le prime respirazioni. Non c'e' dubbio che in molti casi si potrebbe salvare la vita cominciando una respirazione artificiale utilizzando un respiratore a pressione negativa”*. Nel 1967 venne ufficialmente descritta una *“nuova sindrome cronica polmonare associata con l'uso di respiratori a pressione intermittente-positiva ed elevata ossigenazione”*. Questa venne chiamata displasia broncopolmonare (BPD) [Northway et al.1967]. La BPD rappresenta una importante causa di mortalita' e morbidita' nel neonato pretermine [Lemons et al. 2001] e la sua incidenza nei neonati con peso alla nascita inferiore a 1500 g varia dal 23% al 26% [Walsh et al. 2006]. La BPD viene definita come la presenza di ossigeno-dipendenza a 36 settimane di eta' post-concezionale o a 28 giorni di vita, in associazione a persistenti sintomi clinici respiratori e a compatibili anomalie radiologiche polmonari [O'Brodovich, et al. 1985; Jobe 2001]. Dal punto di vista clinico oggi distinguiamo due forme di BPD – *“Old”* e *“New”* BPD - a seconda dell'estensione del periodo di inizio e della durata dell'insulto polmonare:il denominatore comune e' costituito da infiammazione, scarsa alveolarizzazione e fibrosi polmonare mediamente estesa [Albertine et al. 1999; Blanco et al. 1993; Liu et al. 1993].

Dal punto di vista molecolare le cause che innescano la BPD sono ancora poco chiare. Ci sono evidenze che un ruolo importante sia giocato dall'elastina espressa a livello alveolare [Bostrom et al. 1996; Wendel et al. 2000]. Bruce e collaboratori hanno ad esempio dimostrato che nei pazienti che sviluppano BPD di grado severo e' aumentata l'escrezione urinaria dei prodotti di degradazione dell'elastina [Pierce et al. 1997]. L'alterazione nel metabolismo dell'elastina potrebbe essere influenzata da diversi fattori che includono il grado dell'espansione polmonare durante operazioni di ventilazione meccanica, esposizione all'ossigeno e acido retinoico [Bancalari et al. 2003; Bland, 2000]. Recentemente, sono state avanzate delle ipotesi secondole quali il profilo genetico dei prematuri sembra non conforme alla normalita'. Vanno ricordati i geni che codificano per SPB [Rova et al. 2004], per ABCA3 [Karjalainen et al. 2007], per TNF- α [Kazzi et al. 2004] e IFN- γ [Bokodi et al. 2007]. Uno studio recente ha dimostrato che in situazioni di iperossia viene indotta un'alterazione evidente dell'espressione di alcuni geni, fra i quali molti coinvolti nello sviluppo alveolare [Chen Z et al. 2007]. Sicuramente l'esteso danno polmonare che si incontra nei prematuri interferisce con la normale sequenza dello sviluppo dei polmoni. E questo si traduce in un pattern che dal punto di vista istologico appare in semplificazione alveolare (con alveoli piu' larghi, ma ridotti di numero e con ridotta septazione), e consistente riduzione della densita' capillare [Coalson, 2000; Stenmark et al. 2005]. Poiche' l'infiammazione gioca un ruolo importante nella patogenesi della BPD, i corticosteroidi sono stati ampiamente utilizzati nella profilassi e nel trattamento di tale patologia [Speer et al. 2001].

1.3 Terapie Disponibili per il trattamento della BPD

Il trattamento della BPD richiede un considerevole impegno dal punto di vista della spesa del Servizio Sanitario Nazionale poiche' questa patologia e' fra le piu' diffuse fra i neonati [Ireys et al 1999]. E' inoltre in grado di causare coinvolgimento di piu' sistemi ed e' associata cosi' ad una serie di condizioni che comprendono ritardo nella crescita, ipertensione polmonare, ritardo nello sviluppo neurologico, difetti all'udito, retinopatia.

Allo stato attuale diversi trial clinici, sono stati svolti per le forme transitorie di BPD, ma non per quelle che invece risultano piu' persistenti nell'infanzia e nell'adolescenza [Allen et al. 2003; Kinsella et al. 2006]. L'approccio terapeutico elettivo e' rappresentato dalla somministrazione sistemica di ingenti dosi di corticosteroidi con effetto migliorativo della meccanica polmonare e respiratoria e questo a causa del ruolo svolto dagli ingenti processi infiammatori nella patogenesi della BPD [Allen et al. 2003]. L'impiego di questi farmaci nel trattamento di routine di neonati prematuri non e' molto incoraggiante a causa dei pesanti

effetti collaterali a breve termine che si hanno, soprattutto a carico del sistema nervoso [American Academy of Pediatrics, 2003]. Anche dopo la dimissione dall'Unità di Terapia Intensiva Neonatale è necessaria la somministrazione di cicli di corticosteroidi per prevenire e trattare eventuali riacutizzazioni. Nei pazienti stabilizzati si è notato, tuttavia, che la somministrazione di corticosteroidi per via inalatoria non ha ridotto l'incidenza dei sintomi e nemmeno ha aumentato la ripresa delle funzioni [Pantalitschka et al. 2006; Pelkonen et al. 2001; Dugas et al. 2005]. L'utilizzo dei classici broncodilatatori ad azione β_2 -agonista e agenti anticolinergici può aumentare la funzione respiratoria nel breve termine, ma è ancora poco chiaro se effettivamente questi siano in grado di prevenire esacerbazioni e aumento della qualità della vita [Abman et al. 2006]. Un'altra possibilità è rappresentata dall'uso di farmaci diuretici anche se con meccanismo ancora poco chiaro soprattutto nei pazienti che stanno ricevendo ingenti quantità di ossigeno o che hanno funzionalità cardiaca compromessa.

Si sono tentati anche dei trial con degli anticorpi monoclonali come il Palivizumab[®] nella profilassi contro le infezioni respiratorie virali, soprattutto da virus respiratorio sinciziale.

Rimangono, tuttavia, molti interrogativi a cui dare risposta. Per esempio non è chiaro se il trattamento dovrebbe essere iniziato quando si diagnostica una riduzione della funzione respiratoria in assenza di sintomi evidenti. E nemmeno si conosce bene l'effetto di una terapia a base di agenti antinfiammatori per prevenire il rimodellamento delle vie respiratorie oppure l'applicazione di terapie combinate a base di anti leucotrienici e β_2 -agonisti.

1.4 I modelli animali di studio della BPD

L'implementazione di un modello animale di danno polmonare rappresenta una fase imprescindibile nell'applicazione di una terapia sperimentale che serva alla cura e al miglioramento della funzione respiratoria in età adulta e pediatrica. Come già accennato la Displasia Broncopolmonare è il risultato di un danno polmonare presente in un individuo immaturo e ancora in via di completo sviluppo. La difficoltà nella generazione di un modello animale sta proprio nella estremamente elevata numerosità di fattori che giocano un ruolo predominante nella genesi della BPD. Abbiamo fatto riferimento a danni da ventilazione, al fattore tempo, ossia alla durata dell'esposizione all'ossigeno, a volutrauma o biotrauma, ovvero l'alterazione dei processi cellulari e molecolari del polmone indotta dallo stress meccanico della ventilazione meccanica [Plotz et al. 2004]. A volte già a livello fetale vi sono degli stimoli che possono tradursi in danno ai polmoni soprattutto quando si verificano corioamnionite e rottura delle membrane prima della nascita. Sicuramente i modelli animali

che sono piu' raffrontabili con la patologia umana sono quelli offerti dall'agnello sviluppato da Bland e collaboratori e dal babbuino: infatti, in questa situazione i neonati possono essere ventilati per settimane mimando molto bene la situazione clinica. Mentre nel caso dell'agnello e' possibile riprodurre il quadro tipico della "vecchia" BPD (alterato pattern dell'inspirazione, fibrosi delle vie respiratorie principalmente) [Albertine et al. 1999], con il babbuino ritroviamo gli aspetti della "nuova" BPD ovvero di dilatazione alveolare e aumento della fibrosi [Coalson et al. 1988].

La difficolta' di stabulazione e i problemi etici relativi al trattamento e alla sperimentazione di animali ad alto indice neurologico hanno spinto verso l'utilizzo di animali a basso indice neurologico come topi e ratti.

Attualmente i modelli sperimentali pre-clinici di danno polmonare vengono ottenuti in maniera diversa, a seconda del tipo di danno che si vuole indurre e quindi della patologia che si vuole riprodurre. Una possibilita' e' rappresentata dalla somministrazione di bleomicina endotracheale in ratti adulti e neonati [Goto et al 2004; Ortiz et al. 2003] anche se il limite di questo approccio e' rappresentando dall'estrema tossicita' della bleomicina e dalle misure di sicurezza necessarie per la sua manipolazione. Il modello di barotrauma ottenuto mediante esposizione di ratti adulti o neonati a concentrazioni variabili di ossigeno dal 65% al 95% [Jankov et al. 2003; Belik et al. 2005] e di babbuini neonati [Coalson et al. 1999] tramite l'impiego di apparecchiature automatizzate in grado di erogare i gas in modo sicuro e continuo, sembra prendere gradualmente il sopravvento.

In questo tipo di modello l'ossigeno induce emorragia alveolare, edema, ridotta compliance polmonare. A paragone dell'adulto il modello animale neonatale presenta ridotta sintesi di DNA, ridotta crescita del polmone, mancanza di una sufficiente alveolarizzazione e, da ultimo, displasia polmonare. L'entita' e morbidity dell'iperossia non sono ancora completamente chiarite. Dopo circa una settimana di esposizione si verificano nel ratto neonato alterazioni polmonari reversibili in due settimane se l'esposizione cessa e i soggetti tornano ad aria ambiente [Jankov et al. 2003]. L'arresto maturativo altera l'alveolarizzazione e la vascolarizzazione cosi', per esposizione prolungata ad O₂, puo' esservi un'obliterazione vascolare che riduce il rapporto tra la componente vascolare e quella alveolare [Shaffer et al. 1987; Frank et al. 1987]. L'esposizione al 60% o 65% e' in grado di mimare i cambiamenti che si osservano nella "nuova" BPD [Han et al. 1996] mentre a concentrazioni elevate tra l'80% e il 100% si osservano quelli descritti per la "vecchia" BPD [Warner et al. 1998].

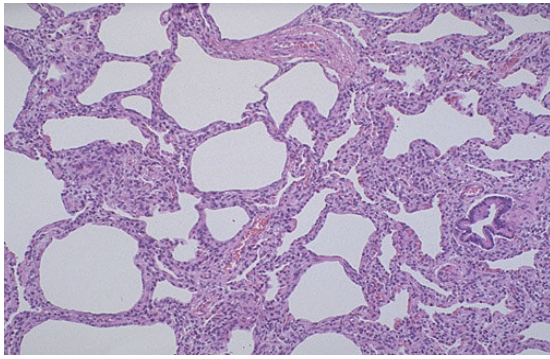


Figura II: Polmone umano affetto da BPD

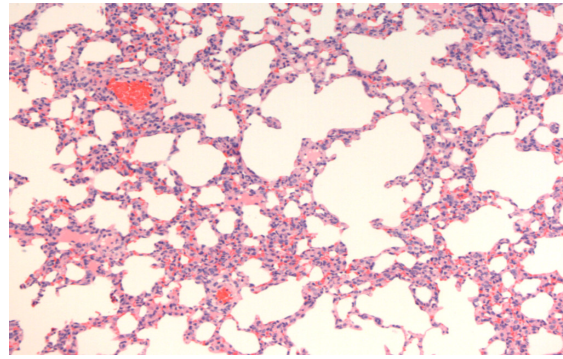


Figura III: Polmone di ratto con iperossia 60%

1.5 Le cellule staminali

Nell'ultimo decennio le cellule staminali stanno ricevendo sempre maggiore attenzione scientifica in seguito al loro crescente impiego nel settore della medicina rigenerativa di tessuti e organi con caratteristiche bio-artificiali. Una cellula staminale è una cellula non differenziata in grado di auto rinnovarsi e vivere per lungo tempo. La caratteristica che rende particolarmente interessante queste cellule è quella di potersi dividere producendo linee differenziate e in grado di ripopolare funzionalmente il tessuto di origine. Le cellule staminali embrionali (ES) derivano direttamente dalla massa di quattro cellule della blastocisti e sono considerate pluripotenti, *al limite* della totipotenza. Così' posso produrre tutti i tipi di cellule che compongono i tre foglietti di germinazione embrionale: endoderma, mesoderma ed ectoderma. Le cellule ES possono essere espanse in modo indefinito, ma richiedono una serie di accorgimenti a tratti complessi e costosi [Kawabata et al. 2006] e inoltre il loro ottenimento e manipolazione potrebbero comportare speciali autorizzazioni di difficile reperimento in molte nazioni. Le cellule staminali adulte sono considerate multipotenti. Continuano a possedere capacità auto-rigenerativa, ma il loro potenziale differenziativo è di solito limitato verso tipi cellulari che compongono i tessuti della loro origine. Le cellule staminali adulte meglio caratterizzate e conosciute sono quelle ematopoietiche (HSC) provenienti dal midollo osseo che possono differenziare verso tutti gli elementi figurati del sangue. Queste sono cellule relativamente rare e vengono selezionate sulla base di un antigene di superficie, il CD34. Il midollo osseo contiene anche cellule staminali di tipo mesenchimale (MSC) che possiedono capacità *in vitro* e *in vivo* di differenziare in osteoblasti, condroblasti, fibroblasti e adipociti [Pittenger et al. 1999]. Sono state caratterizzate recentemente anche delle cellule classificate come progenitori multipotenti e conosciute come MAPC. Questi progenitori sono

stati isolati da una popolazione co-purificata assieme a cellule mesenchimali e sono in grado di differenziare in molti tipi di cellule somatiche come ad esempio quelle polmonari, se iniettate in una blastocisti precoce [Jiang et al. 2002]. E' possibile l'isolamento di MAPC in molti animali come topi, ratti e umani e possono essere espanse senza troppi problemi in modo stabile e continuativo. Vi sono, infine, numerose popolazioni di cellule staminali classificate come "unipotenti" come ad esempio le cellule staminali residenti nell'epidermide che sono in grado di generare solamente un unico tipo cellulare.

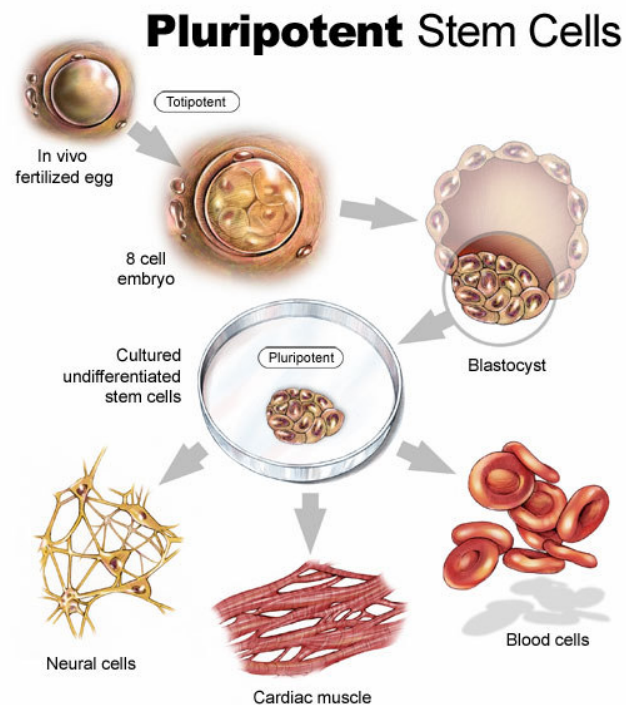


Figura IV: Il razionale delle cellule staminali pluripotenti e della loro differenziazione.

Fonte: *CSA Company, USA* www.csa.com

1.6 Le cellule staminali del Fluido Amniotico (hAFS)

Il fluido amniotico umano viene utilizzato nell'ambito della diagnosi prenatale da piu' di 70 anni. Si e' rivelato un mezzo molto utile, sicuro e di semplice ottenimento per la messa a punto di test per lo screening di moltissime malattie genetiche [Fairweather et al. 1978]. Una popolazione cellulare con caratteristiche di pluripotenza puo' essere isolata a partire dal fluido amniotico selezionando cellule che espongono il recettore di membrana *c-kit* [Atala et al. 2004]. Questo recettore e' in grado di interagire con il ligando *stem cell factor*. Nel fluido amniotico le cellule che mostrano positivita' al fattore *c-kit* sono tra lo 0.9% e l'1.4%. Queste

cellule dimostrano di mantenere un cariotipo normale anche nei passaggi piu' tardivi presentando normali fasi G1 e G2. La lunghezza dei telomeri e' regolata anche nei passaggi piu' tardivi. Le cellule presentano marcatori specifici di staminalita' caratteristici dello stadio embrionale come *SSEA4* e *OCT4*, ma non ne esprimono altri come *SSEA1*, *SSEA3*, *CD4*, *CD8*, *CD34*, *CD133*, *C-MET*, *ABCG2*, *NCAM*, *BMP4*, *TRA1-60* e *TRA1-81*. [De Coppi et al. 2007]. Questo originale profilo antigenico dimostra che le cellule staminali del fluido amniotico possiedono in parte caratteristiche tipiche delle cellule staminali embrionali, pur non essendo classificabili come tali e pur conservando caratteristiche di pluripotenza sconosciute nella componente staminale adulta. Un'altra interessante caratteristica osservata *in vitro* e' che sebbene le hAFS diano luogo alla formazione di corpi embrionali che risultano positivi alle colorazioni specifiche per i marcatori di tutti foglietti di germinazione embrionale, quando inoculate *in vivo* in animali immunodeficienti non danno luogo alla formazione di teratomi, fenomeno osservato invece con le cellule staminali embrionali [Thomson et al. 1998]. Una prova della loro pluripotenza e' rappresentata dal differenziamento *in vitro* nei fenotipi osteogenico, adipogenico, miogenico, neurogenico, endoteliale ed epatico. Queste cellule dimostrano quindi di avere un elevato potenziale dal punto di vista di applicazioni di ingegneria cellulare e tissutale. Inoltre la loro relativa semplicita di reclutamento e raccolta, a partire da campioni di amniocentesi routinarie effettuate in qualsiasi struttura ostetrica, le rendono particolarmente attraenti anche perche' esenti da problemi di carattere etico che ruotano attorno alla reperibilita' e l'ottenimento delle cellule staminali embrionali. Inoltre, non essendo necessario l'utilizzo di *feeder layer* per la loro espansione i tempi, i costi di mantenimento e amplificazione risultano notevolmente ridotti anche per la possibilita' di crioconservazione senza compromissione della capacita' differenziativa. Rimangono, tuttavia, alcuni aspetti da migliorare, primo fra tutti quello di poterne effettuare una selezione efficiente e soddisfacente dal punto di vista quantitativo, cio' nell'ottica di un impiego delle hAFS su larga scala, anche solamente in trials di studio pre-clinico.

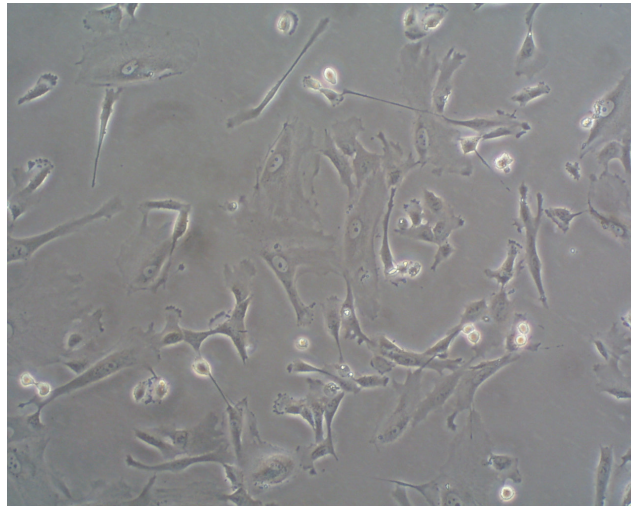


Figura V: Cellule staminali del fluido amniotico al passaggio 7. Ingrandimento 20X

1.7 Il trasferimento genico e i vettori Adenovirali

Il trasferimento di sequenze geniche estranee in cellule eucarioti a scopo di terapia genica o allo scopo di valutare l'espressione di un gene di interesse in ambito diverso da quello naturale, ha ricevuto negli ultimi anni notevole impulso dall'ampia caratterizzazione e impiego di vettori virali. Tali virus, pur mantenendo inalterata la loro capacità di infettare le cellule bersaglio, sono opportunamente modificati allo scopo di: 1) alterare, qualora sia possibile, la loro capacità replicativa, in modo da limitare la loro capacità infettante, 2) sostituire alcuni geni virali con geni di interesse che saranno veicolati dal virus stesso all'interno della cellula o del tessuto bersaglio. I vettori virali, essendo dotati della naturale capacità di penetrare attivamente all'interno delle cellule, consentono, in generale, una notevole amplificazione dell'espressione dei geni transdotti rispetto a quella che mediamente si ottiene impiegando sistemi di trasferimento chimici o fisici. Infatti, milioni di anni di evoluzione hanno specializzato questi particolari organismi nell'abilità di penetrare le cellule eucarioti e di "schiavizzare" la cellula alla produzione delle proteine virali. Parecchie sono, tuttavia, le caratteristiche a cui un vettore virale deve rispondere per poter essere utilizzato a scopo di trasferimento o di terapia genica. Principalmente, il vettore deve essere in grado di infettare lo specifico tipo (o tipi) cellulare di interesse, deve riuscire a veicolare la sequenza di interesse in uno stato attivo dal punto di vista trascrizionale, deve risultare complessivamente non tossico o il meno tossico possibile per le cellule bersaglio e deve consentire la corretta produzione della proteina di interesse nel distretto bersaglio. Alcune di queste caratteristiche sono insite nei vettori virali oggi maggiormente impiegati, altre sono state, invece, artificialmente introdotte; tra queste ultime le delezioni a livello genomico che tolgono ai

virus la capacità di replicazione indipendente e, contemporaneamente, aumentano lo spazio a disposizione per l'inserimento di sequenze estranee. La corretta trascrizione della sequenza si ottiene poi mediante l'utilizzo di appropriate sequenze promotoriali.

Negli ultimi anni il trasferimento genico mediato da vettori virali ha riguardato il settore delle patologie a base genetica, ma anche il trattamento di alcuni tipi di tumori e di importanti malattie infettive, quali l'AIDS. L'utilizzo dell'una o dell'altra specie virale è di solito dipendente dalle caratteristiche del vettore virale in funzione dell'obiettivo finale che ci si propone.

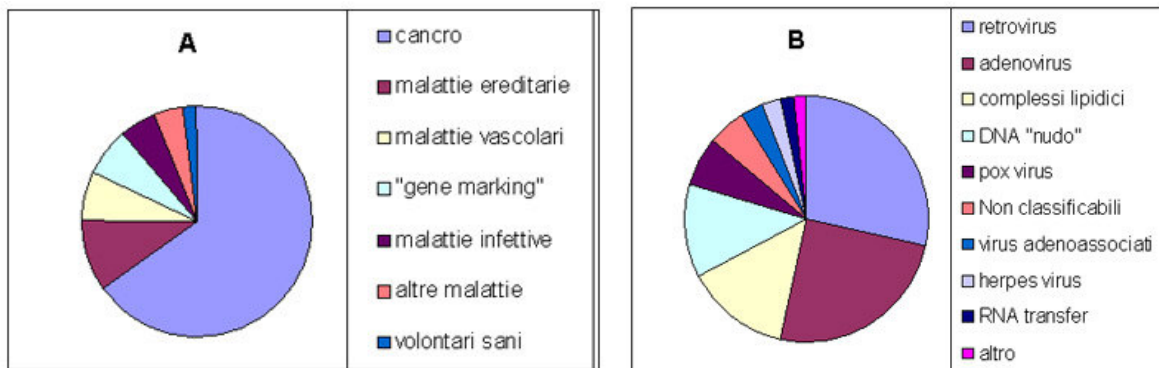


Figura VI: quadri relativi all'impiego di trial pre-clinici di Terapia Genica nelle varie tipologie di patologie e proporzioni dei vari vettori utilizzati.

1.7.1 Gli Adenovirus

Gli adenovirus sono virus a DNA, con un genoma lineare della lunghezza di circa 36 kb, che circolarizza all'interno delle cellule infettate prima della replicazione del virus stesso.

Gli adenovirus sono stati riconosciuti quale classe indipendente di agenti infettivi nel 1953 da Rowe e collaboratori che li hanno isolati dalle adenoidi di un paziente. Si riconoscono numerosi sierotipi diversi, 43 in grado di infettare l'uomo. Fino ad oggi nessuno dei sierotipi umani è stato associato con l'insorgenza di neoplasie nell'uomo e solo il sierotipo 12 si associa a tumori in hamster. I sierotipi che più frequentemente infettano l'uomo sono il 2 e il 5 e determinano comunemente patologie a carico dell'apparato respiratorio (sono responsabili del 5-15% dei comuni raffreddori), intestinale e delle congiuntive, tutte di solito in forma piuttosto leggera. Negli adenovirus entrambe le catene di DNA vengono trascritte per la produzione di proteine virali e vi si distinguono alcuni geni detti precoci (early, E) trascritti prima della replicazione del virus, e altri che vengono, invece, trascritti solo dopo che si è verificata la replicazione virale, detti geni tardivi (late, L). I geni early sono convenzionalmente distinti con un numero che indica l'ordine di trascrizione: E1, E2, E3, E4.

La localizzazione dei geni tardivi lungo il genoma si sovrappone a quella dei geni precoci, tuttavia la trascrizione dei geni early e late avviene nelle due opposte direzioni, eccetto per il gene E3, sovrapposto alla regione tardiva. Alle due estremità lineari del genoma virale sono localizzate due regioni ripetute (ITR), di diversa lunghezza nei diversi sierotipi, la cui integrità risulta fondamentale per la replicazione del virus stesso. La trascrizione e la post-trascrizione in adenovirus sono particolarmente complesse a causa dello splicing multiplo che si verifica a carico dei trascritti sia precoci che tardivi.

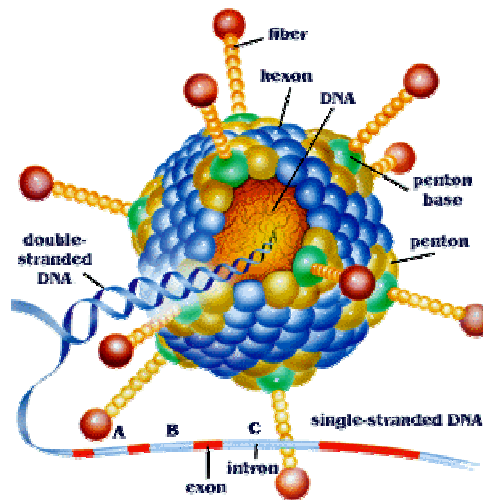


Figura VII: struttura dell'adenovirus

Fonte: www.nobelprize.org

2. Scopo della Ricerca

La broncodisplasia viene definita come una patologia polmonare caratterizzata da ossigeno-dipendenza, per 28 giorni o più, nei primi due mesi di vita, con alterazioni radiografiche polmonari stabili in un neonato di peso molto basso e/o sottoposto a ventilazione meccanica. L'incidenza è compresa tra il 4,2% ed il 40% dei neonati sottoposti a ventilazione meccanica ed è inversamente proporzionale al peso alla nascita e all'età gestazionale.

L'eziopatogenesi della malattia è cambiata negli ultimi anni: mentre la forma descritta negli anni 60 da Northway - "vecchia BPD"- riconosceva come fattori determinanti la malattia delle membrane ialine polmonari, l'ossigenoterapia ad alte concentrazioni, la ventilazione meccanica spesso aggressiva e l'intubazione tracheale, oggi, soprattutto per l'uso del surfattante suppletivo e di tecniche ventilatorie meno invasive, la BPD sembra più legata alla prematurità estrema, alla dilatazione alveolare, alla mancanza di neoangiogenesi e all'infezione: "nuova BPD". Il barotrauma, ovvero il trauma legato alla pressione di picco inspiratorio usata per la ventilazione meccanica e il danno ossidativo legato, nel prematuro, alle basse concentrazioni di enzimi antiossidanti oltre che alle basse concentrazioni di vitamina A, E e C, sono fattori determinanti, insieme agli altri suddetti, nell'insorgenza della broncodisplasia. Attualmente non esiste alcuna terapia risolutiva per il trattamento della BPD, ma soltanto delle cure palliative e sintomatiche.

Vista la disponibilità di una popolazione cellulare staminale di recente isolamento e caratterizzazione proveniente dal fluido amniotico (cellule staminali umane del fluido amniotico, hAFS) con caratteristiche di pluripotenza, ma facilmente ottenibili senza manipolazione dell'embrione umano, si è pensato di valutare il mantenimento del loro potenziale differenziativo *in vitro* dopo infezione con vettori adenovirali di prima generazione trasducenti geni marcatori.

La messa a punto di un opportuno modello animale di BPD, ottenuto mediante utilizzo di un'apparecchiatura di nuova concezione denominata Oxycycler (Biospherix, USA) in grado di erogare concentrazioni di ossigeno variabili e standardizzate, ci spinge a saggiare *in vivo* l'homing e l'attecchimento e di valutare un possibile effetto terapeutico delle hAFS somministrate per via intratracheale in ratti neonati esposti ad una concentrazione di O₂ del 60%.

3. Materiali e Metodi

Tutte le procedure sugli animali, di seguito descritte, sono state condotte in maniera conforme al D. L. 116/1992 e secondo AUTORIZZAZIONE N. 173/2006-B del 4.12.2006

3.1 Infezione delle cellule staminali del fluido amniotico (hAFS) con vettori adenovirali

Per la messa a punto della fase in vitro, le cellule staminali del fluido amniotico, opportunamente espansive, sono state valutate in esperimenti di tipo dose-effetto con vettori adenovirali della prima generazione, esprimenti geni marcatori.

3.1.1 Espansione *in vitro* delle cellule hAFS

Le cellule hAFS sono state ottenute dal Laboratorio di trattamento e studio del midollo osseo del Dipartimento di Pediatria di Padova, opportunamente selezionate secondo i metodi descritti da De Coppi e collaboratori [De Coppi et al. 2007] e provenivano da campioni di amniocentesi prelevati in pazienti fra la quattordicesima e la diciottesima settimana di gravidanza secondo quanto stabilito dal Comitato etico dell'Azienda Ospedaliera di Padova. Le cellule, congelate al passaggio 5, venivano scongelate ed espanse in terreno di coltura *Chang Medium* (Chang B con Chang C; Irvine Scientific, CA), 15% di siero bovino fetale (FBS), 1% di penicillina, streptomina e L-glutamina (Invitrogen, Italia). Il terreno veniva cambiato ogni due giorni.

3.1.2 Espansione e purificazione degli stock di Adenovirus AdHCMVsp1LacZ e AdHCMV.EGFP

I due vettori adenovirali di prima generazione AdHCMVsp1LacZ and AdHCMV.EGFP, di sierotipo 5 ed esprimono rispettivamente il gene della β -galattosidasi (β -gal) di E coli e la *enhanced green fluorescent protein (EGFP)* sono stati costruiti secondo quanto descritto in letteratura [Morsy AF et al. 1995; Anton M et al. 2005]. Entrambi i geni si trovano sotto il controllo trascrizionale del promotore del citomegalovirus umano (*human cytomegalovirus*, HCMV). I vettori sono stati espansi in cellule 293 secondo tecniche standardizzate [Graham FL et al. 1997] e purificati mediante bandatura con centrifugazione a gradiente di CsCl e mantenuti in Tris-HCl 10mM, MgCl₂ 1mM NaCl 135mM e glicerolo 10% (vol/vol) a -80°C. Il titolo virale è stato successivamente determinato mediante saggio di placca ed espresso

come *plaque-forming units* (pfu)/ml. Entrambe le preparazioni virali sono state valutate per la presenza di particelle ricombinanti mediante saggio RCA (replication-competent adenovirus) su cellule A549.

3.1.3 Infezione dose-effetto delle cellule hAFS

Preliminarmente all'infezione le cellule sono state staccate con tripsina e contate. In media non meno di 3×10^6 cellule totali sono state poi infettate con i vettori alle molteplicità di infezione (MOI) di 1, 2, 5, 10, 25, 50, 100, 200 e 400 pfu/cell. Brevemente, dopo rimozione del mezzo di mantenimento è stata aggiunta una sospensione di PBS con Calcio e Magnesio contenente il vettore virale alla MOI prescelta. La sospensione è stata mantenuta a contatto con le cellule per 1 ora a 37 °C, successivamente addizionate con MEM supplementato con siero di cavallo al 5% , penicillina-streptomicina 1% .

3.1.4 Valutazione qualitativa dell'attività Beta galattosidasi e dell'espressione della EGFP

In entrambi gli esperimenti dose-effetto, l'espressione dei geni marcatori trasdotti (β -gal e EGFP), è stata valutata 48 ore post-infezione. Le colture cellulari infettate con AdHCMVsp1LacZ sono state valutate dal punto di vista dell'espressione qualitativa della β -gal e della fluorescenza emessa dall'EGFP. Nel primo caso si rimuove il terreno dalle piastre e si lava con PBS senza Calcio e Magnesio. Si procede con la fissazione mediante paraformaldeide 4% e glutaraldeide 2.5% in tampone fosfato 0.1M pH 7.3. Si colora poi con soluzione X-gal ($MgCl_2$ 1M, Potassio ferrocianuro 50mM, Potassio ferricianuro 50mM e infine X-gal 20mg/ml in dimetilformamide). Dopo incubazione di 1 ora a 37°C le piastre sono visionate al microscopio ottico. Per l'identificazione dell'EGFP, invece, le piastre sono state direttamente visionate mediante microscopio a fluorescenza modello Olympus IX 71, fotografate con fotocamera digitale Camedia C4040 e analizzate con il programma Analysis 3.2. Queste valutazioni sono state effettuate dopo due, sette e quattordici giorni in modo da quantificare la persistenza dell'espressione dei due geni marcatori.

3.1.5 Valutazione quantitativa dell'attività Beta galattosidasi

Per la messa a punto del saggio quantitativo della β -gal le cellule sono state staccate con tripsina e centrifugate. Il pellet così ottenuto è stato risospeso in 200 μ l di PMSF/NP40 buffer (PMSF 1mM, NP400.5%, Tris HCl 250mM pH 7.8). In seguito si è proceduto a una centrifugazione rapida alla massima velocità e il supernatante è stato utilizzato per la

prosecuzione del saggio: 40µl provenienti da ogni estratto cellulare vengono aggiunti a 350µl di 2-mercaptoethanol soluzione 50mM, e 132µl di o-nitrofenolo β-D-galactopiranoside (4g/liter in sodio fosfato 100mM a pH 7.5), incubata a 37°C per un'ora. La reazione viene terminata mediante aggiunta di 172µl di Na₂CO₃ 1M. La lettura dell'assorbanza avviene a 420 nm. L'attività beta galattosidasi è stata espressa come microgrammi di proteina prodotta ogni milione di cellule infettate.

3.1.6 Sorting cellulare

Per selezionare le cellule hAFS che sono state infettate con AdHCMV.EGFP e poterle poi riseminare nei mezzi differenziativi è stato utilizzato il sorting mediante citofluorimetria a flusso con FACS Aria cell sorter (BD Biosciences, San Jose, CA) equipaggiato con laser blu, rossi e viola. Sei milioni di hAFS infettate sono state processate con forward scatter (FSC) rispetto ad un side scatter (SSC), selezionate e raccolte sulla base della misurazione dell'intensità di fluorescenza usando un filtro a banda passante di 530 nm e un laser a ioni di Argon (488 nm 100 mW) per l'eccitazione. Il parametro impostato per la purezza della popolazione era ad una velocità di 5 mila eventi per secondo. Le popolazioni così raccolte sono state nuovamente analizzate sia per purezza che per vitalità.

3.1.7 Differenziazioni delle cellule hAFS dopo infezione con AdHCMV.EGFP

Per valutare il potenziale differenziativo delle hAFS infettate con AdHCMV.EGFP e raccolte mediante sorting cellulare si procede con la loro messa in coltura in particolari mezzi di mantenimento e differenziazione verso due linee mesenchimali: osteogenica e adipogenica.

Differenziazione osteogenica. Per indurre differenziazione osteogenica le hAFS vengono piastrate ad una densità di almeno 4×10^3 cells/cm² e condizionate per due settimane in mezzo differenziativo a base di DMEM *low glucose* (Gibco) supplementato con FBS 10% (Gibco), desametasone 100nM, β-glicerolo fosfato 10mM, acido 2 fosfato ascorbico 50µM (StemCell Technologies Inc.), penicillina-streptomina 1% (Gibco).

Differenziazione adipogenica. Per indurre differenziazione osteogenica le hAFS vengono piastrate ad una densità di almeno 4×10^3 cells/cm² e condizionate per due settimane in mezzo differenziativo a base di DMEM *low glucose* (Sigma) supplementato con FBS 10% (Gibco), 0.25mM IBMX (Sigma), desametasone 0.1µM (StemCell Technologies Inc.), insulina 66nM (MP Biomedicals, Germania), Triiodotironine T₃ 1nM (Sigma), rosiglitazone 10µM (Avandia[®], GlaxoSmithKline, Regno Unito), hepes 10mM (Sigma), pantotenato 170µM

(Sigma), biotina 33 μ M (Ink Biomedicals, USA), transferrina 10 μ g/ml (MP Biomedicals), 1% pen/strep and 1% L-glutamine (Gibco).

Estrazione dell'RNA e allestimento di una RT-PCR. Per completare l'indagine sul differenziamento e' necessaria la valutazione dei geni che si accendono e di quelli che si spengono quando le cellule assumono un determinato fenotipo mesenchimale. Viene quindi estratto l'RNA totale a partire da cellule differenziate e non differenziate mediante TRI reagent (Sigma). 1 μ g of RNA viene retro trascritto nel corrispondente cDNA con transcriptasi inversa Superscript II (Life Technologies, Inc. Rockville, MD) utilizzando primer Oligo-dT (Invitrogen) secondo le raccomandazioni del produttore. Sia la retrotrascrizione che la successiva PCR sono state effettuate mediante termociclatore GeneAmp[®] PCR System 2700 (Applied Biosystem, Italia). Ogni PCR e' stata allestita in un volume finale di 25 μ l con dNTPs 200mM, 10pM di ciascun primer, Taq polimerasi 0.3U, tampone MgCl₂ (Invitrogen). I cicli sono stati programmati come segue: 94°C for 2 minuti; annealing a 60/63°C per 40 secondi e extension a 72°C per 1 minuto. Il numero di cicli variava da 22 a 37. Le sequenze dei primer specifici per i geni Peroxisome Proliferator-activated Receptors Gamma (PPaR γ), Core Binding Factor Alpha1 (Cbfa1), Osteocalcin and β_2 microglobulin sono riassunte in tabella 1. Gli amplificati ottenuti sono stati corsi su gel di agarosio all'1% e visionati mediante il programma Studio Version 9[®]. Tutti i primer sono stati disegnati utilizzando http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi web site.

3.2 Messa a punto del modello animale di BPD mediante iperossia al 60% di O₂

Il modello animale che abbiamo messo a punto si basa sull'esposizione di ratti neonati ad una concentrazione di ossigeno pari al 60%. Tale livello di ossigeno induce negli animali un danno paragonale a quello da barotrauma che si osserva nei pazienti umani sottoposti a ventilazione in caso di diagnosi di BPD.

3.2.1 Esposizione dei ratti neonati all'ossigeno

L'esposizione a concentrazioni variabili di ossigeno e' resa possibile dall'impiego di una macchina di nuova concezione denominata OXYCYCLER modello A42OC (Biospherix, USA). L'impianto e' in grado di mantenere in modo automatico e continuo le concentrazioni di O₂ e CO₂ stabilite dall'operatore grazie ad un flusso variabile di N₂. Gli animali sono stati processati sperimentalmente secondo l'autorizzazione N. 173/2006-B del 4.12.2006. In particolare la pneumopatia sperimentale si ottiene con l'ossigenazione di ratti neonati (e della

rispettiva madre per lo svezzamento) nel periodo coincidente con la massima alveolarizzazione nel ratto, ovvero tra la quarta e la tredicesima giornata di vita. Le camere di esposizione (75cm X 50cm X 50cm) hanno un sistema di ventilazione e filtri di rimozione della CO₂, costantemente rilevata. Temperatura e umidità vengono mantenute a 26° C e 75-80% rispettivamente. Viene, inoltre, garantito un ritmo luce/buio di 12 ore, così pure l'apertura quotidiana per la pulizia. Ratte Sprague Dawley del peso di circa 300 grammi, di età... di gravidanza vengono stabulate in condizioni di aria ambiente nei locali dove risiede l'attrezzatura almeno sette giorni prima il loro ingresso in sperimentazione. Una volta nati, i ratti e la rispettiva madre vengono esposti per 14 giorni ad una concentrazione di O₂ pari al 60%. Contestualmente una seconda cucciolata è mantenuta in un'altra camera in condizioni di aria-ambiente, ovvero al 21% di O₂.

3.2.2 Valutazione dell'effetto dell'esposizione all'iperossia nei polmoni e negli altri organi

Per verificare la funzionalità della macchina, la validità del modello scelto e l'impatto dell'iperossia anche su altri organi è stata condotta una serie di valutazioni morfologiche su cuore, reni, milza, fegato, ileo e cervello. Gli animali sono stati sacrificati al tempo P21 ovvero a due settimane dalla nascita (P14) e una di ripresa in aria ambiente (P21). L'eutanasia è stata praticata mediante pre-anestesia con Zoletil (100mg/ml di Zolazepam + Tiletamina in rapporto 1:1 ovvero 0,04 ml i.m. per ogni 100 grammi di ratto) e successivo sovradosaggio di Zoletil i.p., e gli organi prelevati. Ogni emilobo polmonare è stato conservato in formalina al 10% mentre l'altro è stato congelato e conservato a -80°C.

Allestimento dei preparati istologici. L'emilobo precedentemente fissato in formalina al 10% è stato incluso in paraffina. Le inclusioni vengono lasciate per 20 minuti in soluzione di paraffina e xilolo e successivamente altri 20 minuti per tre volte in miscele contenenti un volume sempre maggiore di paraffina fino ad una soluzione pura al 100%. Quando i campioni sono completamente imbevuti di paraffina si lasciano solidificare e si procede con la preparazione di sezioni dello spessore di 3-5 µm mediante microtomo (Leica 1900 CM) e al successivo montaggio su vetrini super frost polilisinati (Menzel-Glaser). I vetrini vengono poi colorati con colorazione Ematossilina-Eosina. Brevemente: i vetrini vengono lavati con acqua distillata, immersi in ematossilina di Mayer per 8-10 minuti, risciacquati nuovamente in acqua distillata e quindi in acqua di fonte tiepida. Si procede quindi con immersione in eosina alcolica 0,5% per 2 minuti. Si idrata in serie crescente di alcool e si diafanizza in xilolo. L'ematossilina di Mayer è una lacca alluminica basica che colora progressivamente i nuclei e

le sostanze anioniche in blu. L'eosina, invece, e' debolmente acida e colora i citoplasmi, il tessuto connettivo e le sostanze a carattere cationico in varie tonalita' di rosa. La visione dei preparati avviene con microscopio ottico LeicaTm DM 4000 B

Indagini morfologiche polmonari. Le indagini morfologiche sui preparati polmonari sono state eseguite utilizzando il software ImageJ, un programma nato per l'elaborazione delle immagini sviluppato presso il *National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA*. Nella nostra valutazione ImageJ è risultato utile per la conta del numero degli alveoli consentendo anche di differenziare quelli maturi da quelli immaturi, il rapporto tra spazi aerei e non comprendendo in questo gruppo interstizio e setti. Altri parametri la cui valutazione è stata possibile sono stati la RAC (conta radiale degli alveoli) e la valutazione dell' infiltrato linfocitario. Parallelamente a questo tipo di approccio, i conteggi matematici relativi alle indagini morfometriche sono stati supportati da metodi non automatici effettuati da un patologo diverso utilizzando una griglia di 5 cm per 5 cm suddivisa in riquadri di 2 mm² su cui veniva posto un vetrino e successivamente conteggiati il numero degli alveoli per mm² e la RAC ovvero la conta radiolare alveolare.

3.3 Trapianto di cellule hAFS negli animali esposti al 60% di O₂

La fase preliminare del trapianto prevedeva la consueta esposizione dei ratti neonati al 60%. 2 ratte gravide *Sprague-Dawley* (SD) del peso di 200-300 g e relative cucciolate erano esposte a condizioni di iperossia al 60%, mentre una terza ratte gravida e cucciolata veniva mantenuta come controllo al 21% in aria ambiente secondo le pratiche di stabulazione e trattamento gia' descritte in precedenza.

3.3.1 Disegno sperimentale

Gli animali sono stati distribuiti in maniera random in otto gruppi sperimentali, con 4 soggetti per gruppo (n=4). Il Gruppo 1 e il Gruppo 2 ricevevano il trattamento placebo (anestesia, intervento chirurgico, mezzo di risospensione cellulare) ed erano sacrificati rispettivamente dopo 3 e 4 settimane dal trapianto. Gli animali dei gruppi 3 e 4 costituiscono il gruppo controllo ovvero gli esposti all'iperossia, ma non trattati e venivano sacrificati rispettivamente a 3 e a 4 settimane. Gli animali dei gruppi 5 e 6 ricevevano invece le cellule hAFS preventivamente infettate alla dose di 5 pfu/cell con il vettore adenovirale AdHCMVsp1LacZ.

3.3.2 Infezione delle cellule hAFS con il vettore adenovirale AdHCMVsp1LacZ

Le cellule hAFS da usare nel trapianto venivano infettate, secondo le procedure già descritte, ad una dose di 5 pfu/cell. Trascorse 48 ore dall'infezione erano staccate e raccolte in 80 µl di mezzo di risospensione e siero in singole dosi di almeno $1,5 \times 10^6$ cellule/dose, mantenute a 4°C in eppendorf da 0,5 ml.

3.3.3 Procedura chirurgica

Una settimana prima del trattamento (P14) le cucciolate venivano poste in aria ambiente come precedentemente descritto.

Anestesia. L'anestesia generale veniva erogata con un apparato Fluovac Isoflurano/Halotano (Harvard Apparatus Ltd, Kent, Inghilterra) mediante una maschera di assorbimento connessa all'animale. Contestualmente alla pratica anestesiológica veniva somministrato ad ogni animale del Tramadol, alla dose di 5 mg/kg i.m. (CONTRAMAL[®], Formenti, Italia) . La preanestesia veniva somministrata erogando in una camera di plastica l'isoflurano (FORANE[®], Abbott SpA, Campoverde, Italia) al 3% con O₂ (1litro al minuto). Il mantenimento delle condizioni di anestesia profonda impongono l'erogazione di Isoflurano al 1.5 - 2% con O₂ (1 litro per minuto). Il muso dell'animale viene inserito nella mascherina connessa all'unità di erogazione, mentre il vapore in eccesso viene eliminato da una seconda tubazione.

Chirurgia. Gli interventi chirurgici sono stati condotti in ambiente pulito non sterile. E' stata praticata una piccola incisione sulla parte anteriore in modo da esporre ed isolare la trachea. Mentre viene praticata una temporanea apnea mediante leggera compressione sulla gabbia toracica, una puntura effettuata nella parete anteriore della trachea utilizzando un ago 30G consente la somministrazione delle cellule hAFS precedentemente preparate alla dose di $1,5 \times 10^6$ cell secondo quanto descritto. Successivamente la ferita viene suturata con filo 5/0 e medicata con Iodopovidone tintura . Gli animali hanno ricevuto anche una singola dose di tetraciclina TERRAMYCIN[®] L. A. (Pfizer Italiana SpA, Italia).

Procedure post-trapiantologiche. Immediatamente dopo il trapianto ogni animale è stato posizionato sotto una lampada riscaldante e monitorato nei suoi parametri vitali fino al risveglio, normalmente entro 5 minuti dalla sospensione del flusso anestetico. Gli animali sono stati poi stabulati a temperatura ambiente con accesso illimitato a cibo e acqua. Nei giorni successivi al trapianto sono stati controllati il peso e la salute dell'animale, la motricità e il comportamento. Ogni animale trapiantato ha ricevuto una dose di Ciclosporina (Sandimmun, Novartis Pharma SPA, Basel, Svizzera) di 15 mg/Kg in 0.9% (wt/vol) NaCl per

3 o 4 settimane. Al termine di ogni time-point (3 e 4 settimane) gli animali venivano sacrificati con sovradosaggio di anestetico e contestuale *ex sanguinatio*.

3.3.4 Allestimento dei preparati istologici

Dopo il sacrificio veniva effettuata una perfusione *ex vivo* dei polmoni con PBS come operazione di pulizia del flusso ematico. Il polmone era quindi espantato e perfuso con un reagente preparato estemporaneamente a base di CaCl₂ 0,15 mM, saccarosio 4%, paraformaldeide 1%. I polmoni rimanevano immersi in questa soluzione o/n a 4°C. Il giorno successivo erano immersi in soluzioni a gradiente di saccarosio crescente dal 10% al 30% in paraformaldeide e conservati per altre 24 ore a 4°C. I polmoni così fissati venivano in parte congelati con miscela di ghiaccio secco e isopentano e inclusi in OCT per successiva sezione al criostato, mentre un'altra parte veniva stoccata in soluzione di formalina al 10%. Sezioni di 8 µm ottenute con il criostato venivano montate su vetrini super frost polilisinati e colorate con X-gal secondo le procedure descritte per valutare la presenza di cellule hAFS esprimenti beta galattosidasi. Contestualmente a queste sezioni venivano allestite delle preparazioni istologiche mediante inclusione in paraffina e colorazione Ematossilina-Eosina come descritto. Entrambi i preparati venivano visionati mediante microscopia ottica e valutati per gli aspetti morfologici.

3.3.5 Valutazione molecolare dell'homing delle hAFS su preparati polmonari

Per valutare la presenza di cellule staminali umane a livello polmonare in particolare a livello alveolare, viene estratto il DNA che si suppone essere umano con *Charge Switch® Forensic DNA Purification Kit* da sezioni di tessuto di 8 µm ottenute con il criostato. Successivamente, mediante una PCR duplex, vengono amplificati i frammenti di 359 del gene *cyt b* e 157 bp del 16s RNA. Gli amplificati ottenuti sono poi controllati con un'elettroforesi su gel di poliacrilammide al 12%; i campioni di origine umana presentano due bande (157 e 359 bp), che corrispondono ad entrambi i frammenti, mentre le tracce prodotte da animali presentano una sola banda (359 bp), relativa al frammento del gene *cytb*.

Dopo denaturazione di 1 minuto a 94 °C la PCR e' stata allestita con 40 cicli programmati come segue: 5 secondi a 94°C, 30 secondi a 50°C e 40 secondi a 72°C, seguiti da un allungamento 3 minuti a 72°C. La mix e' stata preparata come segue: 0.4 mM di ogni primer per il *cyt b*, 0.6 mM di ogni primer per 16S rRNA, 1.25 U Taq polimerasi (Applied Biosystems USA), 0.2 mM dNTPs, 2.5 ml 10X Taq Buffer (Applied Biosystems), in un volume finale di 25 µl

Frammento	Primer
<i>cyt.b</i> forward	5'-CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TGA AA-3'
<i>cyt.b</i> reverse	5'-GCC CCT CAG AAT GAT ATT TGT CCT CA-3'
<i>16S rRNA</i> forward	5'-CAA TTG GAC CAA TCT ATC ACC-3'
<i>16S rRNA</i> reverse	5'-GTG AGG GTA ATA ATG ACT TGT-3'

Tabella 2: primer corrispondenti ai geni *cyt B* e *16s RNA*

4. Risultati

4.1 Infezione delle cellule hAFS per valutazione dose-effetto

Le cellule hAFS sono state infettate con AdHCMVsp1LacZ o AdHCMV.EGFP, due vettori adenovirali della prima generazione. Sono stati effettuati due diversi tipi di esperimento nei quali ogni volta una popolazione di hAFS veniva esposta ad un diverso vettore. Nel primo tipo di esperimento veniva allestita un'infezione di tipo dose-effetto per valutare l'efficienza di infezione delle hAFS. Nel secondo tipo si effettuava un'analisi di tipo *time-course* per valutare il mantenimento dell'espressione delle proteine marker prodotte dai geni transdotti.

L'esperimento di dose-effetto e' stato condotto esponendo le cellule a molteplicita' di infezione crescente, da 1 a 400 pfu/cell, del vettore virale AdHCMVsp1LacZ (**Figura 1 parte a**) o AdHCMV.EGFP (**Figura 2 parte b**) e valutandone l'effetto 48 ore post-infezione.

La Figura 1 mostra i risultati ottenuti dopo colorazione delle hAFS precedentemente infettate. Alla dose di 50 pfu/cell l'efficienza di infezione sembrava interessare quasi il 100% delle cellule. A dosaggi piu' elevati, come 100 e 200 pfu/cell, si notavano delle discontinuita' nel tappeto cellulare indicando un probabile effetto tossico del virus.

4.2 Valutazione quantitativa dell'espressione della Beta-galattosidasi trasdotta

La valutazione quantitativa dell'attività beta galattosidasica trasdotta dal vettore AdHCMVsp1LacZ è stata condotta infettando le hAFS nelle stesse condizioni di quelle utilizzate per le valutazioni qualitative, ossia esponendo la popolazione cellulare al vettore a molteplicità di infezione crescente ed eseguendo il saggio specifico 48 ore post infezione. La **figura 3** mostra un incremento della quantità di proteina prodotta proporzionale alla dose virale saggiata fino ad un massimo di $65\mu\text{g}/10^6$ di proteina prodotta ottenuta alla molteplicità di infezione di 400 pfu/cell. Nella **figura 3** (parte evidenziata) si può apprezzare il particolare relativo agli effetti ottenuti con molteplicità di infezione più basse. Una evidente relazione di tipo dose-effetto si apprezza a MOI comprese fra 1 e 10 pfu/cell.

4.3 Effetto dell'infezione sulle cellule hAFS

Vitalità'. Per stabilire gli effetti dell'infezione del vettore adenovirale sulla vitalità delle hAFS si è effettuata una quantificazione mediante 7-aminoactinomicina D (7-AAD) utilizzando la citofluorimetria a flusso, a partire da una popolazione di cellule infettate a 5 pfu/cell e valutate 48 ore post-infezione. Questo test permette di determinare la vitalità delle cellule poiché il 7-AAD intercalandosi fra le basi Citosina e Guanosina del DNA cellulare altera la diffusione ortogonale della luce, e questa alterazione può venire quantificata con una misura citofluorimetrica. Nella popolazione di cellule non esposta al vettore si è misurata una vitalità del 95% (**Figura 4**), mentre in quella esposta era pari all'82% (**Figura 5**). A questa MOI il 30% delle cellule infettate è in grado di esprimere una discreta quantità di proteina beta-gal.

Staminalità'. Un altro aspetto critico valutato è stato il mantenimento delle caratteristiche di staminalità delle hAFS post-infezione. Per questo tipo di osservazione si sono comparate le popolazioni esposte con quelle non esposte ai vettori e si sono indagati eventuali cambiamenti dei parametri di tipo immunofenotipico. Non c'è stata evidenza di alcun cambiamento nell'espressione di molecole di adesione e dello stroma come CD29 e CD73 e nemmeno in quella dei marcatori tipici della staminalità come SSEA4 e OCT4 sebbene si sia evidenziato un ridotto decremento di SSEA4 nelle hAFS infettate. Nessun cambiamento è stato, inoltre, osservato nel pannello immunologico delle cellule infettate che continuavano a mantenere il proprio complesso maggiore di istocompatibilità HLA-ABC inalterato e non esprimevano quello di classe HLA-DR (**Figura 6**)

Un risultato del tutto analogo e' stato riscontrato quando l'infezione era effettuata con AdHCMV.EGFP, nelle stesse condizioni e parametri di esecuzione e valutazione dell'esperimento effettuato con il vettore AdHCMVsp1LacZ (dato non mostrato).

Time course dell'espressione genica. Visto il mantenimento di marcatori di staminalita' e proteine di adesione si e' verificata la permanenza nel tempo dell'espressione dei transgeni β Gal ed EGFP nelle popolazioni cellulari esposte ai vettori ad una MOI di 5 pfu/cell. L'esperimento prevedeva un time-course dell'espressione qualitativa dei transgeni dal giorno 2 al giorno 14. I risultati ottenuti sono mostrati nelle **figure 1 parte b** per la beta galattosidasi nella **figura 2 parte b** per l'EGFP. Sette giorni post-infezione l'espressione delle proteine marcatrici sembra aumentare a causa del loro accumulo rispetto a quanto visto a 48 ore. Al giorno 14 solamente il 10% delle cellule era ancora in grado di esprimere positività per LacZ o EGFP e questo perche' i prodotti di espressione dei geni virali transdotti si mantengono in forma episomale, ovvero transiente, essendo suscettibili di diluizione a causa della proliferazione delle cellule infettate.

Capacita' differenziativa. Il mantenimento della capacita' differenziativa delle cellule hAFS post infezione veniva valutata investigando la loro plasticita' e la possibilita' differenziativa sia verso la linea adipogenica che osteogenica (**Figura 7**) In particolare, dopo l'esecuzione di un sorting per recuperare solamente le hAFS infettate, si analizzava l'espressione di marcatori specifici nell'arco di 14 giorni per le due linee: Cbfa1 ed osteocalcina per l'osteogenesi e PPAR γ per l'adipogenesi, confrontando il risultato con l'espressione del gene costitutivo β_2 microglobulin come gene di riferimento (**Figura 9**). I fattori di trascrizione Cbfa1 e PPAR γ rimanevano accesi solo nelle fasi precoci del differenziamento, mentre elevati livelli di mRNA specifico per osteocalcina erano presenti per l'intero *follow-up*. Analoghi risultati si ottenevano esponendo le hAFS alle dosi di 20 e 50 pfu/cell che permettevano di ottenere un'efficienza di infezione prossima al 100% (**Figura 8**). Le RT-PCR sono state allestite impiegando dei primer opportunamente disegnati e schematizzati in **tabella 1**

Implementazione del modello animale di iperossia al 60%

Abbiamo verificato la capacita' di induzione di danno polmonare da iperossia esponendo ratti neonati al 60% di O₂ verso un gruppo di ratti mantenuti in condizioni di aria ambiente, ovvero al 21% di O₂. Come si apprezza nella **Figure 10/a e 10/b**, nonostante l'utilizzo di animali non barrierati, sono evidenti alcune differenze fra i soggetti mantenuti in aria ambiente e quelli esposti al gas. Mentre nei primi (**Figura 10/a**) il grado di alveolarizzazione e' pressoché normale, così come lo spessore dell'interstizio, negli esposti all'O₂ (**Figura 10/b**) si ritrovano

i tre elementi tipici della patologia respiratoria cronica: un forte ispessimento dell'interstizio, la ridotta alveolarizzazione ed estese aree enfisematose con presenza di discreti infiltrati linfocitari. Contestualmente, e' stato verificato l'impatto dell'esposizione al 60% di O₂ a livello cardiaco, epatico, renale e cerebrale (**Figura 11**). In queste condizioni non sono rilevabili grossolane differenze rispetto agli animali esposti in condizioni di aria ambiente, facendo rientrare le contenute alterazioni riscontrabili a livello epatico e renale nell'ambito di una prevedibile migrazione linfocitaria. Nel miocardio sono individuabili delle aree di compattamento e disorganizzazione con zone di edema, probabilmente dovute ad una compromessa funzionalita' polmonare in grado di riflettersi anche in questo distretto.

4.4 Trapianto di hAFS e valutazione dell' "Homing"

E' stata messa a punto una procedura di trapianto di cellule hAFS per via intratracheale utilizzando l'animale modello generato come appena descritto. In particolare, l'esposizione per due settimane al 60% di O₂ riproduce il danno cronico riscontrabile nei pazienti affetti da broncodisplasia. Gli animali sono stati divisi in due gruppi sacrificati a tre e a quattro settimane dal trapianto.

A tre settimane e' stato possibile evidenziare la presenza delle cellule hAFS marcate con AdHCMVLacZ, infettate in vitro con una MOI di 5 pfu/cell, a livello degli epitelii cilindrici che rivestono i bronchioli terminali (**Fig 12 quadro 3**). Focali localizzazioni sono state evidenziate in corrispondenza dell'interstizio e della superficie alveolare nei casi sacrificati a 4 settimane (**Fig 12 quadri 1 e 2**).

Per comprovare la presenza delle cellule hAFS a livello alveolare sono state praticate delle sezioni seriali di 8 µm sul materiale polmonare congelato degli animali risultati positivi alla colorazione per X-gal. L'esperimento prevede l'estrazione e la purificazione del DNA dei campioni in esame; quindi, tramite PCR, l'amplificazione di un frammento del gene mitocondriale *cyt b* e del gene umano *16s RNA*. Come si vede nella fotografia del gel di poliacrilammide (**Figura 14**) sono identificabili in tutti i campioni di DNA estratto dai polmoni degli animali trapiantati le due bande corrispondenti agli amplificati *16s RNA* di 157 bp e *cyt B* di 359 bp. Questo pattern e' perfettamente sovrapponibile con quello del DNA proveniente da un campione di controllo umano, mostrato sulla destra della figura.

4.5 Valutazione di un possibile effetto terapeutico

Dal punto di vista della valutazione anatomo-patologica della morfologia e dell'aspetto polmonare si può notare come negli animali valutati tre settimane dopo il trapianto compaiano evidenti progressi in termini di ripristino della alveolarizzazione. Sono, tuttavia, ancora evidenti zone di ispessimento dell'interstizio associate ad un discreto infiltrato flogistico di tipo prevalentemente linfocitario e presenza di alterazioni enfisematose sia subpleuriche che centrali (**Fig 13 quadro C**).

Gli stessi progressi, in forma più chiara ed evidente, sono evidenziabili nel gruppo di animali trattato per quattro settimane. In questo caso, l'ispessimento dell'interstizio si riduce progressivamente, la presenza di elementi flogistici diventa sempre più rara, il recupero dell'alveolarizzazione appare consistente, mentre le alterazioni di tipo enfisematose sono rare e localizzate quasi esclusivamente in sede subpleurica. Inoltre, a livello degli alveoli è facilmente distinguibile il pneumocita di tipo I con un nucleo appiattito e fusato rispetto alla cellula di Clara caratterizzata da un orletto citoplasmatico verticalizzato rispetto alla sede di impianto e con una morfologia cilindrico-cubica; aspetti morfologici che non erano assolutamente distinguibili a tre settimane dal trapianto (**Figura 13 quadro D**).

Nei soggetti che hanno ricevuto il placebo il recupero dell'alveolarizzazione è presente anche se in misura nettamente inferiore rispetto ai trattati e nonostante la presenza sia di ispessimento dei setti, sia di flogosi, che delle lesioni enfisematose, più marcati nella terza settimana che nella quarta settimana post-trapianto (**Figura 13 quadri A e B**).

I casi non trattati, invece, hanno evidenziato un ridotto tentativo di alveolarizzazione e la persistenza di enfisema, di flogosi e di ispessimento dei setti e non si è evidenziata alcuna differenza tra la terza e la quarta settimana (**Figura 13 quadri E e F**).

Per quantificare il possibile effetto terapeutico a 3 e 4 settimane post trapianto abbiamo valutato la percentuale dello spazio alveolare, il numero degli alveoli e la RAC (specificata) come conta per mm^2 . **Il Grafico 1** mette in comparazione i risultati complessivi della percentuale dello spazio alveolare ottenuti negli animali trapiantati e seguiti per 3 e 4 settimane verso quelli che non hanno ricevuto il trapianto. Come si può vedere nel gruppo dei trapiantati seguiti per 3 settimane ($n=4$) e nel gruppo degli animali seguiti per 4 settimane ($n=4$) l'incremento della percentuale dello spazio alveolare è del 42,90% dopo 3 settimane e del 59,52% al termine della quarta settimana di follow up.

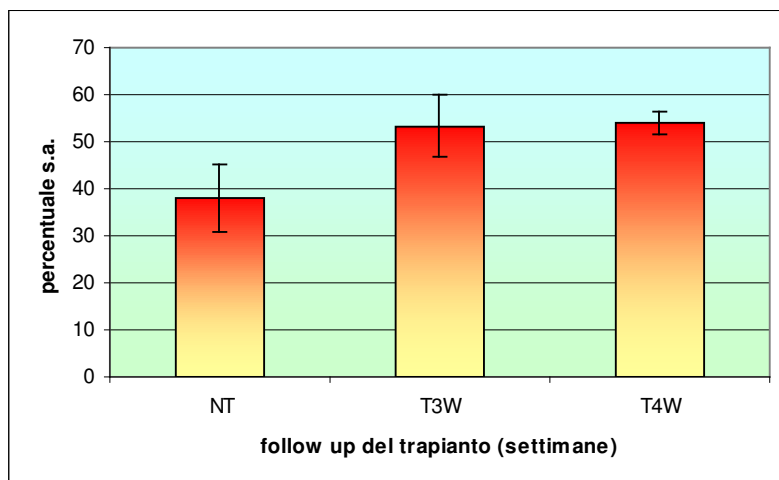


Grafico 1: valutazione della percentuale dello spazio alveolare in funzione del follow up post trapianto.

NT= non trapiantati; T3W=trapiantati seguiti per 3 settimane; T4W=trapiantati e seguiti per 4 settimane.

La differenza fra le medie osservate e' significativa per $p < 0,05$

Il Grafico 2 compara i risultati complessivi del numero degli alveoli contati negli animali trapiantati e seguiti per 3 e 4 settimane verso quelli che non hanno ricevuto il trapianto. Si nota come il gruppo di animali a 3 settimane ($n= 4$) e nel gruppo seguito per 4 settimane ($n=4$) presenti un incremento del numero degli alveoli pari al 110% dopo la terza settimana e del 175% al termine della quarta.

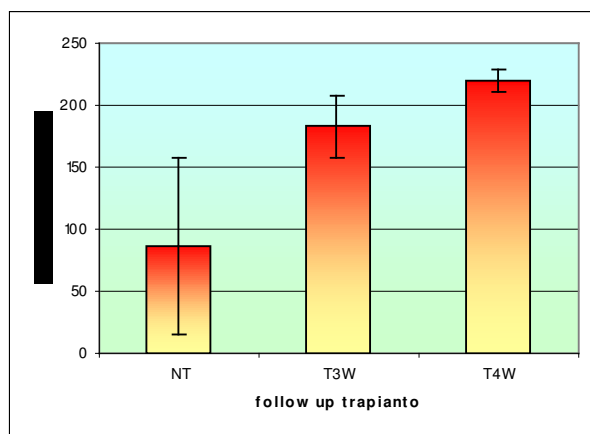


Grafico 2: valutazione del numero degli alveoli in funzione del follow up post trapianto.

NT= non trapiantati; T3W=trapiantati seguiti per 3 settimane; T4W=trapiantati e seguiti per 4 settimane.

La differenza fra le medie osservate e' significativa per $p < 0,05$

Il Grafico 3 illustra i progressi in termini di RAC ottenuti negli animali seguiti per 3 e 4 settimane post trapianto verso i non trapiantati. Anche in questo contesto nei trapiantati si evidenziano incrementi medi rispetto ai non trattati del 47,90% al termine della terza settimana e del 116% al termine della quarta.

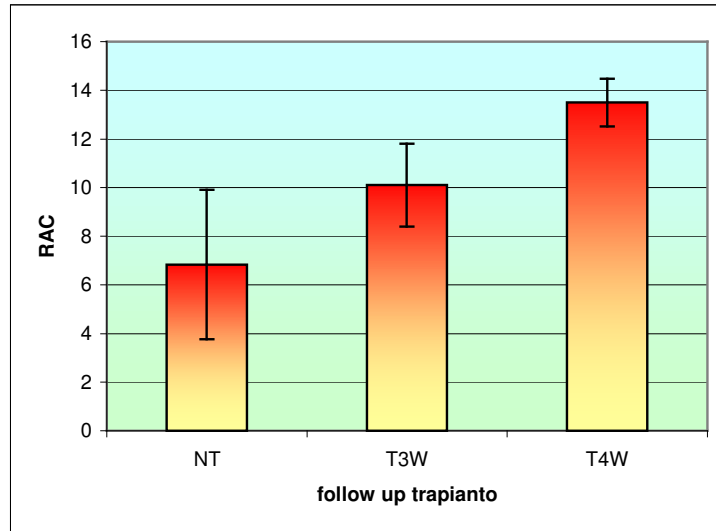


Grafico 3: valutazione della RAC in funzione del follow up post trapianto.
 NT= non trapiantati; T3W=trapiantati seguiti per 3 settimane; T4W=trapiantati e seguiti per 4 settimane.
 La differenza fra le medie osservate e' significativa per $p < 0,05$

Il Grafico 4 confronta i dati della superficie alveolare espressi in mm^2 nei gruppi di animali trapiantati e seguiti per 3 e 4 settimane. Analogamente a quanto osservato per i tre parametri precedenti anche considerando la superficie alveolare si nota come a 4 settimane l'incremento medio sia del 240%.

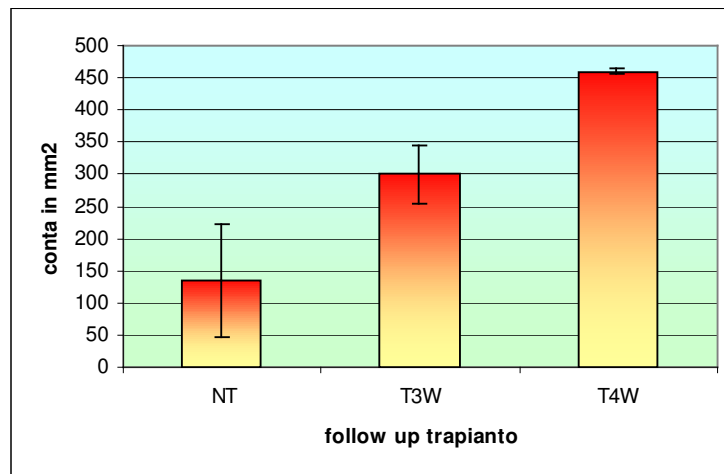


Grafico 4: valutazione della superficie alveolare in funzione del follow up post trapianto.
 NT= non trapiantati; T3W=trapiantati seguiti per 3 settimane; T4W=trapiantati e seguiti per 4 settimane.
 La differenza fra le medie osservate e' significativa per $p < 0,05$

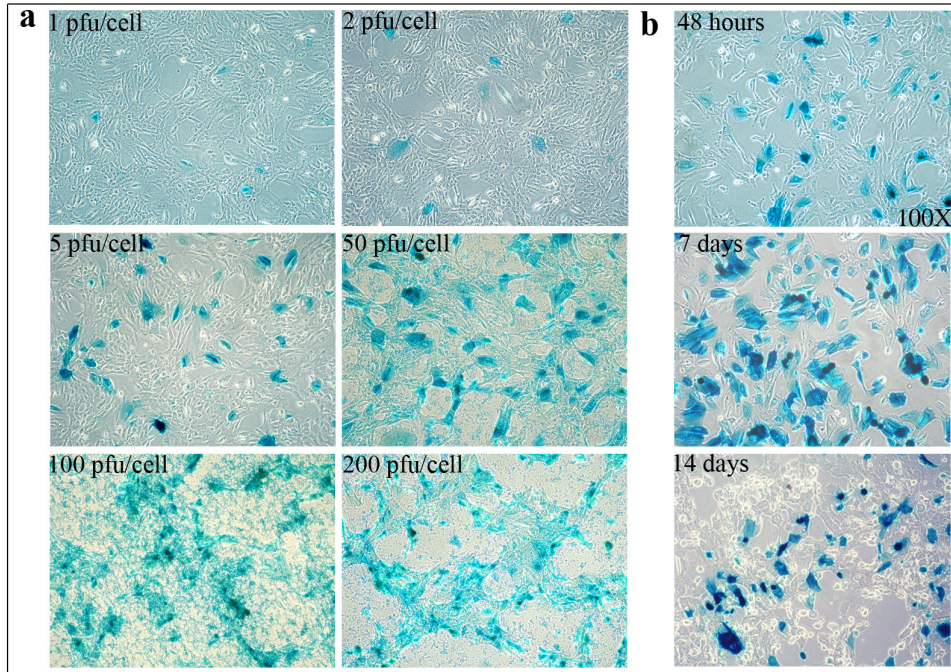


Figura 1: espressione qualitativa dose-effetto della Betagal nelle hAFS infettate con il vettore AdHCMVLacZ e time-course dell'espressione della proteina da 2 a 14 giorni post infezione

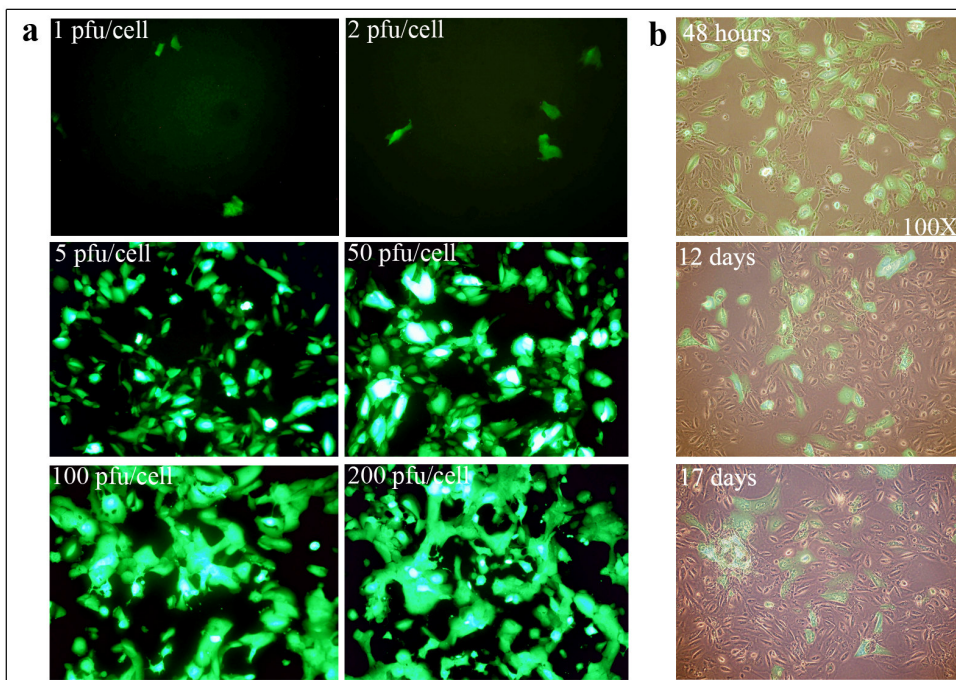


Figura 2: espressione qualitativa dose-effetto dell'EGFP delle hAFS infettate con il vettore AdHCMV.EGFP e time-course dell'espressione della proteina da 2 a 17 giorni post infezione

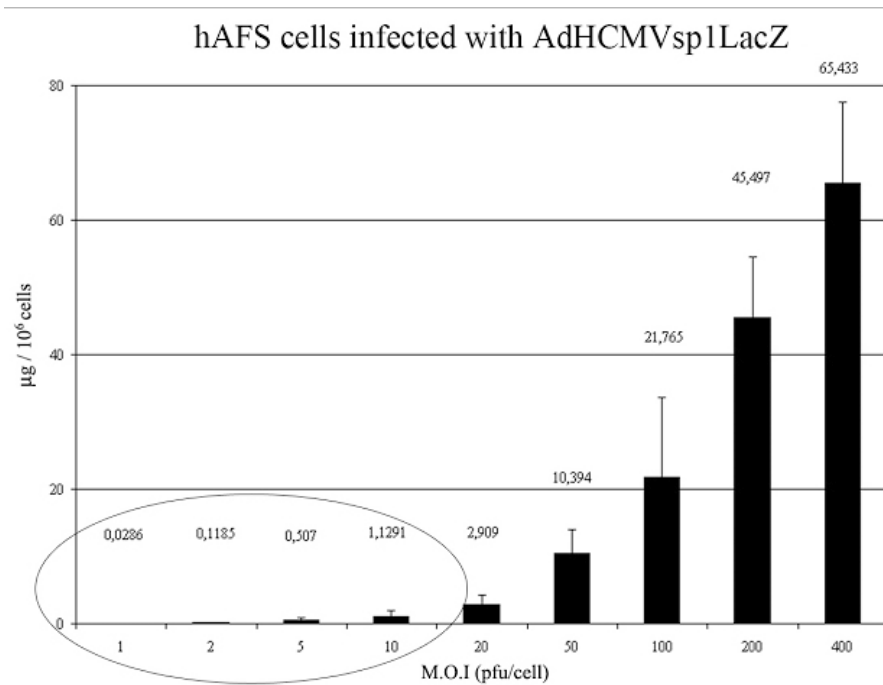


Figura 3: espressione quantitativa dell'attività Beta-galattosidasi delle hAFS infettate con AdHCMVLacZ espressa in microgrammi di proteina per milione di cellule

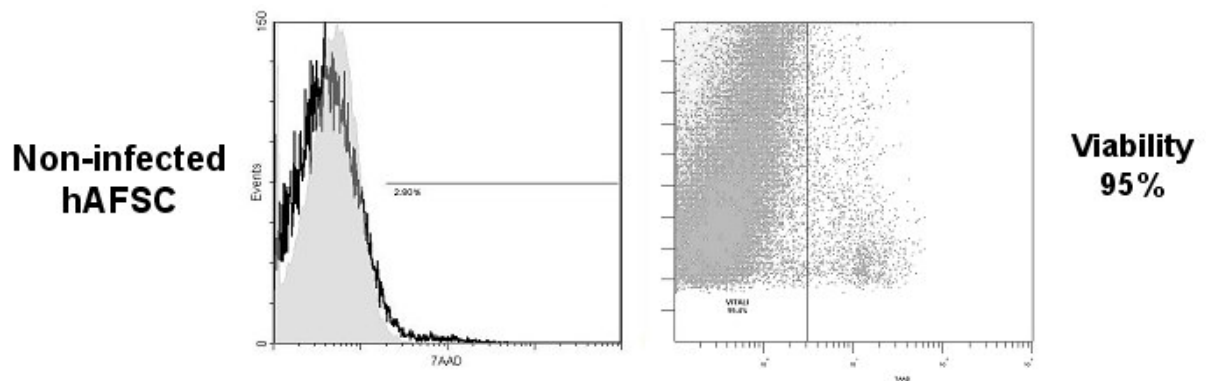
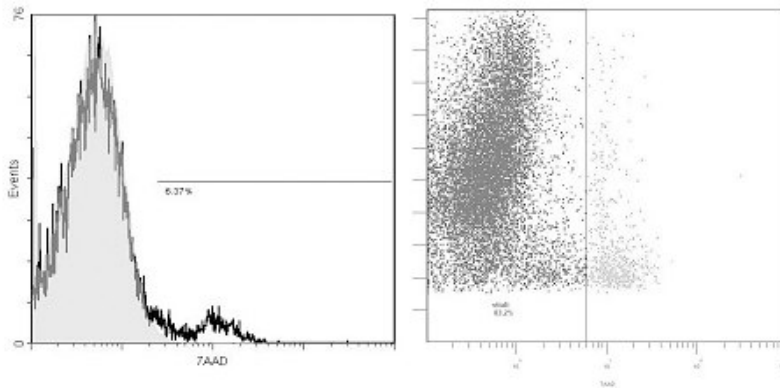


Figura 4: citogramma relativo alla vitalità delle hAFS native non infettate.

**Infected
hAFSC
(5 pfu/cell)
48 h post-
infection**



**Viability
82%**

Figura 5: citogramma relativo alla vitalita' delle cellule hAFS native e infettate con i vettori virali a 5 pfu/cell.

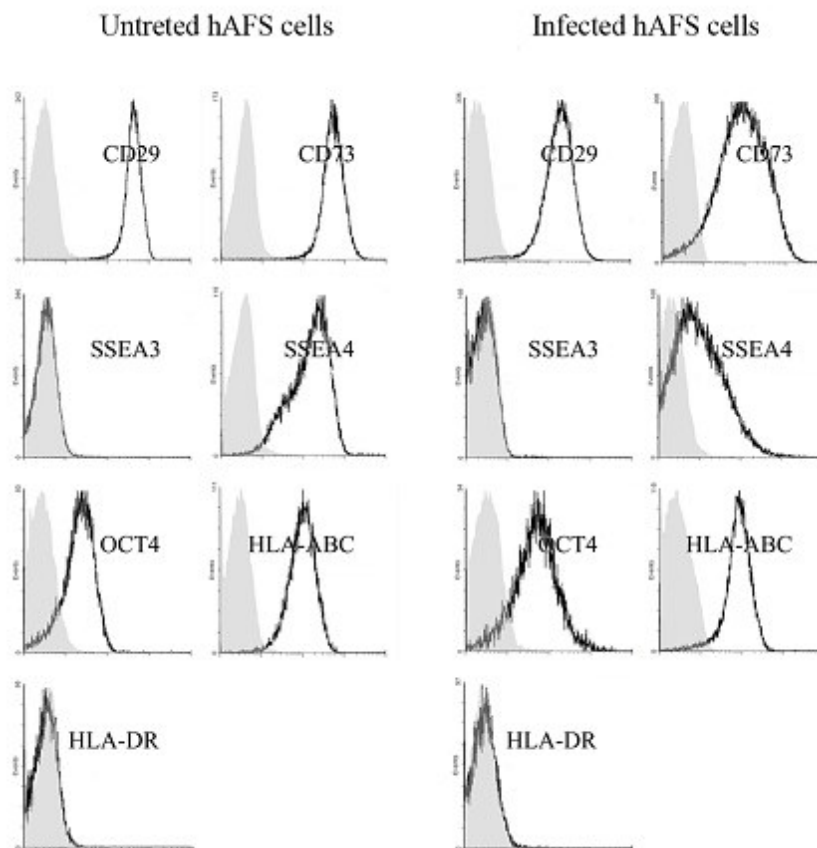


Figura 6: Citogrammi degli antigeni di superficie espressi dalle hAFS infettate con AdHCMV.EGFP e AdHCMLacZ a 5 pfu/cell e pannello del complesso maggiore di istocompatibilita' di classe 1 e 2

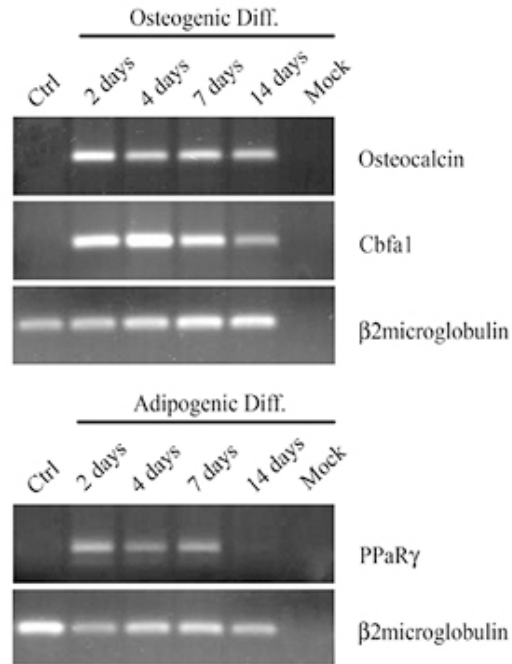


Figura 7: PCR del DNA delle hAFS infettate a 5 pfu/cell con AdHCMV.EGFP e time-course dell'espressione dei geni di differenziamento

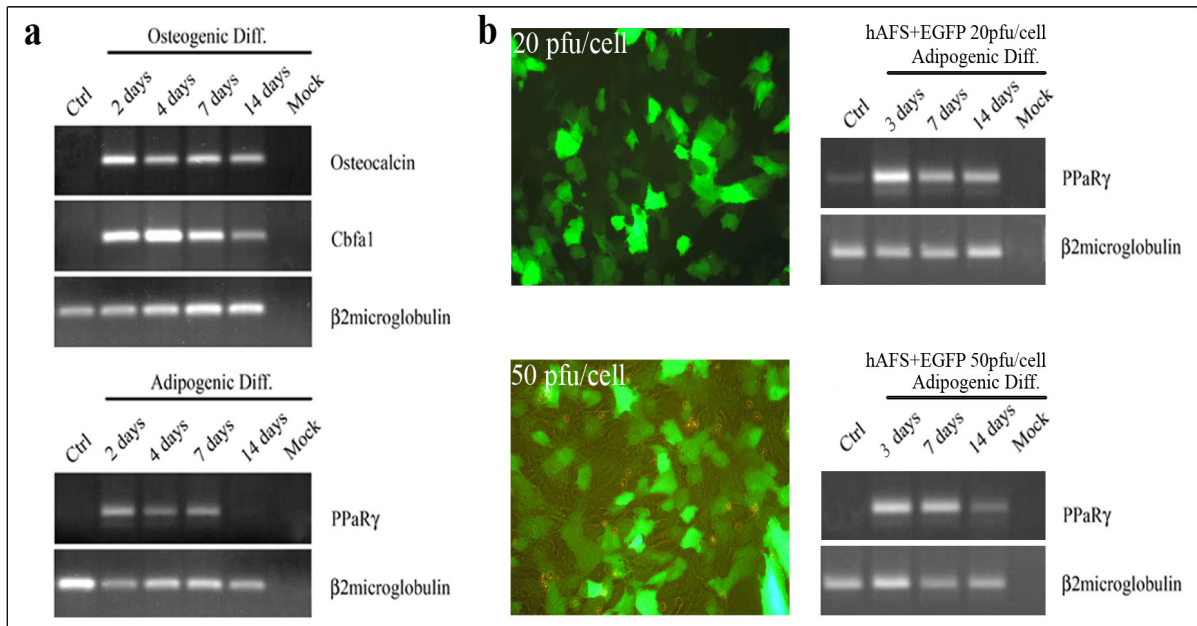


Figura 8: PCR del DNA delle hAFS infettate a 20 e 50 pfu/cell con AdHCMV.EGFP e time-course dell'espressione dei geni di differenziamento

Primers	Sequences	Product size
β 2microglobulin	5'-GCT GTG CTC GCG CTA CTC T-3'	151 bp
	5'-CAA CTT CAA TGT CGG ATG GAT G-3'	
PPaR γ	5'-TCA GTG GAG ACC GCC CA-3'	152 bp
	5'-TCT GAG GTC TGT CAT TTT CTG GAG-3'	
Lpl	5'-CTG GTC GAA GCA TTG GAA T-3'	131 bp
	5'-TGT AGG GCA TCT GAG AAC GAG-3'	
Cbfa1	5'-AGA TTT GTG GGC CGG AGT G-3'	301 bp
	5'-CAT CAA GCT TCT GTC TGT GC TT-3'	
Osteocalcin	5'-TGA AGA GAC CCA GGC GCT A-3'	125 bp
	5'-GAT GTG GTC AGC CAA CTC GTC-3'	

Tabella 1: sequenze dei primer impiegati per la PCR di verifica del differenziamento

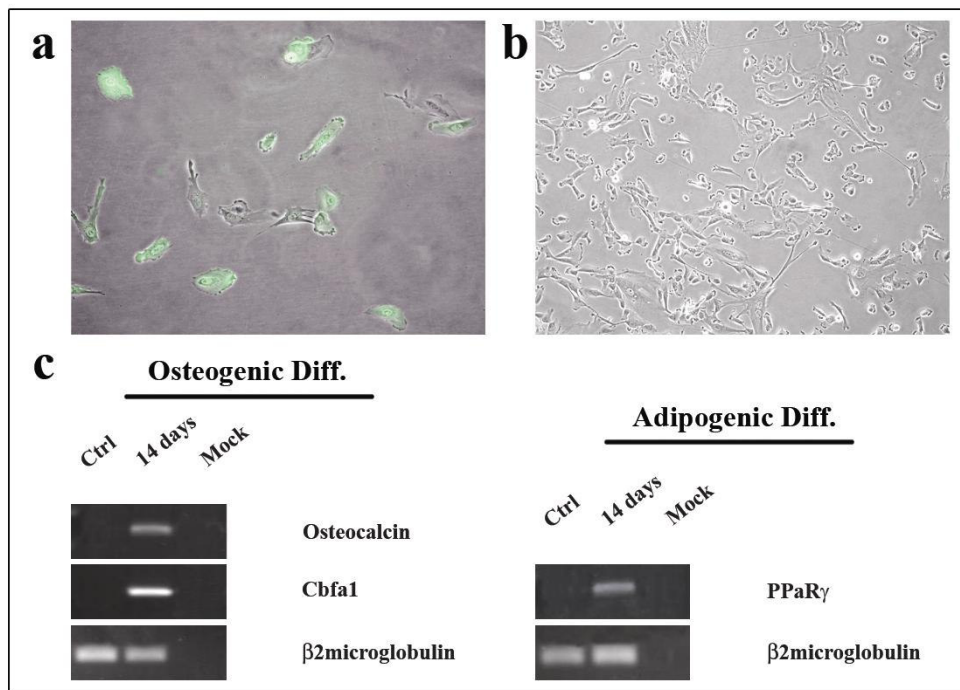


Figura 9: Cell-sorting delle hAFS infettate a 5 pfu/cell con AdHCMV.EGFP e PCR per verifica differenziamento fino a 14 giorni post-infezione

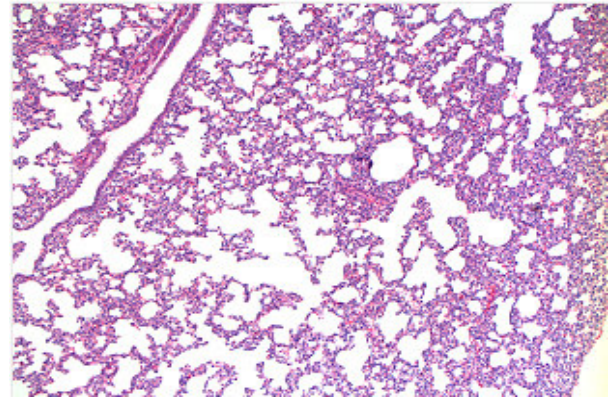
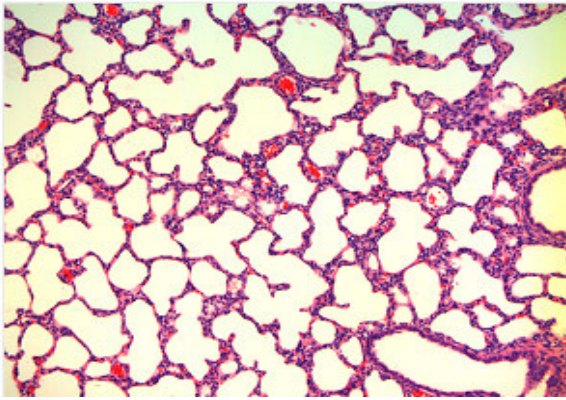
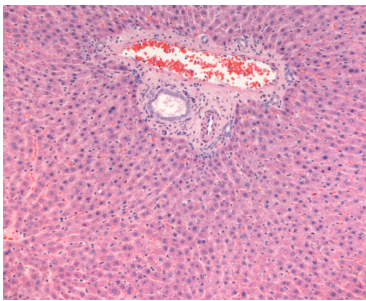
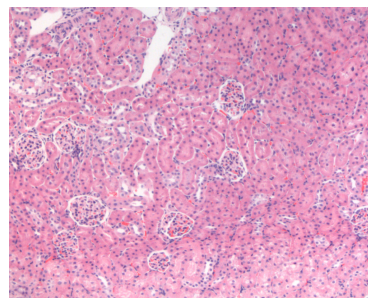


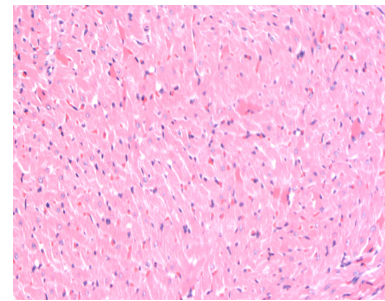
Figura 10/A: tessuto polmonare di ratto mantenuto per due settimane in condizioni di normossia (21% O₂) **Figura 10/B:** tessuto polmonare di ratto mantenuto per due settimane in condizioni di iperossia (60% O₂)



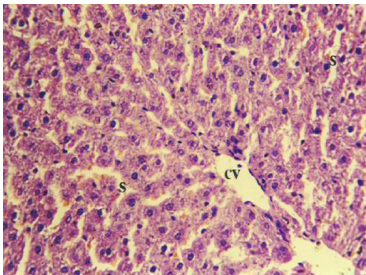
1



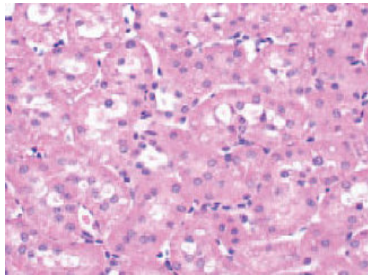
2



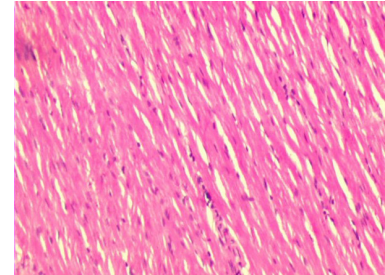
3



4



5



6

Figura 11:

quadri 1-2-3 = tessuti di fegato, rene e cuore provenienti da animali esposti 14 giorni al 60% di O₂

quadri 4-5-6 = tessuti di fegato, rene e cuore provenienti da animali mantenuti al 21 % di O₂

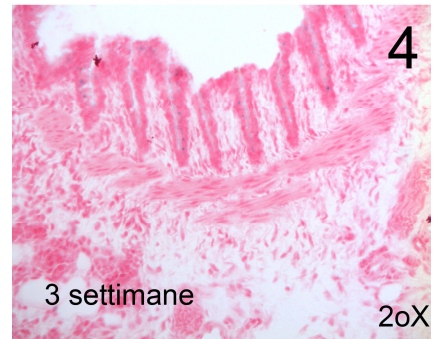
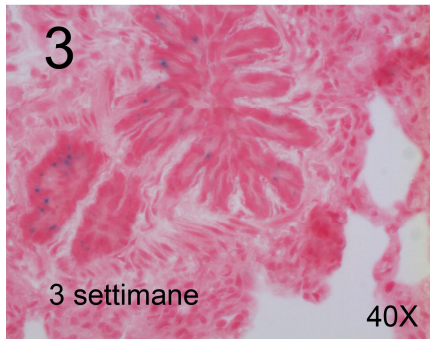
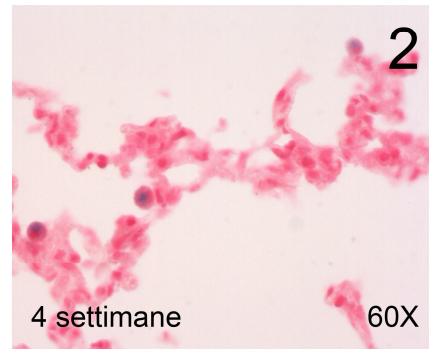
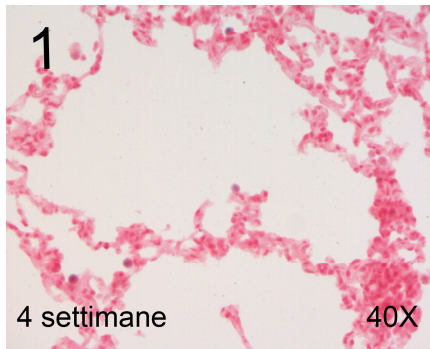


Figura 12: diffusione delle cellule hAFS infettate dal virus AdHCMVsp1LacZ.

Quadri 1 e 2: situazione a 4 settimane a diverso ingrandimento

Quadri 3 e 4: situazione a 3 settimane a diverso ingrandimento

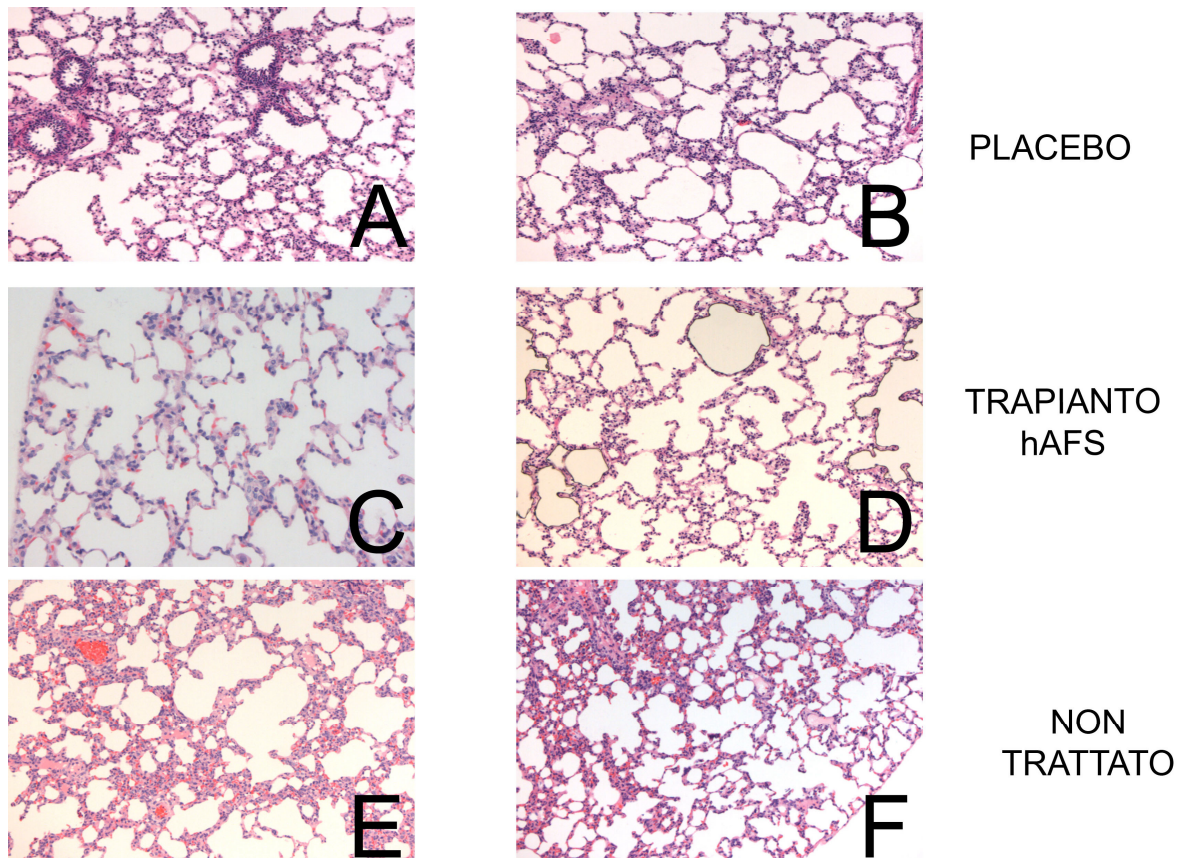


Figura 13: possibile effetto terapeutico negli animali trapiantati con hAFS.

Quadri A e B = situazione a 3 e 4 settimane post trapianto in animali che hanno ricevuto il placebo

Quadri C e D = situazione a 3 e 4 settimane post trapianto in animali che hanno ricevuto le hAFS

Quadri E e F = situazione a 3 e 4 settimane in animali esposti al 60% di O₂ che non hanno ricevuto il trapianto di hAFS

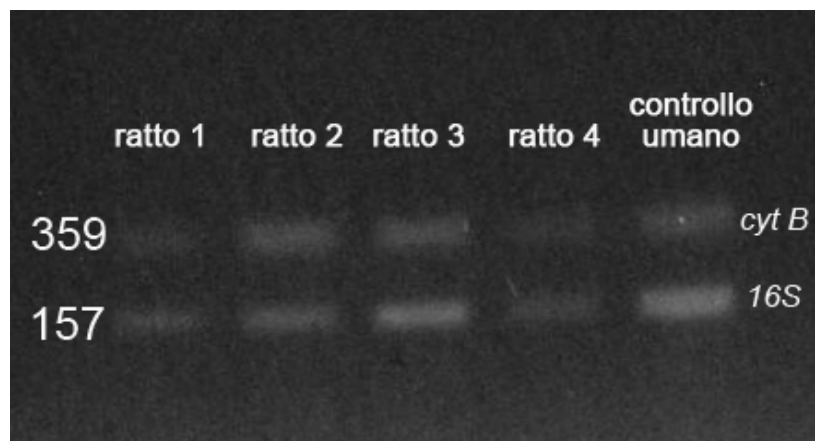


Figura 14: PCR duplex effettuata sulle sezioni dei polmoni dei ratti trapiantati con hAFS.

Ratto1, ratto2, ratto3, ratto4 = ratti che hanno ricevuto il trapianto

Controllo umano = DNA di controllo umano

5. Discussione

La Broncodisplasia Polmonare e' un' importante malattia respiratoria cronica e rappresenta oggi una rilevante causa di mortalita' e morbidita' nel neonato pretermine. La malattia, attualmente classificata in due forme, "*vecchia e nuova BPD*", presenta sempre un quadro comune costituito in generale da arresto del processo maturativo del polmone e, in particolare, da mancanza di alveolarizzazione, presenza di aree enfisematose, estesi fenomeni flogistici con annessi infiltrati linfocitari e danni indotti dalle specie reattive dell'ossigeno, intensamente utilizzato in terapia intensiva per il mantenimento della funzione respiratoria. Non esistono attualmente terapie risolutive, ma soltanto di tipo sintomatico. La sopravvivenza, aumentata di molto negli ultimi anni, si raggiunge da un lato grazie alla disponibilita' di strutture ospedaliere in grado di gestire pazienti impegnativi come i neonati pretermine e, dall'altro, con l'impiego di massicce dosi di farmaci corticosteroidi e con l'applicazione di terapie combinate a base di anti leucotrienici e β_2 -agonisti in grado di spegnere e di lenire gli effetti della flogosi scatenata dai processi infiammatori e, in ultimo, mediante somministrazione di preparazioni artificiali a base di surfattante.

Ricerche degli ultimi anni hanno dimostrato come l'insorgenza della malattia – *vecchia BPD* – non sia soltanto legata a fattori meccanici in parte riconducibili al barotrauma indotto da ossigenoterapia ad alte concentrazioni, da ventilazione meccanica spesso aggressiva e dall'intubazione tracheale: oggi, soprattutto per l'uso del surfattante suppletivo e di tecniche ventilatorie meno invasive, la *nuova BPD* sembra maggiormente legata alla prematurità estrema, alla dilatazione alveolare, alla mancanza di neoangiogenesi, fattori questi in correlazione con anomalie o predisposizioni di carattere genetico.

Per lo studio della patologia e di possibili applicazioni terapeutiche sono stati messi a punto nel corso degli anni diversi modelli animali presentanti un quadro simile alla BPD, indotta da regimi di iperossia o da somministrazione di bleomicina. A causa dell'enorme complessita' nella gestione di trial pre-clinici in animali ad alto indice neurologico, l'opinione comune sembra quella di spostare l'attenzione verso l'impiego di un modello murino ottenuto o mediante esposizione a concentrazioni variabili di O_2 o a somministrazione intratracheale di bleomicina e derivati. Questo modello, infatti, e' in grado da un lato di semplificare l'aspetto logistico e dall'altro di mimare fedelmente gli aspetti principali della patologia umana. La tossicita' della bleomicina e i suoi pesanti effetti collaterali ci hanno spinto a preferire l'implementazione del modello dovuto a esposizione al 60% di O_2 . La disponibilita' di una

nuova attrezzatura denominata Oxicycler consente di applicare questi regimi di iperossia in tutta sicurezza per gli operatori e semplifica di molto i passaggi relativi alla gestione e al trattamento degli animali anche in funzione di successive fasi di elaborazione di schemi terapeutici a carattere sperimentale.

In particolare, il presente progetto di dottorato prevede l'applicazione di cellule staminali del fluido amniotico (hAFS) di recente caratterizzazione tramite somministrazione intratracheale. Queste cellule presentano delle caratteristiche genotipiche e differenziative che le rendono molto vicine alle cellule staminali embrionali pur essendo di semplice reperibilità e, in parte, esenti da problemi etici, risultando ottenibili da campioni di liquido amniotico provenienti da analisi routinarie di amniocentesi. Inoltre, a differenza delle cellule staminali embrionali non sembra diano luogo alla formazione di teratomi. Infine, rispetto a quelle multipotenti di derivazione mesenchimale di limitata capacità proliferativa e differenziativa, le hAFS appaiono in grado di espandersi velocemente e senza necessità di particolari accorgimenti per la loro coltura. Nel presente progetto per la prima volta abbiamo studiato la capacità di vettori adenovirali umani di infettare le cellule hAFS e di trasdurre un gene marcatore come LacZ o EGFP. Questi vettori sono di facile ottenimento, si possono concentrare in stock ad alto titolo e ad alto grado di purezza. Considerato il loro blando pericolo biologico (sono una delle comuni cause del raffreddore) si possono considerare degli ottimi strumenti di studio e indagine. È stato possibile identificare una chiara relazione di tipo dose-risposta fra concentrazioni scalari di vettore da 1 a 200-400 pfu/cell e percentuale di cellule esprimenti LacZ ed EGFP. Ad una molteplicità di infezione di 5 pfu/cell il monostrato cellulare si infettava con una percentuale di circa il 50%. Era, inoltre, possibile evidenziare, sia sotto il profilo microscopico che antigenico, il mantenimento a 48 ore post-infezione della capacità vitale e replicativa delle cellule infettate. Questo risultato si otteneva sia in cellule infettate con il vettore esprimente il LacZ che in quelle infettate con il vettore esprimente il gene EGFP. Inoltre, a differenza di quanto osservato in lavori precedenti che avevano saggiato l'efficienza di infezione di cellule staminali mesenchimali ed embrionali, non è stato necessario l'impiego di vettori adenovirali modificati in modo tale da permettere una maggiore interazione recettoriale e in ultimo una più elevata efficienza di penetrazione. Impiegando, infatti, vettori adenovirali standard con knob non modificati è stata ottenuta in questo caso un'elevata efficienza di infezione, di molto superiore a quella osservata dopo infezione delle staminali mesenchimali con vettori opportunamente modificati. Questo effetto è probabilmente riconducibile all'elevata espressione dei recettori necessari all'interazione fra cellula e virus come coxsackievirus e adenovirus receptor (CAR) e α_v integrine.

L'infezione con adenovirus di prima generazione può scatenare importanti reazioni di tipo immunitario in parte dovute all'espressione sulla superficie cellulare di antigeni virali. Per questo abbiamo valutato il profilo del complesso maggiore di istocompatibilità di classe II (HLA-DR) evidenziandone tuttavia la negatività 48 ore post-infezione, mentre non è stata riscontrata alcuna alterazione dell'espressione delle molecole HLA-ABC del complesso maggiore di istocompatibilità di classe I.

Abbiamo dimostrato come l'infezione a bassa molteplicità di infezione non sia in grado di alterare gli antigeni cellulari di superficie $\beta 1$ integrin e SH2/SH3 espressi nella stessa misura di quelli delle cellule non infettate. Analogo risultato è stato ritrovato valutando il mantenimento dell'espressione di antigeni cellulari marcatori di staminalità come OCT4 e SSEA4, quest'ultimo leggermente alterato per cause ancora poco chiare.

Infine, ci siamo preoccupati di verificare il mantenimento delle capacità differenziative delle cellule infettate ricercando i fattori di espressione caratteristici delle linee adipogeniche ed osteogeniche. Questo aspetto è ritenuto cruciale in vista di un possibile impiego di cellule infettate in trial di tipo trapiantologico e di medicina rigenerativa. Infatti, alcuni studi recenti hanno evidenziato come cellule staminali mesenchimali infettate con vettori adenovirali perdano la loro capacità differenziativa verso la linea adipogenica. Questo effetto è completamente opposto a quello da noi osservato poiché le hAFS infettate preservano il loro potenziale differenziativo in entrambe le linee adipogeniche ed osteogeniche come testimonia l'espressione di specifici marcatori, quali PPAR γ e Cbfa1 per la linea adipogenica, e Osteocalcina per quella osteogenica, fino a 16 giorni post-infezione. Analogo risultato è stato rilevato nelle cellule infettate a molteplicità di infezione da 20 a 50 pfu/cell anche se a queste dosi è possibile rilevare un rilevante ritardo nell'induzione e nell'espressione dei marcatori del differenziamento. Sulla base di queste evidenze si può dedurre che per quanto riguarda possibili applicazioni in trial pre-clinici di terapia cellulare-genica la molteplicità di infezione che meglio offre un compromesso in termini di capacità differenziativa, di vitalità cellulare ed espressione del gene trasdotto sia compresa fra 5 e 10 pfu/cell.

Il limite di un sistema adenovirale di prima generazione consiste nella transiente persistenza del prodotto di transduzione genica che rimane espresso a livello citoplasmatico per poche settimane oltre le quali, a causa dei processi di divisione cellulare, viene completamente diluito. Sarà necessario, in futuro, verificare altre tipologie di vettori sia adenovirali della nuova generazione che chimerici adeno-retrovirali o adeno-associati. Questi ultimi due, infatti, potrebbero combinare la straordinaria efficienza di infezione con la capacità di generare un retrovirus in grado di integrarsi nel genoma della cellula infettata, dando così la

possibilita' di mantenere attivo il prodotto di trasduzione anche nella progenie delle cellule staminali per diverse generazioni.

Il progetto qui presentato prevedeva la contemporanea implementazione di un modello animale da iperossia in grado di riprodurre nel ratto condizioni e caratteristiche tipiche della broncodisplasia umana. Abbiamo condotto una valutazione preliminare esponendo ratti neonati per due settimane al 60% di O₂ seguite da una di ripresa in aria-ambiente (21% di O₂), con lo scopo di verificare la validità del modello di base da utilizzare per successivi trial pre-clinici. Il quadro offerto dalle analisi istologiche effettuate sui polmoni sono risultate in accordo con quanto osservato in lavori precedentemente descritti e con cio' che si ritrova nel paziente prematuro umano ovvero la presenza a 21 giorni dalla nascita di scarsa alveolarizzazione, estesi fenomeni flogistici, interstizio ispessito, aree enfisematose e di extravasazione con moderato infiltrato linfocitario. I neonati, rispetto ai controlli mantenuti in condizioni di normossia, risultavano all'aspetto piu' deboli, di minor peso e di contenute dimensioni. E' stata tentata anche una valutazione del tutto generale dell'impatto dell'iperossia in altri organi quali il cuore, il fegato, il rene e il cervello. Mentre in fegato e rene, le scarse alterazioni evidenziabili sono riconducibili ad un quadro generale di sofferenza polmonare in grado di scaricarsi anche a distanza su questi distretti, nel cuore sono presenti delle alterazioni sicuramente piu' importanti dovute nel caso del miocardio ad una evidente presenza di scompenso causato indubbiamente da alterata funzionalita' polmonare. Nel cervello (dati non mostrati) cominciano a formarsi dei foci di proliferazione a livello sub-corticale e di sofferenza cellulare in quella corticale, dovuti probabilmente alla ridotta entita' dello scambio ossigeno-anidride carbonica che normalmente viene garantito da una componente alveolare intatta.

La fase successiva del progetto e' coincisa con la somministrazione di cellule staminali del fluido amniotico opportunamente marcate *in vitro* con vettori adenovirali esprimenti il gene marcatore LacZ. La procedura scelta per effettuare il trapianto e' stata quella della somministrazione intratracheale evidentemente meno invasiva e piu' efficace per favorire l'homing e l'attecchimento delle cellule in profondita' nel distretto polmonare, con particolare riferimento all'ambito bronchiolare ed alveolare. Praticando una piccola incisione in grado di mettere a nudo la trachea, circa 1,5 milioni di cellule sono state veicolate mediante una iniezione di breve durata tra la compagine cartilaginea interposta fra disco e disco. La sopravvivenza a poche ore dal termine della pratica chirurgica si attesta attorno al 90%. Gli animali, nelle giornate successive al trapianto e per l'intera durata del trial (3 o 4 settimane) hanno ricevuto la ciclosporina come immunosoppressore. Le indagini che abbiamo condotto

al termine del follow up offrono un pannello chiaro di cio' che succede post-trapianto. A 3 settimane e' stato possibile evidenziare la presenza delle cellule hAFS marcate con AdHCMVLacZ a livello degli epiteli cilindrici che rivestono i bronchioli terminali. Solo focali localizzazioni sono state evidenziate in corrispondenza dell'interstizio e della superficie alveolare. In modo evidente, a quattro settimane si ritrovano probabili cellule hAFS colorate a livello alveolare e nell'interstizio. Molto interessante e' la persistenza dell'espressione genica fino a 3 settimane e in diluizione, come previsto, nella quarta settimana. Inoltre, analisi di biologia molecolare effettuate amplificando la coppia di geni umani cytB e 16s RNA a partire da campioni di DNA estratti da sezioni seriali di tessuto polmonare murino hanno confermato la presenza di materiale umano in misura non superiore all'1 forse 1,5%. Anche in questo caso ci troviamo di fronte ad un risultato che sta emergendo nel campo del trapianto di cellule staminali: a fronte di ingenti quantitativi di cellule veicolate, solamente poche raggiungono i distretti periferici nei quali il danno appare piu' evidente. Potrebbe essere necessario in futuro prolungare la durata del follow-up procedendo con cellule marcate in modo piu' stabile. Oltre alla verifica dell'homing e dell'attecchimento abbiamo cercato di quantificare un possibile effetto terapeutico indotto dalla presenza delle cellule hAFS. Dal punto di vista della valutazione anatomo-patologica del polmone si puo' notare come negli animali che hanno ricevuto il trapianto e sono stati valutati dopo tre settimane compaiano evidenti progressi in termini di ripristino della alveolarizzazione anche se sono ancora evidenti zone di ispessimento dell'interstizio associate ad un discreto infiltrato flogistico di tipo prevalentemente linfocitario e presenza di alterazioni enfisematose sia subpleuriche che centrali.

Gli stessi progressi, in forma piu' chiara ed evidente, sono evidenziabili nel gruppo di animali trattato per quattro settimane. In questo caso l'ispessimento dell'interstizio si riduce progressivamente, la presenza di elementi flogistici diventa sempre piu' rara, il recupero dell'alveolarizzazione appare consistente mentre le alterazioni di tipo enfisematose sono rare e localizzate quasi esclusivamente in sede subpleurica. Inoltre, a livello degli alveoli e' facilmente distinguibile il pneumocita di tipo I con un nucleo appiattito e fusato rispetto alla cellula di Clara caratterizzata da un orletto citoplasmatico verticalizzato rispetto alla sede di impianto e con una morfologia cilindrico-cubica; aspetti morfologici che non erano assolutamente distinguibili a tre settimane dal trapianto.

Nei soggetti che hanno ricevuto il placebo il recupero dell'alveolarizzazione e' presente anche se in misura nettamente inferiore rispetto ai trattati e nonostante la presenza sia di ispessimento dei setti, sia di flogosi, che delle lesioni enfisematose, piu' marcati nella terza

settimana che nella quarta settimana post-trapianto. I casi non trattati, invece, hanno evidenziato un ridotto tentativo di alveolarizzazione e la persistenza di enfisema, flogosi e di ispessimento dei setti e non si è evidenziata alcuna differenza tra la terza e la quarta settimana. Questo probabilmente rientra da un lato nell'avvio di normali tentativi di compensazione del danno con reclutamento della compagine delle cellule staminali adulte residenti. Dall'altro la differenza che si osserva nei trattati potrebbe essere forse spiegata con l'attivazione di segnali rilasciati dalle cellule staminali umane in grado di mobilitare ulteriori pool di cellule staminali residenti e di influenzare più velocemente il differenziamento verso linee progenitrici di pneumociti alveolari di tipo II, piuttosto che di tipo I. Nell'insieme questi risultati incoraggiano ulteriori future valutazioni che potrebbero riguardare la caratterizzazione di questi progenitori e la verifica del processo differenziativo verso linee adulte. Rimane da valutare, infine, il ruolo della componente angiogenica, nell'innescare di processi rigenerativi, come quelli da noi osservati, e quali mediatori o fattori potrebbero a loro volta essere rilasciati da strutture cellulari di nuova formazione. L'approfondimento di queste problematiche assieme all'aumentata disponibilità di quantitativi di cellule hAFS in futuro, potrebbe significare una fase di notevole progresso nel campo della terapia genica e cellulare applicata alle patologie respiratorie a carattere cronico come asma e fibrosi cistica.

6. Bibliografia

Abman SH.

Recent advances in the pathogenesis and treatment of persistent pulmonary hypertension of the newborn.

Neonatology. 2007;91(4):283-90. Epub 2007 Jun 7.

Albertine KH, Wang ZM, Michael JR.

Expression of endothelial nitric oxide synthase, inducible nitric oxide synthase, and endothelin-1 in lungs of subjects who died with ARDS.

Chest. 1999 Jul;116(1 Suppl):101S-102S.

Albertine KH, Jones GP, Starcher BC, Bohnsack JF, et al.

Chronic lung injury in preterm lambs. Disordered respiratory tract development.

Am J Respir Crit Care Med. 1999 Mar;159(3):945-58.

Allen J, Zwerdling R, Ehrenkranz R, Gaultier C, et al.

Statement on the care of the child with chronic lung disease of infancy and childhood.

Am J Respir Crit Care Med. 2003 Aug 1;168(3):356-96.

Atala A.

Tissue engineering and regenerative medicine: concepts for clinical application.

Rejuvenation Res. 2004 Spring;7(1):15-31.

Bancalari E, Claure N, Sosenko IR.

Bronchopulmonary dysplasia: changes in pathogenesis, epidemiology and definition.

Semin Neonatol. 2003 Feb;8(1):63-71. Review.

Belik J, Pan J, Jankov RP, Tanswell AK.

Bronchial epithelium-associated pulmonary arterial muscle relaxation in the rat is absent in the fetus and suppressed by postnatal hypoxia.

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2005 Feb;288(2):L384-9.

Bland RD, Albertine KH, Carlton DP, Kullama L, et al.

Chronic lung injury in preterm lambs: abnormalities of the pulmonary circulation and lung fluid balance.

Pediatr Res. 2000 Jul;48(1):64-74.

Blanco LN, Frank L.

The formation of alveoli in rat lung during the third and fourth postnatal weeks: effect of hyperoxia, dexamethasone, and deferoxamine.

Pediatr Res. 1993 Sep;34(3):334-40.

Bokodi G, Treszl A, Kovács L, Tulassay T, et al.

Dysplasia: a review.

Pediatr Pulmonol. 2007 Oct;42(10):952-61.

Boström H, Willetts K, Pekny M, Levéen P, et al.

PDGF-A signaling is a critical event in lung alveolar myofibroblast development and alveogenesis.

Cell. 1996 Jun 14;85(6):863-73.

Coalson JJ, Kuehl TJ, Prihoda TJ, deLemos RA.

Diffuse alveolar damage in the evolution of bronchopulmonary dysplasia in the baboon.

Pediatr Res. 1988 Sep;24(3):357-66.

Coalson JJ, Winter V, Yang F.

Site specificity of surfactant protein expression in airways of baboons during gestation.

Anat Rec. 1998 Mar;250(3):300-15.

Chen Z, Chintagari NR, Guo Y, Bhaskaran M, et al.

Gene expression of rat alveolar type II cells during hyperoxia exposure and early recovery.

Free Radic Biol Med. 2007 Aug 15;43(4):628-42.

De Coppi P, Bartsch G Jr, Siddiqui MM, Xu T, et al.

Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy.

Nat Biotechnol. 2007 Jan;25(1):100-6. Epub 2007 Jan 7.

Fairweather DV, Lucas M.

Four years' experience of antenatal chromosome diagnosis.

Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 1978 Aug;8(4):205-9.

Frank L.

Oxygen toxicity in neonatal rats: the effect of endotoxin treatment on survival during and post-O₂ exposure.

Pediatr Res. 1987 Feb;21(2):109-15.

Goto H, Senba T, Sato M, Minami T.

Intratracheal administration of bleomycin via a catheter in unanesthetized rats.

Exp Anim. 2004 Apr;53(2):113-9.

Grover TR, Zenge JP, Parker TA, Abman SH.

Vascular endothelial growth factor causes pulmonary vasodilation through activation of the phosphatidylinositol-3-kinase-nitric oxide pathway in the late-gestation ovine fetus.

Pediatr Res. 2002 Dec;52(6):907-12.

Han RN, Han VK, Buch S, Freeman BA, Post M, Tanswell AK.

Insulin-like growth factor-I and type I insulin-like growth factor receptor in 85% O₂-exposed rat lung.

Am J Physiol. 1996 Jul;271(1 Pt 1):L139-49.

Karjalainen MJ, Neuvonen PJ, Backman JT.

Tolfenamic acid is a potent CYP1A2 inhibitor in vitro but does not interact in vivo: correction for protein binding is needed for data interpretation.

Eur J Clin Pharmacol. 2007 Sep;63(9):829-36. Epub 2007 Jul 6.

Kawabata K, Sakurai F, Koizumi N, Hayakawa T, Mizuguchi H.

Adenovirus vector-mediated gene transfer into stem cells.

Mol Pharm. 2006 Mar-Apr;3(2):95-103.

Kazzi SN, Kim UO, Quasney MW, Buhimschi I.

Polymorphism of tumor necrosis factor- α and risk and severity of bronchopulmonary dysplasia among very low birth weight infants.

Pediatrics. 2004 Aug;114(2):e243-8.

Kinsella JP, Greenough A, Abman SH.

Bronchopulmonary dysplasia.

Lancet. 2006 Apr 29;367(9520):1421-31.

Jankov RP, Johnstone L, Luo X, Robinson BH, et al.

Macrophages as a major source of oxygen radicals in the hyperoxic newborn rat lung.

Free Radic Biol Med. 2003 Jul 15;35(2):200-9.

Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, et al.

Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain.

Exp Hematol. 2002 Aug;30(8):896-904.

Jobe AH.

Glucocorticoids, inflammation and the perinatal lung.

Semin Neonatol. 2001 Aug;6(4):331-42. Review.

Lemons JA, Bauer CR, Oh W, Korones SB, et al.

Very low birth weight outcomes of the National Institute of Child health and human development neonatal research network, January 1995 through December 1996.

Pediatrics. 2001 Jan;107(1):E1.

Levin DL, Heymann MA, Kitterman JA, Gregory GA, et al..

Persistent pulmonary hypertension of the newborn infant.

J Pediatr. 1976 Oct;89(4):626-30.

Liu B, Harvey CS, McGowan SE.

Retinoic acid increases elastin in neonatal rat lung fibroblast cultures.

Am J Physiol. 1993 Nov;265(5 Pt 1):L430-7.

Northway WH Jr, Rosan RC, Porter DY.

Pulmonary disease following respirator therapy of hyaline-membrane disease.

Bronchopulmonary dysplasia.

N Engl J Med. 1967 Feb 16;276(7):357-68.

O'Brodovich HM, Mellins RB.

Bronchopulmonary dysplasia. Unresolved neonatal acute lung injury.

Am Rev Respir Dis. 1985 Sep;132(3):694-709. Review.

Ortiz LA, Gambelli F, McBride C, Gaupp D, et al.

Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Jul 8;100(14):8407-11. Epub 2003 Jun 18.

Pantalitschka T, Poets CF

Inhaled drugs for the prevention and treatment of bronchopulmonary dysplasia.

Pediatr Pulmonol. 2006 Aug;41(8):703-8.

Pelkonen AS, Hakulinen AL, Hallman M, Turpeinen M.

Effect of inhaled budesonide therapy on lung function in schoolchildren born preterm.

Respir Med. 2001 Jul;95(7):565-70.

Pierce RA, Albertine KH, Starcher BC, Bohnsack JF, et al.

Chronic lung injury in preterm lambs: disordered pulmonary elastin deposition.

Am J Physiol. 1997 Mar;272(3 Pt 1):L452-60.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, et al.

Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells.

Science. 1999 Apr 2;284(5411):143-7.

Plötz FB, Slutsky AS, van Vught AJ, Heijnen CJ.

Ventilator-induced lung injury and multiple system organ failure: a critical review of facts and hypotheses.

Intensive Care Med. 2004 Oct;30(10):1865-72.

Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, et al.

Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA.

Science. 1989 Sep 8;245(4922):1066-73.

Rova M, Haataja R, Marttila R, Ollikainen V, et al.

Data mining and multiparameter analysis of lung surfactant protein genes in bronchopulmonary dysplasia.

Hum Mol Genet. 2004 Jun 1;13(11):1095-104. Epub 2004 Apr 21.

Shaffer SG, O'Neill D, Bradt SK, Thibeault DW.

Chronic vascular pulmonary dysplasia associated with neonatal hyperoxia exposure in the rat.

Pediatr Res. 1987 Jan;21(1):14-20.

Shulenin S, Noguee LM, Annilo T, Wert SE, Whitsett JA, Dean M.

ABCA3 gene mutations in newborns with fatal surfactant deficiency.

N Engl J Med. 2004 Mar 25;350(13):1296-303.

Stenmark KR, Balasubramaniam V.

Angiogenic therapy for bronchopulmonary dysplasia: rationale and promise.

Circulation. 2005 Oct 18;112(16):2383-5.

Speer CP.

New insights into the pathogenesis of pulmonary inflammation in preterm infants.

Biol Neonate. 2001;79(3-4):205-9.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, et al.

Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts.

Science. 1998 Nov 6;282(5391):1145-7.

Warner BB, Stuart LA, Papes RA, Wispé JR.

Functional and pathological effects of prolonged hyperoxia in neonatal mice.

Am J Physiol. 1998 Jul;275(1 Pt 1):L110-7.

7. Ringraziamenti

La realizzazione di questo progetto ha richiesto la collaborazione di numerosi ricercatori. Grazie all'impegno e soprattutto alla loro disponibilit  e' stato possibile completare gli esperimenti e dare un significato ai risultati ottenuti.

Ringrazio quindi i partner della squadra di ricerca sapientemente coordinata dalla Dott. ssa Patrizia Zaramella:

Il Laboratorio di Terapia Genica del Dipartimento di Pediatria:

Dott. ssa. Rosella Tomanin, Dott. ssa. Adelaide Friso, Dott. Maurizio Scarpa

L'Unita' di Terapia Intensiva Neonatale del Dipartimento di Pediatria:

Dott. ssa Patrizia Zaramella, Dott. ssa Anna Milan, Dott. ssa Federica Freato, Prof. Lino Chiandetti

Il Laboratorio per lo studio Del Midollo Osseo e delle Cellule Staminali

Dott. ssa Martina Piccoli, Dott. ssa Michela Pozzobon, Dott. ssa Sveva Bollini, Dott. Andrea Ditadi, Dott. Paolo De Coppi

Il Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche Sperimentali

Dott. Arben Dedja, Dott. Emanuele Cozzi, Sig. Massimo Rizza

Il Dipartimento di Anatomia Patologica

Dott. Roberto Salmaso, Dott. ssa Roberta Salmaso, Dott. ssa Enza..., Dott. ssa Alessia Gazziero, Prof. Ambrogio Fassina

Il Dipartimento di Anatomia e Fisiologia Umana

Dott. Andrea Porzionato, Dott. ssa Veronica Macchi, Dott. ssa Gloria Sarasin e Dott. ssa Anna Rambaldo, Prof. Raffaele De Caro e Prof. ssa Paola Andreis

Il Dipartimento di Scienze medico-diagnostiche e terapie speciali

Dott. ssa Luciana Caenazzo

Il Servizio Veterinario dell'Universita' di Padova

Dott. Ludovico Scenna e Dott. ssa Francesca Patrese

Un Ringraziamento va anche a numerosi altri Ricercatori che pur se non in collaborazione ufficiale mi hanno aiutato, consigliato e permesso di arrivare alla fine:

Dott. Stefano Ugel, Dott. ssa Iaria Marigo *del Dipartimento di Scienze Oncologiche dell'Universita di Padova*

Dott. Enrico Moro *del Dipartimento di Biologia dell'Universita' di Padova*

Il Personale presente e passato della ditta "Research and Innovation" di Padova

Il Dott. Mauro Bordin, la Dott. ssa Marika Salvalaio, La Dott. ssa Nicoletta Gasparotto, la Dott.ssa Eva Zaccariotto e la Dott. ssa Alessandra Zanetti *colleghi del laboratorio di Terapia Genica del Dipartimento di Pediatria*

La Dott. ssa Marilina Ongaro, la Dott. ssa Sara Cazzola, *per l'amicizia, l'affetto, la professionalita' e l'aiuto nei momenti di scoraggiamento.*

Infine, ringrazio la **studentessa di medicina e chirurgia Valentina Vanzo**: senza la sua collaborazione al progetto, l'impegno, l'assiduita' e l'entusiasmo per la scienza non sarei veramente riuscito ad arrivare al termine.

Un grazie deve anche andare a tutti quelli che in qualche modo, anche solo per la loro vicinanza in questi 3 anni di ricerca, hanno reso possibile l'impresa. Impossibile citarli tutti: La mia famiglia **Nico Grisafi, Eloisa Pennisi ed Elena Grisafi, Francesco Rota, Marco e Giovanni Capovilla, Mariarosaria Russo, Remi Favre, il Tenente Christian Faccineto.**

E ancora: **Mario Vio, Elena Facco, Eloisa Pastorino, Carlo Alberto Rossi, Valeria Orsetti, Tommaso Lagrasta, Matteo Motta, Chiara Aporti, Bruno Gavassini, Barbara Velozo, Moira Campagnaro, Flavia Micciche', Paolo dei Agnoli, Serena Pillon e Diletta Antonini, Maurizio Trevisan, Ricardo Bego, Bianca Borgato, Paolo Casella, Wanda Tassan, Daniele Zoppi, Massimo Rainato, Giorgio Infante, Paolo Guarnerio, Gigliola Pennisi, i volontari** del gruppo comunale di Protezione Civile di Abano Terme, **l'equipe** della Farmacia al Leon d'Oro di Padova.