

Alma Mater Studiorum - Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE CARDIO NEFRO TORACICHE

Ciclo 34

Settore Concorsuale: 06/D1 - MALATTIE DELL'APPARATO
CARDIOVASCOLARE E MALATTIE DELL'APPARATO RESPIRATORIO

Settore Scientifico Disciplinare: MED/21 - CHIRURGIA TORACICA

ADATTAMENTO MORFOLOGICO E VARIAZIONE DELL'ESPRESSIONE
GENICA DOPO PNEUMONECTOMIA: OSSERVAZIONI SU MODELLO
SPERIMENTALE ANIMALE

Presentata da: Rossella Potenza

Coordinatore Dottorato

Gaetano Domenico Gargiulo

Supervisore

Niccolò Daddi

Esame finale anno 2022

Abstract Tesi di Dottorato

Introduzione

La pneumonectomia su modello animale potrebbe essere un'utile piattaforma di studio per approfondire i meccanismi della risposta compensatoria al danno polmonare. Scopo dello studio è determinare la presenza di variazioni morfologiche e di espressione del trascrittoma dopo pneumonectomia.

Materiali e metodi

Undici suini sono stati sottoposti a pneumonectomia sinistra. Sono stati eseguiti prelievi sito-specifici intraoperatori su polmone sinistro e successivamente confrontati con prelievi sito-specifici su polmone destro dopo eutanasia a 60 giorni. I prelievi degli animali con decorso regolare sono stati sottoposti a RNA-sequencing e successiva analisi computazionale per valutare il peso funzionale del singolo gene o di clusters di geni.

Risultati

Un animale è stato escluso per insorgenza di ernia diaframmatica. In 7/10 è stata riscontrata apertura della pleura mediastinica con parziale erniazione del polmone controlaterale e shift mediastinico. L'istologia ha mostrato dilatazione degli spazi aerei, rottura dei setti interalveolari, lieve infiammazione, assenza di fibrosi, stiramento radiale dei bronchi e riduzione del letto capillare. L'analisi di bulk RNA-sequencing ha identificato 553 geni espressi in modo differenziale (DEG)($P < 0,001$) tra pre e post-pneumonectomia. I primi 10 DEG up-regolati: Edn1, Areg, Havcr2, Gadd45g, Depp1, Cldn4, Atf3, Myc, Gadd45b, Socs3; i primi 10 geni down-regolati: Obscn, Cdkn2b, ENSSSCG00000015738, Prrt2, Amer1, Flrt3, Efnb2, Tox3, Znf793, Znf365.

Tra i DEG è stata riscontrata una predominanza di geni specifici dei macrofagi. L'analisi di gene ontology basata su DAVID ha mostrato un significativo arricchimento della "via di segnalazione apoptotica estrinseca"(FDR $q=7,60 \times 10^{-3}$), della via di "Risposta all'insulina"(FDR $q=7,60 \times 10^{-3}$) ed un arricchimento di geni "Regolatori negativi del segnale DDX58/IFIH1"(FDR $q=7.50 \times 10^{-4}$).

Conclusioni

Il presente studio conferma la presenza di variazioni macroscopiche e microscopiche fenotipiche dopo pneumonectomia. L'RNA sequencing e lo studio di genomica traslazionale hanno mostrato l'esistenza di geni singoli e di network di geni disregolati dopo pneumonectomia, prevalentemente in determinate popolazioni cellulari.

1. INTRODUZIONE.....	2
1.1. <i>Crescita polmonare compensatoria</i>	2
1.2. <i>Meccanismi alla base della crescita polmonare compensatoria</i>	3
1.3. <i>Riduzione del tessuto polmonare</i>	4
1.4. <i>Variazioni anatomiche e funzionali dopo pneumonectomia</i>	4
1.5. <i>Valutazione della crescita polmonare compensatoria</i>	6
2. SCOPO DELLO STUDIO.....	8
3. MATERIALI E METODI.....	9
3.1. <i>Dichiarazione</i>	9
3.2. <i>Scelta del modello animale, tecnica chirurgica ed anestesiologicala</i>	9
3.3. <i>Valutazioni fenotipiche e dell'espressione genica</i>	13
3.4. <i>Isolamento dell'RNA, costruzione di librerie e sequenziamento</i>	14
3.5. <i>Elaborazione dei dati di sequenziamento grezzi e allineamento delle letture</i>	15
3.6. <i>Analisi dei geni espressi in maniera differenziale (DEG)</i>	15
3.7. <i>Citometria digitale e identificazione di modelli di espressione genica specifica</i>	16
3.8. <i>Analisi funzionale dell'ontologia genica e reti di interazione</i>	16
4. RISULTATI.....	17
4.1. <i>Anatomia patologica macroscopica e microscopica</i>	17
4.2. <i>Riepilogo dei dati di sequenziamento del trascrittoma</i>	20
4.3. <i>Identificazione e analisi dei geni espressi in modo differenziale (DEG)</i>	21
4.4. <i>Quantificazione cellulae e modelli di espressione genica specifici del tipo cellulare</i>	23
4.5. <i>Analisi funzionale e network interattivo Gene Ontology</i>	24
5. DISCUSSIONE.....	30
6. CONCLUSIONI.....	34
7. BIBLIOGRAFIA.....	35

1. INTRODUZIONE

Il potenziale rigenerativo dei polmoni umani è poco conosciuto. Sebbene una rigenerazione del tessuto polmonare sia stata descritta in bambini dopo resezione polmonare maggiore, negli adulti è un'evenienza rara. Nell'era della medicina rigenerativa e dei tessuti bioingegnerizzati, la rigenerazione polmonare e la crescita compensatoria polmonare, sono di estremo interesse per i possibili risvolti terapeutici nella ricerca applicata alle malattie degenerative polmonari.

1.1 Crescita polmonare compensatoria

La crescita polmonare compensatoria (CLG) è definita dall'aumento assoluto della quantità di tessuto polmonare funzionante in risposta a lesioni e/o malattie, con un impatto positivo sul risultato funzionale [1].

La normale crescita polmonare consiste in due ampi processi:

- 1) Generazione di ulteriori scambi gassosi ed interfacce gassose
- 2) Rimodellamento delle componenti esistenti al fine di ottimizzare l'architettura tissutale e facilitare lo scambio di gas.

Questa definizione evidenzia i seguenti concetti chiave.

- a. In assenza di un aumento assoluto del tessuto polmonare funzionante, la comparsa di un maggior contenuto di aria o la congestione capillare/riorganizzazione di componenti strutturali non costituiscono una crescita polmonare compensatoria.
- b. L'aumento di componenti tissutali che non migliorano la funzione dell'organo, come l'infiammazione, la fibrosi e l'edema interstiziale, non costituiscono una crescita polmonare compensatoria.
- c. Poiché la crescita compensatoria comporta costi metabolici aggiuntivi ed altera l'architettura esistente, può svilupparsi una distorsione anatomica che può portare a compromessi struttura-funzione e ad una normalizzazione incompleta della funzione dell'organo [1,2].

1.2 Meccanismi alla base della crescita polmonare compensatoria

Sono diversi i meccanismi alla base del processo della CLG ed un grande numero di studi è stato condotto nel tempo, ciascuno dei quali, volto ad esplorare sempre più nello specifico, singoli tasselli di questo fenomeno estremamente complesso. E' noto che forze meccaniche, così come fattori circolanti, come il Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), il Basic Fibroblast Growth Factor, l'Epithelial Growth Factor (EGF), il recettore dell'Eritropoietina ed il Sistema neuroendocrino polmonare siano coinvolti nel processo della rigenerazione polmonare [1,3-7].

Il feedback meccanico tra il polmone e il torace costituisce sicuramente un segnale importante che sostiene sia lo sviluppo polmonare post-natale sia la CLG post-pneumonectomia [8].

Dopo pneumonectomia, l'aumento dello stress meccanico e della tensione sul polmone residuo inducono risposte adattative allo scopo di aumentare il trasporto dell'ossigeno. Tra queste [9]:

- 1) Reclutamento delle riserve alveolo-capillari
- 2) Rimodellamento del tessuto esistente
- 3) Crescita rigenerativa del tessuto acinare, quando lo stiramento supera la soglia critica.

Maromi e collaboratori hanno riscontrato, come, su modello animale murino, la somministrazione di VEGF dopo pneumonectomia, accorci i tempi necessari a completare il processo di CLG (4 vs 10 giorni) e di come la somministrazione di 2 differenti inibitori dei recettori per il VEGF non modifichi il risultato, suggerendo che il VEGF possa non essere l'unico fattore coinvolto nella regolazione della CLG [6].

Altri studi hanno mostrato un incremento del mRNA codificante il VEGF durante la distensione polmonare, quest'ultima, trigger noto per la neoalveolarizzazione [10].

L'espressione del recettore di EPO è risultata inoltre aumentata nei polmoni di cani sia durante la maturazione postnatale, sia durante la crescita polmonare compensatoria dopo pneumonectomia [11]; in aggiunta, la sua iperepressione è associata all'attivazione di Hypoxia inducible Factor 1alfa [7].

1.3 Riduzione del tessuto polmonare

In diversi modelli animali, una certa riduzione del tessuto polmonare, è in grado di avviare una crescita compensatoria del tessuto residuo, con lo scopo di ripristinare la massa, la struttura e le normali funzioni. Questo processo di CLG è qualitativamente simile nelle diverse specie, ma differisce con il genere, l'età e lo stato ormonale [2].

Il modello di pneumonectomia come surrogato di ridotta funzione respiratoria, può essere quindi considerato un'utile piattaforma di studio.

L'asportazione di uno dei due polmoni, comporta infatti importanti variazioni anatomiche, con conseguente aumento della capacità di diffusione dei gas del polmone restante. L'intero flusso sanguigno è rivolto al polmone residuo e si crea un cavo, verso cui il mediastino si spinge. L'asportazione di un polmone, stimola, nell'animale da esperimento, una crescita rigenerativa e compensatoria del polmone residuo che cerca di ripristinare il volume, la massa, la funzione e la struttura della pregressa condizione fisiologica [12].

Sappiamo ancora poco sul potenziale rigenerativo del polmone residuo dopo pneumonectomia nell'uomo. Sebbene siano stati riportati casi di marcata CLG in bambini dopo resezioni polmonari maggiori, la CLG nell'adulto si manifesta in maniera minore e lo studio di questo fenomeno potrebbe essere di estrema importanza per le possibili ricadute traslazionali nell'ambito delle patologie polmonari croniche che determinano deterioramento della funzione respiratoria.

Il feedback meccanico tra polmone e gabbia toracica costituisce un segnale importante che determina sia la maturazione polmonare post-natale sia la CLG post-pneumonectomia [8].

Dopo la pneumonectomia, l'aumento dello stress e della tensione parietale nel polmone residuo inducono le risposte adattative precedentemente nominate [1-9].

1.4 Variazioni anatomiche e funzionali dopo pneumonectomia

a) Variazioni anatomiche

Le variazioni radiologiche che notiamo dopo una pneumonectomia sono note. Subito dopo l'intervento, trachea e mediastino sono in posizione mediana, il cavo vuoto è riempito di aria e può essere presente del versamento. Entro le prime 24h, l'emidiaframma dello spazio post-

pneumectomia (PPS) si rialza leggermente, il mediastino si spinge verso lo PPS e del liquido sieroso si accumula gradualmente.

b) Variazioni funzionali

In condizioni fisiologiche, si attribuisce una funzione respiratoria del 55% al polmone di destra e del 45% a quello di sinistra. Numerosi autori descrivono una riduzione della funzione polmonare dopo pneumectomia. I valori di riduzione possono dipendere da molteplici fattori, come la funzionalità del polmone restante, l'età del paziente e la durata dell'intervento [13,14].

Sebbene il volume residuo diminuisca dopo l'intervento, esso diminuisce molto meno di quanto atteso, come risultato dell'iperinsufflazione a carico del polmone restante [13]. Il volume espiratorio forzato in 1 secondo e la capacità vitale forzata decrescono del 25-40%. La capacità di diffusione polmonare, la PaO₂ e la PaCO₂ rimangono pressappoco invariati rispetto ai livelli preoperatori [15,16].

I valori di pressione arteriosa polmonare, resistenza vascolare polmonare e pressione sistolica ventricolare destra restano normali o leggermente aumentati, comunque possono aumentare in modo importante con l'esercizio. Lo spazio morto può diminuire o aumentare mentre il rapporto spazio morto/Tidal volume aumenta. La VO₂max dopo pneumectomia può diminuire di un valore compreso tra il 17 e il 28% [16,17].

Fin dal 1892 è noto, grazie a studi condotti su modello animale, che il polmone residuo dopo pneumectomia va incontro ad un aumento di volume, noto come "enfisema vicariante" [18] che rappresenta una sovradistensione alveolare del polmone restante e non una sua distruzione enfisematosa [9].

Pochi studi hanno evidenziato variazioni del ventricolo destro dopo resezione polmonare. Reed dimostrò una diminuzione del 20% della frazione di eiezione (FE) ventricolare destra e un 14% di aumento del volume telediastolico ventricolare dopo resezione polmonare [19]. Queste osservazioni furono confermate da Okada che dimostrò una diminuzione significativa della FE del ventricolo destro ed una diminuzione della gittata cardiaca di destra in seconda giornata, senza che vi fossero variazioni importanti di pressione arteriosa polmonare, pressione venosa centrale e

indice di resistenza vascolare polmonare [20]. Dedussero dunque che la variazione del post-carico era la causa principale della diminuzione postoperatoria della FE ventricolare destra.

1.5. Valutazione della crescita polmonare compensatoria dopo pneumonectomia sperimentale

La pneumonectomia si è dimostrata essere un modello affidabile per caratterizzare in modo più dettagliato, meccanismi e limiti funzionali della CLG. Le resezioni polmonari iniziarono nel 1881, quando fu dimostrato che il polmone restante si espandeva quasi a raggiungere la stessa dimensione dei due polmoni. Gli studi di quel tempo, condotti su modello animale, stabilirono le basi per estendere le loro implicazioni sull'uomo. Cohn nel 1939 notò che le tensioni meccaniche costituivano uno stimolo maggiore nella crescita compensatoria del polmone restante dopo lobectomia. Nel 1950 Schilling studiò dettagliatamente il ben preservato stato funzionale in cani che avevano subito resezioni polmonari [21]. Grandi progressi nella comprensione delle vie molecolari della rigenerazione tissutale sono stati fatti usando topi transgenici e tecniche di biologia molecolare [22-24].

Le cellule epiteliali alveolari nei topi sottoposti a pneumonectomia mostrano variazioni metaboliche tipiche della crescita cellulare accelerata. Studi nei ratti hanno mostrato ipertrofia degli pneumociti di tipo II e la proliferazione e differenziazione in pneumociti di tipo I caratterizzanti la CLG, in modo simile alla precoce crescita polmonare postnatale ed alla rigenerazione polmonare post-traumatica [25].

Nei piccoli animali, si è visto che la risposta compensatoria post pneumonectomia è indipendente dal numero dei lobi rimossi, mentre nei cani sembra che avvenga solo se la resezione polmonare supera il 50% della massa totale polmonare. L'aumento del volume polmonare è parallelo all'aumento della crescita tissutale, che comunque risulta essere una crescita non uniforme [26, 27].

Lo sviluppo di sofisticati metodi morfometrici ha dimostrato che nuovi alveoli possono formarsi dopo pneumonectomia [4, 23].

Anche le cellule staminali broncoalveolari sono state chiamate in causa: la loro proliferazione e differenziazione in pneumociti di tipo I e II può contribuire fino al 25% nel processo di rigenerazione polmonare [28].

Alcuni autori hanno inoltre notato l'aumento in lunghezza ed in numero, delle diramazioni delle arterie polmonari, proporzionale alla quantità di tessuto rimosso. Infatti, nel ratto, in caso di bilobectomia (24% di tessuto rimosso) o trilobectomia (52% di tessuto rimosso), si verifica un aumento del letto arterioso rispettivamente del 26% e del 47% [29]. Il VEGF nel modello murino sperimentale, è in grado di accelerare la risposta compensatoria [6]. Di contro, l'uso sperimentale di inibitori dell'angiogenesi come fumagallina e talidomide dopo pneumonectomia, induce un aumento di peso e volume polmonare inferiore rispetto ai casi in cui non c'è utilizzo di questi inibitori [30]. Nonostante siano stati condotti numerosissimi studi sperimentali sulla CLG, diverse incognite restano su questo argomento. I progressi scientifici e tecnologici potrebbero consentire di riesplorare alcuni aspetti insoluti. Inoltre, le nuove tecnologie di sequenziamento del genoma, suggeriscono la messa a punto di modelli sperimentali.

2. SCOPO DELLO STUDIO

Scopo del presente studio è definire la risposta trascrizionale dell'intero genoma del polmone suino alla pneumonectomia sperimentale.

La scelta dell'animale da esperimento è ricaduta sul suino (*Sus Scrofa Domesticus* – razza Landrace large white) in quanto fisiologia e morfologia di questo modello animale, consentono di eseguire procedure chirurgiche del tutto simili a quelle eseguite sull'uomo [31, 32].

Dopo analisi comparativa dell'espressione genica nel polmone asportato ed in quello rimanente, è stata effettuata un'analisi computazionale, al fine di valutare il peso funzionale del singolo gene o di clusters di geni up/down regolati.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Dichiarazione

Le procedure di trattamento dell'animale sono state eseguite nel rispetto della dignità dell'animale, riducendone, per quanto possibile, la sofferenza, con riferimento al **D. Lgs. n. 116 del 27 Gennaio 1992** in attuazione della **direttiva CEE n. 609/86**.

Le procedure sperimentali hanno seguito scrupolosamente le linee guida riportate nel “**Principles of Laboratory Animal Care**” della *National Society for Medical Research* del 2002 e quelle del *National Institute of Health* (**publication No. 55 – 123, rev. 1996**) [33].

3.2 Scelta del modello animale, tecnica chirurgica ed anestesiologicala

a) Scelta del modello animale

Undici animali da esperimento (*Sus Scrofa Domesticus* – razza landrace large white, 39±4 kg) sono stati trasferiti presso il centro sperimentale 5 giorni prima dell'intervento chirurgico, in modo da consentirne l'adattamento alle nuove condizioni ambientali. Tutti gli animali sono stati sottoposti a pneumonectomia sinistra con accesso toracotomico, in anestesia generale ed intubazione oro-tracheale, con successivo svezzamento dalla ventilazione meccanica mediante ventilazione non invasiva temporanea (Figura 1-2).

Figura 1: Posizione dell'animale durante l'intervento chirurgico



Figura 2: Ventilazione non invasiva con casco subito dopo intervento chirurgico



L'intera procedura chirurgica ed il management peri-operatorio sono stati eseguiti secondo la tecnica da noi precedentemente descritta [34, 35].

L'intervento chirurgico è durato 120 +/- 40 minuti e sono state seguite tutte le regole acquisite nell'esperienza chirurgica sull'uomo, al fine di minimizzare le differenze tra pneumonectomia in campo clinico e pneumonectomia in campo sperimentale. Non è stato mai applicato drenaggio toracico ed il cavo pleurico post-pneumonectomia non ha subito ulteriori manipolazioni successive alla procedura chirurgica in oggetto.

Dopo la pneumonectomia ed il risveglio, i soggetti operati sono stati trasferiti presso box singoli ed ivi mantenuti per 60 giorni. Gli animali, nel loro ricovero, hanno avuto libertà di movimento, acqua ad libitum, alimentazione omogenea e bilanciata una volta al giorno e valutazione medico-veterinaria due volte al giorno. Ogni possibile limitazione ai bisogni fisiologici e comportamentali dell'animale è stata ridotta al minimo.

Le condizioni cliniche sono state monitorate in modo da rilevare un eventuale stato di malessere dell'animale.

Tutti i soggetti che hanno presentato un qualsiasi evento non regolare nel post-operatorio (febbre a partire dalla seconda giornata post-operatoria, tosse, prostrazione, inappetenza) anche se minimi, sono stati esclusi. I suini sono stati successivamente sacrificati mediante protocollo indolore a 60 giorni dall'intervento chirurgico e la carcassa è stata oggetto di autopsia. La valutazione post-mortem dei reperti anatomici macroscopici è stata eseguita dallo stesso gruppo di ricercatori che ha effettuato l'intervento chirurgico, mentre le valutazioni morfologiche microscopiche sono state eseguite dall'anatomo-patologo. Sono state quindi segnalate variazioni anatomiche indotte dalla pneumonectomia (iperinsufflazione del polmone residuo, alterazioni macroscopiche dell'apparato cardiovascolare etc.) e sono stati raccolti campioni sito-specifici da inviare per esame istologico e di biologia molecolare per valutazione del profilo di espressione genica (RNA-seq, next generation sequencing).

b) Tecnica chirurgica

La procedura chirurgica eseguita, è stata fedelmente riprodotta secondo il protocollo descritto e sviluppato nella nostra precedente esperienza in campo sperimentale [34,35].

Dopo sedazione ed induzione dell'anestesia generale, l'animale è stato posizionato in decubito laterale destro, ed è stata eseguita un'accurata disinfezione della cute.

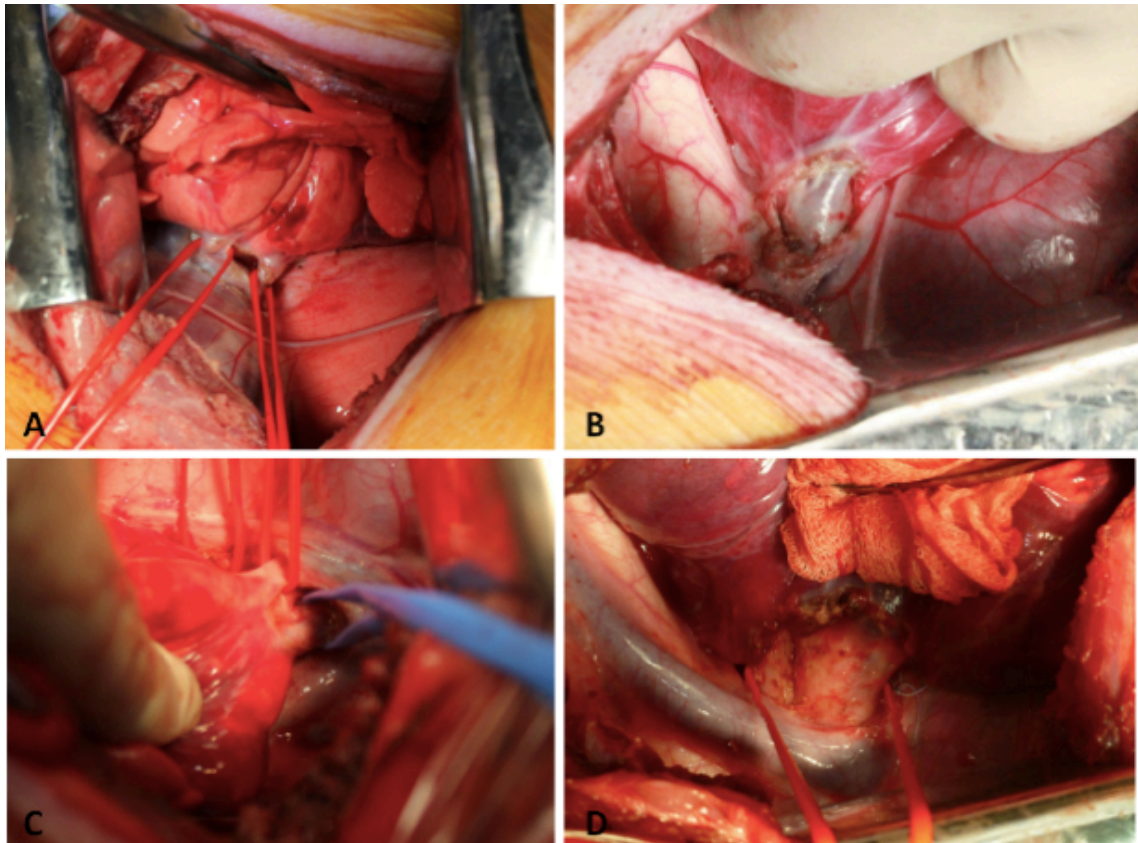
L'incisione chirurgica, lunga 17 ± 2 cm, segue una direzione che dal I capezzolo si porta posteriormente fino all'angolo della scapola e da qui si flette postero-cranialmente circondando la scapola per non più di 5 cm di lunghezza.

Il cavo pleurico è stato aperto sul 7° spazio intercostale.

Dopo interruzione del legamento polmonare e dissezione ilare si è proceduto alla preparazione delle vene polmonari (una anteriore ed una posteriore), che rappresentano il piano più superficiale nella visione anteriore del mediastino. Successivamente, si è proseguito con la preparazione dell'arteria polmonare, che decorre profondamente nel mediastino ed è identificabile nella

porzione superiore dell'ilo, e quindi con l'isolamento del bronco principale. I suddetti elementi, sono stati quindi legati e sezionati (Figura 3 A-B-C-D).

Figura 3: Immagini intraoperatorie. A: identificazione delle vene polmonari; B-C identificazione ed isolamento dell'arteria polmonare; D: isolamento del bronco principale.



Dopo esecuzione del test di tenuta bronchiale, la cavità toracica è stata chiusa senza posizionare tubi di drenaggio.

c) Procedura anestesiológica

Per ridurre al minimo lo stress psico-fisico degli animali, è stata eseguita sedazione con tiletamina-zolazepam (6mg/kg) e metadone (0,2mg/Kg) IM. Dopo circa 5 minuti entrambe le vene auricolari sono state cateterizzate e attraverso una maschera facciale è stata eseguita pre-ossigenazione per 10 minuti ad un flusso 5L/min. L'anestesia è stata indotta con 2-4mg/Kg di

Propofol EV, l'animale è stato quindi intubato e connesso al ventilatore meccanico con successiva somministrazione di 2mg/kg di Carprofene IM.

Il mantenimento dell'anestesia è stato regolato mediante Sevoflurane (2,4-3%) in O₂ (50-100mL/Kg/min). Durante tutto l'intervento sono stati somministrati Sulfentanil (0,5mg/Kg/min) e Ringer Lattato (10 mL/Kg/min). Prima dell'apertura della cavità toracica è stato eseguito un blocco intercostale con Levobupivacaina 0,5% al dosaggio di 1mg/kg. Inoltre, il monitoraggio invasivo dei valori pressori arteriosi, è stato ottenuto mediante incannulazione dell'arteria femorale destra.

Frequenza cardiaca e respiratoria, pressioni arteriose indirette, temperatura ed emogasanalisi arteriosa, sono stati monitorati per tutta la durata della procedura chirurgica.

Chiusa la parete toracica, l'animale è stato svezzato dalla ventilazione meccanica, ed estubato al ripristino del riflesso della deglutizione. Successivamente è stata praticata, per circa 3 ore, ventilazione non invasiva a mezzo di un casco (CaStar CPAP Hood, large - Fig. 7) con flusso di O₂ settato a 10L/min e frazione di O₂ inspirato pari a 0,4 (FiO₂), previa sedazione dell'animale con infusione continua di Propofol (0,1-0,2 mg/kg/min). Ciascun animale è stato successivamente trasferito nel box di degenza, per monitoraggio continuo per le prime 12 ore. Al momento del sacrificio ogni possibile sofferenza per l'animale è stata evitata mediante premedicazione con sedativi. Per l'eutanasia è stata utilizzata una miscela composta da: Embutramide 200 mg/kg; Mebenzonio Ioduro 50 mg/kg; Tetracaina cloridrato 5 mg/kg.

3.3 Valutazioni fenotipiche e dell'espressione genica

In sede chirurgica (giorno 0), sono stati eseguiti prelievi di tessuto polmonare, allo scopo di realizzare valutazioni morfologiche del fenotipo polmonare sinistro, assunta come condizione fisiologica di partenza. Il prelievo, sito-specifico, è avvenuto nel segmento dorsale del lobo caudale (centrale, facile da riconoscere, scarsamente soggetto a variazioni anatomiche e perpendicolare all'ilo polmonare) subito dopo l'esecuzione della pneumonectomia sinistra. Alcuni frammenti di tessuto polmonare sono stati trattati per eseguire valutazioni istologiche; altri sono stati conservati per essere sottoposti a valutazione dell'espressione genica. Dopo il percorso

post-operatorio, ogni suino è stato sacrificato (giorno 60) in maniera indolore (sedazione in sala operatoria, induzione dell'anestesia generale e successiva eutanasia).

Sulla carcassa è stata effettuata autopsia con analisi del fenotipo macroscopico in reazione alla pneumonectomia (fenotipo reattivo). Sul polmone destro (il rimanente), sono stati eseguiti prelievi di tessuto in sede specifica (stesso lobo, stesso segmento dove erano stati eseguiti i prelievi polmonari sul polmone sinistro). I prelievi eseguiti sul polmone destro sono stati allestiti per eseguire le stesse valutazioni eseguite sul sinistro, al fine di valutare l'eventuale presenza di variazioni morfologiche (volume aereo, vascolarizzazione, numero di vasi, diastanza tra i vasi sanguigni e loro calibro, distanza tra i setti, spessore degli strati cellulari, cellularità e stretching radiale) insorte dopo 60 giorni di vita monopolmonare.

E' stata eseguita un' analisi istologica comparativa di natura unicamente descrittiva. La valutazione è stata sempre eseguita dallo stesso anatomopatologo, sia per i campioni allestiti dal polmone sinistro, sia per quelli allestiti dal polmone destro. Al patologo è stato chiesto di riportare una differenza comparativa in caso di delta di almeno il 30% tra i due campioni. Nessuna valutazione quantitativa dei cambiamenti morfologici è stata eseguita.

3.4 Isolamento dell'RNA, costruzione di librerie e sequenziamento

L'RNA totale è stato estratto dai tessuti congelati dopo lo scongelamento e l'omogeneizzazione con IKA Ultra-Turrax e QIAzol Lysis Reagent. L'RNA è stato estratto con il metodo del fenolo cloroformio. Dalla fase acquosa, l'RNA è stato purificato automaticamente da BioRobot EZ1 utilizzando il kit EZ1 RNA Universal Tissue secondo le istruzioni del produttore (Qiagen S.p.A., Milano, Italia). L'RNA è stato eluito in 50 µl di acqua priva di RNasi e conservato a -80°C fino al momento dell'uso. L'RNA totale estratto dai campioni è stato preparato secondo il kit di preparazione del campione Illumina TruSeq RNA. Pertanto, ogni campione è stato indicizzato, raggruppato per 10 e sequenziato su una singola corsia di Illumina Flow Cell PE v3 (Illumina Inc., CA, USA). Il sequenziamento è stato eseguito su Illumina HiSeq1500 con chimica TruSeq SBS (200 cicli), generando 2x100 letture Paired-Ends.

3.5 Elaborazione dei dati di sequenziamento grezzi e allineamento delle letture

I dati di sequenziamento grezzi sono stati elaborati utilizzando CASAVA v1.8 e le analisi bioinformatiche sono state eseguite tramite il pacchetto Bioconductor su R. Il controllo di qualità è stato effettuato con FastQC [36]. Sono state eseguite analisi per sequenza e per base per filtrare le letture secondo i seguenti criteri: distribuzione della lettura in sequenza = 75 bp; copertura del 100% in tutte le basi; contenuto di GC ~50%, ~25% di A, T; contributi nucleotidici G e C; contenuto di basi ambiguo < 0,1% e punteggio Phred superiore a 30 (ovvero, accuratezza dell'identificazione delle basi maggiore del 99,9%). Le letture di brevi sequenze sono state assemblate, mappate e annotate utilizzando come modello, il genoma di riferimento più recente del maiale (Sscrofa11.1/susScr11). La matrice di conteggio delle letture è stata ottenuta contando il numero di letture mappate su un gene specifico in base al set di geni per ciascun campione. Le letture multimappa sono state scartate.

3.6 Analisi dei geni espressi in maniera differenziale (DEG)

I dati sono stati normalizzati mediante una trasformazione logaritmica regolarizzata. È stata condotta un'analisi delle componenti principali (PCA) per determinare la somiglianza dei campioni tra le due condizioni. I DEG sono stati identificati utilizzando il pacchetto DESeq2, applicando la funzione DESeq e trattando i due gruppi, pre e post-pneumectomia, come spaiati, senza aggiustamento per covariate. I valori p risultanti sono stati aggiustati tramite il metodo di correzione di Benjamini-Hochberg (False Discovery Rate) ed è stata utilizzata una soglia per selezionare i geni statisticamente più significativi ($p < 0,001$). Quindi, i geni risultanti, sono stati ordinati in base al loro valore di variazione.

3.7 Citometria digitale da dati bulk RNA-Seq e identificazione di modelli di espressione genica specifici del tipo di cellula

La stima dell'abbondanza cellulare e dei modelli di espressione genica specifici del tipo cellulare dai dati bulk RNA-Seq, sono stati eseguiti utilizzando scSorter [37] e CIBERSORTx [38]. scSorter è stato utilizzato per etichettare ogni cellula inclusa nel set di dati di sequenziamento

dell'RNA a cellula singola (scRNA) del polmone di maiale adulto considerato come riferimento, secondo i 38 marcatori di espressione specifici delle cellule riportati da Zhang [39]. CIBERSORTx ha permesso la creazione della matrice identificativa della sequenza scRNA-Seq su cui sono state identificate le frazioni cellulari e i modelli di espressione genica specifici del tipo cellulare dai dati bulk RNA-Seq. Le differenze nelle frazioni cellulari tra i gruppi pre e post-pneumectomia sono state testate con il test di Kruskal-Wallis, fissando il livello di significatività statistica a $P < 0,05$ (a due code).

3.8 Analisi funzionale dell'ontologia genica e reti di interazione

L'ontologia genica e l'analisi della rete di interazione sono state eseguite sui principali geni up e down-regolati, selezionati calcolando il 10° e il 90° percentile della distribuzione della variazione di espressione nell'intero set di geni espressi. Questi due sottoinsiemi di geni sono stati utilizzati per ricostruire le reti di interazione up e down-regolate, interrogando il database String e selezionando "Sus scrofa" come organismo di riferimento per recuperare le informazioni sulle interazioni [40]. Poiché String è un database di rete di associazione proteina-proteina, i geni di input sono stati mappati automaticamente nelle proteine associate. L'analisi dell'annotazione funzionale è stata eseguita utilizzando DAVID Bioinformatics Resources, utilizzando l'intero "Sus scrofa" come background genetico [41]. L'algoritmo ModuLand (è stato utilizzato per identificare i cluster di nodi nei network [42]. ModuLand è implementato come plug-in di Cytoscape, una piattaforma bioinformatica open-source per l'analisi di dati sperimentali e l'integrazione di modelli di network biomolecolari [43]. Inoltre, questo algoritmo identifica i nodi chiave che collegano due o più network di geni e manifesta la funzione dell'intero network.

4. RISULTATI

Undici suini sono stati sottoposti a pneumonectomia sinistra. Tutti hanno concluso il periodo di osservazione di 60 giorni, eccetto uno (sviluppo di ernia diaframmatica). Cinque soggetti hanno completato il follow-up clinico senza complicanze respiratorie e sistemiche e senza evidenza di turbe comportamentali e dell'accrescimento. L'RNA-seq è stato eseguito solo negli animali che hanno avuto un decorso post-operatorio completamente regolare (N= 5). I restanti 5 soggetti, sono stati esclusi.

4.1 Anatomia patologica macroscopica e microscopica

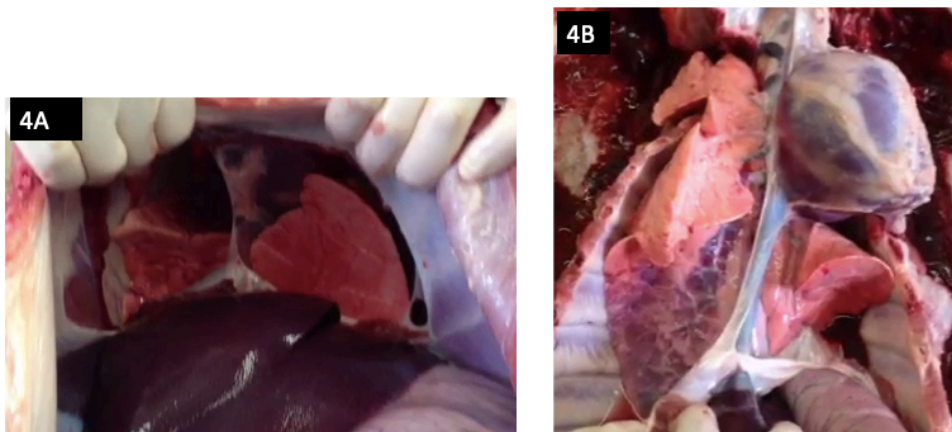
La valutazione anatomico-patologica macroscopica, ha mostrato un notevole incremento volumetrico del polmone residuo, sino a occupazione di tutto lo spazio toracico disponibile.

All'autopsia, l'ispezione della cavità toracica ha mostrato la presenza di shift mediastinico in tutti i suini. Il cavo pleurico sinistro era quasi del tutto occupato da liquido giallastro (intervallo: 140-380 ml, mediana: 200 ml, media: 226 ml), con obliterazione pressochè totale.

Il versamento pleurico formatosi dopo la pneumonectomia risultava presente in 3/10 casi.

In 7 casi è stato evidenziato shift mediastinico verso il cavo residuo, apertura della pleura mediastinica, trasferimento di parte del polmone destro nel cavo pleurico post-pneumonectomia ed occupazione del cavo da parte del polmone rimanente. (Figura 4 A-B).

Figura 4: A: erniazione del lobo inferiore destro nel cavo sinistro post-pneumonectomia, con apertura della pleura sinistra. B: sconfinamento del lobo inferiore destro verso l'emitorace sinistro mediante apertura della pleura mediastinica e shift del mediastino a sinistra.



Morfologicamente il lobo inferiore risultava di maggiori dimensioni rispetto al superiore. Non è mai stato riscontrato versamento pericardico; in 2/10 casi è stata riscontrata ascite. L'erniazione lobare controlaterale è stata riportata sempre a carico del lobo inferiore con l'eccezione del suino n° 7 dove invece coinvolgeva i segmenti più caudali del lobo superiore. La prevalente erniazione dei lobi inferiori, sembra essere dovuta alla minore resistenza che il mediastino offre nelle sedi caudali. Infatti, durante l'esecuzione della pneumonectomia, il lobo polmonare inferiore controlaterale risulta sempre visibile. Il cuore ed i grandi vasi sono risultati essere di normali dimensioni.

L'analisi istologica ha mostrato una variazione rilevante nell'architettura del tessuto tra il polmone rimosso e quello rimanente. (Figura 5 A- B-C-D; Figura 6 A-B-C-D)

Figura 5: A: vetrino allestito da prelievo intraoperatorio lobo superiore polmone sinistro: normale condizione istologica polmonare; B: vetrino allestito da prelievo autoptico lobo superiore polmone destro 60 giorni dopo vita monopolmonare. Presente rottura dei setti interalveolari, aumento del rapporto ventilazione/perfusione, aumento degli spazi aerei, riduzione della capillarità con effetto "spazio morto"; C: vetrino allestito da prelievo intraoperatorio lobo superiore polmone sinistro visto ad un ingrandimento minore; D: vetrino allestito da prelievo autoptico lobo superiore polmone destro 60 giorni dopo vita monopolmonare visto ad un ingrandimento minore.

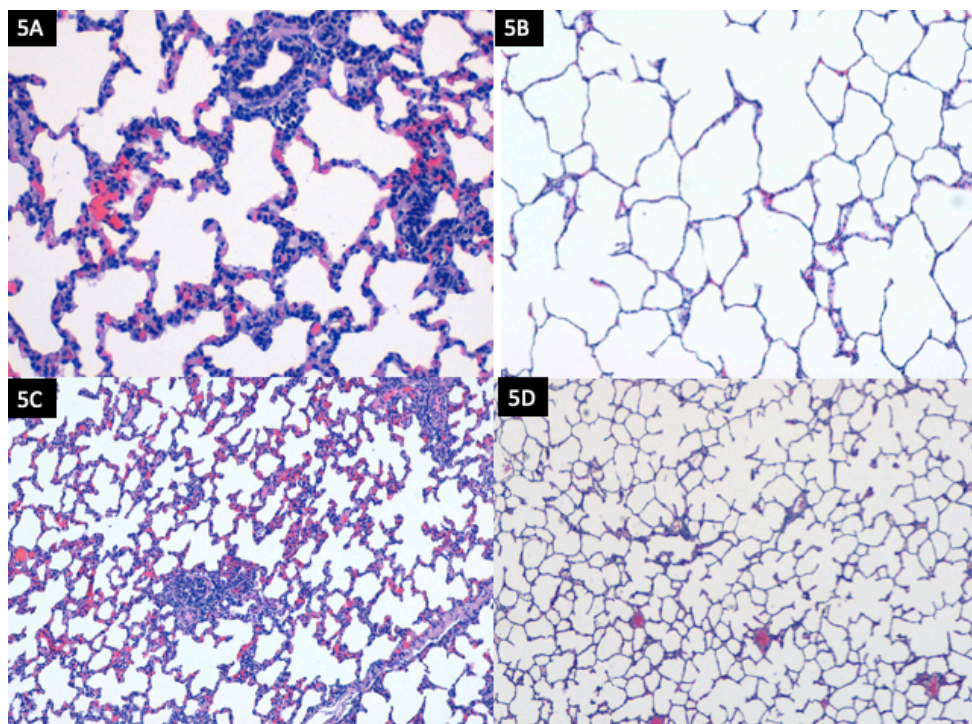
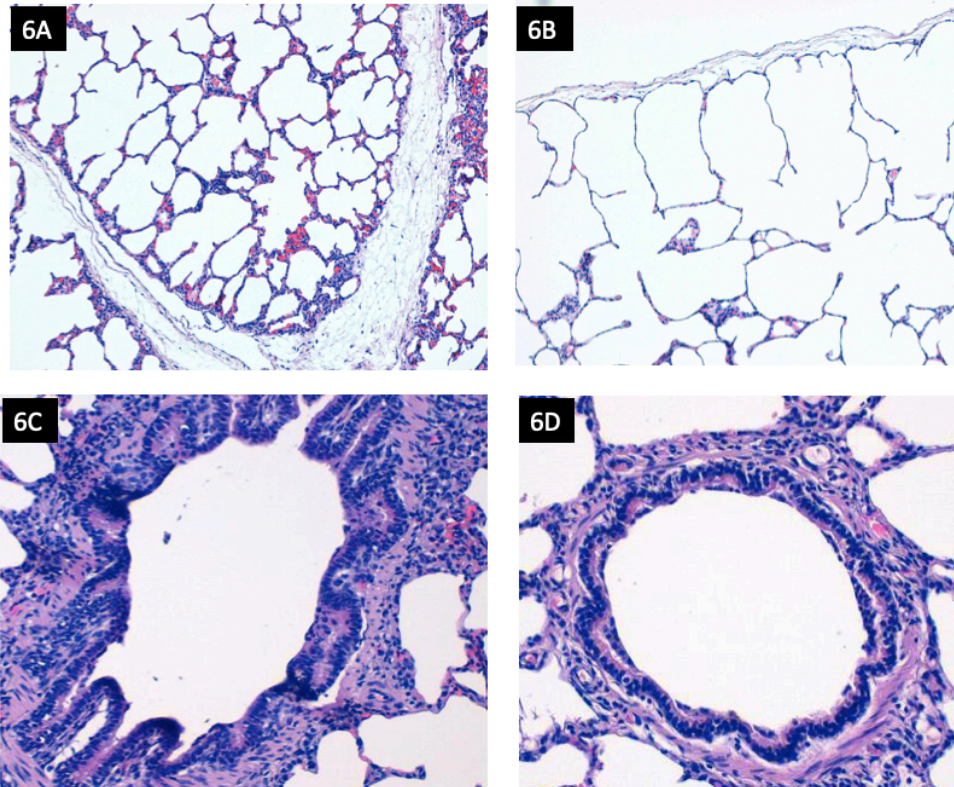


Figura 6: A-B: vetrino allestito da prelievo intraoperatorio (A) e autoptico (B). Evidenza in B di importante dilatazione degli spazi aerei in sede subpleurica. C-D: vetrino allestito da prelievo intraoperatorio (A) e autoptico (B). Evidenza in A di margini bronchiali frastagliati e sinuosi con 3-4-5 file di cellule epiteliali bronchiali. Evidenza in D di “effetto bronchiale”. Tensione parietale e crescita polmonare compensatoria inducono uno stiramento della parete bronchiale con acquisizione di margini circolari/ovaloidi e riduzione della cellularità dell’epitelio bronchiale.



L’analisi istologica del polmone rimanente dopo pneumonectomia sinistra ha mostrato sei caratteristiche principali:

1. Dilatazione degli spazi aerei distali in particolare nella zona subpleurica;
2. Rottura dei setti interalveolari;
3. Assenza di fibrosi e scarsa infiammazione;
4. Dilatazione degli spazi aerei alla periferia dei lobuli polmonari secondari, con comparsa di "enfisema vicariante", ovvero il tentativo del polmone di supplire alla avvenuta riduzione di parenchima;

5. Effetto bronchiale: la dilatazione polmonare provoca un allungamento del bronco; da un bordo sinuoso e frastagliato nel periodo pre-operatorio (condizioni anatomiche normali) ad un bordo luminale più cilindrico e armonico;
6. Forte aumento del rapporto tra spazi aerei (ventilazione) e apporto di sangue (perfusione) con evidenti aree di spazio morto alveolare.

4.2 Riepilogo dati di sequenziamento del trascrittoma

Sono state generate 10 librerie per RNA-seq dal parenchima polmonare di cinque maiali femmina Landrace x Large White che rappresentano il trascrittoma polmonare prima e dopo la pneumonectomia sperimentale. Utilizzando la tecnologia di sequenziamento Illumina paired-end, sono state ottenute un totale di circa 209 milioni di reads grezze (20,9 Gigabases, Gb) e sono state ottenute 202 milioni di reads di alta qualità dopo la rimozione di quelle di bassa qualità. Il numero di reads così ottenute (reads pulite) per ogni campione varia da 34 a 12 milioni (per una media di 20 milioni) (tabella 1). Dopo l'allineamento delle reads pulite con il genoma di riferimento (Sscrofa11.1/susScr11), tutti i campioni hanno mostrato un tasso di mappatura delle reads complessivo superiore all'80,1% e un tasso di allineamento delle coppie di lettura superiore al 74,8% (tabella 1). Per garantire l'affidabilità dei risultati dell'analisi, solo le reads univoche, appartenenti a una coppia concordante, sono state utilizzate per la successiva analisi computazionale.

Tabella 1: Riepilogo dati sequenziamento del trascrittoma

SAMPLE	PRE1	PRE3	PRE4	PRE5	PRE6	POST1	POST3	POST4	POST5	POST6
Raw reads (2x100)	22,215,114	25,366,338	28,012,764	24,912,278	35,572,116	19,130,692	14,760,032	12,1202,62	13,377,040	13,233,150
Gigabases Sequenced	2.2	2.5	2.8	2.5	3.6	1.9	1.5	1.2	1.3	1.3
Left reads										
Input	10,780,311	12,293,103	13,537,886	12,070,157	17,235,284	9,264,443	7,081,099	5,813,708	6,419,030	6,351,333
Mapped (% of input)	8,803,021 (81.7%)	9,985,476 (81.2%)	11,825,297 (87.3%)	10,180,079 (84.3%)	14,637,137 (84.9%)	7,865,224 (84.9%)	5,970,220 (84.3%)	4,740,662 (81.5%)	5,229,452 (81.5%)	5,091,138 (80.2%)
Multiple alignments (% of mapped)	892,646 (10.1%)	970,380 (9.7%)	1,023,269 (8.7%)	1,033,104 (10.1%)	1,510,039 (10.3%)	801,197 (10.2%)	585,006 (9.8%)	464,993 (9.8%)	505,362 (9.7%)	505,968 (9.9%)
Multiple alignments (>20)	5,326	20,652	8,678	8,204	13,126	5,520	4,178	2,699	3,529	3,911
Right reads										
Input	10,780,311	12,293,103	13,537,886	12,070,157	17,235,284	9,264,443	7,081,099	5,813,708	6,419,030	6,351,333
Mapped (% of input)	8,793,373 (81.6%)	9,968,142 (81.1%)	11,812,830 (87.3%)	10,174,749 (84.3%)	14,625,358 (84.9%)	7,853,522 (84.8%)	5,963,922 (84.2%)	4,732,430 (81.4%)	5,221,060 (81.3%)	5,080,082 (80.0%)
Multiple alignments (% of mapped)	891,840 (10.1%)	968,583 (9.7%)	1,022,056 (8.7%)	1,032,995 (10.2%)	1,509,257 (10.3%)	800,103 (10.2%)	584,803 (9.8%)	464,418 (9.8%)	505,350 (9.7%)	504,728 (9.9%)
Multiple alignments (>20)	5,326	20,659	8,677	8,212	13,161	5,508	4,195	2,700	3,542	3,892
Overall read mapping rate	81.6%	81.2%	87.3%	84.3%	84.9%	84.8%	84.3%	81.5%	81.4%	80.1%
Aligned pairs	8,302,651	9,406,157	11,415,114	9,744,077	14,007,152	7,504,319	5,708,423	4,483,065	4,942,064	4,797,613
Multiple alignments (% of mapped)	843,185 (10.2%)	903,395 (9.6%)	983,803 (8.6%)	988,487 (10.1%)	1,443,293 (10.3%)	767,737 (10.2%)	559,097 (9.8%)	438,633 (9.8%)	476,211 (9.6%)	474,236 (9.9%)
Discordant alignment (% of mapped)	90,069 (1.1%)	116,602 (1.2%)	121,979 (1.1%)	132,889 (1.4%)	202,459 (1.4%)	93,671 (1.2%)	64,959 (1.1%)	45,215 (1.0%)	51,286 (1.0%)	49,965 (1.0%)
Concordant pair alignment rate	76.2%	75.6%	83.4%	79.6%	80.1%	80.0%	79.7%	76.3%	76.2%	74.8%

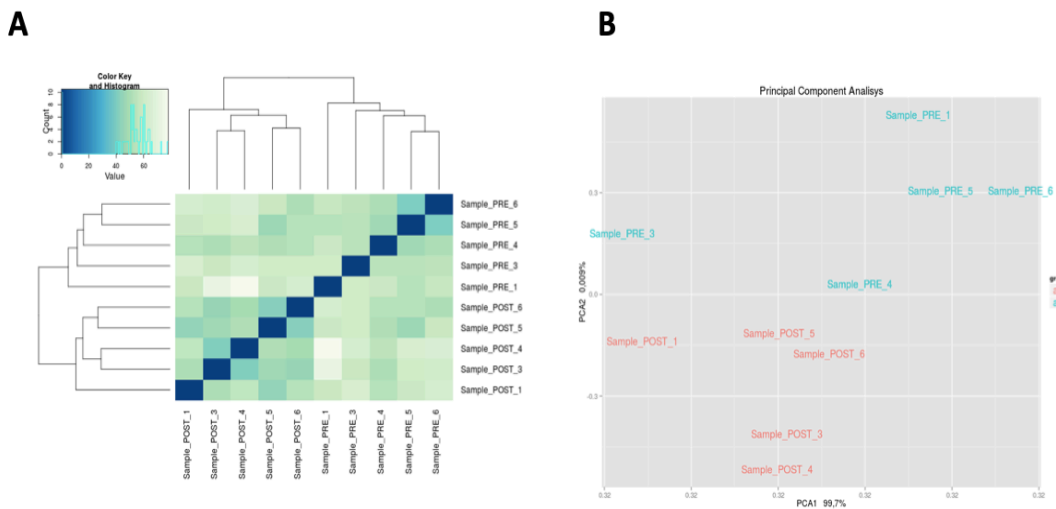
4.3 Identificazione e analisi dei geni espressi in modo differenziale (DEG)

È stato riscontrato un totale di 21.130 geni espressi nei dieci campioni sequenziati, con almeno un conteggio genico riportato in un campione unico, sul numero totale di 25.322 geni annotati riportati per il genoma Sscrofa 11.1/susScr 11. Il trascrittoma polmonare prima e dopo la pneumonectomia ha presentato un cambiamento radicale (Figura 7). Infatti, sia il raggruppamento gerarchico, sia l'analisi delle componenti principali, hanno mostrato una chiara differenza del trascrittoma polmonare tra i gruppi pre e post pneumonectomia. Lo scopo principale dell'analisi statistica è l'identificazione dei geni espressi in modo differenziale (DEG) ottenuta confrontando l'espressione di tutti i geni sequenziati nei campioni ottenuti prima e dopo la pneumonectomia. Cinquecentocinquantatré geni (349 up-regolati e 204 down-regolati) hanno mostrato un pattern di espressione significativamente differente con un valore di $P < 0.001$. I dieci geni più up- e down-regolati sono riportati nella tabella 2. Il rapporto logaritmico dei valori di espressione di un gene (\log_2 -fold change) varia da 2,22 a 2,74 volte nei geni up-regolati e da -1,25 a -1,59 volte nei geni down-regolati.

Tabella 2: Top 10 geni up-regolati e down-regolati

Group	Gene_name	Description	baseMean	log2FoldChange	P	P-adj
Up-regulated	<i>Edn1</i>	Endothelin 1	905.52	2.74	3.18E-35	6.66E-32
	<i>Areg</i>	Amphiregulin	30.26	2.68	2.35E-16	8.60E-14
	<i>Havcr2</i>	Hepatitis A virus cellular receptor 2	472.48	2.66	4.67E-54	2.94E-50
	<i>Gadd45g</i>	Growth arrest and DNA damage inducible gamma	811.90	2.65	2.90E-22	2.03E-19
	<i>Depp1</i>	DEPP1 autophagy regulator	310.97	2.38	1.95E-27	2.46E-24
	<i>Cldn4</i>	Claudin 4	2971.36	2.36	4.72E-21	3.12E-18
	<i>Atf3</i>	Activating transcription factor 3	1434.89	2.34	2.24E-23	2.17E-20
	<i>Myc</i>	MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor	1118.21	2.26	1.39E-37	3.50E-34
	<i>Gadd45b</i>	Growth arrest and DNA damage inducible beta	1294.38	2.26	4.03E-57	5.07E-53
	<i>Socs3</i>	Suppressor of cytokine signaling 3	161.60	2.22	2.42E-22	1.79E-19
Down-regulated	<i>Obscn</i>	Obscurin, cytoskeletal calmodulin and titin-interacting RhoGEF	98.40	-1.59	4.07E-13	8.40E-11
	<i>Cdkn2b</i>	Cyclin dependent kinase inhibitor 2B	79.18	-1.46	2.06E-09	2.01E-07
	ENSSSCG00000015738	n.a	48.35	-1.34	4.92E-08	3.44E-06
	<i>Prrt2</i>	Proline rich transmembrane protein 2	88.19	-1.32	1.78E-06	7.44E-05
	<i>Amer1</i>	APC membrane recruitment protein 1	57.88	-1.32	1.94E-08	1.52E-06
	<i>Flrt3</i>	Fibronectin leucine rich transmembrane protein 3	274.64	-1.30	2.86E-07	1.61E-05
	<i>Efnb2</i>	Ephrin B2	371.29	-1.29	8.55E-07	4.25E-05
	<i>Tox3</i>	TOX high mobility group box family member 3	47.38	-1.27	1.52E-07	9.27E-06
	<i>Znf793</i>	Zinc finger protein 793	36.04	-1.25	3.45E-07	1.88E-05
	<i>Znf365</i>	Zinc finger protein 365	57.98	-1.25	1.84E-07	1.10E-05

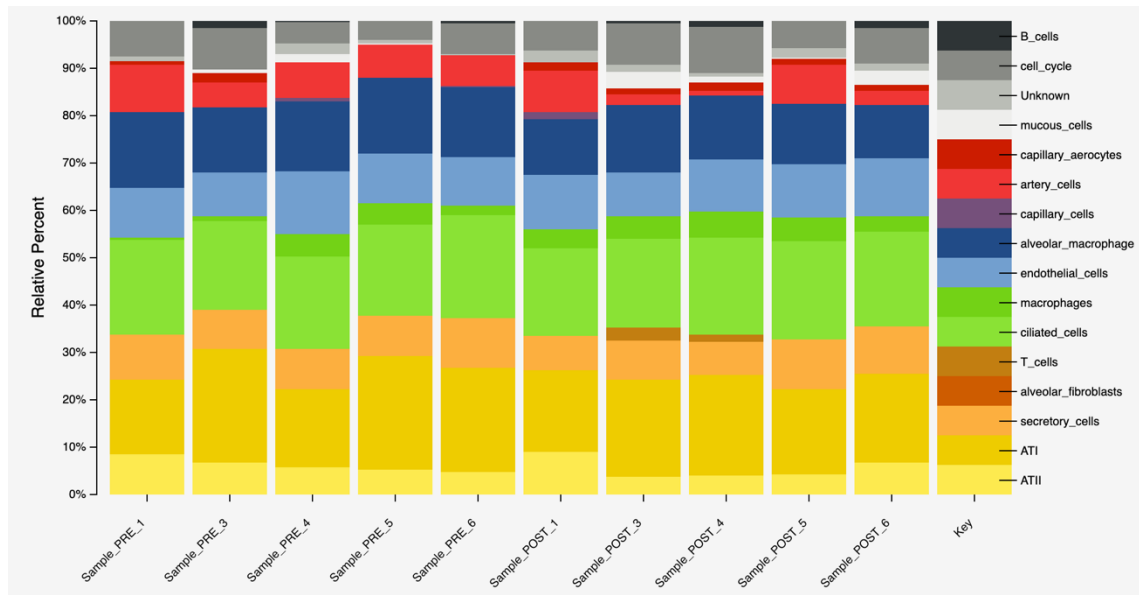
Figura 7: Trascrittoma polmonare prima e dopo la pneumonectomia sperimentale. Mappa termica delle distanze campione-campione. Il clustering gerarchico è stato ottenuto utilizzando la matrice della distanza Euclidea sulla trasformazione log2 dell'intero set di dati.



4.4 Quantificazione cellulare e modelli di espressione genica specifici del tipo cellulare

Sfruttando il set di dati di sequenziamento dell'RNA a cellula singola (scRNA-Seq) del polmone di maiale adulto ottenuto dallo studio di Zhang et al. [39], che comprende 15 diversi tipi cellulari, tra cui le cellule epiteliali alveolari di tipo 1 (ATI), epiteliali alveolari di tipo 2 (ATII), fibroblasti alveolari, cellule endoteliali, cellule ciliate, cellule capillari, aerociti capillari, cellule arteriose, cellule mucose, cellule secretorie, macrofagi, macrofagi alveolari, cellule T, cellule B e stato del ciclo cellulare, utilizzando CIBERSORTx [38], le frazioni cellulari che compongono ciascuno dei dieci campioni bulk di RNA-Seq, sono state determinate. Innanzitutto, è stata stabilita una matrice di firma personalizzata basata sul set di dati scRNA-Seq di riferimento [39], che ha catturato tutti i principali sottoinsiemi di cellule considerati (Figura 8).

Figura 8: Composizione cellulare stimata ottenuta con CIBERSORTx. Le differenze nelle frazioni cellulari stimate, prima e dopo pneumonectomia sono state testate utilizzando il test di Kruskal-Wallis (tutte con $p > 0.345$).



Pertanto, la matrice di firma derivata da scRNA-Seq è stata applicata per risolvere la composizione cellulare dei dieci campioni bulk di RNA-Seq dai gruppi pre e post-pneumonectomia. I tipi cellulari più rappresentati, sono risultati essere ATI e cellule ciliate

(media, 19,8%), macrofagi alveolari (media, 13,9%), cellule endoteliali (media, 10,9%), cellule secretorie (media, 8,8%), stato cellulare nel ciclo cellulare (media, 6,6%), cellule arteriose (media, 6,0%), ATII (media, 5,9%) e macrofagi (media, 3,5%); gli altri sette tipi cellulari considerati, comprese le “sconosciute”, erano assenti (fibroblasti alveolari) o presenti in percentuali molto basse (inferiori o uguali all'1%). Non è stata trovata alcuna differenza significativa (mediante il test di Kruskal-Wallis) nelle frazioni stimate di tipo cellulare, tra campioni pre e post-pneumectomia. Questa evidenza indica una mancanza di bias nella determinazione dei DEG attribuibili a differenze nella composizione cellulare.

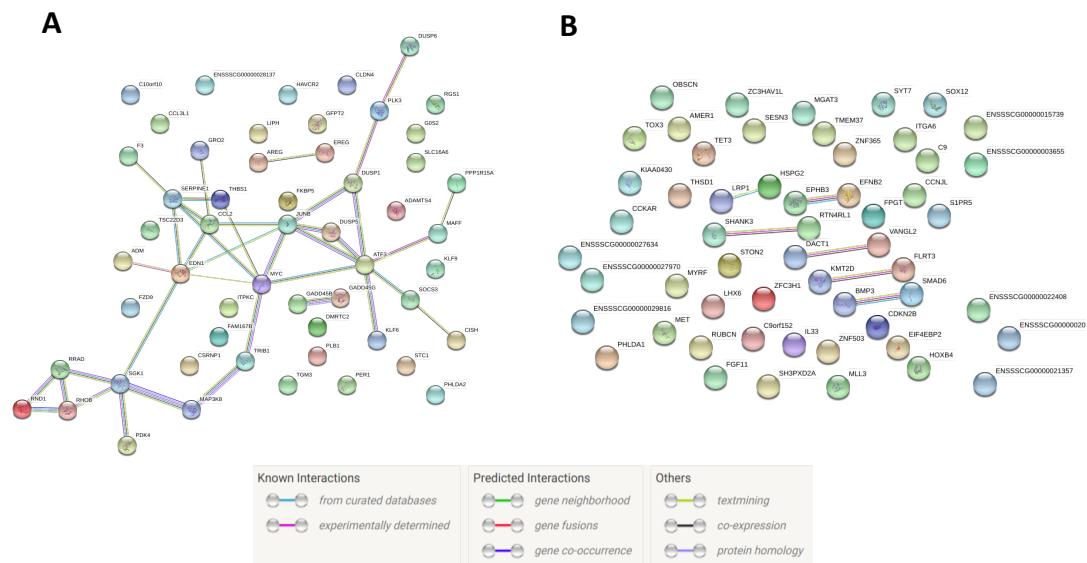
L'imputazione dei profili di espressione genica specifici del tipo cellulare è stata limitata ai nove tipi cellulari più rappresentati (tipo cellulare medio 3,5%). Duecentonovantacinque dei 553 DEG identificati tra i gruppi pre e post-pneumectomia sono stati attribuiti in modo univoco a un tipo di cellula. In particolare, la loro maggioranza (213/295, 72,2%) era attribuibile ai macrofagi, seguiti da ATII (28/295, 9,5%), cellule secretorie (25/295, 8,5%), stato mitotico del ciclo cellulare (20/295, 6,8%), ATI (7/295, 2,4%) e cellule endoteliali (2/295, 0,7%). Nessun DEG specifico per tipo cellulare è stato rilevato per le cellule ciliate, i macrofagi alveolari e le cellule arteriose.

4.5 Analisi funzionale e network interattivo Gene Ontology

Per ottenere una migliore comprensione dei percorsi biologici potenzialmente coinvolti nei cambiamenti complessivi indotti dalla pneumectomia, è stata eseguita un'analisi funzionale utilizzando il database bioinformatico DAVID in modo da trovare i geni significativamente arricchiti ed eventuali modelli associati. Sono stati considerati solo i 553 DEG. L'analisi di Gene Ontology ha rivelato un significativo aumento dei geni della “via di segnale apoptotica estrinseca” (FDR $q=7,60E-03$), di quelli della “risposta all'insulina” (FDR $q=7,60E-03$) e di quelli “Regolatori negativi di DDX58/IFIH1” (FDR $q=7,50E-04$) rispetto ai modelli del database REACTOME. Non è stata riscontrata alcuna analogia con il database KEGG. Sono stati quindi selezionati quei geni che si trovano agli estremi superiori ed inferiori del rapporto logaritmo e sono state dedotte le corrispondenti interazioni (Figura 9 A-B). È interessante notare che la struttura delle reti fra le due figure sopra citate è molto diversa l'una dall'altra, per cui è possibile

evincere che la maggior parte dei meccanismi regolatori attivi prima della pneumonectomia siano completamente disregolati dopo la resezione. La tabella 3 mostra i risultati dell'analisi delle vie di segnale, identificando i nodi della Figura 9.

Figura 9: Network biologico dei geni espressi in maniera differenziale (DEG). A: geni up-regolati; B: geni down-regolati.



Infine, attraverso l'applicazione ModuLand, sono stati identificati 11 nodi principali del network, ricostruito utilizzando l'intero set di geni provenienti sia dalla coda superiore che da quella inferiore della distribuzione logaritmica (Figura 10).

Alcune delle funzioni dei nodi principali individuati attraverso l'utilizzo di ModuLand, sono di seguito riportate [44,45].

Tabella 3. Analisi delle vie di segnale

Pathway description	Observed genes	FDR p-value	Matching proteins
TNF signaling pathway	6	4.03e-05	CCL2, EDN1, GRO2, JUNB, MAP3K8, SOCS3
MAPK signaling pathway	6	0.00187	DUSP1, DUSP5, GADD45B, GADD45G, MAP3K8, MYC
p53 signaling pathway	4	0.00187	GADD45B, GADD45G, SERPINE1, THBS1
FoxO signaling pathway	4	0.0139	GADD45B, GADD45G, PLK3, SGK1
Hippo signaling pathway	4	0.0139	AREG, FZD9, MYC, SERPINE1
ErbB signaling pathway	3	0.0447	AREG, EREG, MYC

Figura 10: Ricostruzione del network biologico completo utilizzando ModuLand. L'analisi del network è stata effettuata considerando l'intero set di geni che appartengono ad entrambe le code superiore ed inferiore nella variazione di distribuzione logaritmica.



a) EREG

EREG, il gene dell'epiregulina codifica per un ormone peptidico membro della famiglia di proteine del fattore di crescita epidermico (EGF). Può funzionare come ligando del recettore EGF oltre che fungere da ligando per la maggior parte dei membri della famiglia dei recettori tirosin-chinasici. Ha proprietà regolatorie bifunzionali: può sia inibire la crescita di diverse cellule tumorali epiteliali sia stimolare la crescita di fibroblasti e di vari altri tipi di cellule. Può anche essere coinvolto in un'ampia gamma di processi biologici tra cui infiammazione, guarigione delle ferite, maturazione degli ovociti e proliferazione cellulare.

b) PPP1R15A

Il gene PPP1R15A appartiene ad una famiglia di geni i cui livelli di trascrizione aumentano a seguito di condizioni che determinano un brusco arresto della crescita e a seguito di trattamento con agenti che possono indurre danno del DNA. L'induzione di questo gene da parte di radiazioni ionizzanti può presentarsi in alcuni tipi cellulari indipendentemente dallo stato di p53 e la sintesi

della proteina codificata correla con l'induzione dell'apoptosi dopo esposizione a radiazioni ionizzanti.

c) GADD45

GADD45 comprende una famiglia di geni implicati nella risposta cellulare allo stress; essi mediano diversi processi cellulari, tra cui la riparazione del DNA, l'apoptosi, l'arresto del ciclo cellulare, la senescenza, la proliferazione delle cellule epiteliali dentali e la risposta immunitaria ai tumori.

d) PLK3

Polo-like chinasi 3 è uno dei quattro membri della famiglia delle Polo-like chinasi. Studi hanno dimostrato che PLK3 è importante nella regolazione del ciclo cellulare: la sua espressione è aumentata durante la fase G1 nelle cellule in coltura.

L'espressione di PLK3 è stata approfondita in diversi studi incentrati sulla differenziazione cellulare durante retinogenesi: lo stimolo ipossico induce la differenziazione delle cellule staminali epiteliali corneali mediante la disregolazione dell'attività di PLK3, mentre PLK3 stimola l'apoptosi nelle cellule epiteliali corneali umane, suggerendo quindi un diverso effetto dello stimolo ipossico sui due tipi cellulari.

e) ATF3

ATF3 è un gene che codifica per proteine appartenenti alla famiglia dell'attivatore Protein-1. L'espressione di ATK 3 è stimolata da molti segnali di stress. In molte condizioni fisiologiche, ATK3 agisce come immunomodulatore reprimendo citochine proinfiammatorie come IL-6, IL-12b, Toll-like receptor 4; al contrario, nelle cellule endoteliali, ATK3 promuove l'infiammazione. ATK3 induce anche l'apoptosi in cellule malfunzionanti, funge da marker neuronale per lesioni nervose, ha un ruolo nel regolare l'attività degli osteoblasti e degli osteoclasti nel rimodellamento osseo. È stato dimostrato che l'ATF 3 è sovraespresso nel cuore di topi dopo infarto miocardico

indotto chirurgicamente, specialmente nei fibroblasti cardiaci, promuovendo così la riparazione cardiaca e proteggendo dalla disfunzione cardiaca.

La sovraespressione di ATF3 comporta stimoli diversi nei diversi tipi di cancro; ad esempio la sua sovraespressione promuove metastasi nel cancro alla prostata, favorisce la tumorigenesi nel carcinoma cutaneo squamoso, nel carcinoma mammario e nel linfoma di Hodgkin classico, ma studi recenti hanno dimostrato che la sua sovraespressione nelle cellule tumorali del colon e del colon-retto è associata a una riduzione della sopravvivenza delle cellule neoplastiche.

f) SERPINE1

Serpine 1, noto anche come inibitore dell'attivatore del plasminogeno 1, ha un ruolo nell'inibizione della fibrinolisi, nella modulazione dell'adesione cellulare, nella migrazione, nella proliferazione e nello sviluppo della fibrosi polmonare. La fibrosi polmonare è associata alla senescenza delle cellule alveolari di tipo II (ATII). È stato dimostrato che le cellule ATII nelle malattie polmonari fibrotiche, esprimono un livello più alto di Serpine 1. Un modello murino knockout per Serpine 1 è associato ad attenuazione della fibrosi polmonare.

g) RHOB

Le proteine Rho sono piccole molecole della famiglia RAS e hanno un ruolo nelle vie di segnalazione intracellulare. Hanno un ruolo nella regolazione delle trascrizioni geniche, nel traffico di vescicole, nell'organizzazione del citoscheletro. RhoB è espresso a livello della membrana plasmatica e nei compartimenti intracellulari. La sua espressione è indotta da molti eventi stressanti, come radiazioni UV, citochine, fattori di crescita, suggerendo così un ruolo nella risposta cellulare al danno del DNA.

h) SOCS3

SOCS3 è un regolatore molto importante nella cascata del segnale delle citochine durante la risposta infiammatoria ed immunitaria. Infatti è coinvolto nello sviluppo di numerose malattie

infiammatorie, come la malattia infiammatoria intestinale, l'artrite reumatoide, le malattie infiammatorie vascolari e la sclerosi multipla.

i) VANGL2

VANGL2 codifica per una proteina di membrana che produce una molecola di polarità cellulare planare presente nella coclea, nell'epitelio e nella piastra neurale. È coinvolto nella morfogenesi della corteccia cerebrale e nella spina bifida. Più recentemente, alla sua espressione, sono stati associati danno glomerulare renale, cardiomiopatia e rimodellamento miocardico. Sono stati descritti anche difetti del tubo neurale ed anencefalia.

l) LRP1

LRP1 produce un recettore per le lipoproteine a bassa densità, coinvolto in una serie di funzioni cellulari, come la formazione della rete intracellulare, il metabolismo dei lipidi e la compensazione dell'amiloide. È ubiquitario, necessario per il turnover della fibronectina e la sua espressione diminuisce negli anni. È coinvolto in importanti funzioni tra cui l'accumulo di farmaci (doxorubicina ed emodina), l'attività modulatrice delle cellule β nel diabete mellito di tipo 2 e la reazione infiammatoria polmonare e la successiva riparazione. È stato inoltre associato al melanoma e al cancro della tiroide.

m) EPHB3

EPHB3 codifica per un recettore tirosin-chinasi. È stato dimostrato il suo ruolo di mediatore nella guida degli assoni, nella migrazione cellulare e nello sviluppo di spine dendritiche e sinapsi eccitatorie. Anche l'angiogenesi, lo sviluppo del palato e della corteccia timica, la migrazione cellulare e la semina linfoide nel timo sono regolate da questo recettore. È anche coinvolto nello sviluppo del cancro gastrico.

5. DISCUSSIONE

Sono stati eseguiti diversi studi per valutare i segnali ed i meccanismi della crescita polmonare compensatoria [1-2,46].

Tuttavia, le basi biologiche ed i processi alla base di questo fenomeno, rimangono ancora in gran parte sconosciuti [47].

Lo scopo del presente studio è definire la risposta trascrizionale dell'intero genoma del polmone dei suini in esame, alla pneumonectomia sperimentale.

I nostri risultati hanno evidenziato una risposta trascrizionale rilevante del polmone rimanente, confrontato con il polmone resecato, con circa il 2% del genoma Sscrofa11.1/susScr11 preso come riferimento, costituito da geni differenzialmente espressi (DEG).

L'analisi della citometria digitale non ha evidenziato alcuna differenza significativa nella composizione del tipo cellulare nel polmone sinistro ed in quello destro, dopo 60 giorni di vita monopolmonare, a supporto dell'affidabilità dell'analisi dei DEG effettuata sui campioni di bulk-RNA.

Nonostante la mancanza di differenze significative nelle frazioni cellulari tra i due gruppi sperimentali, l'analisi dei modelli di espressione genica, specifici del tipo di cellula, ha mostrato tra i DEG, una sorprendente predominanza di geni specifici dei macrofagi. Quindi, è possibile che i macrofagi siano andati incontro ad un rilevante rimodellamento trascrizionale dopo la pneumonectomia. Questo è in linea con emergenti conferme che i macrofagi svolgano ruoli essenziali nella rigenerazione di organi, inclusi arti, intestino, fegato, reni e cuore [48-57].

Lechner et al. hanno recentemente dimostrato che i macrofagi svolgono un ruolo chiave nell'adattamento/crescita compensatoria polmonare dopo pneumonectomia nei topi; infatti, hanno mostrato come i macrofagi interstiziali, siano necessari per la rigenerazione tissutale in caso di resezione polmonare subtotale, poiché risultano essere componenti delle cellule staminali epiteliali alveolari di tipo 2 (AEC2). In effetti, è stato ipotizzato che la crescita compensatoria polmonare dopo pneumonectomia, richieda la proliferazione ed il riarrangiamento coordinati, di numerosi tipi di cellule epiteliali e stromali, tra cui AEC2, una popolazione di cellule staminali epiteliali capace di autorinnovarsi e differenziarsi in cellule epiteliali alveolari di tipo 1[58].

Nella top-ten dei geni up-regolati dopo pneumonectomia, (Tabella 2) 6 di questi, nello specifico Areg, Edn1, Gadd45b, Gadd45g, Myc e Socs3, risultano essere parte di sei vie di segnale con target TNF, MAPK, p53, FoxO, Hippo e ErbB. Ciascuna di queste vie di segnale risulta collegata a ipossia, rigenerazione tissutale e genesi tumorale.

La via di segnalazione del TNF viene avviata in risposta allo stress cellulare e ai segnali infiammatori che portano all'attivazione di vie pro-apoptotiche e cascata citochinica [59].

Edn1 guida l'attivazione e proliferazione delle cellule fibroblastiche e la loro differenziazione in miofibroblasti che portano a deposizione di collagene. La sua espressione nel tessuto polmonare è aumentata nella fibrosi polmonare idiopatica [60]. Tuttavia, nel nostro modello non è stata osservata fibrosi, probabilmente a causa del breve periodo di osservazione; inoltre, Edn1 è anche un potente peptide vasocostrittore, e la sua disregolazione è stata implicata nella disfunzione microvascolare coronarica e nello sviluppo/progressione del cancro del polmone non a piccole cellule [61].

Il gene Socs3 regola la risposta infiammatoria polmonare, promuovendo la riparazione del danno polmonare attraverso l'inibizione di JAK2/STAT3, riducendo l'espressione di fattori dell'infiammazione e contribuendo alla protezione dell'endotelio polmonare [62-64].

L'attivazione delle vie di segnalazione MAPK, p53 e FOXO nel mesenchima polmonare è cruciale per lo sviluppo polmonare, poiché questi percorsi, regolano diverse funzioni cellulari (proliferazione, differenziazione e apoptosi) in risposta a uno stress endogeno o esogeno [65-67].

Un gene cruciale, che agisce da modulatore in tutti e tre i percorsi citati, è Gadd45b, coinvolto nelle reazioni di risposta al danno cellulare e alla carcinogenesi polmonare [68,69]. Allo stesso modo, Gadd45g, essendo membro della famiglia di geni inducibili dal danno al DNA e che inibiscono la crescita cellulare in risposta allo shock da stress ed inducono apoptosi, agisce frequentemente come gene oncosoppressore, frequentemente inattivato epigeneticamente in caso di tumori multipli [70].

Un'elevata espressione del gene Myc si verifica in cellule in fase proliferativa durante lo sviluppo e nei tessuti adulti [71]. In particolare, l'espressione di Myc coordina un'ampia varietà di processi cruciali per la rigenerazione del tessuto polmonare [72]. Nell'uomo, la disregolazione di questo oncogene è stata osservata in diversi tumori, incluso il cancro del polmone [73].

Anche la via di segnalazione di Hippo è risultata arricchita nel nostro studio [74]. Questa via, gioca un ruolo cruciale nell'omeostasi del surfattante e nella coordinazione del differenziamento polmonare periferico [75, 76].

ErbB è fondamentale in numerose vie di segnalazione coinvolte sia nella normale fisiologia che nella tumorigenesi.

Nella nostra analisi è stata inoltre rilevata anche una up-regulation del gene Areg. Areg è coinvolto nel rimodellamento delle vie aeree dopo trapianto polmonare e promuove la guarigione della via aerea dopo risposta infiammatoria. Il gene è anche fortemente espresso dai macrofagi alveolari nel danno polmonare acuto indotto da lipopolisaccaridi [77, 78].

Diversi geni up-regolati non sono stati riscontrati all'interno delle vie di trasduzione del segnale risultate particolarmente attivate. Questi geni hanno dimostrato di essere coinvolti nelle reazioni contro il danno polmonare ed il metabolismo polmonare, rappresentando così, interessanti candidati per future indagini.

Depp1 è stato segnalato come gene responsivo all'ipossia e correlato all'autofagia [79].

Cldn4 codifica per una proteina transmembrana della membrana alveolo-capillare [80], espressa dalle cellule epiteliali dell'intero apparato respiratorio, che agisce come regolatore della permeabilità paracellulare durante la clearance del fluido alveolare [81, 82]. Inoltre, Cldn4 è anche coinvolto nella risoluzione dell'edema polmonare, pur essendo utilizzato come indicatore di danno polmonare [82-84].

Infine, Atf3 promuove la crescita cellulare, l'invasione e la sintesi di collagene, inibisce l'apoptosi e svolge un ruolo cruciale nel polmone, come dimostrato dalla sua associazione nella protezione contro il danno polmonare acuto e l'infezione virale [85, 86].

È interessante notare che nessuno dei primi 10 geni down-regolati è risultato incluso nelle vie di segnale. Questi geni sembrano avere importanti ruoli strutturali dei tessuti.

Obscn infatti, codifica per proteine giganti del citoscheletro, espresse in un'ampia varietà di tipi cellulari, principalmente nel cuore e in altre cellule muscolari striate, dove svolge un ruolo strutturale e regolatore nell'organizzazione delle miofibrille [87-89].

Cdkn2b regola i processi critici per la rigenerazione polmonare come rimodellamento della matrice extracellulare, proliferazione endoteliale e progressione del ciclo cellulare [90-92].

Amer1 è un gene espresso in maniera diffusa durante lo sviluppo embrionale del topo, che agisce come modulatore negativo della via WNT/ β -catenina la quale svolge funzioni pleiotropiche durante l'organogenesi [93]. Flrt3 è espresso in una grande varietà di tessuti ed è coinvolto nell'adesione cellulare e nella via di trasduzione del segnale delle adipocitochine [94]. Inoltre, è riconosciuto come il gene più down-regolato nel tessuto adiposo viscerale toracico dopo allotrapianto [95].

Efnb2 è un fattore angiogenetico implicato nella regolazione dei vasi polmonari regolando angiogenesi e linfangiogenesi VEGF-indotte [96]. Inoltre, un'aumentata espressione di Efnb2 promuove lo sviluppo polmonare fetale nei ratti [97]. Al contrario, una sua ridotta espressione, inibisce lo sviluppo alveolare, mentre la somministrazione intranasale della proteina, inibisce l'apoptosi delle cellule epiteliali alveolari [98]. Inoltre, l'inattivazione di Efnb2 provoca displasia polmonare distale, formazione della cresta alveolare e ridotta compliance polmonare [99].

I geni Prrt2, Tox3 e RNA-Znf793, rispettivamente, risultano collegati a diverse funzioni neuronali o a meccanismi immuno-correlati, coinvolti nella risposta immunitaria alle sollecitazioni polmonari [100-104]. Quindi, è probabile che il loro ruolo possa essere legato ad una risposta biologica generale ad insulti/variazioni importanti, piuttosto che rappresentare meccanismi polmonari specifici alla base dei processi compensatori e rigenerativi dopo pneumonectomia. Tuttavia, la forte disregolazione nell'espressione di questi geni dopo pneumonectomia sperimentale, non dovrebbe essere ignorata, poiché questi geni potrebbero svolgere un ruolo cruciale nei processi rigenerativi dopo procedure chirurgiche.

6. CONCLUSIONI

E' importante riconoscere la natura esplorativa di questo studio, quale primo tentativo di individuare l'espressione dell'intero genoma dopo pneumonectomia sperimentale nel modello suino. D'altra parte, la natura "hypotesis free" dello studio stesso, non consente di fornire una risposta definitiva e completa a domande specifiche. Inoltre, il fatto che le variazioni di espressione genica siano state analizzate in una singola biopsia polmonare sito specifica, unitamente al numero contenuto di modelli testati, costituisce un limite del nostro studio, sebbene il nostro approccio sperimentale abbia garantito un controllo dell'ambiente elevato, secondo procedure standardizzate, riducendo al minimo la presenza di possibili bias sperimentali.

E' chiaro che l'individuazione del "gene dell'alveologenesi" sia un'utopia, al momento attuale. Tuttavia nuovi spunti scientifici potrebbero in futuro migliorare le conoscenze volte alla creazione di una possibile terapia genica per malattie polmonari croniche, causa di deterioramento della funzione polmonare.

La possibilità di individuare una terapia su misura per il paziente con target genetici specifici, potrebbe inoltre essere un ulteriore spunto di studio anche in campo oncologico, considerando che il cancro del polmone rappresenta la prima causa di morte per neoplasia nei paesi industrializzati.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Hsia CC. Signals and mechanisms of compensatory lung growth. *J Appl Physiol*. 2004;97(5):1992-1998.
2. Fernández LG, Isbell JM, Jones DR, Laubach VE. Compensatory lung growth after pneumonectomy. Guerreiro Cardoso. Paulo F, editor. *Topics in Thoracic Surgery*. 2012;415-31.
3. Gilbert, K. A. & Rannels, D. E. Increased lung inflation induces gene expression after pneumonectomy. *Am J Physiol*, 1998; Vol.275, No.1 Pt 1, (Jul), pp. L21-29.
4. Kaza, A. K., Kron, I. L., Long, S. M., Fiser, S. M., Stevens, P. M., Kern, J. A., Tribble, C. G. & Laubach, V. E. Epidermal growth factor receptor up-regulation is associated with lung growth after lobectomy. *Ann Thorac Surg*, 2001;72(2), (Aug), pp. 380- 385.
5. Reynolds SD, Giangreco A, Power JHT, Stripp BR: Neuroepithelial bodies of pulmonary airways serve as a reservoir of progenitor cells capable of epithelial regeneration. *Am J Pathol* 2000; 156: 269-278.
6. Sakurai, M. K., Lee, S., Arsenault, D. A., Nose, V., Wilson, J. M., Heymach, J. V. & Puder, M. Vascular endothelial growth factor accelerates compensatory lung growth after unilateral pneumonectomy. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2007; Vol.292, No.3, (Mar), pp. L742-747.
7. Zhang, Q., Moe, O. W., Garcia, J. A. & Hsia, C. C. Regulated expression of hypoxia-inducible factors during postnatal and postpneumonectomy lung growth. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2006; Vol.290, No.5, (May), pp. L880-889.
8. Hsia, C. C., Wu, E. Y., Wagner, E. & Weibel, E. R. Preventing mediastinal shift after pneumonectomy impairs regenerative alveolar tissue growth. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2001; Vol.281, No.5, (Nov), pp. L1279-1287.

9. Burrows B, Harrison RW, Adams WE, et al. The postpneumonectomy state: clinical and physiologic observations in 36 cases. *Am J Med* 1960; 28:281-297.
10. Muratore CS, Nguyen HT, Ziegler MM, Wilson JM. (2000). Stretch- induced upregulation of VEGF gene expression in murine pulmonary culture: a role for angiogenesis for lung development. *J Pediatr Surg* 35:906-912; discussion 903-912.
11. Foster, D. J., Moe, O. W. & Hsia, C. C. Upregulation of erythropoietin receptor during postnatal and postpneumonectomy lung growth. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004;Vol.287, No.6, (Dec), pp. L1107-1115.
12. Paisley D, Bevan L, Choy K J, Gross C. The pneumonectomy model of compensatory lung growth: insights into lung regeneration. *Pharmacol Ther.* 2014;142(2):196-205.
13. Pianetto MB, Harris HA, Sweet HC. Changes in pulmonary function before and after pneumonectomy for pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 1967; 95 (2)189-199.
14. Laros CD, Westermann CJJ. Dilatation, compensatory growth, or both after pneumonectomy during childhood and adolescence. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1987;93 (4):570-6.
15. Gaensler EA, Strieder JW. Progressive changes in pulmonary function after pneumonectomy: the influence of thoracoplasty, pneumothorax, oleothorax, and plastic sponge plombage on the side of pneumonectomy. *J Thorac Surg*,1951;Jul 22(1):1-34.
16. Cournand A, Berry FB. The effect of pneumonectomy upon cardiopulmonary function in adult patients. *Ann Surg* 1942 Oct;116(4)532-52.
17. Bolliger CT, Wyser C, Roser H, et al. Lung scanning and exercise testing for the prediction of postoperative performance in lung resection candidates at increased risk for complications. *Chest* 1995 Aug;108(2):341-8.
18. Haasler F. Ueber kompensatorische hypertrophie der lunge. *Virchows Arch* 1892.

19. Reed CE, Spinale FG, Crawford FA. Effect of pulmonary resection on right ventricular function. *Ann Thorac Surg* 1992 Apr;53(4):578-82.
20. Okada M, Ota T, Okada M, et al. Right ventricular dysfunction after major pulmonary resection. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1994 Spt;108 (3):503-11.
21. Schilling, J. A., Lategola, M. T. & Massion, W. H. Physiologic effects of lung resection in dogs; mechanics of breathing, gas exchange, pulmonary arterial pressure, compliance, and lung weights. *Bull Soc Int Chir*, 1958; Vol.17, No.5-6, (Dec), pp. 310-319.
22. Leuwerke, S. M., Kaza, A. K., Tribble, C. G., Kron, I. L. & Laubach, V. E. Inhibition of compensatory lung growth in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2002; Vol.282, No.6, (Jun), pp. L1272-1278.
23. Sakamaki, Y., Matsumoto, K., Mizuno, S., Miyoshi, S., Matsuda, H. & Nakamura, T. Hepatocyte growth factor stimulates proliferation of respiratory epithelial cells during postpneumonectomy compensatory lung growth in mice. *Am J Respir Cell*, 2002; 26(5):525-33.
24. Sakuma, T., Sagawa, M., Hida, M., Nambu, Y., Osanai, K., Toga, H., Takahashi, K., Ohya, N. & Matthay, M. A. Time-dependent effect of pneumonectomy on alveolar epithelial fluid clearance in rat lungs. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2002; Vol.124, No.4, (Oct), pp. 668-674.
25. Kaza, A. K., Kron, I. L., Leuwerke, S. M., Tribble, C. G. & Laubach, V. E. Keratinocyte growth factor enhances post-pneumonectomy lung growth by alveolar proliferation. *Circulation*, 2002; Vol.106, No.12 Suppl 1, (Sep 24), pp. I120-124.
26. Fernandez, L. G., Le Cras, T. D., Ruiz, M., Glover, D. K., Kron, I. L. & Laubach, V. E. Differential vascular growth in postpneumonectomy compensatory lung growth. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2007; Vol.133, No.2, (Feb), pp. 309-316.

27. Hsia, C. C., Herazo, L. F., Fryder-Doffey, F. & Weibel, E. R. Compensatory lung growth occurs in adult dogs after right pneumonectomy. *J Clin Invest*, 1994; Vol.94, No.1, (Jul), pp. 405-412.
28. Nolen-Walston, R. D., Kim, C. F., Mazan, M. R., Ingenito, E. P., Gruntman, A. M., Tsai, L., Boston, R., Woolfenden, A. E., Jacks, T. & Hoffman, A. M. Cellular kinetics and modeling of bronchioalveolar stem cell response during lung regeneration. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2008; Vol.294, No.6, (Jun), pp. L1158-1165.
29. Le Cras, T. D., Fernandez, L. G., Pastura, P. A. & Laubach, V. E. Vascular growth and remodeling in compensatory lung growth following right lobectomy. *J Appl Physiol*, 2005; Vol.98, No.3, (Mar), pp. 1140-1148.
30. Maxey, T. S., Reece, T. B., Dimling, G. M., Tribble, C. G., Kron, I. L. & Laubach, V. E. Inhibition of angiogenesis prevents post-pneumonectomy compensatory lung growth. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003; Vol.167, No.7, (April), pp. A575.
31. Kobayashi E, Hishikawa S, Teratani T, Lefor AT. The pig as a model for translational research: overview of porcine animal models at Jichi Medical University. *Transplant Res* 2012 Aug 16;1(1):8.
32. Walters EM, Wells KD, Bryda EC, Schommer S, Prather RS. Swine models, genomic tools and services to enhance our understanding of human health and diseases. *Lab Anim* 2017;46(4): 167-172.
33. National Research Council. Guide for the care and use of laboratory animals. 8th ed. Washington, D.C. :National Academies Press (US);2011.
34. Experimental left pneumonectomy in pigs: procedure and management. Antonello Bufalari, valentine De Monte, Roberta Pecoriello, Livia Donati, Silvia Ceccarelli, Lucio Cagini, Mark Ragusa, Jacopo Vannucci. *Journal of Surgical research* 2015;198:208-216.
35. Pericardium matrix buttressing hinders the stapled bronchial stump healing. Vannucci J, Gervasi GL, Freddolini M, Pistilli A, De Monte V, Bufalari A, Rende M,

Puma F. *J Surg Res.* 2016Apr;201(2):286-92.

36. Andrews S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. 2010.

37. Guo H, Li J. scSorter: assigning cells to known cell types according to marker genes. *Genome Biol.* 2021;22(1):69.

38. Newman AM, Steen CB, Liu CL, Gentles AJ, Chaudhuri AA, Scherer F, et al. Determining cell type abundance and expression from bulk tissues with digital cytometry. *Nat Biotechnol.* 2019;37(7):773-782.

39. Zhang L, Zhu J, Wang H, Xia J, Liu P, Chen F, et al. A high-resolution cell atlas of the domestic pig lung and an online platform for exploring lung single-cell data. *J Genet Genomics.* 2021;48(5):411-425.

40. Von Mering C, Jensen LJ, Snel B, Hooper SD, Krupp M, Foglierini M, et al. STRING: known and predicted protein–protein associations, integrated and transferred across organisms. *Nucleic Acids Res.* 2005;33 Suppl 1:433-437.

41. Huang DW, Sherman BT, Tan Q, Kir J, Liu D, Bryant D, et al. DAVID Bioinformatics Resources: expanded annotation database and novel algorithms to better extract biology from large gene lists. *Nucleic Acids Res.* 2007;35:W169-75

42. Szalay-Bekő M, Palotai R, Szappanos B, Kovács IA, Papp B, et al. ModuLand plug-in for Cytoscape: determination of hierarchical layers of overlapping network modules and community centrality. *Bioinformatics.* 2012;28(16):2202-2204.

43. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* 2003;13(11):2498-2504.

44. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 2014;15(12):550.

45. www.genecards.org

46. Mentzer SJ. The puzzling mechanism of compensatory lung growth. *Stem cell investig.* 2018;5:8.
47. Hsia CC. Comparative analysis of the mechanical signals in lung development and compensatory growth. *Cell Tissue Res.* 2017;367(3):687-705.
48. Aurora AB, Olson EN. Immune modulation of stem cells and regeneration. *Cell Stem Cell.* 2014;15(1):14-25.
49. Aurora AB, Porrello ER, Tan W, Mahmoud AI, Hill JA, Bassel-Duby R, et al. Macrophages are required for neonatal heart regeneration. *J Clin Invest.* 2014;124(3):1382-92.
50. Boulter L, Govaere O, Bird TG, Radulescu S, Ramachandran P, Pellicoro A, et al. Macrophage-derived Wnt opposes Notch signaling to specify hepatic progenitor cell fate in chronic liver disease. *Nat Med.* 2012;18(4):572-9.
51. Dutta P, Sager HB, Stengel KR, Naxerova K, Courties G, Saez B, et al. Myocardial Infarction Activates CCR2(+) Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Cell Stem Cell.* 2015;16(5):477-87.
52. Epelman S, Lavine KJ, Beaudin AE, Sojka DK, Carrero JA, Calderon B, et al. Embryonic and adult-derived resident cardiac macrophages are maintained through distinct mechanisms at steady state and during inflammation. *Immunity.* 2014;40(1):91-104.
53. Gibbons MA, MacKinnon AC, Ramachandran P, Dhaliwal K, Duffin R, Phythian-Adams AT, et al. Ly6Chi monocytes direct alternatively activated profibrotic macrophage regulation of lung fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;184(5):569-81.
54. Godwin JW, Pinto AR, Rosenthal NA. Macrophages are required for adult salamander limb regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(23):9415-20.

55. Lin SL, Li B, Rao S, Yeo EJ, Hudson TE, Nowlin BT, et al. Macrophage Wnt7b is critical for kidney repair and regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(9):4194-9.
56. Pull SL, Doherty JM, Mills JC, Gordon JI, Stappenbeck TS. Activated macrophages are an adaptive element of the colonic epithelial progenitor niche necessary for regenerative responses to injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(1):99-104.
57. Ramachandran P, Pellicoro A, Vernon MA, Boulter L, Aucott RL, Ali A, et al. Differential Ly-6C expression identifies the recruited macrophage phenotype, which orchestrates the regression of murine liver fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(46): E3186-95.
58. Lechner AJ, Driver IH, Lee J, Conroy CM, Nagle A, Locksley RM, et al. Recruited Monocytes and Type 2 Immunity Promote Lung Regeneration following Pneumonectomy. *Cell Stem Cell*. 2017;21(1):120-134.e7.
59. Guo Y, Feng Y, Liu H, Luo S, Clarke JW, Moorman PG, et al. Potentially functional genetic variants in the TNF/TNFR signaling pathway genes predict survival of patients with non-small cell lung cancer in the PLCO cancer screening trial. *Mol Carcinog*. 2019;58(7):1094-1104.
60. Swigris JJ, Brown KK. The role of endothelin-1 in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *BioDrugs*. 2010;24(1):49-54. (Xu Z, Mo L, Feng X, Huang M, Li L. Using bioinformatics approach identifies key genes and pathways in idiopathic pulmonary fibrosis. *Medicine (Baltimore)*. 2020;4:99.
61. Ford TJ, Corcoran D, Padmanabhan S, Aman A, Rocchiccioli P, Good R, et al. Genetic dysregulation of endothelin-1 is implicated in coronary microvascular dysfunction. *Eur Heart J*. 2020;41(34):3239-3252.
62. Alexander WS, Hilton DJ. The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:503-529.

63. Jiang Z, Chen Z, Li L, Zhou W, Zhu L. Lack of SOCS3 increases LPS-induced murine acute lung injury through modulation of Ly6C(+) macrophages. *Respir Res.* 2017;18(1):217.
64. Qin MZ, Qin MB, Liang ZH, Tang GD. Effect of SOCS3 on lung injury in rats with severe acute pancreatitis through regulating JAK2/STAT3 signaling pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2019;23(22):10123-10131.
65. Robles AI, Linke SP, Harris CC. The p53 network in lung carcinogenesis. *Oncogene.* 2002;21(45):6898-6907.
66. Boucherat O, Landry-Truchon K, Aoidi R, Houde N, Nadeau V, Charron J, et al. Lung development requires an active ERK/MAPK pathway in the lung mesenchyme. *Dev Dyn.* 2017;246(1):72-82.
67. Farhan M, Wang H, Gaur U, Little PJ, Xu J, Zheng W. FOXO signaling pathways as therapeutic targets in cancer. *Int J Biol Sci* 2017;13(7): 815.
68. Hou W, Yin J, Vogel U, Sun Z, Liang D. 19p13.3-GADD45B common variants and 19q13.3-PPP1R13L and 19q13.3-CD3EAP in lung cancer risk among Chinese. *Chem Biol Interact.* 2017;277:74-78.
69. Jin X, Liu X, Zhang Z, Guan Y, Xv R, Li J. Identification of key pathways and genes in lung carcinogenesis. *Oncol Lett.* 2018;16(4):4185-4192.
70. Ying J, Srivastava G, Hsieh WS, Gao Z, Murray P, Liao SK, et al. The stress-responsive gene GADD45G is a functional tumor suppressor, with its response to environmental stresses frequently disrupted epigenetically in multiple tumors. *Clin Cancer Res.* 2005;1(18):6442-9.
71. Zhao L, Li S, Gan L, Li C, Qiu Z, Feng Y, et al. Paired box 5 is a frequently methylated lung cancer tumour suppressor gene interfering β -catenin signalling and GADD45G expression. *J Cell Mol Med.* 2016;20(5):842-54.
72. Dong J, Sutor S, Jiang G, Cao Y, Asmann YW, Wigle DA. c-Myc regulates self-

renewal in bronchoalveolar stem cells. *PLoS ONE*. 2011;6(8): e23707.

73. Massó-Vallés D, Beaulieu ME, Soucek L. MYC, MYCL, and MYCN as therapeutic targets in lung cancer. *Expert Opin Ther Tar*. 2020;24(2):101-114.

74. Chung C, Kim T, Kim M, Kim M, Song H, Kim TS, et al. Hippo-Foxa2 signaling pathway plays a role in peripheral lung maturation and surfactant homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(19): 7732-7737.

75. Hynes NE, MacDonald G. ErbB receptors and signaling pathways in cancer. *Curr Opin Cell Biol*. 2009;21(2):177-84.

76. Song H, Sun B, Liao Y, Xu D, Guo W, Wang T, et al. GPRC5A deficiency leads to dysregulated MDM2 via activated EGFR signaling for lung tumor development. *Int J Cancer*. 2019;144(4):777-787.

77. Todd JL, Kelly FL, Nagler A, Banner K, Pavlisko EN, Belperio JA, et al. Amphiregulin contributes to airway remodeling in chronic allograft dysfunction after lung transplantation. *Am J Transplant*. 2020;20(3):825-833.

78. Poole JA, Nordgren TM, Heires AJ, Nelson AJ, Katafiasz D, Bailey KL, et al. Amphiregulin modulates murine lung recovery and fibroblast function following exposure to agriculture organic dust. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2020;318(1):L180-L191.

79. Ragel BT, Couldwell WT, Gillespie DL, Jensen RL. Identification of hypoxia-induced genes in a malignant glioma cell line (U-251) by cDNA microarray analysis. *Neurosurg Rev*. 2007;30(3):181-187.

80. Günzel D, Yu AS. Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiol Rev*. 2013;93(2):525–569.

81. Schlingmann B, Molina SA, Koval M. Claudins: gatekeepers of lung epithelial function. *Semin Cell Dev Biol*. 2015;42:47-57.

82. Wray C, Mao Y, Pan J, Chandrasena A, Piasta F, Frank JA. Claudin-4 augments

alveolar epithelial barrier function and is induced in acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2009;297(2):L219–L227.

83. Kage H, Flodby P, Gao D, Kim YH, Marconett CN, DeMaio, et al. Claudin 4 knockout mice: normal physiological phenotype with increased susceptibility to lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2014;307(7):L524-L536.

84. Jin W, Rong L, Liu Y, Song Y, Li Y, Pan J. Increased claudin-3, -4 and -18 levels in bronchoalveolar lavage fluid reflect severity of acute lung injury. *Respirology.* 2013;18(4):643–651.

85. Qian L, Zhao Y, Guo L, Li S, Wu X. Activating transcription factor 3 (ATF3) protects against lipopolysaccharide-induced acute lung injury via inhibiting the expression of TL1A. *Journal of cellular physiology.* 2017;232(12):3727-3734.

86. Islam ABMMK, Khan MAAK, Ahmed R, Hossain MS, Kabir SMT, Islam MS, et al. Transcriptome of nasopharyngeal samples from COVID-19 patients and a comparative analysis with other SARS-CoV-2 infection models reveal disparate host responses against SARS-CoV-2. *J Transl Med.* 2021;19(1):1-25.

87. Shriver M, Stroka KM, Vitolo MI, Martin S, Huso DL, Konstantopoulos K, Kontogianni-Konstantopoulos A. Loss of giant obscurins from breast epithelium promotes epithelial-to-mesenchymal transition, tumorigenicity and metastasis. *Oncogene.* 2015;34:4248–4259.

88. Rajendran B. Kumar, Deng C. A comprehensive genomic meta-analysis identifies confirmatory role of OBSCN gene in breast tumorigenesis. *Oncotarget.* 2017;8:102263-102276.

89. Manring HR, Carter OA, Ackermann MA. Obscure functions: the location-function relationship of obscurins. *Biophys Rev.* 2017;9(3):245-258.

90. Hesselink PB, Hough SF, Nel ED, van Riet FA, Beneke T, Wessels G. Bone mineral density in long-term survivors of childhood cancer. *Int J Cancer Res.* 1998;78(S11):44-

47.

91. Griffioen AW, Coenen MJ, Damen CA, Hellwig SM, HJ van Weering D, Vooyts W, et al. CD44 is involved in tumor angiogenesis; an activation antigen on human endothelial cells. *Blood*. 1997;90(3):1150-1159.

92. Bolte C, Flood HM, Ren X, Jagannathan S, Barski A, Kalin TV, Kalinichenko VV. FOXF1 transcription factor promotes lung regeneration after partial pneumonectomy. *Sci Rep*. 2017;7(1):10690.

93. Comai G, Boutet A, Neirijnck Y, Schedl A. Expression patterns of the Wtx/Amer gene family during mouse embryonic development. *Dev Dyn*. 2010;239(6):1867-78.

94. Lacy SE, Bönemann CG, Buzney EA, Kunkel LM. Identification of FLRT1, FLRT2, and FLRT3: a novel family of transmembrane leucine-rich repeat proteins. *Genomics*. 1999;62(3):417-26.

95. Diamond JM, Arcasoy S, McDonnough JA, Sonett JR, Bacchetta M, D'Ovidio F, et al. Adipose Gene Expression Profile Changes With Lung Allograft Reperfusion. *Am J Transplant*. 2017;17(1):239-245.

96. Wang Y, Nakayama M, Pitulescu ME, Schmidt TS, Bochenek ML, Sakakibara A, et al. Ephrin-B2 controls VEGF-induced angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature*. 2010;465:483-486.

97. Liu H, Li X, Yu WQ, Liu CX. Upregulated EFNB2 and EPHB4 promotes lung development in a nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia rat model. *Int J Mol Med*. 2018;42(5):2373-2382.

98. Vadivel A, van Haaften T, Alphonse RS, Rey-Parra GJ, Ionescu L, Haromy A, et al. Critical role of the axonal guidance cue EphrinB2 in lung growth, angiogenesis, and repair. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;185:564–574.

99. Bennett KM, Afanador MD, Lal CV, Xu H, Persad E, Legan SK, et al. Ephrin-B2 reverse signaling increases $\alpha 5\beta 1$ integrin mediated fibronectin deposition and reduces

distal lung compliance. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2013;49:680–687.

100. Tan GH, Liu YY, Wang L, Li K, Zhang ZQ, Li HF, et al. PRRT2 deficiency induces paroxysmal kinesigenic dyskinesia by regulating synaptic transmission in cerebellum. *Cell Res.* 2018;28(1):90-110.

101. Fruscione F, Valente P, Sterlini B, Romei A, Baldassari S, Fadda M, et al. PRRT2 controls neuronal excitability by negatively modulating Na⁺ channel 1.2/1.6 activity. *Brain.* 2018;141(4):1000-1016.

102. Yuan SH, Qiu Z, Ghosh, A. TOX3 regulates calcium-dependent transcription in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(8):2909-2914.

103. Bastien D, Landete VB, Lessard M, Vallieres N, Champagne M, Takashima A, et al. IL-1 α gene deletion protects oligodendrocytes after spinal cord injury through upregulation of the survival factor Tox3. *J Neurosci.* 2015;35(30):10715-10730.

104. Li J, Bi L, Shi Z, Sun Y, Lin Y, Shao H, Zhu Z. RNA-Seq analysis of non-small cell lung cancer in female never-smokers reveals candidate cancer-associated long non-coding RNAs. *Pathol Res Pract.* 2016;212(6):549-54.