



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Pediatria

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN MEDICINA DELLO SVILUPPO E SCIENZE
DELLA PROGRAMMAZIONE
INDIRIZZO IN GENETICA BIOCHIMICA E MOLECOLARE E DI MALATTIE RARE
CICLO XXII

**Sistema neuroendocrino polmonare:
bersaglio per la prevenzione della BPD?**

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Giuseppe Basso

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Giorgio Perilongo

Supervisore :Ch.mo Prof. Lino Chiandetti, dott.ssa Patrizia Zaramella

Dottorando : dott.ssa Enrica Fornaro

INDICE

| | |
|---------------------------------------|---------|
| Introduzione | Pag. 2 |
| • La displasia broncopolmonare | Pag. 2 |
| • Modello animale di bronco displasia | Pag. 14 |
| • La fluoxetina | Pag. 20 |
| • Cellule neuroendocrine polmonare | Pag. 25 |
| Scopo dello studio | Pag. 33 |
| Materiali e metodi | Pag. 34 |
| Risultati | Pag. 42 |
| Discussione | Pag. 51 |
| Conclusioni | Pag. 58 |
| Bibliografia | Pag. 59 |

INTRODUZIONE

1. LA DISPLASIA BRONCOPOLMONARE

Nel 1967 veniva ufficialmente descritta una “nuova sindrome cronica polmonare associata con l’uso di respiratori a pressione intermittente-positiva ed elevata ossigenazione”, chiamata displasia broncopolmonare, BPD (Northway et al.1967). Era descritta come una malattia riscontrabile in neonati pretermine affetti da *Respiratory Distress Syndrome*, RDS, che erano stati trattati con ossigeno e ventilazione meccanica. La sindrome RDS (o malattia da membrane ialine) è una condizione di immaturità polmonare tipica del pretermine causata dall’assente produzione di *surfactant*. Si caratterizza per atelettasia, edema e presenza di cellule ed altro materiale negli spazi alveolari con impossibilità di mantenere buoni scambi gassosi. Alla base della BPD descritta da Northway vi erano la tossicità da radicali dell’ossigeno e il barotrauma per supportare la funzionalità respiratoria dei piccoli pazienti affetti da RDS (Bland RD 2005; Christou H et al. 2005). Nel polmone era riscontrabile la presenza di edema, metaplasia dell’epitelio delle vie respiratorie, fibrosi peribronchiale, ipertrofia muscolare delle vie aeree e dei vasi. La mortalità era molto elevata, fino a superare il 50% in alcune casistiche, e nei sopravvissuti era frequente la necessità di mantenere a lungo un sostegno dell’attività respiratoria.

Molto è cambiato con l'avvento di nuove opzioni terapeutiche, quali il surfattante, i corticosteroidi prenatali che accelerano la maturazione del polmone, i nuovi supporti ventilatori, l'uso della *Continuous Positive Airway Pressure* (CPAP) per diminuire il barotrauma, il monitoraggio della saturazione d'ossigeno per minimizzarne l'esposizione e l'aumento nutrizionale. L'incidenza della BPD nei neonati di peso alla nascita > 1200 g o età gestazionale > 30 settimane risulta diminuita, ma al tempo stesso è divenuta una delle più comuni patologie riscontrabili in nati prima della 27^a settimana gestazionale. In questi ultimi anni, gli aspetti clinici, eziopatologici e la stessa epidemiologia della BPD risultano ampiamente modificati tanto da essere definita una "*new-BPD*" contrapposta alla "*old-BPD*" di Northway (Tabella 1). Questa "*new BPD*" è interpretata come un disordine di sviluppo (Baraldi, 2007), che appare essere correlata con l'interferenza/interruzione dei normali segnali di sviluppo alveolare e angiogenesi in neonati prematuri (Thebaud, 2007; Abman, 2006).

Il danno evidenziabile nel polmone consiste in ipoplasia alveolare, arresto dello sviluppo degli alveoli e delle strutture vascolari associate, eccesso di tessuto muscolare liscio nelle pareti delle vie aeree e dei vasi, edema e proliferazione della matrice extracellulare nell'interstizio. A differenza della "*old BPD*" vi è una minore fibrosi a carico del parenchima e delle vie aeree (Tabella 1 e Figure 1 e 2).

Tabella 1: differenze fra “old BPD” e “new BPD”

| Old BPD | New BPD |
|---|--|
| Bambini mediamente prematuri | Neonati estremamente prematuri |
| Danno grave delle grandi vie aeree | Modesta ventilazione e richiesta di ossigeno |
| Edema alveolare ed interstiziale | Arresto dell'alveolarizzazione |
| Danno esteso delle piccole vie aeree con alternanza di aree enfisematose e fibrotiche | Minimo danno delle piccole vie aeree con minor infiammazione e fibrosi |
| Ipertrofia muscolare delle arterie polmonari | Minori alterazioni delle arterie polmonari |

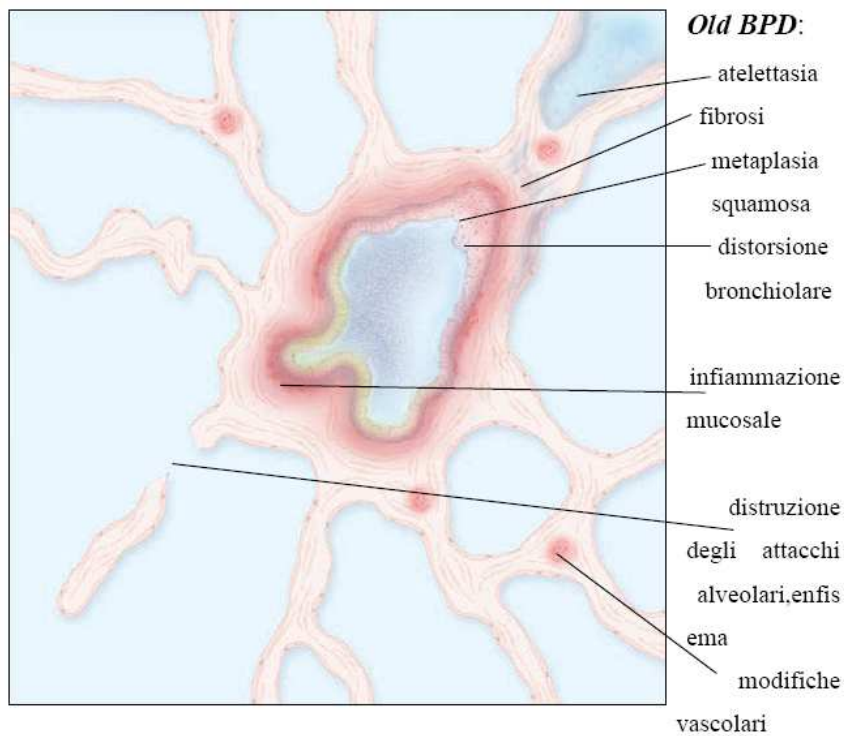


Figura 1: aspetto istologico della “old” BPD. Da Baraldi et al. 2007

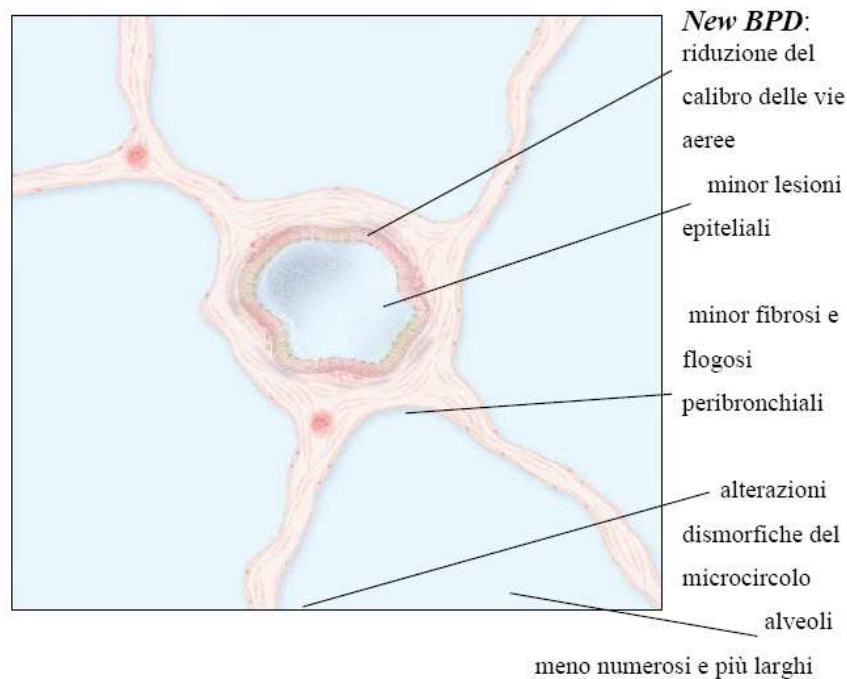


Figura 2: aspetto istologico della “new” BPD. Da Baraldi et al. 2007

Nel 2000 in occasione del National Institute of Child Health and Human Development Workshop on BPD è stata introdotta una nuova definizione in base all'età gestazionale e all'esposizione alla terapia con O₂ intesa come tempo, modalità e quantità:

1. Neonati < 32 settimane di età gestazionale sono classificati:

- Lieve BPD se richiedono ossigeno per i primi 28 giorni ma sono in aria ambiente a 36 settimane PMA (*post menstrual age*) o alla dimissione;
- Moderata BPD se richiedono ossigeno per i primi 28 giorni e meno del 30% di O₂ a 36 settimane PMA o alla dimissione;
- Severa BPD se richiedono ossigeno per i primi 28 giorni e ancora il 30% o più di O₂ e/o CPAP o ventilazione meccanica a 36 settimane PMA o alla dimissione.

2. Neonati > 32 settimane PMA: valgono le stesse categorie ma la valutazione si sposta dalle 36 settimane PMA a 56 giorni post natali o dimissione.

L'incidenza della BPD aumenta col decrescere del peso alla nascita e attualmente colpisce circa il 30% di neonati di peso < 1000g e di età gestazionale alla nascita inferiore alle 28 settimane (ELBW: *extremely low birth weight infants*). Questi pazienti non sviluppano la patologia in seguito all'eccessiva esposizione all'ossigeno, bensì a causa della marcata immaturità polmonare che consegue all'arresto dell'alveolarizzazione nel neonato pretermine. Rimane importante il danno legato alla tossicità dell'ossigeno anche se nella "*new-BPD*" esso sembra derivare soprattutto dall'immaturità dei sistemi antiossidativi con un incremento relativo di ossigeno non associato ad una reale somministrazione di O₂ ad alte concentrazioni.

I piccoli pazienti che sviluppano questa sindrome mostrano una mortalità del 20-40% legata soprattutto a fenomeni di progressiva insufficienza respiratoria, infezioni, ipertensione polmonare o dipendenza dal respiratore. In ogni caso i neonati affetti da BPD rappresentano una popolazione esposta ad un maggior rischio di infezioni ricorrenti, asma, frequenti ospedalizzazioni, anomalie dello sviluppo neurologico aggravando da l'outcome e benessere del neonato pretermine dopo la dimissione così come i costi di salute in senso lato.

In particolare per quel che riguarda l'apparato respiratorio, i pretermine affetti da BPD richiedono infatti una supplementazione di ossigeno per mesi o anni (Greenough, 2002) ed alcuni rimangono ossigeno dipendenti

fino ai 2 anni d'età (Greenough., 2006). Bisogna ricordare che la supplementazione domiciliare d'ossigeno permette sì una più precoce dimissione ma ha spesso dei pessimi effetti sulla qualità di vita del nucleo familiare (McLean, 2000).

I neonati affetti hanno comuni riospedalizzazioni nei primi 2 anni di vita (73%) e fino a tre ricoveri post-dimissione (27%) (Greenough., 2001). Il virus respiratorio sinciziale ha un'incidenza preponderante nelle flogosi delle vie aeree inferiori (bronchiolite), per questo motivo che ai neonati prematuri viene consigliata la profilassi nei mesi invernali con immunoglobuline anti RSV (Broughton, 2005).

In età scolare i bambini prematuri affetti da BPD continuano a presentare un maggior numero di affezioni respiratorie rispetto i coetanei nati a termine e i casi più gravi rimangono sintomatici anche in età adulta: uno studio ha dimostrato come il 23% di giovani adulti che avevano sviluppato BPD presentassero *wheezing* e necessità di terapia farmacologica a lungo termine (Northway et al., 1990).

Per quel che riguarda le anomalie della funzione polmonare, studi su neonati con BPD alla 36° settimana PMA mostrano come essi abbiano diminuiti volumi polmonari e riduzione dell'efficacia dello scambio gassoso (Hjalmarson et al., 2005). Questo è in parte spiegato con l'ipotesi dell'arresto dello sviluppo polmonare (Greenough, 2008) .

In adolescenti sono stati documentati ostruzione delle vie aeree, ipereattività e aumento della risposta all'istamina (Allen et al., 2003), inoltre pazienti apparentemente asintomatici hanno rivelato desaturazione durante l'esercizio fisico (Santuz et al., 1995), rendendo comunque difficile l'espletamento di selezionate attività fisico-agonistico.

1.1 Patogenesi

Nell'insorgenza della BPD concorrono molteplici fattori: la prematurità, l'ossigeno terapia, la ventilazione meccanica, le infezioni e la pervietà del dotto arterioso. Nuovi studi dimostrano anche l'importanza di aspetti quali alterazioni nello sviluppo vascolare e polimorfismi genetici (Chess, 2006). L'eziopatogenesi della malattia è cambiata negli ultimi anni: mentre la forma descritta negli anni 60 da Northway - "old 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 angiogenesi e all'infezione- "new 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 nell'insorgenza della broncodisplasia.

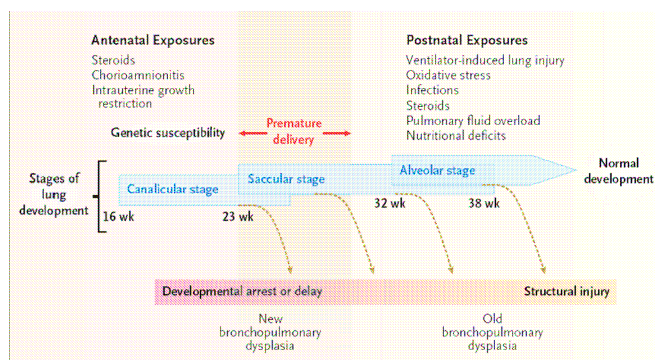


Figura 3: stadi dello sviluppo polmonare, fattori potenzialmente dannosi e tipo di insulto polmonare. (Baraldi et al. 2007).

In neonati prematuri il polmone è spesso esposto a severi tipi di insulto, sia prima che dopo la nascita. L'esposizione stessa all'ossigeno, come la suscettibilità genetica, causa danno diretto alle vie aeree e al parenchima e induce una variazione rispetto al normale sviluppo. A seconda della durata e dell'entità dell'esposizione, il danno polmonare può variare da un precoce arresto dello sviluppo (*new BPD*) ad un danno strutturale su un polmone relativamente immaturo (*old BPD*). I prematuri nati tra le 23 e le 30 settimane, durante lo stadio canalicolare e sacculare dello sviluppo polmonare, sono quelli più a rischio di BPD.

Nell'ultima decade è apparso chiaramente come la BPD nei neonati estremamente prematuri sia associata strettamente con due importanti processi fisiopatologici: infiammazione e arresto dello sviluppo (Ryan, 2008). L'esposizione di animali neonati all'iperossia e/o alla ventilazione meccanica sicuramente provoca una risposta infiammatoria ma anche una diminuita alveolarizzazione, con minori e più larghi alveoli, minor superficie e minor formazione di creste secondarie, assolutamente compatibile con quello dimostrato in neonati umani affetti da BPD. Sta diventando sempre più evidente come ci sia una connessione tra diminuita alveolarizzazione e precedente processo infiammatorio. Nella fase acuta della BPD modelli animali è stato dimostrato un afflusso di neutrofili e macrofagi nei polmoni e di vari mediatori dell'infiammazione, inclusi chemochine, citochine e fattori di crescita, che sono presenti nell'aspirato tracheale di bambini con BPD (Groneck, 1994). Nella fase iniziale della BPD indotta dall'iperossia in modelli animali, oltre all'afflusso di polimorfonucleati e macrofagi, è stato anche associato un incremento

anche un aumento di molecole come la MCP-1 e l'IL-8, potenti chemoattrattori per le cellule infiammatorie. Le sorgenti di queste ed altre citochine sono l'epitelio alveolare, l'endotelio e le stesse cellule infiammatorie. Ci sono parecchi studi sperimentali che dimostrano che il blocco dei mediatori dell'infiammazione o dei loro recettori migliora l'outcome polmonare, specificatamente con un aumento dell'alveolarizzazione (Auten, 2001).

Tuttavia il processo infiammatorio sia esso associato a corioamnionite clinicamente manifesta può essere esacerbata dalla rianimazione in sala parto, specie se con alti volumi correnti. A ciò si deve aggiungere che anche l'aria ambiente è relativamente iperossica per il polmone prematuro che normalmente è esposto a minor tensione di ossigeno in utero. In questo contesto l'esposizione all'iperossia e il danno polmonare indotto dalla ventilazione continuano il processo infiammatorio eventualmente iniziato durante la vita fetale (corioamnionite).

Vi sono numerose evidenze che i processi infiammatori post-natali continuino la cascata infiammatoria, così le sepsi e l'enterocolite necrotizzante.

La cascata infiammatoria che innesca la BPD è associata alla produzione di metaboliti tossici dell'ossigeno in uno squilibrio tra capacità ossidante e anti-ossidante a livello polmonare. Neutrofili e macrofagi sono un'importante fonte di ROS (*Reacting Oxygen Species*) nel polmone prematuro, al pari dell'adulto (Saugstad, 1997; Freeman et al., 1982; Speer et al., 1998) È stato dimostrato che l'endotelina, un peptide vasocostrittore, ha la capacità di stimolare i macrofagi alveolari a rilasciare maggiori quantità di ROS e quindi di contribuire al danno

ossidativo polmonare. I neonati affetti da BPD hanno livelli maggiori di endotelina nei loro aspirati tracheali, rispetto a quelli sani (Niu et al., 1998) e incremento dei prodotti di perossidazione lipidica sono stati trovati nell'aria espirata durante la prima settimana di vita rispetto a controlli sani. I neonati prematuri hanno minori livelli di acido retinoico, che agisce come soppressore della formazione di superossidi e perossido di idrogeno in neutrofili e macrofagi stimolati. Tuttavia, i trials con l'uso di antiossidanti per prevenire l'insorgenza di BPD hanno mostrato risultati contrastanti.

Nella fase cronica della malattia entrano in gioco nuove cellule infiammatorie: in modelli animali esposti 3 e 5 settimane all'iperossia si è visto un infiltrato linfocitario ed incremento delle citochine: la più studiata è sicuramente il TGF-beta, estremamente fibrogenica e associata con una estesa deposizione di proteine della matrice extracellulare, quali fibronectina ed elastina e anche con il riscontro di cellule di tipo miofibroblastico.

In particolare la fibronectina è fattore chemotattico e di crescita per i fibroblasti. Il TGF beta risulta aumentato nell'aspirato tracheale di neonati con BPD, specie dopo 20-25 giorni, mentre livelli elevati nella prima settimana di vita sono predittivi di sviluppo di BPD rispetto a neonati con RDS che invece non la sviluppano.

Studi recenti evidenziano come il circolo sanguigno sia essenziale per il corretto sviluppo alveolare e contribuisca al mantenimento della struttura polmonare durante la vita adulta (Abman, 2001; Jakkula et al., 2000; Kasahara et al., 2000). È stato ipotizzato che l'alterazione dell'angiogenesi durante un periodo critico di sviluppo polmonare possa

diminuire l'alveolarizzazione e contribuire all'ipoplasia polmonare (Stenmark, 2005). A riprova di ciò si è visto come la BPD sia caratterizzata da una crescita vascolare ridotta e dismorfica, da una riduzione di fattori di crescita angiogenetici (Thebaud, 2005), il *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) e da una diminuzione delle cellule progenitrici endoteliali (EPC) che sono indispensabili per una corretta vasculogenesi (Balasubramaniam, 2007).

Cruciale infine l'"endotrauma" ossia un danno alle vie aeree e al polmone, che deriva dalla rottura dell'omeostasi tra laringe e controllo diaframmatico della respirazione durante, e talvolta dopo, manovre di ventilazione artificiale con l'uso di tubo endotracheale. Bypassare la laringe e la perdita del controllo sui volumi polmonari espone il neonato ad un insulto fisico, che negli animali da esperimento si può rilevare con una riduzione dell' NO espirato. L'endotrauma danneggia direttamente il polmone, creando un circolo vizioso che aumenta la necessità di cure intensive. La diminuzione dell'endotrauma con l'uso di presidi respiratori non invasivi sembra risultare in un normale sviluppo polmonare in animali pretermine e in una diminuzione di incidenza di BPD (Kulkarni et al., 2006).

Nel corso degli anni, le conoscenze riguardo la patogenesi e la fisiopatologia della BPD, si sono sviluppati tentativi terapeutici, che però si sono rilevati di modesta efficacia (Tabella 2).

Tabella 2 Terapie attuali e limiti. (Cerny, 2008)

| TERAPIA | MECCANISMO D'AZIONE | COMMENTI |
|---|---|---|
| Ventilazione | L'uso di NCPAP o SNIPPV. Ridurre il tempo di ventilazione. Accettare un'ipercapnia permissiva | Per minimizzare il volu/baro/endotrauma |
| Ossigeno | Accettare una saturazione tra l'88 e il 92% | Per prevenire la tossicità da ossigeno |
| Surfattante | Per diminuire la tensione superficiale alveolare e aumentare la compliance polmonare | Possibile riduzione della BPD a 28 giorni |
| NO inalatorio | Diminuisce il mismatch ventilo/per fusorio, riduce l'infiammazione e ristabilisce il normale pattern di crescita polmonare | Non porta a riduzione della BPD, ma sono in corso studi su neonati di peso <1000g |
| Caffeina | Diminuisce le apnee per azione centrale, sulla soglia per la CO2 e per diminuzione della fatica Muscolare | Pochi studi sulla reale diminuzione nella frequenza della BPD |
| Steroidi antenatali | Inducono maturazione polmonare | Riducono l'incidenza e la severità della RDS ma non della BPD. |
| Postnatali - Sistemici | Antiinfiammatori | Significativa riduzione di incidenza di BPD ma effetti negativi sul neuro sviluppo. |
| - Inalatori | Antiinfiammatori locali con minimi effetti sistemici | Non efficaci nel ridurre l'incidenza di BPD |
| Antibiotici | Trattamento di patogeni causanti infiammazione | Non efficaci nel ridurre l'incidenza di BPD |
| Diuretici | Riduzione dell'edema polmonare | Miglioramento della funzionalità polmonare a breve termine ma non efficaci nel ridurre l'incidenza di BPD |
| Broncodilatatori | Dilatazione delle vie aeree attraverso il rilascio della muscolatura liscia bronchiale per aumentare la compliance polmonare e il volume corrente e ridurre le resistenze | Dati insufficienti sull'efficacia riguardo la BPD |
| Nutrizione/ restrizione idrica | Fornire calorie adeguate per la crescita e la riparazione del danno | Miglioramento della crescita polmonare |
| Vitamina A | Importante per la crescita, la risposta immunitaria e l'integrità delle cellule epiteliali | Diminuisce l'incidenza di BPD ma non la sopravvivenza |
| Inositolo | Elemento essenziale per il segnale cellulare, il mantenimento delle membrane e la maturazione del surfattante | Sembra diminuire l'incidenza e la mortalità ma mancano studi |
| Anti ossidanti e anti infiammatori | Protezione contro infiammazione e tossicità da ossigeno | Non efficaci nel ridurre l'incidenza di BPD |

2. MODELLO ANIMALE DI BRONCODISPLASIA

La creazione di modelli animali rappresenta un passo fondamentale della ricerca medica e specificatamente neonatologica nel contesto della patologia respiratoria acuta e cronica.

Come già accennato, la BPD è il risultato di un danno polmonare presente in un neonato pretermine, quindi ancora in via di sviluppo. La difficoltà nel generare un modello sperimentale ha origine dalla molteplicità di fattori coinvolti.

Il modello animale che meglio rappresenta la “*new BPD*” è stato perfezionato dagli studi di Coalson e si ottiene in babbuini nati prematuri dopo 125 giorni di gestazione (normalmente il parto a termine nel babbuino avviene 185 giorni dopo il concepimento), trattati con surfactant esogeno e sottoposti a ventilazione con pressione positiva per almeno 1 o 2 mesi (Coalson, 1999). A 125 giorni di gestazione il polmone del babbuino si trova nel periodo canalicolare, corrispondendo così ad un polmone umano a 16-26 settimane di gestazione (Figura 4).

All'istologia si evidenziano aree di flogosi, riduzione del numero di alveoli e capillari, presenza di spazi aerei dilatati con pareti spesse e ricche di cellule ed abbondante matrice. Questo particolare modello è stato applicato in più studi volti ad evidenziare la risposta polmonare in seguito all'esposizione del babbuino agli stessi fattori che entrano in gioco nella BPD del neonato umano. Si è così valutata nel babbuino la risposta alla ventilazione meccanica effettuata tramite *nasal Continuous Positive Airway Pressure* (nCPAP) (Thomson, 2004) o *High-Frequency Oscillatory*

Ventilation (HFOV) (Yoder, 2000), all'inalazione di NO (McCurnin et al., 2005), allo sviluppo di infezioni polmonari (Yoder., 2003).

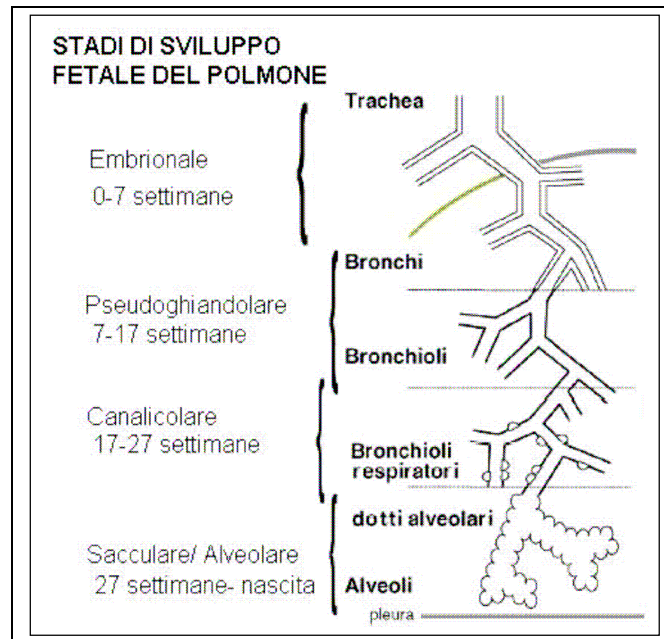


Figura 4: Schema di sviluppo polmonare (Hislop et al., 2005).

Un altro modello utilizzato nello studio della patologia respiratoria cronica del neonato è rappresentato da ovini nati dopo 125 giorni di gestazione (la durata della gestazione è normalmente di 147 giorni), trattati con surfattante esogeno e successivamente ventilati per 3 o 4 settimane. Gli animali presentano un'istologia polmonare caratterizzata da uno stadio maturativo tipico del periodo sacculare tardivo con riduzione degli alveoli, aree di atelettasia, eccesso di elastina, ipertrofia della muscolare delle vie aeree distali, flogosi ed edema. Tutti questi elementi sono riscontrabili anche nel neonato umano affetto da BPD (Albertine, 1999). Anche in questo caso il modello ha permesso di approfondire la valutazione di alcuni aspetti particolari della BPD come ad esempio la risposta

all'inalazione di NO (Albertine, 2002; Bland., 2003) o alla somministrazione di vit.A (Bland, 2005).

Il terzo, fondamentale, modello animale di BPD è costituito dal ratto. Esso rappresenta, in molti campi della ricerca, l'animale grazie al quale è stato possibile approfondire conoscenze fisiologiche e patogenetiche nonché sviluppare nuove strategie terapeutiche. Anche nell'ambito delle malattie respiratorie può essere considerato un buon modello, come confermato da studi consolidati (Tanswell, 1989) supportati dalle conoscenze dello sviluppo postnatale del polmone nel ratto (Meyrickl., 1982). Alla nascita il ratto presenta larghi alveoli primitivi (periodo sacculare) con pareti spesse. Tra il quarto e il quinto giorno di vita queste strutture iniziano ad essere suddivise in spazi più piccoli in seguito alla crescita e all'allungamento dei setti che originano a livello delle pareti (periodo alveolare). Il processo prosegue fino all'inizio della terza settimana di vita, momento in cui inizia una fase di riduzione dello spessore delle pareti e di rimodellamento degli alveoli definitivi. Simili modificazioni postnatali avvengono, seppur con una differente scala temporale, anche nell'uomo. Alcuni dati raccolti in studi di comparazione tra le diverse specie (Zoetis., 2003) consentono di notare come lo sviluppo dell'albero respiratorio nel ratto possa essere paragonato a quello umano (Tabella 3).

Va sottolineato come alla nascita il polmone del ratto si presenti ancora nella fase sacculare (Tabella 4) mentre nell'uomo, nel babbuino e nell'ovino sia già alveolarizzato. Questa particolarità rende il ratto neonato a termine un modello particolarmente indicato per studiare le fondamentali fasi di alveolarizzazione che avvengono nell'ultimo periodo fetale umano e che risultano incomplete nel prematuro. Senza dover

indurre una nascita pretermine dell'animale, quindi, si ha a disposizione un buon modello per lo studio dell'immatùrità polmonare del neonato prematuro.

Tabella 3: Sviluppo polmonare. I numeri indicano l'aumento, in volte, del parametro in esame dall'epoca neonatale alla vita adulta. (Zoetis, 2003).

| Parametro | uomo | ratto |
|--|------|-------|
| volume polmonare (ml) | 23.4 | 23.5 |
| volume degli spazi aerei (ml) | 30.2 | 26.9 |
| volume dei setti (ml) | 13.5 | 13.6 |
| superficie alveolare (m ²) | 21.4 | 20.5 |
| Superficie dei capillari (m ²) | 23.3 | 19.2 |

Le dimensioni ridotte dell'animale rispetto al babbuino e all'ovino, la maggior semplicità nell'accudimento, la riduzione dei costi nella gestione dello stabulario, ma soprattutto il particolare timing dello sviluppo polmonare hanno indotto molti gruppi di ricerca ad utilizzare il ratto come modello animale di BPD allo scopo di affinare le conoscenze mediche della patologia in esame (Blomberg, 2002; Belik, 2003; Yi., 2004). Nel nostro studio si è scelto di utilizzare il ratto per poter implementare un modello animale di danno polmonare.

Tabella 4: Fasi dello sviluppo del polmone nel ratto e nell'uomo con indicazione dei relativi giorni di gestazione (o settimane di gestazione, SG). (Zoetis et al., 2003.)

| specie | ghiandolare | canalicolare | sacculare | alveolare |
|--------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------------------|
| RATTO | 13-18 | 19-20 | 21-nascita | nascita-21 |
| UOMO | 42-112 (6-16 SG) | 112-196 (16-28 SG) | 196-252 (28-36 SG) | 252- infanzia (36 SG-infanzia) |

Una possibilità alternativa è rappresentata dalla somministrazione di bleomicina endotracheale in ratti adulti e neonati (Ortiz , 2003) anche se i limiti di questo approccio sono l'estrema tossicità della bleomicina e le misure di sicurezza necessarie per la sua manipolazione. Il modello di danno polmonare ottenuto mediante esposizione di ratti adulti o neonati a concentrazioni variabili di ossigeno dal 65% al 95% (Belik., 2005) e di babbuini neonati (Coalson, 1999) tramite l'impiego di apparecchiature automatizzate in grado di erogare i gas in modo sicuro e continuo, sembra prendere gradualmente il sopravvento. L'eccesso di ossigeno causa emorragia alveolare, edema, riduzione della compliance polmonare. Il danno è più evidente nel ratto neonato rispetto all'animale adulto e comprende situazioni di ridotta crescita del polmone, ridotta alveolarizzazione associata a displasia delle strutture vascolari e, da ultimo, BPD. Questa situazione di arresto maturativo coinvolge sia gli alveoli che i vasi, portando ad un'alterazione del rapporto fra le due componenti (Shaffer, 1987; Frank., 1987). Un ulteriore effetto dannoso

legato all'iperossia è dovuto alla formazione di radicali liberi dell'ossigeno con conseguente intensa reazione flogistica (Jankov, 2003). E' stato evidenziato come un'esposizione al 95% di ossigeno crei un arresto maturativo omogeneo mentre un esposizione al 65% di ossigeno per circa 14 giorni comporti un danno non uniforme con aree di arresto dell'alveolarizzazione associate a zone di ispessimento dell'interstizio e attiva sintesi di DNA (Yi., 2001), situazione che ancor meglio riproduce il polmone affetto da BPD. Di fatto, l'esposizione al 60% o 65% e' in grado di mimare i cambiamenti che si osservano nella "*new BPD*" (Han., 1996) mentre a concentrazioni elevate tra l'80% e il 100% si osservano quelli descritti per la "*old BPD*" (Warner., 1998).

3. LA FLUOXETINA

La Fluoxetina, introdotta per la prima volta sul mercato negli anni '80, fa parte del gruppo di farmaci antidepressivi denominati *Selective Serotonin Uptake Inhibitors* (SSRI), che inibiscono selettivamente la ricaptazione della serotonina (5-HT) dalle terminazioni nervose monoaminergiche, facilitando quindi la trasmissione sinaptica.

Quando il farmaco venne commercializzato negli Stati Uniti sottoforma di capsule dal nome Prozac divenne così famoso tanto da essere chiamato "la pillola della felicità". Dopo un primo periodo di entusiasmo il farmaco fu rivalutato in modo più realistico, ma in ogni caso, l'introduzione della Fluoxetina rimane un grosso passo avanti nel trattamento della depressione.

Gli SSRI si presentarono innovativi soprattutto in contrasto con i tradizionali antidepressivi triciclici (TCAs), inibitori della ricaptazione della serotonina e della noradrenalina, in quanto più selettivi e per questo caratterizzati da meno effetti collaterali di tipo cardiovascolare e anticolinergico, e minor pericolo in caso di sovradosaggio.

La Fluoxetina è attualmente l'antidepressivo più prescritto. Viene utilizzata nel trattamento della depressione di tipo maggiore come pure in altre sindromi, come la bulimia nervosa, gli attacchi di panico e i disordini ossessivo-compulsivi (Feighner, 1991). I più importanti effetti collaterali nel trattamento con Fluoxetina sono nausea, anoressia ed insonnia, perdita della libido e anorgasmia. In associazione con un altro gruppo di antidepressivi, gli inibitori delle monoaminossidasi (IMAO), la Fluoxetina può causare la "sindrome serotoninergica", caratterizzata

dalla comparsa di tremore, ipertermia e collasso cardiocircolatorio, che possono portare a morte il paziente (Rangl., 2005).

3.1.Farmacocinetica e metabolismo

La farmacocinetica e il metabolismo della Fluoxetina sono stati oggetto di molti studi sia su uomo che animale, grazie all'uso di metodi specifici per la rilevazione della Fluoxetina e del suo principale metabolita (norfluoxetina) nei diversi fluidi biologici. Tra i metodi utilizzati vi è la fluorimetria, la spettrometria di massa (Li , 2002), la cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC) (Gupta., 1992; Eerkes., 2002), e altri.

Uno studio in particolare analizza il metabolismo della Fluoxetina riassumendo la precedente letteratura a riguardo (Mandrioli, 2006): la Fluoxetina è di solito somministrata in capsule da 20 mg, una volta al giorno. Dopo la somministrazione, il farmaco viene metabolizzato a livello epatico da parte del citocromo P450, uno dei principali sistemi implicati nelle reazioni di fase uno per la detossificazione degli xenobiotici. Il principale prodotto del metabolismo della Fluoxetina è la norfluoxetina, che presenta un'emivita più lunga della prima (14-16 giorni rispetto a 1-3 giorni). Un altro metabolita è il p-trifluorometilfenolo, prodotto della reazione di de alchilazione ossidativa a partire dalla Fluoxetina.

In uno studio sul monitoraggio terapeutico dei farmaci si è dimostrato come la norfluoxetina contribuisca alla efficacia terapeutica della Fluoxetina, valutando le rispettive concentrazioni medie nel plasma (Jannuzzi, 2002).

Se somministrata a pazienti pediatrici o adolescenti, dopo la correzione per il peso corporeo, la Fluoxetina mostra una farmacocinetica simile a quella osservata nei pazienti adulti.

La diminuita funzionalità renale non sembra avere effetto sulla farmacocinetica della fluoxetina e della norfluoxetina, in uno studio infatti non è stata trovata alcuna correlazione tra i vari gradi di insufficienza renale e parametri quali la velocità di escrezione, il volume di distribuzione e il legame alle proteine plasmatiche dei suddetti farmaci (Aronoff, 1984). Al contrario invece l'insufficienza epatica riduce la clearance della fluoxetina e del suo metabolita (Bergstrom, 1993).

Nel metabolismo della Fluoxetina intervengono diversi citocromi.

- Per quanto riguarda la Fluoxetina come substrato, il CYP2D6 è coinvolto nella N-demetilazione nel fegato (Hamelin et al., 1996) e le concentrazioni plasmatiche del farmaco sono correlate con i diversi genotipi dello stesso citocromo, come anche sembrano avere un ruolo i genotipi del citocromo CYP2C9 (Pacherl., 1998). Il citocromo CYP2C19 è invece coinvolto nella O-dealchilazione della Fluoxetina, come pure il CYP3A4 (Liu, 2006).
- Per quanto riguarda la Fluoxetina come inibitore, studi hanno dimostrato che le concentrazioni nel plasma e l'efficacia farmacologica della Fluoxetina e dei TCAs sono aumentate se somministrate insieme, in quanto la prima è sia un potente inibitore del CYP2D6 sia un suo substrato. (Alfaro et al., 1999). La Fluoxetina inibisce inoltre l'attività del CYP2C19, e del CYP3A4, tuttavia la norfluoxetina sembra essere un più potente inibitore di quest'ultimo (Preskorn et al., 1996). Un altro esempio

di inibizione sul CYP2D6 e sul CYP3A4 è l'aumento delle concentrazioni plasmatiche degli antipsicotici se somministrati insieme alla Fluoxetina.

Il meccanismo del CYP2C11 è stato studiato invece nel fegato di ratto e sembra essere simile all'inibizione del CYP3A4 nell'umano. (Murray, 2003).

Dati i complessi meccanismi nel metabolismo che coinvolge Fluoxetina e citocromi, e la lunga emivita del farmaco e del suo metabolita, le interazioni farmacologiche da tenere in considerazione sono molte: ricordiamo quindi quelle con gli antipsicotici, gli oppiacei, gli antidepressivi triciclici, le benzodiazepine, il litio e gli inibitori delle monoaminossidasi (già citati a riguardo della sindrome serotoninergica). Per quanto riguarda invece la farmacocinetica della Fluoxetina somministrata in gravidanza, studi recenti su animale (ratto) hanno dimostrato basse concentrazioni del farmaco e del suo metabolita nella placenta e nel tessuto fetale ed embrionale, ed hanno evidenziato come il farmaco attraversi la placenta circa 4 ore dopo la somministrazione, e come si accumuli soprattutto nel timo e nel cervello del feto. Il polmone è invece l'organo materno che ne contiene la massima concentrazione.

Nel feto non è presente attività di de metilazione o glucuronidazione e la maggior parte della Fluoxetina è legata alle proteine plasmatiche (Pohland , 1989; Pohland 2004).

3.2.Fluoxetina e depressione in gravidanza

Molte donne sviluppano malattie psichiatriche in gravidanza e diversi studi hanno evidenziato che più del 35 % delle donne gravide fanno uso

di farmaci antidepressivi (Goodman, 1992). Come riportato dallo studio di Ververs et al., 2006, negli ultimi anni c'è stato un importante utilizzo dei farmaci antidepressivi nelle donne tra i 20 e i 40 anni, soprattutto a causa dell'aumento delle indicazioni terapeutiche per cui questi farmaci sono prescritti (depressione, ma anche disturbi d'ansia, sindrome premestruale, anoressia e bulimia, trattamento del dolore).

Sebbene questi farmaci siano di largo impiego in gravidanza, non si è ancora certi della loro sicurezza, in particolare, di recente, la preoccupazione riguarda l'uso degli SSRI e lo sviluppo dell'ipertensione polmonare nel neonato (Fornaro, 2007); (Chambersl., 2006). Sono stati inoltre dimostrati un aumento del rischio di parto prematuro e di basso peso alla nascita (Nonacs et al., 2003), manifestazioni di crisi d'astinenza postnatale (Sanz et al., 2005), maggior incidenza di tre o più malformazioni di grado minore come pure di complicanze perinatali, tra cui difficoltà di respirazione, alimentazione e ittero (Chambers, 1996).

Nello stesso studio olandese di Ververs, si è dimostrato come la Fluoxetina e la Paroxetina siano i farmaci antidepressivi più usati nella popolazione, risultati sovrapponibili a quelli della popolazione statunitense (Schirm, 2004).

Sebbene l'evidenza dimostri come l'uso degli antidepressivi in gravidanza non sia totalmente sicuro, questi farmaci vengono prescritti in ogni caso frequentemente: la ragione potrebbe essere che gli effetti collaterali di stress, ansia e depressione sulla madre e sul feto potrebbero avere un risvolto peggiore rispetto all'effetto teratogeno degli stessi antidepressivi sullo sviluppo del bambino.



Figura 5 : il farmaco venne commercializzato negli Stati Uniti sottoforma di capsule dal nome Prozac

CELLULE NEUROENDOCRINE POLMONARI

Lo sviluppo polmonare è stato suddiviso in sei fasi: embrionale, pseudoghiandolare, canalicolare, sacculare, alveolare e maturazione microvascolare. A loro volta queste fasi possono essere suddivise in sviluppo polmonare precoce (embrionale e pseudo ghiandolare), medio (canalicolare e sacculare) e tardivo (alveolare e maturazione microvascolare). Questo tipo di sviluppo accomuna l'uomo e il topo, ma differisce per il modo in cui si formano i lobi (nell'uomo, i cinque lobi che si sviluppano nella vita fetale derivano due dal bronco principale di sinistra e tre da quello di destra; nel topo, quattro dei cinque lobi derivano dal bronco di destra mentre solo uno da quello di sinistra), e per il tempo nel quale si configurano le cinque diverse fasi (Tabella 4).

Nello sviluppo polmonare precoce, il passaggio dalla fase embrionale alla fase pseudoghiandolare è caratterizzato dall'iniziale differenziazione delle cellule delle vie aeree in formazione.

La differenziazione cellulare polmonare può essere suddivisa in quattro gruppi: cellule dell'epitelio delle vie aeree prossimali, cellule dell'epitelio delle vie aeree distali, cellule mesenchimali prossimali e cellule mesenchimali distali. Ogni gruppo andrà differenziandosi in specifici sottotipi cellulari. In particolare, le cellule indifferenziate che fanno parte del primo gruppo si differenzieranno in cellule di Clara, cellule cigliate e cellule neuroendocrine polmonari.

- **Tabella 4:** Stadi dello sviluppo polmonare nell'uomo e nel topo (E. Bancalari "The Newborn Lung", Saunders)

| STADIO DELLO SVILUPPO | Uomo (settimane di gestazione) | Topo (giorni di gestazione) | Formazione di strutture |
|----------------------------|--------------------------------|-------------------------------|--|
| embrionale | 3,5-7 | 9,5-14,2 | Gemma iniziale, trachea, bronchi principali, principali vie aeree |
| pseudoghiandolare | 5-17 | 14,2-16,6 | Albero bronchiale preacinare |
| canalicolare | 16-26 | 16,6-17,4 | Completamento delle vie aeree, acini polmonari, zona di scambio dei gas, aumento del letto capillare, inizio della differenziazione epiteliale |
| sacculare | 24-38 | 17,5-5 giorni dopo la nascita | Sacculi, dotti e sacchi alveolari, surfattante, |
| alveolare | 36- 2 anni dopo la nascita | 4-14 giorni dopo la nascita | Creste secondarie e alveoli |
| maturazione microvascolare | Nascita-3 anni dopo la nascita | 14-21 giorni dopo la nascita | Assottigliamento dei setti alveolari, rimodellamento della vascolarizzazione polmonare, fusione del doppio strato capillare |

Le cellule neuroendocrine polmonari sono le prime cellule che si differenziano dai precursori endodermici nell'epitelio respiratorio. Esse sono presenti come singole cellule nell'epitelio della trachea e dei bronchi, mentre solo a livello delle vie aeree intrapolmonari si possono trovare raggruppate in strutture chiamate corpi neuroepiteliali (NEB, *neuroepithelial bodies*), dove appaiono più concentrate nei punti di diramazione (Porzionato, 2008). Si tratta di cellule caratterizzate dalla presenza di glicogeno sparso nel citoplasma e numerosi organelli, tra cui mitocondri, apparato di Golgi, reticolo endoplasmatico rugoso e vescicole

citoplasmatiche dense, segno di differenziazione neuroendocrina (Panl., 2005).

Queste cellule contengono diverse sostanze biologicamente attive, tra cui: serotonina (Cokelaere, 1973) , calcitonina e peptide del gene correlato alla calcitonina (CGRP, calcitonin gene-related peptide), peptide YY (McDowell, 1994), cromogranina A (Lauweryns., 1987) , pancreastatina (Lauweryns, 1993), colecistochinina, somatostatina (Balaguer, 1992), endotelina (Van Lommel, 2001), peptide di rilascio della gastrina (GRP gastrin releasing peptide, facente parte della famiglia dei peptidi simili strutturalmente alla bombesina) (Wharton, 1978; Cutz, 1982; Spindel, 1987). Anche l'ATP è stata ipotizzata essere uno dei neurotrasmettitori dei NEB. CGRP e GRP sono i peptidi predominanti rispettivamente nel roditore e nell'uomo (Li, 1994).

I corpi neuroepiteliali sono innervati prevalentemente da fibre sensitive afferenti, ma ricevono anche fibre efferenti. Sono stati descritti tre tipi principali di fibre afferenti (Porzionato et al., 2008): fibre vagali mielinizzate, fibre non mielinizzate che originano dai gangli delle radici dorsali, e terminali nervosi di tipo nitrgico. La stimolazione dei corpi neuroepiteliali potrebbe scatenare due tipi di risposta nei nervi sensitivi, la trasmissione dello stimolo sensitivo al sistema nervoso centrale, e la liberazione locale di CGRP per esocitosi dagli assoni, che potrebbe amplificare la zona d'influenza degli stessi corpi epiteliali.

Nell'uomo, le cellule neuroendocrine polmonari e i corpi neuroepiteliali sono rintracciabili rispettivamente all'ottava e alla dodicesima settimana di gestazione (Linnoila, 2006).

Inizialmente queste cellule si differenziano nella laringe e nella parte superiore della trachea, e poi si espandono in direzione centrifuga alle altre vie aeree. In uno studio di McDowell del 1994 sul criceto, sono stati evidenziati tre stadi sequenziali di differenziazione: il primo stadio, precedente alla nascita, dà origine alla popolazione principale di PNECs, con cellule positive per serotonina e CGRP; il secondo stadio è caratterizzato invece dalla formazione di cellule isolate nella laringe e nella trachea, positive per CGRP ma non per serotonina; il terzo stadio infine, successivo alla nascita, presenta cellule isolate o raggruppate in NEB a livello alveolare, che risultano essere positive per peptide YY ma non per CGRP e serotonina. Nello stesso studio è stato anche dimostrato il cambiamento postnatale delle sostanze secrete dalle PNECs in ambito umano, con la positività al peptide YY e al CGRP, mentre uno studio (Nakagawa, 1994), ha dimostrato la diminuzione dell'immunoreattività per calcitonina e GRP nello stesso contesto.

Si era d'altra parte già evidenziato che le PNECs raggiungessero un picco massimo di numerosità alla nascita e andassero poi diminuendo subito dopo, anche per un processo di "diluizione", sottolineando il loro possibile ruolo nello sviluppo del polmone e nel suo adattamento nel neonato (Cutz., 1984)

Un doppio ruolo è stato attribuito alle PNECs a seconda dello stadio di sviluppo polmonare: il ruolo di modulatori della crescita e della differenziazione polmonare nelle prime fasi dell'organogenesi, dimostrato anche dalle proprietà delle sostanze rilasciate, e il ruolo di chemocettori nel primo periodo postnatale (Sorokin, 1993). Molti altri studi hanno

confermato la funzione di chemocettori, tra cui quello di Cutz del 1984 che dimostrava una modulazione del contenuto di serotonina nei corpi neuro epiteliali in vitro da parte di cambiamenti di concentrazione dell'ossigeno. Questo si spiega tenendo conto dell'espressione sulla membrana cellulare di un complesso molecolare in grado di legare l'ossigeno e sensibile ad esso, che in stati di ipossia determina il rilascio delle sostanze attive contenute nelle vescicole dense citoplasmatiche (Pan, 2005). Hanson, nel 1986, aveva suggerito che le cellule dei corpi neuroepiteliali rispondessero a cambiamenti di concentrazione dei gas direttamente nell'aria inspirata, completando la funzione chemocettiva del glomo carotideo che risponde invece a cambiamenti di concentrazione dei gas nel sangue (Jackson, 1999). Sembra inoltre che i corpi neuro epiteliali rispondano all'ipossia acuta ma non all'ipercapnia (Lauweryns, 1977; Cutz 1999).

Due tipi di cellule neuroendocrine sono state ritrovate nel polmone fetale umano, l' "*open type*", con processi citoplasmatici che raggiungono il lume delle vie aeree, e il "*closed type*", con processi citoplasmatici simil dendritici lungo la membrana basale, senza contatto con il lume. Quest'ultimo tipo è stato riscontrato solo nel polmone fetale e neonatale (Sunday,1997). Questo particolare arrangiamento anatomico potrebbe facilitare la funzione paracrina, in quanto i processi dendritici delle cellule "*closed type*" sono direttamente a contatto con diverse cellule epiteliali adiacenti e con il tessuto mesenchimale circostante, giocando un ruolo importante nella trasmissione degli stimoli meccanici rappresentati dai movimenti respiratori fetali e dall'espansione delle vie aeree causata

dalla secrezione polmonare. Gli stimoli meccanici intervengono nello sviluppo polmonare inducendo la proliferazione delle cellule polmonari fetali, la produzione della matrice extracellulare, e la differenziazione delle cellule alveolari. In particolare, gli stimoli meccanici determinano il rilascio di serotonina da parte delle PNECs (Pan, 2006) .

Il ruolo giocato dalla serotonina in questo contesto è riportato dallo studio di Cutz del 2007, dove il neurotrasmettitore è presentato come potente mitogeno delle cellule endoteliali e mesenchimali e potente broncocostrittore, facendo in questo modo partecipare le PNECs al processo di contrazione ritmica spontanea delle vie aeree, descritta da Lewis già nel 1924. La serotonina inoltre, come riportato ancora una volta da Cutz, potrebbe essere coinvolta nel processo di riassorbimento del liquido polmonare alla nascita.

Dopo la nascita, il coinvolgimento delle PNECs nella regolazione del tono bronchiale è stato evidenziato da uno studio che aveva dimostrato come rimuovendo l'epitelio tracheale che comprendeva le PNECs si verificasse un cambiamento nel tono della muscolatura liscia (da acuto oscillante ad acuto non oscillante), concludendo che il tono muscolare fosse controllato da un lato, dal rilascio della serotonina che promuove la contrazione, e dall'altro dal rilascio di un altro mediatore delle PNECs, il CGRP, che invece promuove il rilassamento, controllando il tono muscolare e dunque la ventilazione (Skogvall, 1999).

Per quanto riguarda il ruolo che svolgono le PNECs , numerosi studi hanno evidenziato un'alterazione del numero di cellule in diversi quadri patologici, confermando così alcune loro funzioni. Un numero aumentato

di PNECs e di NEB, insieme ad un incremento della concentrazione dei loro mediatori, è stato riscontrato nei polmoni delle vittime della SIDS (Sudden Infant Death Syndrome) (Porzionato, 2008), nella sindrome congenita da ipoventilazione centrale (Cutz, 1997), e nella broncodisplasia polmonare (Cutz, 1984).

Nel primo caso, l'iperplasia delle cellule è stata attribuita all'ipossia cronica, al ritardo nello sviluppo, all'infiammazione delle vie aeree e anche al fumo in gravidanza. Nel secondo caso è stata riscontrata, insieme all'iperplasia delle cellule neuroendocrine polmonari, un'ipoplasia del glomo carotideo, confermando in questo modo il ruolo delle PNECs come chemocettori. Nel terzo caso, in particolare, la proliferazione delle PNECs causata dall'esposizione all'ipossia potrebbe alterare sia il tono vascolare che la reattività bronchiale, inducendo una proliferazione tissutale tipica della bronco displasia polmonare (la serotonina e il CGRP hanno rispettivamente un effetto vasocostrittore e vasodilatatore).

Alcune manifestazioni cliniche della bronco displasia polmonare, come l'ipertensione polmonare, l'iperreattività delle vie aeree e gli aumentati episodi di apnea sono stati correlati con l'iperplasia dei NEB e l'aumento dei loro mediatori (Johnson, 1989).

L'aumentato numero delle cellule neuroendocrine è il risultato di diversi processi cellulari, tra cui proliferazione, differenziazione, e diminuita apoptosi: i meccanismi molecolari alla base dei diversi processi non sono chiari, ma si suppone che siano coinvolti molteplici mediatori dell'infiammazione, tra cui peptidi della famiglia "*bombesin like*" (Willet et

al., 1999). Le PNECs, una volta stimulate, rilasciano peptidi che inducono iperplasia delle cellule epiteliali e delle cellule muscolari lisce, agendo così sul tono vasale (la serotonina e il CGRP hanno rispettivamente un effetto vasocostrittore e vasodilatatore) e sul tono bronchiale causando la tipica proliferazione tissutale che caratterizza la BPD (Shenberger, 1997). Alcune manifestazioni cliniche della BPD, come l'ipertensione polmonare, l'iperreattività delle vie aeree e gli aumentati episodi di apnea sono stati correlati con l'iperplasia dei NEB e l'aumento dei loro mediatori (Georgieff, 1989).

SCOPO DELLO STUDIO

Studiare l'azione della fluoxetina nel modello animale di broncodisplasia (ratto esposto ad iperossia con FiO₂ 60%)

1. al termine della somministrazione del farmaco (2 settimane di vita):
modello in acuto
2. a distanza dalla somministrazione del farmaco (6 settimane di vita):
modello in cronico

in termini di modificazione del quadro morfoistologico (morfometria su preparato istologico), di modificazione quantitativa e qualitativa delle NEC e SMC (immunoistochimica)

MATERIALI E METODI

1. Modello animale di BPD mediante iperossia a 60% di O₂

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. E' stata assicurata un'assistenza adeguata per la salute e il benessere degli animali in accordo con la legge 116/92. Questi studi sono stati condotti sotto la supervisione del Comitato Etico Internazionale.

Il modello animale che abbiamo messo a punto si basa sull'esposizione di ratti neonati ad una concentrazione di ossigeno pari ad una frazione di inspirazione (FiO₂) del 60%. Tale livello di ossigeno induce negli animali un danno paragonabile a quello da barotrauma (trauma legato alla pressione di picco inspiratorio) che si osserva nei pazienti neonati umani sottoposti a ventilazione in caso di diagnosi di BPD.

2. Esposizione dei ratti neonati all'ossigeno

L'esposizione a concentrazioni variabili di ossigeno è resa possibile dall'impiego di un'attrezzatura denominata OXYCYCLER modello A420C (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 (Figura 5). 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 di larghezza X 50cm

di profondità X 50cm di altezza), hanno un sistema di ventilazione e filtri di rimozione della CO₂, la quale viene costantemente rilevata, insieme alla concentrazione di O₂, mediante un software collegato. Temperatura e umidità vengono mantenute rispettivamente a 24°C e 50%. Viene, inoltre, garantito un ritmo luce/buio di 12 ore, così pure l'apertura quotidiana per la pulizia e il rifornimento di acqua e cibo ad libitum (circa 10 minuti al giorno). Ratte Sprague-Dawley (Harlan, Udine, Italia) del peso di circa 300 grammi, in gravidanza, vengono stabulate in condizioni di aria ambiente nei locali dove risiede l'attrezzatura almeno sette giorni prima il loro ingresso in sperimentazione. Questo per far familiarizzare la madre con l'ambiente sperimentale e per evitare stress al momento del parto. Una volta nati, i ratti e la rispettiva madre vengono esposti per 14 giorni ad una concentrazione di O₂ pari al 60% (pressione sul livello del mare di 760 mmHg).



Figura 5: Camere di stabulazione degli animali nel modello sperimentale di danno polmonare da iperossia OxyCycler® (BioSpherix).

3. Disegno sperimentale

La fase preliminare dello studio prevedeva l'esposizione dei ratti neonati al 60% di O₂. Due ratte gravide Sprague-Dawley (SD) del peso di 200-300 g e relative cucciolate erano esposte a condizioni di iperossia al 60% di concentrazione di O₂, mentre una terza ratta gravida e cucciolata veniva mantenuta come controllo al 21% di concentrazione di O₂, in aria ambiente.

Per il modello in acuto gli animali, una volta nati, sono stati distribuiti in maniera random in 3 gruppi sperimentali: i gruppi 1(n=10) e 2(n=10) sono stati sottoposti al trattamento con iperossia al 60% per 2 settimane dalla nascita; il gruppo 1 ha ricevuto il trattamento con Fluoxetina mentre il gruppo 2 non ha ricevuto alcun trattamento. Il gruppo 3(n=10) è stato considerato gruppo di controllo e mantenuto in aria ambiente ad una concentrazione di 21% di ossigeno per 2 settimane. Durante tutto il tempo dello studio ogni ratto appartenente a ciascun gruppo è stato pesato quotidianamente annotando le variazioni giornaliere in modo tale da poter costruire delle curve di crescita media per ogni gruppo.

Per il modello in cronico è stata seguita la stessa procedura ma al termine dei 14 giorni di vita, tutti gli animali appartenenti ad ogni gruppo sono stati mantenuti in aria ambiente per ulteriori 6 settimane. Al termine dei tempi previsti per ciascun braccio (2 settimane e 6 settimane dalla nascita), tutti gli animali sono stati anestetizzati per prelevare campioni di sangue arterioso e campioni di fluido dal bronco lavaggio alveolare (BAL). Infine sono stati prelevati tutti gli organi.

4. Somministrazione della fluoxetina

I ratti neonati del gruppo 1 sono stati trattati con Fluoxetina in soluzione diluita a 2 mg /10 ml, dal giorno 1 al giorno 14, una volta al giorno, e alla dose di 10 mg/kg di peso corporeo del ratto. Il farmaco è stato somministrato per via peritoneale usando siringhe ma 1 ml montate con ago 26 Gauge (figura 6).



Figura 6: Iniezione intraperitoneale in ratto neonato

5. Sacrificio degli animali

Per verificare la funzionalità della macchina, la validità del modello scelto e l'impatto dell'iperossia anche su altri organi, gli animali sono stati sacrificati al tempo P14. Il sacrificio è stato praticato 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' stato quindi raccolto il sangue arterioso e un catetere 0.5 F (Vygon Corporation) è stato posto in trachea per raccogliere i fluidi del BAL dopo aver instillato 0.25-0.5 ml di soluzione salina NaCl allo 0.9 %. Ogni campione di sangue e di BAL è stato poi centrifugato a 150xg per 10 minuti, e rispettivamente il plasma e il supernatante sono stati conservati a -20 °C fino al momento dell'analisi. I tessuti polmonari

sono stati prelevati dopo l'eutanasia via exsanguinatio. Ogni emilobo polmonare è stato conservato in formalina al 10% mentre l'altro è stato congelato e conservato a -80°C .

Tutti gli animali sono stati pesati quotidianamente durante il periodo di trattamento/esposizione e prima del sacrificio sono stati pesati utilizzando una bilancia con precisione centesimale da laboratorio.

6. 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).

6.1. Istologia polmonare e aspetti morfometrici

Tutte le sezioni sono state colorate con Ematossilina-Eosina. L'analisi morfometrica è stata effettuata usando tecniche standardizzate e tecniche di elaborazione dell'immagine computer-assistita mediante un software denominato ImageJ (un programma Java di elaborazione delle immagini di dominio pubblico, creato da W. Rasband al dipartimento di ricerca dell'Istituto Nazionale per la Salute Mentale di Bethesda, MD) con il quale sono stati valutati il numero di alveoli e la superficie media alveolare in pixel per ogni gruppo. Sono stati

selezionati per lo studio sei campi polmonari random per ogni animale e per ciascuno, nella valutazione (sia del numero di alveoli, sia della superficie alveolare), sono stati eliminati bronchi e zone di rottura del tessuto. La visione dei preparati è avvenuta con microscopio ottico LeicaTm DM 4000 B (Leica, Solms, Germania) integrato con una macchina fotografica digitale (Leica DFC 280).

E' stata inoltre valutata l'alveolarizzazione mediante l'impiego della Conta Radiale Alveolare (RAC) secondo il metodo di Emery e Mithal (Emery e Mithal, 1960) implementato da Cooney e Thurlbeck (Cooney e Thurlbeck, 1982). Una linea perpendicolare è stata tracciata dal centro del bronchiolo respiratorio al limite dell'acino, definito come un setto di tessuto connettivale o la pleura, ed è stato contato il numero di alveoli che intersecavano la retta. Tutti i bronchioli respiratori contenuti nella sezione analizzata sono stati considerati per il conteggio. L'analisi della RAC è stata effettuata su 10 campi per sezione ad un ingrandimento di 20X.

7. Analisi immunoistochimica

Le sezioni sono state sottoposte a due protocolli immunoistochimici finalizzati alla localizzazione delle PNECs ed all'analisi della componente vascolare, mediante anticorpi anti-Protein Gene Product (PGP) 9.5 ed anti-actina del muscolo liscio, rispettivamente. Sono state eseguite delle sezioni al microtomo di 3-4 micron. E' stato eseguito uno smascheramento antigenico mediante riscaldamento: i vetrini sono stati immersi in tampone sodio citrato 10 mM, pH 6.0, a 96 °C per 30 minuti. Sono state quindi lasciate a raffreddare per 20 minuti e successivamente sono state lavate per 10 minuti con Phosphate Buffer Solution (PBS) 0,01 M. Le sezioni sono state

incubate in perossido di idrogeno allo 0,03% in acqua distillata, per rimuovere l'attività della perossidasi endogena. Per eliminare eventuali legami aspecifici le sezioni sono state incubate per 30 minuti con Blocking Serum (Albumina di siero bovino, Sigma chemical A-2153 Sigma Aldrich, Milan, Italy) allo 0,04% e Normal Goat Serum (DAKO ® X0907Dako corporation, Carpinteria, CA, USA) in PBS.

Successivamente le sezioni sono state incubate con l'anticorpo primario (anticorpo policlonale di coniglio anti-PGP 9.5, Ab1761 Millipore®, diluito 1:500 in PBS o anticorpo monoclonale di topo anti-actina del muscolo liscio, DAKO, Ref. M851, diluito 1:1500) per 60 minuti a temperatura ambiente, lavate con PBS per 10 minuti, quindi incubate con l'anticorpo secondario (polimero da siero di coniglio e topo Immpress Universal, Vector®) per 30 minuti e lavate nuovamente con PBS. Successivamente la reazione è stata sviluppata con 3-3' diaminobenzidina (DAB, Sigma) contenente perossido di idrogeno. Infine è stata effettuata una colorazione di contrasto con ematossilina.

8. Misurazione della tonaca media

L'analisi dei preparati di immunohistochimica con anticorpi anti-alfa-actinaSMC è avvenuta con microscopio ottico LeicaTm DM 4000 B (Leica, Solms, Germania) integrato con una macchina fotografica digitale (Leica DFC 280) per la ripresa di campi polmonari con risoluzione 20x da campi polmonari del lobo superiore di destra di ogni gruppo. Successivamente con elaborazione dell'immagine computer-assistita mediante il software ImageJ è stato misurato il

perimetro interno ed esterno della tonaca muscolare di ogni singolo bronchioli e arterie individuata. Le arterie dalle vene sono state distinte in base al maggior numero di tessuto muscolare marcato con l'anticorpo specifico per le SMC. Si sono misurati solo i vasi e le vie aeree tagliate in sezione trasversale. Il diametro è stato calcolato secondo la formula: perimetro interno diviso π . Lo spessore della tonaca muscolare sottraendo all'area della circonferenza esterna l'area della circonferenza interna, come già descritto (Fornaro, 2007). I diametri così ottenuti sono stati stratificati con attribuzione di un valore categoriale calcolato come valore mediano del diametro del gruppo di riferimento (diametro 1000-2000 μm dei bronchi: mediana 1500 μm ; diametro 100-900 μm dei vasi: mediana 500 μm).

9. Analisi statistica

I risultati sono presentati come $\text{media} \pm \text{deviazione standard}$ della media. Le differenze tra i gruppi sono state analizzate con il test ANOVA considerando significativo un valore della $p < 0.05$.

I calcoli statistici sono stati eseguiti usando Statgraphic (Software Inc., Ateneo patavino, IT).

RISULTATI

MORFOMETRIA

2. FiO2 60% per 2 settimane

Nei ratti esposti ad iperossia si ritrovano gli elementi tipici della patologia respiratoria cronica: un forte ispessimento dell'interstizio, la ridotta alveolarizzazione con minor numero di creste secondarie ed estese aree enfisematose con presenza di discreti infiltrati linfocitari.

Quando i ratti sono trattati con fluoxetina l'interstizio appare più assottigliato, l'infiltrato flogistico linfocitario ridotto e diminuiti anche i foci di alterazioni enfisematose rispetto ai ratti esposti. Entrambi i casi possono essere confrontati con la morfologia polmonare del gruppo di animali utilizzati come controllo in aria ambiente. (figura 1)

In termini di RAC e di conta alveolare è presente una differenza statisticamente significativa ($p < 0.05$) tra le due popolazione esaminate e rispetto ai trattati. Nei ratti trattati con fluoxetina si nota una perdita della significatività rispetto ai controlli aria ambiente. (tabella 1, tabella 2)

Tabella 1: RAC

| | controllo | esposti | trattati |
|-------|-----------|---------|----------|
| Media | 15,9 | 12,7 | 15,6 |
| DS | 3,5 | 3,3 | 3,1 |

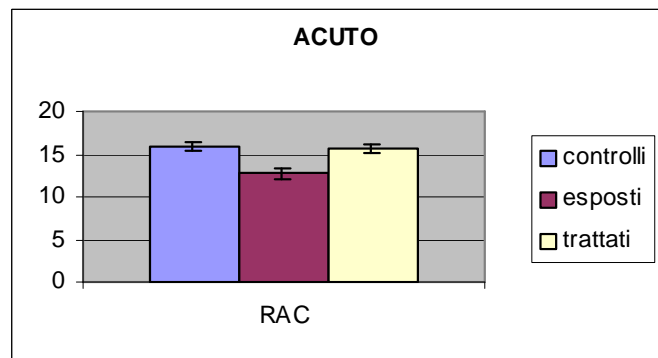
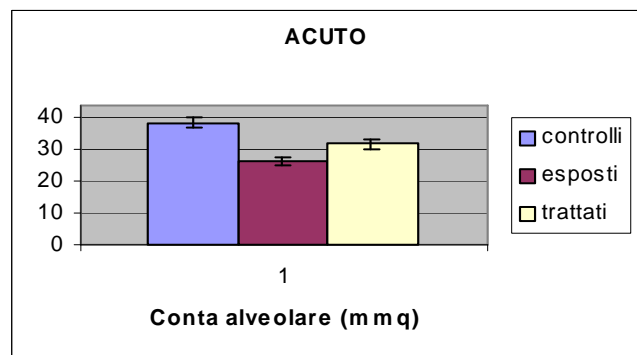


Tabella 2: Conta alveolare (mm²)

| | controllo | esposti | trattati |
|-------|-----------|---------|----------|
| Media | 38,5 | 26,5 | 31,9 |
| DS | 8,6 | 7,8 | 8,6 |



2. FiO2 60% per 2 settimane + FiO2 21% per 4 settimane

Quando i ratti vengono sacrificati dopo 4 settimane di riposo in aria ambiente, il danno iperossico appare peggiorato con un quadro istologico caratterizzato da infiltrati cellulari, ispessimento e diminuita alveolarizzazione. (figura 2)

In termini di RAC e conta alveolare esse appaiono significativamente inferiori rispetto al controllo in aria ambiente ($p < 0.01$).

I ratti trattati con fluoxetina confermano un quadro istologico in miglioramento e dal punto di vista morfometrico perdita di significatività rispetto ai ratti esposti. (tabella 3 e tabella 4).

Tabella 3: RAC

| | controllo | esposti | trattati |
|-------|-----------|---------|----------|
| Media | 12,8 | 8 | 10,5 |
| DS | 3,4 | 1,8 | 1,7 |

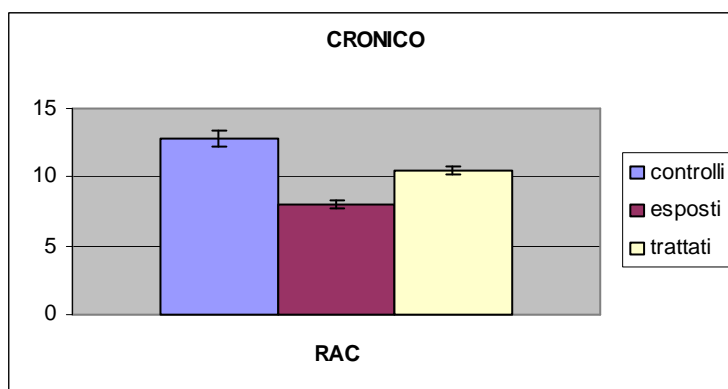
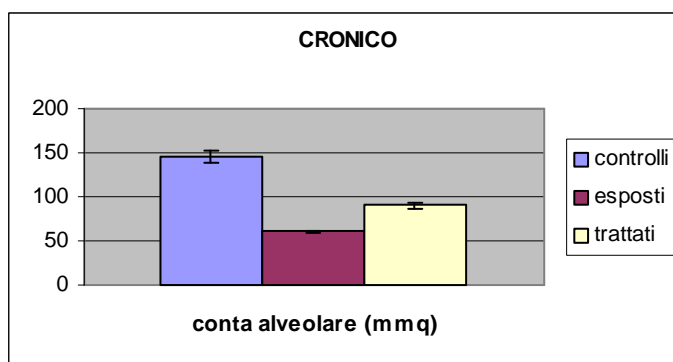


Tabella 4: Conta alveolare (mm²)

| | controllo | esposti | trattati |
|-------|-----------|---------|----------|
| Media | | | |
| DS | | | |



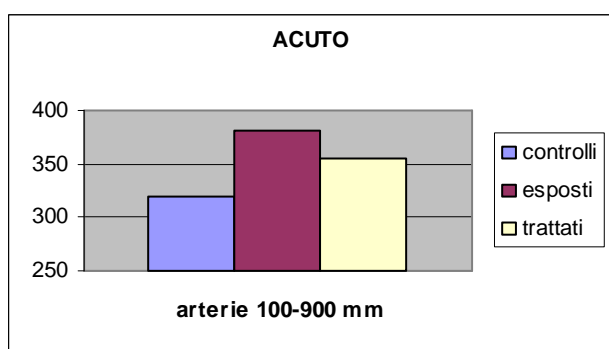
IMMUNOISTOCHEMICA

A. Colorazione con alfa actina SMC

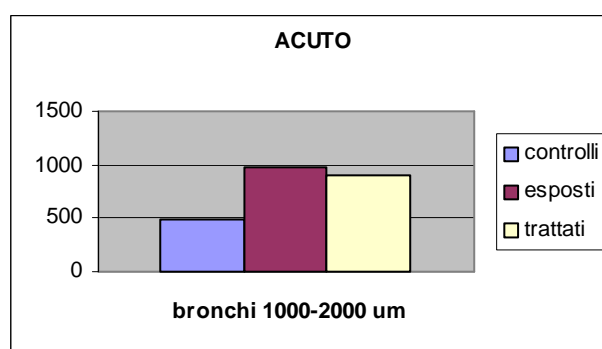
2 FiO2 60% per 2 settimane

Nei ratti esposti ad iperossia la tonaca muscolare risulta ispessita sia a livello arterioso che bronchiale rispetto ai controlli in aria ambiente ($p < 0.05$). Quando trattati con fluoxetina si nota una tendenza alla diminuzione che però non raggiunge valori statisticamente significativi. (tabella 5)

Tabella 5: spessore tonaca muscolare



| | controlli | esposti | trattati |
|----------|-----------|---------|----------|
| Diametro | 500 | 500 | 500 |
| Spessore | 319 | 381 | 356 |



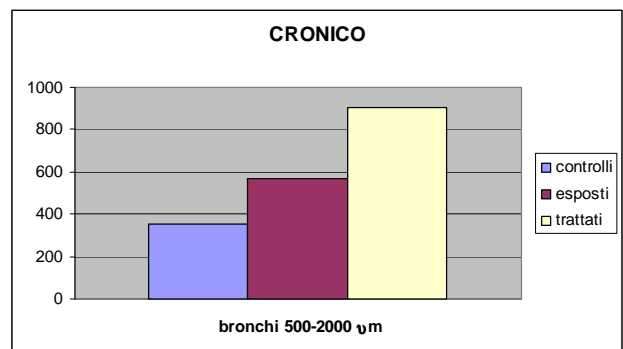
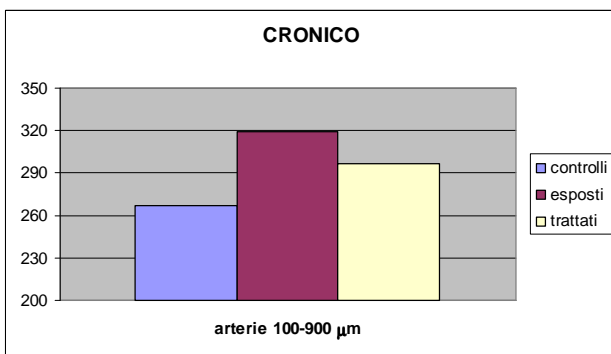
| | controlli | esposti | trattati |
|----------|-----------|---------|----------|
| Diametro | 1500 | 1500 | 1500 |
| Spessore | 494 | 970 | 895 |

3 FiO2 60% per 2 settimane + FiO2 21% per 4 settimane

Dopo 4 settimane dall'esposizione ad iperossia la tonaca muscolare risulta ispessita sia a livello arterioso che bronchiale rispetto ai controlli in aria ambiente ($p < 0.05$). Quando trattati con fluoxetina c'è una tendenza alla diminuzione dello spessore della tonaca arteriosa che però non raggiunge

valori statisticamente significativi. Sul versante bronchiale la tonaca muscolare aumenta in modo significativo ($p < 0.05$). (tabella 6)

Tabella 6: Spessore tonaca muscolare



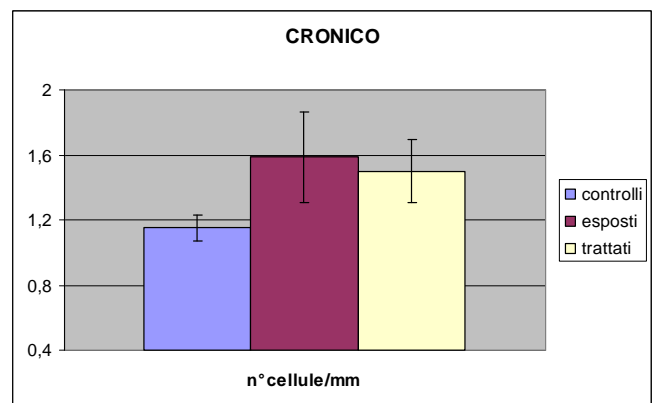
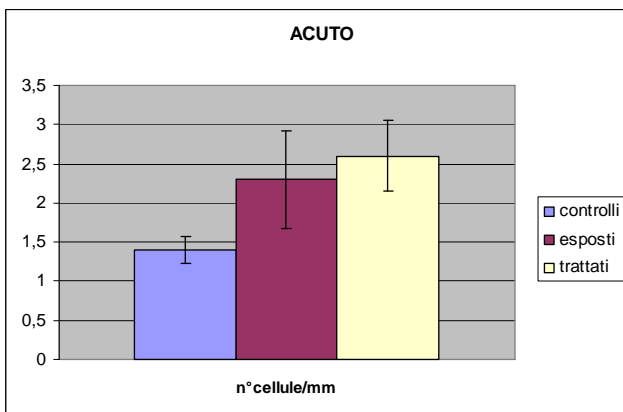
| | controlli | esposti | trattati |
|--------------|------------|------------|------------|
| Diam | 500 | 500 | 500 |
| spess | 266 | 319 | 296 |

| | controlli | esposti | trattati |
|--------------|-------------|-------------|-------------|
| Diam | 1500 | 1500 | 1500 |
| spess | 355 | 568 | 905 |

B. Colorazione con PGP

Le cellule neuroendocrine sono state evidenziate in tutti i gruppi a livello dell'epitelio respiratorio (Figura 7-9). Le PNEC nei ratti esposti ad iperossia erano aumentate rispetto al gruppo di controllo nel modello in acuto e si mantenevano elevate anche a distanza di 4 settimane. Quando trattate con fuoxetina la numerosità delle PNEC rimaneva pressoché invariata rispetto al gruppo esposto ad iperossia. (tabella 7)

Tabella 7: numero PNEC nell'epitelio



| | controlli | esposti | trattati |
|--------------|-------------|-------------|-------------|
| Media | 1,4 | 2,3 | 2,6 |
| SD | 0,48 | 1,77 | 1,28 |

| | controlli | esposti | trattati |
|--------------|-------------|-------------|-------------|
| Media | 1,15 | 1,6 | 1,5 |
| DS | 0,22 | 0,79 | 0,54 |

4 Crescita ponderale

La crescita ponderale durante le due settimane di trattamento è risultata sovrapponibile nei tre gruppi. (figura 8) così come il peso raggiunto al momento del sacrificio sia nel modello acuto che in quello cronico. (tabella 9)

Figura 6:
crescita ponderale

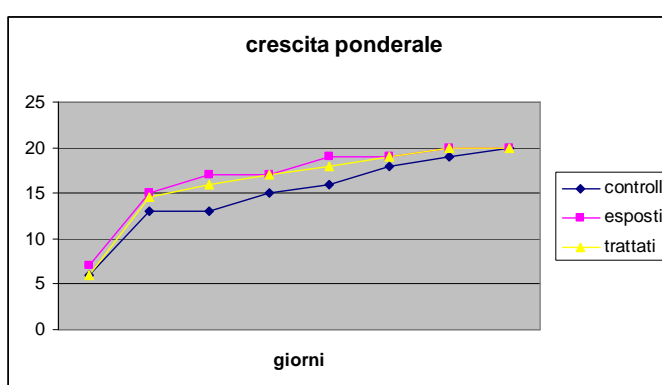


Tabella 8: Peso al momento del sacrificio (grammi)

| ACUTO | | | |
|--------------|-----------|---------|----------|
| | controlli | esposti | trattati |
| Media | 16.03 | 18.01 | 17.08 |
| DS | 2 | 2 | 1 |

| CRONICO | | | |
|--------------|-----------|---------|----------|
| | controlli | esposti | trattati |
| Media | 168 | 166 | 177 |
| DS | 13 | 18 | 21 |

ISTOLOGIA

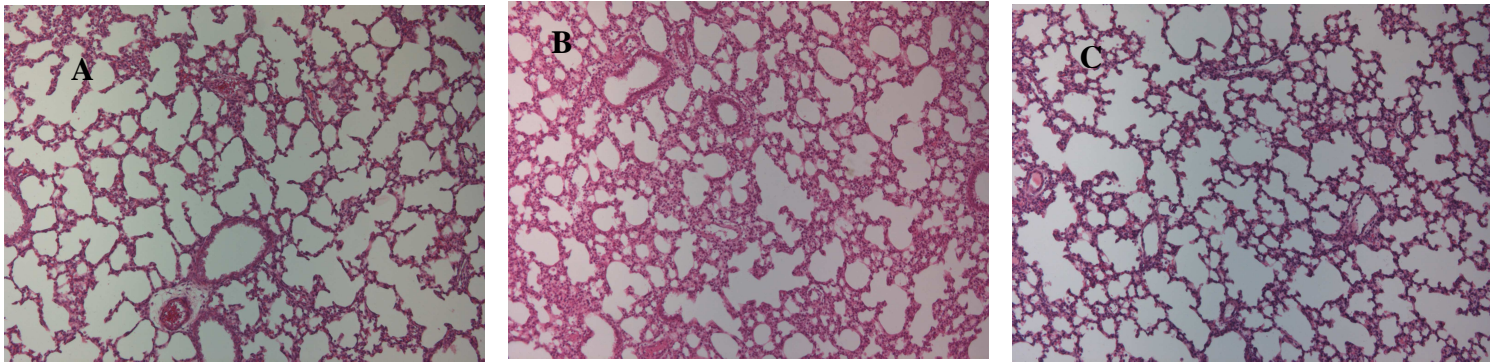


Figura 1: tessuto polmonare di ratto a 2 settimane di vita.
Colorazione ematossilina-eosina. (A: controllo; B: esposto; C: trattato)

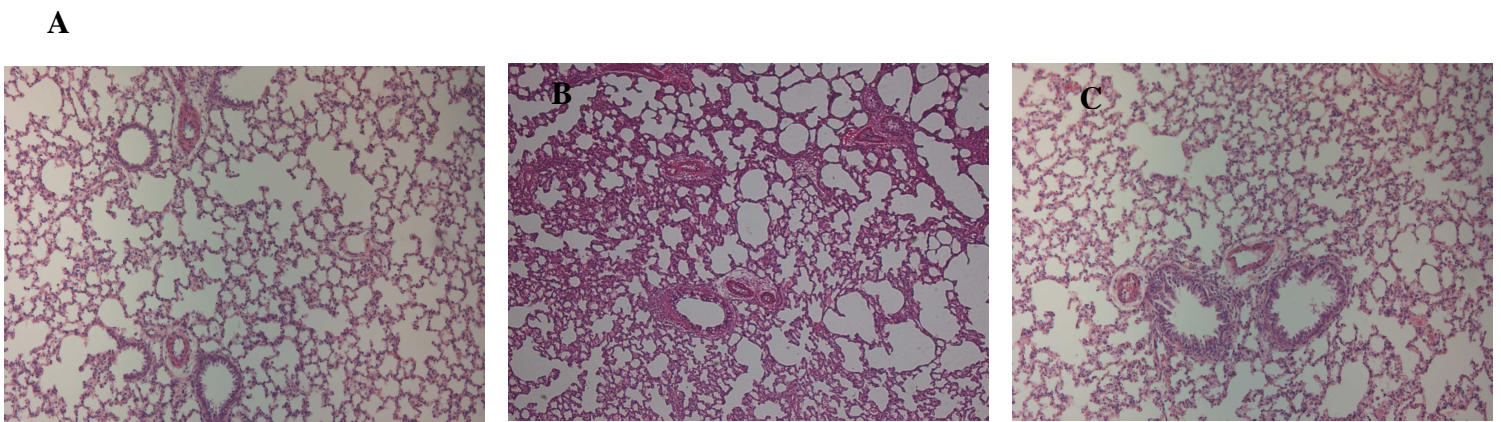


Figura 2: tessuto polmonare di ratto a 6 settimane di vita.
Colorazione ematossilina-eosina. (A: controllo; B: esposto; C: trattato)

IMMUNOISTOCHIMICA

Tonaca muscolare

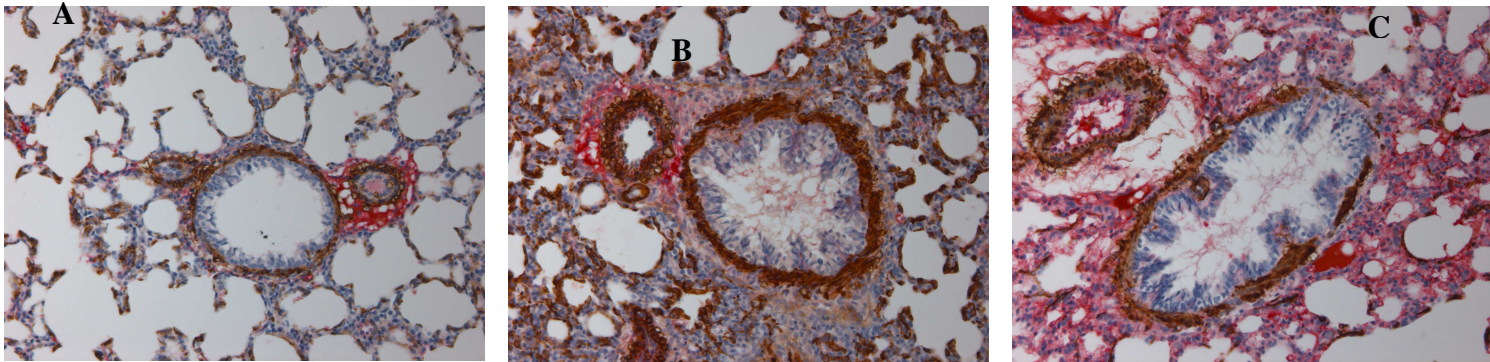


Figura 1: tessuto polmonare di ratto a 2 settimane di vita.
Colorazione alfa actina SMC. (A: controllo; B: esposto; C: trattato)

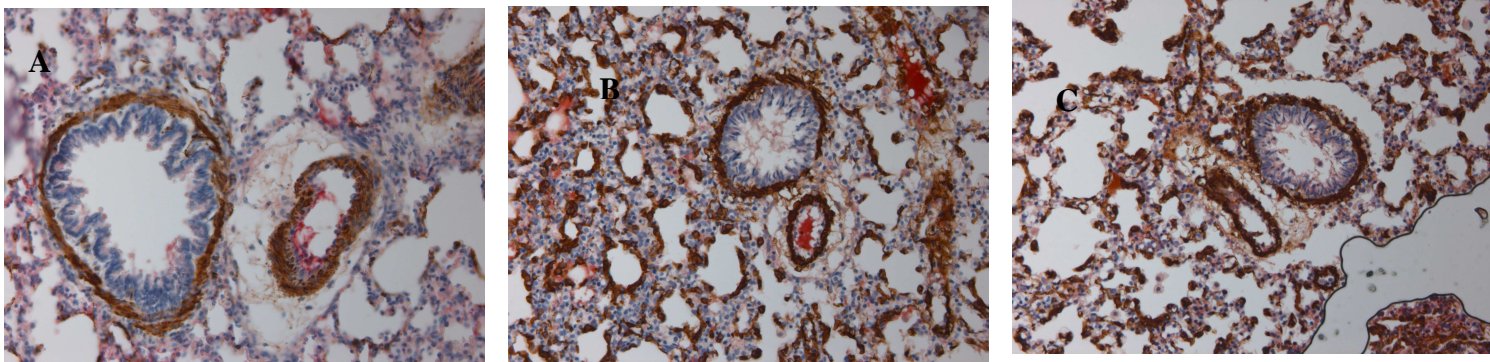


Figura 2: tessuto polmonare di ratto a 6 settimane di vita.
Colorazione anti- alfa actina SMC. (A: controllo; B: esposto; C: trattato)

PNEC

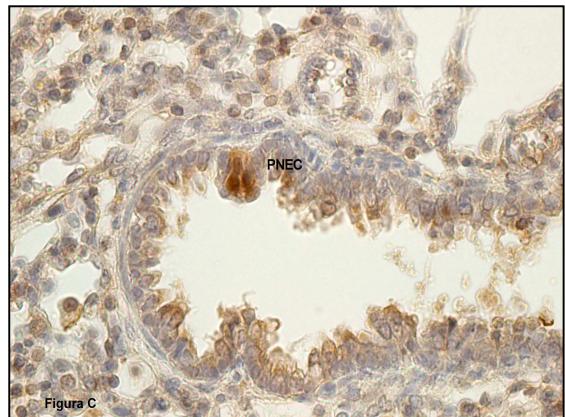
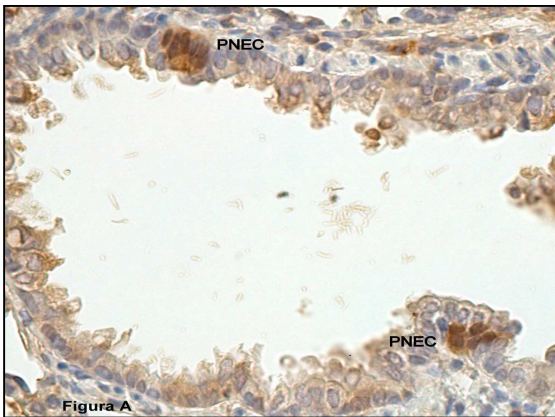
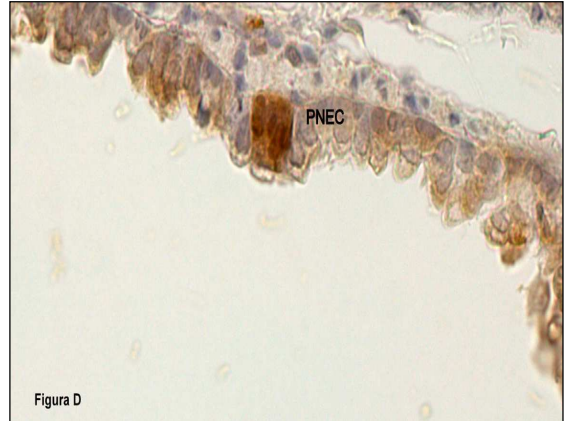
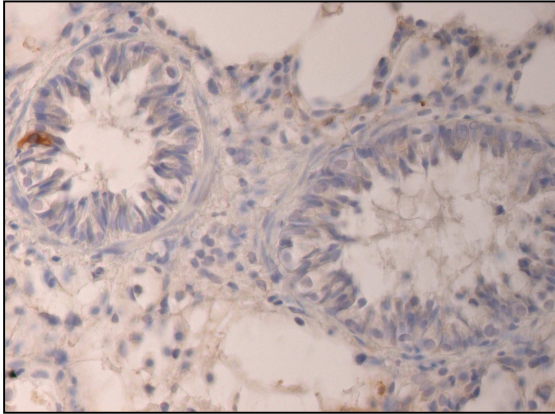


Figura 3: tessuto polmonare di ratto. Colorazione anti-PGP.
Si noti la presenza di PNEC (in marrone) in sede intraepiteliale.

DISCUSSIONE

Come noto la bronco displasia, descritta per la prima volta da Northway (35), è una patologia del neonato pretermine con distress respiratorio acuto sottoposto a ventilazione meccanica e supplementazione di ossigeno per lungo tempo, ma tale reperto è presente anche nei gravemente pretermine anche solo come conseguenza di un inizio di scambio gassoso precoce.

L'esposizione di ratti neonati ad una FiO₂ del 60% per 14 giorni induce un danno del parenchima polmonare eterogeneo con aree di arresto dell'alveolarizzazione e della crescita miste ad aree di ispessimento interstiziale con aumento di sintesi del DNA analogo a quanto osservato in neonati pretermine affetti da BPD.

Abbiamo valutato la quantificazione della alveolarizzazione in termini morfometrici misurando la conta radiale alvolare (RAC) e il numero degli alveoli: anche nel nostro studio si conferma la differenza tra il gruppo degli animali esposti ad iperossia, che presenta peggioramento del quadro morfometrico, rispetto al gruppo mantenuto in aria ambiente.

Per la prima volta in letteratura abbiamo ricercato l'effetto della fluoxetina sul modello animale di danno da iperossia su modello animali, trovando un recupero negli animali studiati di RAC e conta alvolare sia al termine della somministrazione del farmaco che dopo un periodo di recupero di 4 settimane.

E' ormai noto, infatti, che la fluoxetina ha azione terapeutica anche a livello polmonare e in letteratura compaiono le prime indicazioni come farmaco per le forme di ipertensione essenziale nell'adulto

(Pulm Pharmacol Physiol 2006;33:1047-1051). A livello sperimentale la fluoxetina è stata dimostrata proteggere nell'ipertensione polmonare indotta di ipossia (Marcos, 2003) e da monocrotalina (Giugnabert, 20005) in modelli animali di ratto e di topo. Secondo gli autori l'effetto protettivo sarebbe da imputare al rimodellamento vascolare con azione diretta sulla proliferazione delle cellule muscolari lisce.

Come già descritto dal punto di vista istologico il danno da iperossia è caratterizzata da danno diffuso delle vie respiratorie, ipertrofia delle cellule muscolari lisce, infiammazione neutrofila e fibrosi parenchimale con distruzione massiva delle strutture presenti nel polmone immaturo.

L'azione protettiva della fluoxetina *per se* non trova precedenti in letteratura e apre ad alcune ipotesi interpretative. E' noto che già dopo 7 giorni di esposizione al 60% di ossigeno si assiste ad un afflusso importante associato con lo sviluppo di ipertensione polmonare. (M. Yi, K. Tanswell 2004) e con marcata ipertrofia delle cellule muscolari lisce (SMC) delle arterie e delle vie aeree, senza modificazioni epiteliali (Jhonson, 1992).

Nei nostri preparati istologici abbiamo identificato in maniera disomogenea aree di enfisema alternate ad aree di ipercellularità interstiziale e dubbio infiltrato infiammatorio o fibrotico (non ancora tipizzato).

Come dimostrato precedentemente la fluoxetina in epoca prenatale ha un'azione inibente la crescita delle SMC correlata positivamente alla concentrazione plasmatica (Fornaro, 2007). Questo potrebbe spiegare la diminuzione della tonaca muscolare vasale e bronchiale, riducendo da un lato l'ipertensione polmonare associata alla BPD e dall'altro l'ipereattività e la rigidità bronchiale.

Proprio in base a queste considerazioni abbiamo calcolato lo spessore della tonaca muscolare arteriosa, che ne ha confermato l'incremento nei ratti sottoposti ad iperossia ma con effetto terapeutico della fluoxetina sia AL termine della somministrazione (2 settimane) che a distanza (4 settimane in aria ambiente). Per quanto riguarda la misurazione della parete muscolare bronchiale, in accordo con la letteratura (Jhonson, 1992), abbiamo rilevato un aumento nei ratti sottoposti ad iperossia. Il trattamento con fluoxetina riduce lo spessore della tonaca muscolare dopo 2 settimane di iperossia ma non dopo ulteriori 4 settimane in aria ambiente. Sarà utile eseguire un approfondimento in questo braccio con un aumento della numerosità dei campioni analizzati.

Come già detto, lo studio si propone di indagare il sistema neuroendocrino polmonare quale possibile bersaglio terapeutico per la BPD. Esso appartiene al cosiddetto "sistema neuroendocrino diffuso" che ha avuto una definizione come entità circa 60 anni fa, essendo stato identificato un complesso di cellule capaci di captare amine e decarbossilarle (APUD, amine precursor uptake and decarboxylation). Embriologicamente queste cellule risultano di derivazione neurectodermica e creste neurali e sono fisiologicamente capaci di produrre amine o peptidi neurotrasmettitori. Possiedono vescicole, tipo sinaptico e neurosecretorio, a nucleo centrale denso che liberano per esocitosi. Il gruppo delle cellule neurendocrine include cellule che costituiscono la midollare del surrene, e cellule C della tiroide, isole del Langherans, la neuroipofisi, ma anche le cellule neurendocrine del sistema respiratorio, gastroenterico, urogenitale, i chemocettori

del glomo carotideo e l'apparato iuxta-glomerulare.(Wheather, Istologia ed anatomia microscopica Atlante, Ed. Ambrosiana, 2005)

Nell'apparato respiratorio tali cellule sono chiamate PNEC e si è visto essere abbondanti nella vita fetale vicino al termine e diminuire ai livelli dell'adulto poco dopo la nascita, suggerendo una funzione importante nella vita fetale e perinatale. In ratti esposti ad iperossia, come nel nostro modello, si assiste ad iperplasia di queste cellule che aumentano come in nessun'altra patologia polmonare. Anche nel nostro lavoro abbiamo confermato l'incremento delle PNEC nei ratti esposti ad iperossia utilizzando il marcatore aspecifico PGP all'analisi immunohistochimica. E' noto che l'iperplasia delle PNEC associata ad aumento dei prodotti di secrezione nel ratto sottoposto ad iperossia contribuisca alla proliferazione non specifica dei fibroblasti, delle cellule muscolari lisce e delle cellule epiteliali. Quando trattati con fluoxetina la numerosità delle PNEC non sembra risentirne, sia in acuto che in cronico. Ulteriori studi sono necessari per verificare l'azione diretta del farmaco sulle PNEC attraverso coltura cellulare e per verificare il tipo di PNEC coinvolte con immunohistochimica specifica per serotonina, bombesina e CGRP. La serotonina ha azione stimolante la proliferazione di cellule muscolari lisce in vitro (Fornaro, 2007) ma è anche noto che la fluoxetina inibisce il trasportatore per la serotonina (5HTT) che sembra essere esso stesso responsabile per l'effetto proliferativo della serotonina. Al momento attuale non sono disponibili dati sull'espressione di questo recettore a livello polmonare.

Un ulteriore commento merita la scelta del ratto come modello animale per lo studio del sistema serotoninergico e neuroendocrino. Nei ratti la formazione degli alveoli dalla fase sacculare si verifica in epoca postnatale attraverso un processo in cui i sacculi si suddividono in compartimenti più piccoli con gemmazione e allungamento di setti secondari a partenza dai primari (fase rapida di alveolarizzazione tra 3 e 8 giorni dopo la nascita, pressochè completa dopo 14 giorni) (figura 1).

L'esposizione di ratti neonati al 60% di ossigeno per 14 giorni induce danno polmonare con morfologia simile a quella di neonati umani affetti da BPD, provocando un arresto dell'alveogenesi (M. Yi, K. Tanswell 2004).

Il modello animale murino di iperossia è stato validato non solo in termini morfologici e descrittivi ma anche dal punto di vista funzionale (compliance, breathing pattern) e questo consente una buona base per lo studio della BPD *in vivo*.

Il nostro studio si propone come target le PNEC , la loro implicazione nella BPD e la possibilità che esse diventino bersaglio terapeutico.

Come si nota dalla tabella 1 e 2, il modello murino non è quello che si avvicina così bene all'uomo per quanto riguarda la rappresentazione del sistema neuroendocrino, soprattutto per la produzione di serotonina in epoca neonatale (Polak, 1992). Infatti, come già descritto è proprio questa l'epoca di maggior rappresentazione del sistema neuroendocrino umano nonchè il periodo di interesse del nostro studio.

Anche la localizzazione (aree di biforcazioni, lume vie aeree) e la tipizzazione delle PNEC in base ai prodotti di secrezioni (serotonina, bombesina, CGRP) variano in funzione della specie e

dell'età. Ne consegue che i dati riportati in letteratura sono disomogenei e difficilmente confrontabili (Polak, 1992) per poter desumere le caratteristiche intrinseche di questa linea cellulare.

Date queste premesse sarà importante implementare lo studio delle PNEC su modelli di con sistema neuroendocrino a comportamento e distribuzione più simile a quello umano, come il coniglio.

La scelta di somministrare giornalmente la fluoxetina ad una concentrazione maggiore rispetto a quanto prescritto terapeuticamente nell'uomo è stata dettata, come descritto (Steven, 1993), dalla necessita di superare la maggiore clearance epatica del ratto ma tale da mantenere concentrazioni plasmatiche analoghe a quelle umane.

Abbiamo valutato i ratti dopo 14 giorni di terapia perchè questo periodo, in cui si completa l'alveolarizzazione, coincide con il raggiungimento di un adeguato range terapeutico e attività farmacologica della fluoxetina. Il controllo dopo 4 settimane in aria ambiente è stato scelto sulla base dell'esperienza trapiantologica polmonare nel nostro dipartimento (Grisafi, 2009 submitted) su modello implementato. Inoltre, 4 settimane dalla sospensione del trattamento è ritenute tempo sufficiente per valutare il completamento morfostrutturale al termine dello sviluppo polmonare tipico del ratto adulto (Burri, 2006)

La somministrazione di Fluoxetina ha mostrato alcuni effetti benefici in termini di riparazione del danno polmonare su modello animale, da cui si potrebbe ipotizzare un miglioramento anche della funzione polmonare.

Per approfondimento in merito a quanto visto nei risultati preliminari esposti sono in corso:

- Componente angiogenetica: rimane da valutare il ruolo di fenomeni di neoangiogenesi e rimodellamento vascolare in corso sia di danno che di riparazione. Questo può essere effettuato studiando fattori coinvolti normalmente in questi processi, come il VEGF , Von Willebrand Factor, CD31/PECAM1 (Thebaud et al. 2007) ;
- Citochine proinfiammatorie: una valutazione su un panel di citochine presenti generalmente nel siero in quantità aumentata in caso di flogosi e fibrosi polmonare, per testare se effettivamente vi sia una loro diminuzione nel siero degli animali trattati (tipo MMP9 come marker di danno ossidativo).

| Species | Soli-tary | Clus-ters | A/P | PGP | NSE | CG | SYN | LEU7// HNK | MOC-1 | SOM | CGRP | ENK | BN/ GRP | CT | 5-HT | CCK | OTHERS |
|-------------------|-----------------|-----------------|-----|-----|----------------|----|-----|---------------|-------|-----------------|----------------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|-----|--------------------------|
| Human | + | ± | A | + | + | + | + | + | + | + | ± | ± | + ² | + | + | ± | SP ³ |
| Monkey | | | | + | + | + | | + | | + | | | | + | + | ± | |
| Cow/Cattle | ± | + | AP | + | + | | | | | | | | | | | | |
| Sheep | + | ± | A | + | + | | | | | | | | | | + | ± | |
| Goat | ± | + | AP | + | + | | | | | | | | | | | | |
| Pig | | | | + | | + | | + | | | + | | | + | + | ± | |
| Dog | | | | + | | | | | | | | | | + | ± | | |
| Cat | | | | | | | | | | + | | | | + | ± | | |
| Rabbit | | | | + | + ⁵ | + | + | | + | | + | | | + | + ⁵ | + | |
| Guinea Pig | | | | + | + | + | | | | | + | + | - | + | ± | ± | SP ⁶ |
| Rat | | | | + | + | + | | | | | + ⁷ | + | - | + ^{8,9} | + | ± | |
| Mouse | | | | + | + | + | ± | | | | + | + | ± ¹⁰ | + | + | ± | PYY ^{11,12} |
| Hamster | | | | + | + | + | | | | - | + | + | ± ¹⁰ | + | + | ± | |
| Turtle | | | | | | | | | | | + | + | | | + | | |
| Lizard | | | | | | | | | | | | | | + | | | |
| Frog | + | + | | + | | | | | | + | | | | | + | + | |
| Toad | + | + | | + | | | | | | + | | + | | | + | | |
| Salamander | + | - | | + | | | | | | | | | + | | + | | SP ¹² |
| Polypterus spp | + | - | | | | | | | | + ¹³ | | | | | + ¹⁴ | | |
| Protopterus spp | + | - | | | | | | | | | | | + ¹⁵ | | + ¹⁴ | | |
| Teleosts | + | + | | | | | | | | | | + ¹⁵ | | | + ¹⁴ | | |
| Selachians | + | + | | | | | | | | | | + ¹⁶ | | | + ¹⁶ | | |
| Lampreys | + | + | | | | | | | | | | + ¹⁵ | | | | | |
| Ambystoma (gills) | + ¹⁵ | + ¹⁵ | | | | | | | | | | + ¹⁵ | | | + ¹⁵ | | FMRP-amide ¹⁵ |

● **Tabella 1:** PNEC: marcatori generici e specifici per amine e peptidi prodotti (Polak, 1992)

| | Fetal | Newborn | Adult |
|-------------------------|------------------|---------|-------|
| Human | +++ ² | +++ | + |
| Monkey (Macaca mulatta) | +++ | +++ | + |
| Calf | + | + | / |
| Lamb | +++ | +/+++ | ± |
| Pig | ++ | ++ | / |
| Dog | / | + | ± |
| Cat | / | + | / |
| Rabbit ³ | +++ | +++ | + |
| Hamster | ++ | ++ | + |
| Guinea pig | + | / | + |
| Rat | + | + | - |
| Mouse | + | + | - |

Tabella 2: immunoreattività di PNEC specifica per 5HT (Polak, 1992)

CONCLUSIONI

Con questo lavoro per la prima volta si è studiata l'azione della fluoxetina in un modello animale di bronco displasia. I risultati preliminari ottenuti incoraggiano ad approfondire le osservazioni fatte al fine di dare una conferma dell'azione protettiva di questo antidepressivo. Come è avvenuto per il suo impiego per l'ipertensione polmonare primitiva, anche per la displasia broncopolmonare potrebbero aprirsi nuove prospettive terapeutiche.

BIBLIOGRAFIA

Abman SH: Bronchopulmonary dysplasia: “a vascular hypothesis”. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164:1755–1756.

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;159:945-58.

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;116(1 Suppl):101-102.

Alfaro CL , Lam YW, Gaedigk A, Ereshefsky L, Simpson J: CYP2D6 inhibition by selective serotonin reuptake inhibitors: analysis of achievable steady-state plasma concentrations and the effect of ultrarapid metabolism at CYP2D6. *Pharmacotherapy*. 2002;22:1001-6.

Allen J, Zwerdling R, Ehrenkranz R, Gaultier C, Geggel R, Greenough A, Kleinman R, Klijanowicz A, Martinez F, Ozdemir A, Panitch HB, Nickerson B, Stein MT, Tomezsko J, Van Der Anker J; for the American Thoracic Society: Statement on the care of the child with chronic lung disease of infancy and childhood. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168: 356–396.

Aronoff GR, Bergstrom RF, Pottratz ST, Sloan RS, Wolen RL, Lemberger L: Fluoxetine kinetics and protein binding in normal and impaired renal function. *Clin Pharmacol Ther*. 1984; 36:138-44.

Auten RL Jr, Mason SN, Tanaka DT, Welty-Wolf K, Whorton MH: Anti-neutrophil chemokine preserves alveolar development in hyperoxia-exposed newborn rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001;281:336-344.

Balaguer L, Romano J, Ruiz-Pesini P: Localization of serotonin, cholecystokinin and somatostatin immunoreactivity in the lower respiratory tract of embryonic, foetal and postnatal sheep. *Histol Histopathol.* 1992;7:703-8.

Balasubramaniam V, Mervis CF, Maxey AM, Markham NE, Abman SH: Hyperoxia reduces bone marrow, circulating and lung endothelial progenitor cells in the developing lung: implications for the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 292: 1073–1084.

Belik J, Jankov RP, Pan J, Tanswell AK: Chronic O₂ exposure enhances vascular and airway smooth muscle contraction in the newborn but not adult rat. *J Appl Physiol.* 2003; 94(6):2303-12.

Bergstrom RF, Beasley CM Jr, Levy NB, Blumenfield M, Lemberger L: The effects of renal and hepatic disease on the pharmacokinetics, renal tolerance, and risk-benefit profile of fluoxetine. *Int Clin Psychopharmacol.* 1993; 8:261-6.

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;288:384-389.

Bland RD: Neonatal chronic lung disease in the post-surfactant era. *Biol Neonate.* 2005;88:181-91.

Bland RD, Ling CY, Albertine KH, Carlton DP, MacRitchie AJ, Day RW, Dahl MJ: Pulmonary vascular dysfunction in preterm lambs with chronic lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2003; 285(1):L76-85.

Blomberg LA, Chan WY, Clerch LB, Massaro D: Molecular cloning and characterization of a novel gene upregulated early during postnatal rat lung development. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1574(3):391-8.

Broughton S, Roberts A, Fox G, Pollina E, Zuckerman M, Chaudhry S, Greenough A: Prospective study of health care utilisation and respiratory morbidity due to RSV infection in prematurely born infants. *Thorax* 2005; 60: 1039–1044.

Brouns I, Oztay F, Pintelon I, De Proost I, Lembrechts R, Timmermans JP, Adriaensen D: Neurochemical pattern of the complex innervations of neuroepithelial bodies in mouse lungs. *Histochem Cell Biol.* 2009; 131:55–74.

Burri PH: The postnatal growth of the rat lung. 3. Morphology *Anat Rec.* 1974;180(1):77-98.

Cerny L, Torday JS and Rehan VK: Prevention and treatment of bronchopulmonary Dysplasia: Contemporary Status and Future Outlook. *Lung* 2008; 186: 75 – 89.

Chambers CD, Johnson KA, Dick LM, Felix R, Jones K: Birth outcomes in pregnant women taking fluoxetine. *N Engl J Med.* 1996; 335(14):1010-5.

Chess PR, D'Angio CT, Pryhuber GS, and Maniscalco WM: Pathogenesis of Bronchopulmonary Dysplasia. *Semin Perinatol* 2006; 30:171-178.

Christou H, Brodsky D: Lung injury and bronchopulmonary dysplasia in newborn infants. *J.Intensive Care Med.* 2005; 20(2): 76-87.

Coalson JJ: Pathology of new bronchopulmonary displasia. *Seminars in Neonatology.* 2003; 8:73-81.

Cooney TP, Thurlbeck WM. The radial alveolar count method of Emery and Mithal: a reappraisal 1--postnatal lung growth. *Thorax* 1982;37:572-579.

Cooney TP, Thurlbeck WM. The radial alveolar count method of Emery and Mithal: a reappraisal 2--intrauterine and early postnatal lung growth. *Thorax* 1982;37:580-583.

Cutz E, Yeger H, Pan J. Pulmonary neuroendocrine cell system in pediatric lung disease-recent advances: *Pediatr Dev Pathol.* 2007; 10(6):419-35.

Cutz E, Jackson A: Neuroepithelial bodies as airway oxygen sensors. *Respir Physiol.* 1999 ;115(2):201-14.

- Cutz E, Perrin DG, Chan W, Madapallimattam A, Sole MJ: Serotonin in the human infant carotid body. *Experientia.* 1986 May 15;42(5):562-4.

Cutz E, Speirs V, Yeger H, Newman C, Wang D, Perrin DG: Cell biology of pulmonary neuroepithelial bodies. Validation of an in vitro model. Effects of hypoxia and Ca²⁺ ionophore on serotonin content and exocytosis of dense core vesicles. *Anat Rec.* 1993; 236(1):41-52.

Cutz E, Perrin DG, Hackman R, Czegledy-Nagy EN: Maternal smoking and pulmonary neuroendocrine cells in sudden infant death syndrome. *Pediatrics.* 1996; 98(4 Pt 1):668-72.

Cutz E, Ma TK, Perrin DG, Moore AM, Becker LE: Peripheral chemoreceptors in congenital central hypoventilation syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997 ;155(1):358-63.

Cyphert JM, Kovarova M, Allen IC, Hartney JM, Murphy DL, Wess J, Koller BH: Cooperation between mast cells and neurons is essential for antigen-mediated bronchoconstriction. *J Immunol,* 2009;182:7430-7439.

Emery JL, Mithal A. The number of alveoli in the terminal respiratory unit of man during late intrauterine life and childhood. *Arch Dis Child* 1960;35:544-547.

Feighner JP, Boyer WF: Selective serotonin reuptake inhibitors. 1991, John Wiley & Sons, New York .

Fornaro E, Li D, Pan J, Belik J: Prenatal exposure to fluoxetine induces fetal pulmonary hypertension in the rat. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007 15;176(10):1035-40.

Frank L. Oxygen toxicity in neonatal rats: the effect of endotoxin treatment on survival during and post-O₂ exposure. *Pediatr Res*. 1987; 21(2): 109-115.

Gillan JE, Curran C, O'Reilly E, Cahalane SF, Unwin AR: Abnormal patterns of pulmonary neuroendocrine cells in victims of sudden infant death syndrome. *Pediatrics*. 1989; 84(5):828-34.

Goldstein DJ: Use of serotonin reuptake inhibitors by women of childbearing potential. *JAMA*. 1998 Jun 17;279(23):1873-4.

Goodman WK ,Barr LC, , Price LH, McDougle CJ, Charney DS : The serotonin hypothesis of obsessive compulsive disorder: implications of pharmacologic challenge studies. *J Clin Psychiatry*. 1992 ;53 Suppl:17-28.

Goto H, Senba T, Sato M, Minami T: Intratracheal administration of bleomycin via a catheter in unanesthetized rats. *Exp Anim.* 2004; 53(2):113-9.

Gram L: Fluoxetine. *N Engl J Med.* 1994; 331(20):1354-61.

Greenough A: Long-term pulmonary outcome in the preterm infant. *Neonatology.* 2008;93(4):324-7.

Greenough A, Alexander J, Burgess S, Bytham J, Checuti PAJ, Hagan J, Lenney W, Melville S, Shaw NJ, Boorman J, Coles S, Pang F, Turner J: Preschool health care utilisation related to home oxygen status. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2006; 91: 337–341.

Greenough A, Alexander J, Burgess S, Chetcuti PAJ, Cox S, Lenney W, Turnbull F, Shaw NJ, Woods A, Boorman J, Coles S, Turner J: Home oxygen status on rehospitalisation and primary care requirements of chronic lung disease infants. *Arch Dis Child* 2002; 86: 40–43.

Greenough A, Alexander J, Burgess S, Chetcuti PAJ, Cox S, Lenney W, Turnbull F, Shaw NJ, Woods A, Boorman J, Coles S, Turner J: Health care utilisation of chronic lung disease infants related to hospitalisation for respiratory syncytial virus infection. *Arch Dis Child* 2001; 85: 463–468.

Greenough A, Dimitriou G, Bhat RY, Broughton S, Hannam S, Rafferty GF, Leipala JA: Lung volumes in infants who had mild to moderate bronchopulmonary dysplasia. *Eur J Pediatr* 2005; 164: 583–586.

Groneck P, Gotze-Speer B, Oppermann M, Eiffert H, Speer CP: Association of pulmonary inflammation and increased microvascular permeability during the development of bronchopulmonary dysplasia: a sequential analysis of inflammatory mediators in respiratory fluids of high-risk preterm neonates. *Pediatrics* 1994; 93:712–718

Guignabert C, Raffestin B, Benferhat R, Raoul W, Zadigue P, Rideau D, Hamon M, Adnot S, Eddahibi S: Serotonin transporter inhibition prevents and reverses monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Circulation*. 2005 31;111(21):2812-9.

Gupta R, Steiner M: Determination of unconjugated 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol by liquid chromatography for monitoring inhibition of monoamine oxidase activity in plasma. *Liq Chrom*; 13:7385-7397.

Hamelin BA, Turgeon J, Vallée F, Bélanger PM, Paquet F, LeBel M: The disposition of fluoxetine but not sertraline is altered in poor metabolizers of debrisoquin. *Clin Pharmacol Ther*. 1996;60(5):512-21.

Han R, Buch S, Tseu I, Young J, Christie N, Frndova H, Lye S, Post M, Tanswell K: Changes in structure, mechanics, and insulin-like growth factor-related gene expression in the lungs of newborn rats exposed to air or 60% oxygen. *Pediatric Research*: 1996; 39: 921-929.

Haworth R, Woodfine J, Mccawley S, Pilling A, Lewis D, Williams T: Pulmonary neuroendocrine cell hyperplasia: identification, diagnostic

criteria and incidence in untreated ageing rats of different strain. *Toxicologic Pathology* 2007; 35:735–740.

Hislop A: Developmental biology of the pulmonary circulation. *Pediatric Respiratory Reviews*. 2005; 6:35-43.

Hjalmarson O, Sandberg KL: Lung function at term reflects severity of bronchopulmonary dysplasia. *J Pediatr* 2005; 146: 86–90.

Jakkula M, Le Cras TD, Gebb S, Hirth KP, Tuder RM, Voelkel NF, Abman SH: Inhibition of angiogenesis decreases alveolarization in the developing rat lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 279:L600–L607.

Jankov RP, Luo X, Belcastro R, Copland I, Frndova H, Lye SJ, Hoidal JR, Post M, Tanswell AK: Gadolinium chloride inhibits pulmonary macrophage influx and prevents O₂-induced pulmonary hypertension in the neonatal rat. *Pediatr Res* 2001;50:172–183.

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 15;35(2):200-9.

- Jannuzzi G, Gatti G, Magni P, Spina E, Pacifici R, Zuccaro P, Torta R, Guarneri L, Perucca: Plasma concentrations of the enantiomers of fluoxetine and norfluoxetine: sources of variability and preliminary observations on relations with clinical response. *Ther Drug Monit*. 2002 ; 24:616-27.

Johnson DE, Georgieff MK: Pulmonary neuroendocrine cells. Their secretory products and their potential roles in health and chronic lung disease in infancy. *Am Rev Respir Dis.* 1989; 140:1807-12.

Kasahara Y, Tuder RM, Taraseviciene-Stewart L, Le Cras TD, Abman S, Hirth PK, Waltenberger J, Voelkel NF: Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and emphysema. *J Clin Invest* 2000;106: 1311–1319.

Kulkarni A, Ehrenkranz RA, Bhandari V: Effect of introduction of synchronized nasal intermittent positive-pressure ventilation in a neonatal intensive care unit on bronchopulmonary dysplasia and growth in preterm infants. *Am J Perinatol* 2006;23:233–40.

Kushnir-Sukhov NM, Gilfillan AM, Coleman JW, Brown JM, Bruening S, Toth M, Metcalfe DD: 5-hydroxytryptamine induces mast cell adhesion and migration. *J Immunol.* 2006 Nov 1;177:6422-32.

Lauweryns JM, van Ranst L, Lloyd RV, O'Connor DT: Chromogranin in bronchopulmonary neuroendocrine cells. Immunocytochemical detection in human, monkey, and pig respiratory mucosa. *J Histochem Cytochem.* 1987; 35(1):113-8.

Lauweryns JM, Cokelaere M: Hypoxia-sensitive neuro-epithelial bodies. Intrapulmonary secretory neuroreceptors, modulated by the CNS. *Zellforsch Mikrosk Anat.* 1973 Dec 21;145:521-40.

Lewis M: Spontaneous rhythmical contractions of the muscles of the bronchial tubes and air sacs of chick embryo. *Am J Physiol*, 1924; 68:385-388.

Li K, Nagalla SR, Spindel ER: A rhesus monkey model to characterize the role of gastrin-releasing peptide (GRP) in lung development. Evidence for stimulation of airway growth. *J Clin Invest*. 1994; 94(4):1605-15.

Li C, Ji Z, Nan F, Shao Q, Liu P, Dai J, Zhen J, Yuan H, Xu F, Cui J, Huang B, Zhang M, Yu C: Liquid chromatography/tandem mass spectrometry for the determination of fluoxetine and its main active metabolite norfluoxetine in human plasma with deuterated fluoxetine as internal standard. *Rapid Commun Mass Sp*. 2002; 16:1844-1850.

- Linnoila RI: Functional facets of the pulmonary neuroendocrine system. *Lab Invest*. 2006; 86(5):425-44.

Massaro D, Teich Nancy, Maxwell S, Massaro GD, Whitney P: Postnatal development of alveoli, regulation and evidence for a critical period in rats. *J. Clin. Invest*. 1985; 76: 1297-1305.

McCurnin DC, Pierce RA, Chang LY, Gibson LL, Osborne-Lawrence S, Yoder BA, Kerecman JD, Albertine KH, Winter VT, Coalson JJ, Crapo JD, Grubb PH, Shaul PW: Inhaled NO improves early pulmonary function and modifies lung growth and elastin deposition in a baboon model of

neonatal chronic lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005; 288:450-9.

McDowell EM, Hoyt RF Jr, Sorokin SP: Ontogeny of endocrine cells in the respiratory system of Syrian golden hamsters. II. Intrapulmonary airways and alveoli. *Cell Tissue Res*. 1994; 275(1):157-67.

Mandrioli R, Cantelli Forti G, Raggi M: Fluoxetine metabolism and pharmacological interactions: the role of cytochrome P450. *Current Drug metabolism*, 2006; 7:127-133.

McLean A, Townsend A, Clark J, Sawyer MG, Baghurst P, Haslam R, Whaites L: Quality of life of mothers and families caring for preterm infants requiring home oxygen therapy: a brief report. *J Paediatr Child Health* 2000; 36: 440–444.

Meyrick B, Reid L: Pulmonary arterial and alveolar development in normal postnatal rat lung. *Am.Rev.Respir.Dis*. 1982;125:468-73.

Murray M, Murray K: Mechanism-based inhibition of CYP activities in rat liver by fluoxetine and structurally similar alkylamines. *Xenobiotica*. 2003; 33(10):973-87.

Nadeau K, Jankov RP, Tanswell A, Sweezey N, Kaplan F : Lgl1 is suppressed in oxygen toxicity animal models of bronchopulmonary

dysplasia and normalizes during recovery in air . *Pediatr Res* 2006; 59: 389-395.

Naidong W, Eerkes A: Development and validation of a hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for the analysis of paroxetine in human plasma. *Biomed Chromatogr.* 2004; 18:28-36.

Nakagawa Y, Doy M, Ohashi N, Misawa S. *Nihon Hoigaku Zasshi*: Distribution of pulmonary neuroendocrine cells. An immunohistochemical study of the lung in autopsied infants including sudden infant death syndrome. 1994; 48:317-25.

Niu JO, Munshi UK, Siddiq MM, Parton LA: Early increase in endothelin-1 in tracheal aspirates of preterm infants: correlation with bronchopulmonary dysplasia. *J Pediatr.* 1998 ;132(6):965-70.

Nocito A, Dahm F, Jochum W, Jang JH, Georgiev P, Bader M, Graf R, Clavien PA: Serotonin regulates macrophage-mediated angiogenesis in a mouse model of colon cancer allografts. *Cancer Res.* 2008 ;68:5152-8.

Nonacs R, Cohen LS. Assessment and treatment of depression during pregnancy: an update. *Psychiatr Clin North Am.* 2003; 26:547-62.

Northway WH Jr, Moss RB, Carlisle KB, Parker BR, Popp RL, Pitlick PT, Eichler I, Lamm RL, Brown BW Jr: Late pulmonary sequelae of bronchopulmonary dysplasia. *N Engl J Med* 1990; 323: 1793-1799.

Northway WH Jr, Rosan RC, Porter DY: Pulmonary disease following respirator therapy of hyaline-membrane disease. Bronchopulmonary dysplasia. *N Engl J Med.* 1967; 276:357-68.

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;100:8407-11.

Pacherl P, Ungvari Z, Keckskemeti V, Furstl S: Serotonin reuptake inhibitors fluoxetine and citalopram relax intestinal smooth muscle. *Curr med chem* 1998; 5:381-390.

Pan J, Copland I, Post M, Yeager H, Cutz E: Mechanical stretch-induced serotonin release from pulmonary neuroendocrine cells: implications for lung development. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006; 290:L185-93.

Pastuszak A, Schick-Boschetto B, Zuber C, Feldkamp M, Pinelli M, Sihn S, Donnenfeld A, McCormack M, Leen-Mitchell M, Woodland C, et al. Pregnancy outcome following first-trimester exposure to fluoxetine (Prozac)*JAMA.* 1993; 269:2246-8.

Perrin D, McDonald TJ, Cutz E: Hyperplasia of bombesin-immunoreactive pulmonary neuroendocrine cells and neuroepithelial bodies in sudden infant death syndrome. *Pediatr Pathol.* 1991; 11(3):431-47.

- Pohland RC, Byrd TK, Hamilton M, Koons JR: Placental transfer and fetal distribution of fluoxetine in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1989 ;98:198-205.

Porzionato A, Macchi V, Parenti A, Maturri L, De Caro R: Peripheral chemoreceptors: postnatal development and cytochemical findings in Sudden Infant Death Syndrome. *Histol Histopathol.* 2008 ; 23:351-65.

Preskorn SH: Effects of antidepressants on the cytochrome P450 system. *Am J Psychiatry.* 1996 Dec;153(12):1655-7.

Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK: *Farmacologia.* Publ Ambrosiana. Milano, 2005. 545-546.

Ryan RM, Ahmed Q and Lakshminrusimha S: Inflammatory Mediators in the Immunobiology of Bronchopulmonary Displasia. *Clinic Rev Allerg Immunol* 2008; 34:174–190.

Santuz P, Baraldi E, Zaramella P, Filippone M, Zachello F: Factors limiting exercise performance in long term survivors of bronchopulmonary dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 1284–1289.

Sanz EJ, De-las-Cuevas C, Kiuru A, Bate A, Edwards R: Selective serotonin reuptake inhibitors in pregnant women and neonatal withdrawal syndrome: a database analysis. *Lancet*. 2005; 365:482-7.

- Saugstad OD: Bronchopulmonary dysplasia and oxidative stress: are we closer to an understanding of the pathogenesis of BPD? *Acta Paediatr*. 1997; 86:1277-82.

Schirm E, Schwagermann MP, Tobi H, de Jong-van den Berg LT: Drug use during breastfeeding. A survey from the Netherlands. *Eur J Clin Nutr*. 2004; 58:386-90.

Shaffer SG, O'Neill D, Bradt SK, Thibeault DW: Chronic vascular pulmonary dysplasia associated with neonatal hyperoxia exposure in the rat. *Pediatr Res*. 1987 ;21:14-20.

Shenberger ,Jeffrey S, Shew, Ronald L, Johnson, Dana E: Hyperoxia induced airway remodelling and pulmonary neuroendocrine cell hyperplasia in the weanling rat. 1997 *Pediatr Res*. 42:539-544.

Skogvall S, Korsgren M, Grampp W: Evidence that neuroepithelial endocrine cells control the spontaneous tone in guinea pig tracheal preparations. *J Appl Physiol*. 1999; 86:787-8.

○

Sorokin SP, Hoyt RF Jr, Shaffer MJ: Ontogeny of neuroepithelial bodies: correlations with mitogenesis and innervation. *Microsc Res Tech.* 1997;37:43-6.

Speer CP, Silverman M : Issues relating to children born prematurely. *Eur Respir J Suppl.* 1998;27:13-16.

Spindel ER, Sunday ME, Hofler H, Wolfe HJ, Habener JF, Chin WW: Transient elevation of messenger RNA encoding gastrin-releasing peptide, a putative pulmonary growth factor in human fetal lung. *J Clin Invest.* 1987;80:1172-9.

Stenmark KR, Abman SH: Lung vascular development: implications for the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia. *Annu Rev Physiol* 2005; 67:623–661.

Sunday M: Neuropeptides and lung development. *Lung growth and development*, 1997; 401-494.

Sunday M, Willet C: Induction and spontaneous regression of intense pulmonary neuroendocrine cell differentiation in a model of preneoplastic lung injury. *1992 Cancer Research (supply);52:2677-2686.*

Sukalo A, Islami H, Shabani R, Dauti H, Kutllovci S, Kastrati B:

Postnatal - physiological research of the bronchial receptor system development on the isolated preparation of the human trachea in vitro. *Bosn J Basic Med Sci.* 2006 ;6:73-7.

Tanswell AK, Jankov RP: Bronchopulmonary dysplasia: one disease or two? *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167:1-2.

Tanswell AK, Wong L, Possmayer F, Freeman BA: The preterm rat: a model for studies of acute and chronic neonatal lung disease. *Pediatr Res* 1989; 25:525-9.

Thebaud B and Abman SH: Bronchopulmonary Dysplasia. Where have all the vessels gone? Roles of Angiogenic Growth Factors in Chronic Lung Disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2007; 175: 978-985.

Thebaud B, Ladha F, Michelakis ED, Sawicka M, Thurston G, Eaton F, Hashimoto K, Harry G, Haromy A, Korbitt G, et al.: Vascular endothelial growth factor gene therapy increases survival, promotes lung angiogenesis, and prevents alveolar damage in hyperoxia-induced lung injury: evidence that angiogenesis participates in alveolarization. *Circulation* 2005;112:2477–2486.

Thomson Ma, Yoder BA, Winter VT, Martin H, Catland D, Siler- Khodr TM, Coalson JJ: Treatment of immature baboons for 28 days with early nasal continuous positive airway pressure. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169:1054-1062.

Track NS, Cutz E: Bombesin-like immunoreactivity in developing human lung. *Life Sci.* 1982; 30:1553-6.

Van Lommel AT, Lauweryns JM: Ultrastructure and innervation of neuroepithelial bodies in the lungs of newborn cats. *Anat Rec.* 1993; 236:181-90.

Ververs T, Kaasenbrood H, Visser G, Schobben F, de Jong-van den Berg L, Egberts T. Prevalence and patterns of antidepressant drug use during pregnancy, *Eur J Clin Pharmacol.* 2006 Oct;62(10):863-70.

Warner BB, Stuart LA, Papes RA, Wispé JR : Functional and pathological effects of prolonged hyperoxia in neonatal mice. *Am J Physiol.* 1998; 275:110-117.

Wharton J, Polak JM, Bloom SR, Ghatei MA, Solcia E, Brown MR, Pearse AG: Bombesin-like immunoreactivity in the lung. *Nature.* 1978; 273:769-70.

Willet C, Shahsafi A, Graham SA, Sunday M: CD10/Neutral endopeptidase inhibition augments pulmonary neuroendocrine cell hyperplasia in hamsters treated with diethylnitrosamine and hyperoxia. 1999 *Am J Respir Cell Mol Biol*; 21:13-20

Yi M, Jankov RP, Belcastro R, Humes D, Copland I, Shek S, Swezey NB, Post M, Albertine KH, Auten RL, Tanswell AK: Opposing effects of

60% oxygen and neutrophil influx on alveologenesis in the neonatal rat. Am J Respir Crit Care Med 2004; 170 (11): 1188-1196.

Yoder BA, Siler-Khodr TM, Winter VT, Coalson JJ: High frequency oscillatory ventilation: effects on lung function, mechanics and airway cytokines in the immature baboon model for neonatal chronic lung disease. Am J Respir Crit Care Med 2000; 162:1867-1876.

Zoetis T, Hurtt M: Species comparison of lung development. Birth defects research (part B) Dev Reprod Toxicol 2003; 68: 121-124.