



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di BIOMEDICINA COMPARATA E ALIMENTAZIONE

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN : SCIENZE VETERINARIE
INDIRIZZO: SANITA' PUBBLICA E PATOLOGIA COMPARATA
CICLO: XXV

ANALISI DEI PROFILI DI ESPRESSIONE DELL'IMMUNO-TRASCRIPTOMA DI CAVALLO NELLE PATOLOGIE IAD E RAO

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Gianfranco Gabai

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Mauro Dacasto

Supervisore :Ch.mo Prof. Luca Bargelloni

Dottorando : Elisa Padoan

RIASSUNTO

Il lavoro di ricerca svolto nell'arco dei tre anni di dottorato, è stato articolato in due progetti sviluppati nell'ambito delle malattie respiratorie su base infiammatoria che colpiscono gli equini.

Tali patologie possono essere distinte in due grandi gruppi: *Recurrent Airway Obstruction* (RAO) ed *Inflammatory Airway Disease* (IAD). Lo scopo dei progetti di ricerca si è basato sull'indagine dei profili di espressione di geni immuno-correlati nell'albero respiratorio di cavalli affetti da IAD e RAO, in relazione ad un gruppo di controllo. Su tutti i soggetti, sono stati eseguiti gli esami clinici mirati alla valutazione dell'apparato respiratorio, l'esame endoscopico e l'esame citologico e microbiologico da *Broncho-Alveolar Lavage* (BAL), per valutare le potenziali correlazioni esistenti tra i profili di espressione genica ed i parametri clinici.

Il primo progetto è stato sviluppato comparando cavalli sani con soggetti affetti da RAO, su cui i campionamenti sono stati ripetuti due volte nell'arco di 15 giorni, al fine valutare una potenziale evoluzione temporale dell'espressione genica e degli altri parametri considerati nella ricerca. Inoltre, sono state eseguite biopsie del tessuto bronchiale, sottoposto sia a valutazione istologica che ad analisi di espressione genica. Mediante *real time* RT-PCR, sono stati indagati i profili di espressione di 10 geni *target* immuno-correlati (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-13, IL-17, TNF α , INF γ , TGF- β 1, NF κ - β e TRL 4), sei dei quali hanno dimostrato un aumento statisticamente significativo dei livelli di espressione nel gruppo RAO rispetto al gruppo di controllo. Le analisi statistiche condotte, hanno riscontrato una correlazione positiva tra la quantità di muco nelle vie aeree e l'espressione di alcuni dei geni indagati. Non sono state evidenziate differenze di espressione, dei geni inclusi nello studio, tra i tessuti biotici prelevati dai soggetti affetti da RAO e quelli ottenuti dal gruppo di controllo.

Il secondo progetto di ricerca, è stato sviluppato ampliando la casistica dei cavalli affetti da RAO ed introducendo lo studio della IAD. Su tutti i soggetti, le indagini cliniche e le valutazioni dei profili di espressione genica sono state condotte sia al momento della diagnosi che al termine del

trattamento farmacologico della durata di 15 giorni. Valutati i risultati del primo lavoro, non sono state eseguite biopsie del tessuto respiratorio. Lo sviluppo di una piattaforma microarray specifica per i geni immuno-correlati di cavallo ha permesso di ottenere una visione globale dei *pathway* coinvolti nella risposta infiammatoria delle due patologie. Le analisi statistiche effettuate hanno evidenziato una differenza di espressione significativa per 379 trascritti (di cui 55 sovra-espressi e 324 sotto-espressi) tra il gruppo IAD ed il gruppo di controllo e per 1763 geni (di cui 903 sovra-espressi e 860 sotto-espressi) tra i pazienti affetti da RAO ed i soggetti sani. Da un punto di vista clinico, sono state riscontrate differenze statisticamente significative sia della frequenza respiratoria a riposo che della quantità di muco presente nelle vie aeree dei cavalli affetti da IAD rispetto ai soggetti RAO. Tra i geni sotto-espressi nei due gruppi di cavalli affetti da malattia respiratoria, hanno acquistato importanza alcuni trascritti coinvolti nella genesi, lunghezza e motilità dell'apparato ciliare dell'epitelio respiratorio. Nella popolazione IAD, è stata dimostrata la sovra-espressione di geni codificanti per mediatori coinvolti nella risposta infiammatoria. I geni sovra-espressi nel gruppo RAO, caratterizzati da maggior rilievo, sono coinvolti nella risposta infiammatoria, nella broncocostrizione, nella via apoptotica e nel *pathway* dell'ipossia. Nella medesima patologia, si sono mostrati sotto-espressi anche alcuni geni coinvolti nella genesi del film muco-proteico di protezione dell'epitelio respiratorio. Lo studio condotto mediante *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA), ha evidenziato che il *pathway* attivato in corso di asma umano, viene arricchito anche nella patologia RAO equina, sebbene la significatività statistica sia marginale (*False Discovery Rate* < 25%, p value 0,08). Non è stato possibile valutare l'effetto della terapia farmacologica sui profili di espressione genica, poiché la bassa qualità dell'RNA estratto dal BAL di alcuni campioni non ha permesso di raggiungere un numero significativo di soggetti valutati prima e dopo il trattamento terapeutico.

Gli studi effettuati hanno quindi permesso di far luce su alcuni dei meccanismi immunologici che stanno alla base delle patologie respiratorie equine di maggiore importanza veterinaria ed economica.

In futuro, le informazioni ottenute, potrebbero condurre allo sviluppo di nuovi mezzi terapeutici per l'inibizione delle molecole coinvolte nello sviluppo di IAD e RAO, come già avviene in medicina umana.

Infine, il coinvolgimento di un medesimo *pathway* nell'asma umano e nella RAO equina, potrebbe condurre all'utilizzo di tale specie come modello animale per lo studio delle patologie respiratorie croniche umane.

SUMMARY

The research project has been developed on the equine inflammatory respiratory diseases, which can be divided in *Recurrent Airway Obstruction* (RAO) and *Inflammatory Airway Disease* (IAD). The aim of this study was to investigate immune-related genes expression in the respiratory tract of IAD and RAO-affected horses. Clinical examination and endoscopy were performed. On the *Broncho-Alveolar Lavage* (BAL) fluid, obtained during endoscopy, cytological and microbiological analysis were performed to evaluate correlations between the gene expressions values and the clinical parameters.

A first analysis was developed by *real time* RT-PCR comparing the gene expression profile of 10 immune-related target genes (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-13, IL-17, TNF α , INF γ , TGF- β 1, NF κ - β and TRL 4) in the BAL of healthy horses and RAO-affected ones, on which sampling was performed twice within 15 days. The aim was to deepen the effects of the respiratory disease on the equine immune system and to assess a potential temporal evolution of the gene expression values and of the other parameters considered. In addition, biopsies of the bronchial tissue were obtained and subsequent, histological evaluation and gene expression analyses were performed. Six of the target genes showed a significant expression values increase in the RAO group compared to the control one. A positive statistical correlation between the amount of mucus in the airways and the expression of some genes investigated was found. Regarding inflammatory mediators expression in the biopsy tissue, neither of target genes was significantly differentially expressed between the RAO horses and the control group.

The second part of the research project included also the study of IAD. On all horses, clinical investigations and assessments of gene expression profiles were carried out twice within 15 days, at the diagnosis moment and at the end of the pharmacological treatment. Considering the results of the first study, no biopsies of the respiratory tissue were performed. The development of a microarray platform specific for equine immune-related genes, provide a global view of the pathways involved in the IAD and RAO inflammatory response. The statistical analyses showed

that 379 transcripts (55 up-regulated and 324 down-regulated) were significantly differentially expressed between the IAD group and control horses and 1763 genes (903 up-regulated and 860 down-regulated) between the RAO-affected horses and the healthy animals. Between IAD-affected horses and RAO animals, were showed significant differences of the respiratory rate at rest and of the amount of mucus in the airways. Some transcripts involved in the genesis, length and motility of the respiratory epithelium cilia, were down-regulated both in IAD and in RAO horses. In the IAD population, has been demonstrated the over-expression of genes coding for inflammatory mediators. Some of the transcripts up-regulated in the RAO group, are involved in the inflammatory response, bronchoconstriction, apoptosis and hypoxia pathway. In the same disease, some genes involved in the genesis of the protective muco-protein film of the respiratory epithelium were under-expressed. The analyses carried out by the software Gene Sets Enrichment Analysis (GSEA) showed that the pathway activated during human asthma, is also enriched in equine RAO, albeit marginally significant (False Discovery Rate <25%, p value 0.08). The low quality of the RNA extracted from the BAL of some samples, did not allow to reach a significant number of horses, considered before and after the pharmacological treatment, to assess the effect of the therapy on gene expression profiles.

In conclusion, the present studies provided information about the immunological mechanisms activated during the most important equine respiratory diseases.

In the future, the information obtained could lead to the development of new therapies for IAD and RAO, by the inhibition of molecules involved in the pathogenesis of these diseases, as is already done in human medicine. The involvement of the same pathway in human asthma and equine RAO, could suggest a possible role of horses as animal model for the study of human chronic respiratory diseases.

INDICE

1. INTRODUZIONE GENERALE	1
1.1. L'IMPORTANZA DELL'INDUSTRIA EQUINA	2
1.2. ANATOMIA DI TRACHEA E BRONCHI	4
1.3. FISIOLOGIA DELL' APPARATO RESPIRATORIO	7
1.3.1. VENTILAZIONE	10
1.3.1.1. ELASTICITA' POLMONARE	11
1.3.1.2. RESISTENZA POLMONARE	12
1.3.2. DISTRIBUZIONE DELL' ARIA NEI POLMONI	13
1.3.3. DIFFUSIONE	13
1.4. <i>Recurrent Airway Obstruction</i> (RAO)	15
1.5. <i>Inflammatory Airway Disease</i> (IAD)	18
2. SCOPO DEL LAVORO	21
3. ANALISI DEI PROFILI DI ESPRESSIONE DI MEDIATORI INFIAMMATORI IN CAVALLI AFFETTI DA RAO MEDIANTE <i>REAL TIME</i> RT PCR	25
3.1. INTRODUZIONE	26
3.2. MATERIALI E METODI	29
3.2.1. ANIMALI INCLUSI NELLO STUDIO	29
3.2.2. ESAME CLINICO	29
3.2.3. LAVAGGIO BRONCO-ALVEOLARE (BAL)	30
3.2.4. BIOPSIE DELL'EPITELIO RESPIRATORIO	31
3.2.5. ESTRAZIONE DELL' RNA TOTALE	32
3.2.6. SAGGIO DI QUANTIFICAZIONE RELATIVA IN <i>Real Time</i> RT-PCR	33
3.2.7. ANALISI STATISTICHE	35

3.3. RISULTATI	36
3.3.1. ESAME CLINICO, EMOCROMOCITOMETRICO E MICROBIOLOGICO	36
3.3.2. CITOLOGIA DEL FLUIDO DA BAL ED ISTOLOGIA DELLE BIOPSIE BRONCHIALI	36
3.3.3. ANALISI MEDIANTE <i>Real Time</i> RT-PCR SU BAL E TESSUTO BIOPTICO	38
3.3.4. CORRELAZIONI TRA I PARAMETRI CLINICI ED I LIVELLI DI ESPRESSIONE GENICA	41
3.4. DISCUSSIONE	42
4. ANALISI DEI PROFILI DI ESPRESSIONE DELL'IMMUNOTRASCRIPTOMA NELL'ALBERO RESPIRATORIO IN CORSO DI IAD E RAO	49
4.1. INTRODUZIONE	50
4.2. MATERIALI E METODI	55
4.2.1. ANIMALI INCLUSI NELLO STUDIO	55
4.2.2. ESAME CLINICO	55
4.2.3. LAVAGGIO BRONCO-ALVEOLARE (BAL)	56
4.2.4. ESTRAZIONE DELL' RNA TOTALE	57
4.2.5. ANALISI QUALITATIVA DELL'RNA ESTRATTO	57
4.2.6. SELEZIONE DEI GENI PER IL DISEGNO DELLA PIATTAFORMA MICROARRAY	59
4.2.7. AMPLIFICAZIONE DELL'RNA, MARCATURA ED IBRIDAZIONE	61
4.2.8. NORMALIZZAZIONE DEI DATI DI MICROARRAY	63
4.2.9. ANALISI STATISTICHE	63

4.2.10. GENE SET ENRICHMENT ANALYSIS (GSEA)	64
4.3. RISULTATI	66
4.3.1. ESAME CLINICO E MICROBIOLOGICO	66
4.3.2. ANALISI CITOLOGICA	67
4.3.3. ANALISI DELLA QUALITA' DELL'RNA ESTRATTO	69
4.3.4. ANALISI DEI PROFILI DI ESPRESSIONE GENICA MEDIANTE DNA-MICROARRAY	71
4.3.5. GSEA	75
4.4. DISCUSSIONE	76
4.5. CONCLUSIONI	87
5. CONCLUSIONI GENERALI	89
BIBLIOGRAFIA	93
APPENDICE 1	105
APPENDICE 2	109

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE GENERALE

1.1. L'IMPORTANZA DELL'INDUSTRIA EQUINA

L'evoluzione del cavallo è un argomento di cruciale importanza per la civiltà dell'uomo.

I cavalli sono presenti sulla terra da più di 50 milioni di anni. Essi fanno parte del phylum *Perissodactyla* ed, evolvendosi nel corso dell'Oligocene, Miocene e Pleistocene, sono arrivati ai nostri giorni come *Equus caballus*.

L'addomesticamento del cavallo è iniziato circa 25000 anni fa, e questa specie ha a lungo rivestito un ruolo essenziale sia nei trasporti che nella produzione di pelli e carne e, più tardi, anche in guerre e combattimenti. Il famoso libro di Senofonte "L'arte dell'equitazione" (*Περὶ ἵππικῆς*) documenta come circa 2400 anni fa i cavalli fossero utilizzati anche come fonte di divertimento e prestigio per l'uomo, fino ad essere impiegati, circa 1500 anni fa, nelle corse con i carri (Jeffcott et al., 2011). Oggi giorno, oltre a mantenere un importante ruolo economico mondiale, il cavallo riveste anche il ruolo di animale da compagnia.

Considerando una piccola parte della sfera dell'equitazione, i Giochi equestri internazionali (*World Equestrian Games, WEG*), svoltisi in Kentucky nel 2010, hanno avuto un impatto economico stimato tra i 373 ed i 396 milioni di dollari (Galdi et al., 2000). Inoltre, uno studio condotto da E.P.M.A. (*European Pari Mutuel Association*), dimostra chiaramente quanto sia importante e vitale il settore dell'ippica in Europa, la cui impronta sull'economia europea corrisponde ad un impatto di 6 miliardi di euro all'anno. Inoltre, da tale ente, è stato evidenziato che a ciascuno dei 170.000 cavalli da corsa, presenti in Europa, corrispondono 1,8 posti di lavoro. Il settore apporta un contributo significativo all'economia delle aree rurali dove le attività ad esso afferenti danno lavoro a più di 300.000 persone (E.M.P.A., 2009). Tra le persone coinvolte nell'industria collegata al cavallo si ricordano allevatori, proprietari di cavalli, veterinari, stallieri, ditte farmaceutiche, ditte mangimistiche, aziende per la produzione di finimenti, per l'allestimento di ricoveri per cavalli e per la produzione di mezzi di trasporto per equini.

L'impatto economico di una malattia che colpisca il cavallo, quindi, potrebbe determinare delle ingentissime perdite. Ad oggi, tra le patologie più frequenti, e che acquistano maggiore importanza

da questo punto di vista, vengono riconosciute le alterazioni muscolo scheletriche e le patologie respiratorie. L'impatto economico dell' osteoartrosi, tra le più comuni alterazioni scheletriche, è stato definito da molti studi (Gupta et al., 2005; Le Pen et al., 2005). Nel 2005, alcuni autori canadesi, hanno considerato le perdite economiche dirette ed indirette attribuibili all'osteartrosi umana. Per 1378 pazienti inclusi nello studio, è stata stimata una perdita economica pari a 10000 dollari l'anno per soggetto, di cui l'80% costituito dalle perdite indirette (Gupta et al., 2005).

La medesima patologia in un cavallo potrebbe determinare fino a 15000 dollari di perdita economica per anno (Oke et al., 2010).

In uno studio condotto presso la Purdue University, è stato stimato un costo annuo di 80 milioni di dollari per la perdita di utilizzo e per i costi sostenuti per l'instaurarsi di alcune patologie che colpiscono il cavallo, tra cui le alterazioni muscolo-scheletriche, le affezioni respiratorie, le malattie dell'apparato riproduttore e le affezioni neurologiche.

Le patologie respiratorie, quindi, rappresentano il secondo problema maggiormente influenzante le performance atletiche del cavallo sportivo. E' stato inoltre riportato che il 5,2% dei cavalli deceduti nel corso del 2010 è stato rappresentato da cavalli colpiti da gravi affezioni respiratorie (Connors et al., 2011) (Fig. 1).

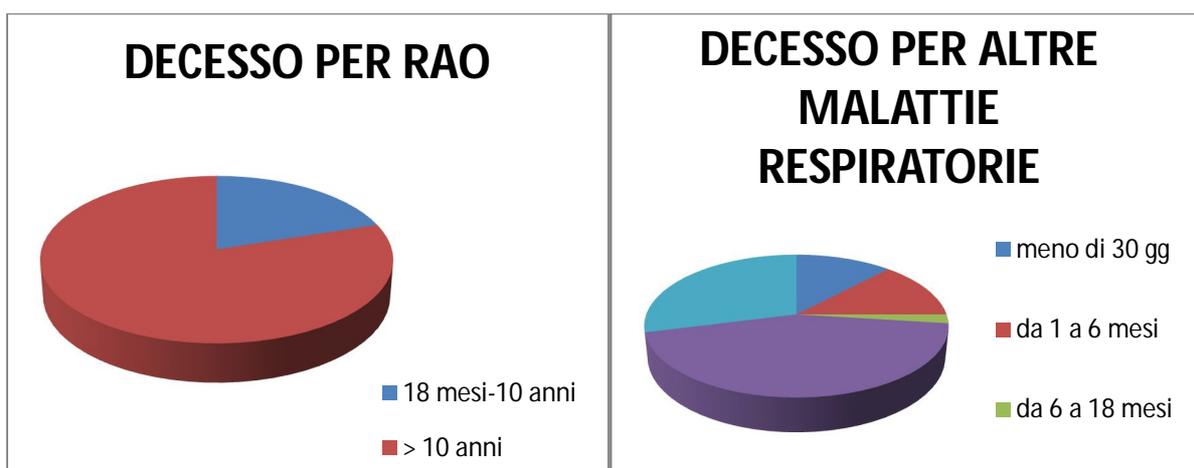


Figura 1: Grafico a sinistra: decesso di cavalli colpiti da RAO in Indiana nel corso del 2010 relazionato all'età dei soggetti. Grafico a destra: decesso di cavalli colpiti da malattie respiratorie, in relazione all'età, nel corso dell'anno 2010 in Indiana. Tratto da Connors S., E., Couetil L., Furdek J. M., Russell M. A., Indiana Equine Industry Economic Impact and Health Study , Lecture presso Purdue University, Settembre 2011

Oltre a determinare delle gravi perdite economiche, le malattie respiratorie causano anche una scarsa qualità di vita dei soggetti affetti.

Inoltre, poiché le informazioni sulla patogenesi della malattia sono ancora molto scarse, non vi sono ad oggi degli ausili terapeutici che possano condurre alla risoluzione della patologia stessa, causando quindi in alcuni casi la definitiva esclusione dall'attività agonistica dei cavalli sportivi affetti da malattia respiratoria cronica.

1.2. ANATOMIA DI TRACHEA E BRONCHI

La trachea ed i bronchi costituiscono, insieme alla laringe che ne controlla l'accesso dell'aria, l'albero aerifero. Entrambi derivano embriologicamente dalla gemma faringea. In modo specifico, l'apparato respiratorio è di origine ecto-endodermica e si sviluppa da un diverticolo dell'intestino cefalico definito " fossa tracheo-bronchiale".

L'adito laringeale o glottide è limitato cranialmente da una prominente ipobranchiale che, al termine della morfogenesi, darà origine all'epiglottide. Successivamente appaiono due prominenze laterali, le eminenze aritnoidee, che vengono a delimitare l'apertura dell'adito. Dall'abbozzo tracheale si estroflettono due prominenze, una destra e l'altra sinistra. La prima si dividerà in tre rami che daranno origine ai tre bronchi principali, mentre il secondo genererà due ramificazioni.

La trachea è un organo tubulare impari, flessibile e beante, costituito da una serie di anelli cartilaginei incompleti dorsalmente; essa fa seguito alla laringe a cui è connessa mediante il legamento crico-tracheale e termina in cavità toracica, dorsalmente al cuore, dando origine ai due bronchi principali, uno per ciascun polmone. Gli anelli cartilaginei susseguendosi permettono la stabilità della trachea, assicurandone allo stesso tempo l'elasticità soprattutto grazie all'interposizione di tessuto muscolare.

Nel cavallo adulto tale organo ha una lunghezza di circa 70-80 cm con un diametro esterno, nel cadavere, di circa 5-6 cm ed uno spessore di parete di circa 5 mm.

Ha una sezione circolare nel primo terzo, mentre nel tratto distale tende ad appiattirsi dorso-ventralmente, con le estremità degli anelli che tendono a sovrapporsi allargandosi trasversalmente.

Procedendo dall'esterno verso l'interno, la trachea è strutturalmente costituita da un'avventizia, una tonaca vascolare ed una mucosa.

L'avventizia è formata da abbondante connettivo che, nel suo tratto toracico, viene ricoperto dalla pleura mediastinica. La tonaca fibrocartilaginea è costituita da anelli cartilaginei di tipo ialino immersi in una membrana fibroelastica, che tra un anello e l'altro forma il legamento anulare e chiude sulla faccia dorsale lo spazio tra le due estremità di ciascun anello (nel cavallo gli ultimi anelli sono ampiamente interrotti dorsalmente e vengono completati da placche cartilaginee).

La tonaca muscolare è costituita *in toto* dal muscolo tracheale formato da fasci di muscolatura liscia disposti trasversalmente che prendono attacco sul pericondrio della faccia interna degli anelli (Dellman et al., 2000).

La mucosa tracheale è in rapporto con la sottomucosa lassa, ricca di fibre elastiche in cui sono presenti ghiandole tubulari ramificate sieromucose. L'epitelio si presenta pluristratificato cilindrico ciliato con cellule mucipare. La secrezione di queste ultime insieme a quella delle ghiandole sieromucose forma, sul versante luminare dell'epitelio, uno strato viscoso contenente anche enzimi antibatterici.

La trachea è costituita da un numero di anelli variabili da 45 a 59 e si divide, nella sua porzione distale, a formare due bronchi principali che si separano l'uno dall'altro formando un angolo di circa 60 gradi.

Il bronco principale destro è un po' più sviluppato in larghezza rispetto al sinistro, ha una lunghezza di circa 7-8 cm e termina formando il bronco lobare medio e il bronco lobare caudale emettendo prima due rami collaterali (lobare craniale e lobare accessorio).

Dai bronchi segmentari originano i rami sottosegmentari che forniscono numerosissimi bronchioli interlobulari o sopralobulari che si continuano in quelli intralobulari.

Questi ultimi si dividono ripetutamente dando origine ognuno a circa un centinaio di bronchioli terminali da cui derivano generalmente due bronchioli respiratori sulle cui pareti compaiono delle estroflessioni a fondo ceco dette alveoli, presenti d'altra parte anche sulle diramazioni terminali dei bronchioli respiratori.

I bronchi extrapolmonari mostrano strutturalmente caratteristiche del tutto simili a quelle tracheali, mentre a cominciare dai bronchi lobari si ha una modificazione della componente cartilaginea che passa da una organizzazione ad anelli ad una a placche di dimensioni progressivamente minori.

La mucosa, sollevata in pieghe, mostra un epitelio batiprismatico pluriseriato ciliato con cellule mucipare (Fig. 2). La lamina propria, che segue ad un evidente membrana basale, è ricca di fibre elastiche; la sottomucosa, a differenza delle altre specie, presenta nel cavallo pochissime ghiandole acinari sieromucose. La *muscularis mucosae* è costituita da fasci con andamento circolare nei bronchi più grossi, che tendono ad assumere una disposizione leggermente obliqua in quelli più piccoli e che sembrano formare delle spirali nei bronchioli in cui tra l'altro avviene la completa scomparsa della componente cartilaginea.

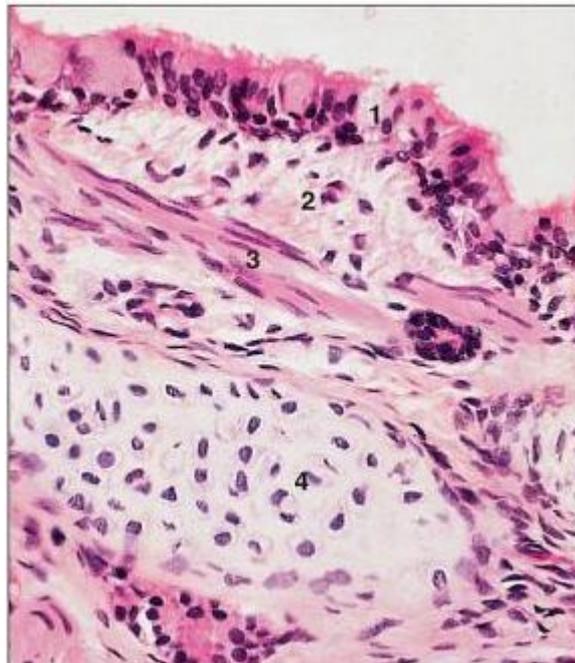


Figura 2. Bronco intrapolmonare. (1) epitelio respiratorio, (2) lamina propria, (3) musccolaris mucosae (4) cartilagine ialina. (da Comparative Veterinary Histology: with Clinical Correlates, Elizabeth Aughey, Fredric L. Frye, 2001)

Nei bronchioli terminali e respiratori, l'epitelio diviene isoprismatico, le cellule mucipare non sono presenti ed accanto a quelle ciliate, sempre più rare, si osservano cellule prive di cilia con superficie libera a forma di cupola, le cellule di Clara (Aughey et al., 2001). Queste ultime elaborano un secreto, che riveste l'epitelio del bronchiolo, contenete lisozima, anticorpi ed enzimi proteolitici per denaturare il muco prodotto dalle vie aeree superiori o eventuali detriti cellulari.

Gli alveoli hanno forma generalmente poliedrica e la loro parete è costituita dall'epitelio, dai setti interalveolari e dall'endotelio dei capillari sanguigni dove avvengono gli scambi gassosi necessari per tutte le funzioni cellulari e viscerali.

L'epitelio è monostratificato e formato principalmente da cellule pavimentose (alveolociti di primo tipo) a cui si interpongono più rare cellule cubiche (alveolociti di secondo tipo) il cui citoplasma è caratterizzato da materiale lipoproteico tensioattivo (surfactante) che viene secreto dagli alveolociti mediante esocitosi e si distende sulla superficie epiteliale evitando il collasso degli alveoli durante l'espiazione e riducendo l'energia necessaria per dilatare i polmoni durante l'inspirazione.

I polmoni sono organi pari situati nella cavità toracica di consistenza molle e spongiosa, si presentano avvolti da una sierosa definita pleura e separati dal mediastino.

1.3. FISIOLOGIA DELL'APPARATO RESPIRATORIO

L'albero tracheo-bronchiale permette il passaggio dell'aria inspirata fino al sistema alveolare, in cui avvengono gli scambi gassosi necessari a tutte le funzioni cellulari ed organiche.

Questo tratto del sistema respiratorio non rappresenta solamente una via di passaggio dell'aria durante gli atti respiratori, ma svolge anche un ruolo importante nella filtrazione e nella regolazione della temperatura dell'aria inspirata. Infatti, percorrendo questo tratto, l'aria introdotta si riscalda, si satura di vapore acqueo e viene filtrata da eventuali fattori irritanti come polveri, pollini, gas inquinanti ed agenti infettivi prima che avvengano gli scambi gassosi con il sangue venoso che circola nella fitta rete di capillari che circonda gli alveoli.

Il cavallo deve necessariamente respirare attraverso le narici e la respirazione buccale è usata solamente come ultima risorsa; la respirazione nasale obbligata è conseguenza dello spazio estremamente stretto che si forma tra il palato molle e le cartilagini laringee, le prime vie respiratorie non possono quindi essere sostituite nella loro funzione dalla respirazione buccale, come avviene nella maggior parte delle altre specie.

La resistenza delle prime vie aeree al flusso d'aria rappresenta una porzione notevole della resistenza totale del sistema respiratorio: alcuni autori riferiscono che due terzi della resistenza totale si sviluppa a questo livello (Derkensen et al., 2002).

Quest'ultima può essere marcatamente diminuita con l'ausilio dell'apparato muscolare ivi presente, dilatando le narici e la laringe, raddrizzando le vie aeree e grazie alla costrizione dei seni venosi della mucosa nasale.

Di seguito viene riportato un grafico (Fig. 3) che evidenzia l'importanza della posizione della testa e del collo del cavallo in rapporto alla resistenza delle prime vie al flusso d'aria.

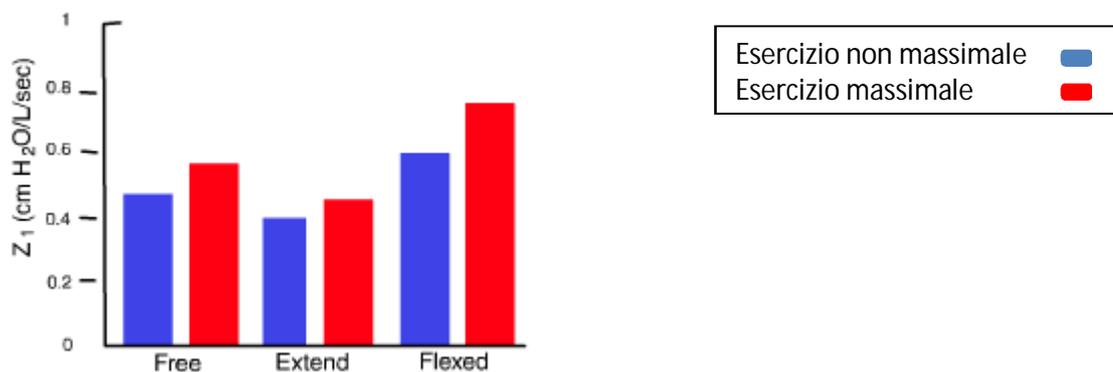


Figura 3: Effetto della posizione di testa e collo sulla resistenza inspiratoria delle vie aeree. Tratto da “Overview of the Equine Respiratory System”, F. J. Derksen and N. E. Robinson, in Equine Respiratory Diseases, Lekeux P. (Ed.). International Veterinary Information Service, Ithaca NY (www.ivis.org).

Durante la corsa e l'esercizio fisico, vengono introdotti elevati volumi di aria nei polmoni con una frequenza respiratoria che nel cavallo è di circa 20 atti al minuto; si ricordano in tabella 1, i principali valori respiratori del cavallo.

Tabella 1: Tratto da “Normal Respiratory Values” E. van Erck-Westergren, T. Art and P. Lekeux, In: Equine Respiratory Diseases, Lekeux P. (Ed.). International Veterinary Information Service, (www.ivia.org)

Valore	Unità	Riposo	Passo	Trotto	Canter	Galoppo	Recupero
VO_{2max} %	%	3.3	14	18	60	100	20
V_T	litri	5.6	5.8	6.2	9.2	13.2	6.5
V_D	litri	3.4	3.4	3.5	2.6	2.6	3.5
V_A	litri	2.2	2.4	2.8	6.6	10.6	3.0
V_D/V_T	%	60	58	57	28	20	54
F	Atti/min	14	65	91	113	121	110
t_i	Secondi	1.9	0.45	0.34	0.27	0.25	0.29
t_e	secondi	2.4	0.47	0.32	0.27	0.25	0.26
t/t_{tot}	%	44	49	52	50	50	53
\dot{V}_E	litri/min	78	377	564	1040	1598	715
\dot{V}_D	litri/min	47	219	321	291	320	386
\dot{V}_A	litri/min	31	158	243	749	1278	329
\dot{V}_E/VO_2	O2/litro	35	40	47	26	24	55
\dot{V}_E/V_{CO_2}	O2/litro	43	48	51	27	23	51
mean \dot{V}_i	litri/s	2.9	13	19	34	53	26
mean \dot{V}_e	litri/s	2.3	12	20	34	53	30
\dot{V}_{imax}	litri/s	4.1	14	27	45	64	32
\dot{V}_{emax}	litri/s	4.2	18	30	52	79	39
\dot{V}_i	litri/s ²	8	240	632	1124	1685	650
\dot{V}_e	litri/s ²	7	225	566	1086	1595	744

VO_{2max} %: Percentuale di massimo uptake di ossigeno; V_T : volume tidale; V_D : *dead space* fisiologico; V_A : volume alveolare; V_D/V_T : rapporto tra *dead space* e volume tidale; f: Frequenza respiratoria; t_i : tempo dell'inspirazione nel ciclo respiratorio; t_e : tempo dell'espiazione; t/t_{tot} : rapporto tra tempo inspiratorio e tempo totale del ciclo respiratorio; \dot{V}_E : minute volume; \dot{V}_D : ventilazione del *dead space*; \dot{V}_A : ventilazione alveolare; \dot{V}_E/VO_2 : equivalente ventilatorio per l'uptake di ossigeno; \dot{V}_E/V_{CO_2} : equivalente ventilatorio per l'output di anidride carbonica; mean \dot{V}_i : media del flusso inspiratorio; mean \dot{V}_e : media del flusso espiratorio; \dot{V}_{imax} : picco del flusso inspiratorio; \dot{V}_{emax} : picco del flusso espiratorio; \dot{V}_i : accelerazione del volume all'inizio dell'inspirazione; \dot{V}_e : accelerazione del volume all'inizio dell'espiazione.

Il consumo di ossigeno e la produzione di anidride carbonica variano in base al tasso metabolico, che è strettamente dipendente dall'attività del soggetto.

Il metabolismo basale è a sua volta una funzione del peso vivo del soggetto ($M^{0,75}$) e la V_{O_2} max, il massimo consumo di ossigeno. In realtà il cavallo ed il cane vengono definite specie maggiormente aerobiche, in quanto sono caratterizzati da una maggiore V_{O_2} max per kg, avendo una maggiore densità mitocondriale nel muscolo striato.

Anche l'entità degli scambi gassosi varia in base al metabolismo, pur richiedendo in qualsiasi caso bassi dispendi energetici. Rappresentano un'eccezione i soggetti affetti da patologie respiratorie nei quali si riscontra un aumento della richiesta di energia per ogni atto respiratorio in associazione ad una diminuzione della quantità e della qualità degli scambi gassosi (Couetil et al., 2007).

L'attività respiratoria può essere suddivisa in:

1. Ventilazione;
2. Distribuzione dell'aria nei polmoni;
3. Diffusione attraverso la membrana alveolo-capillare;
4. Trasporto dell'ossigeno dal circolo polmonare ai capillari tissutali e dell'anidride carbonica in senso opposto;
5. Diffusione dei gas tra sangue ed i tessuti.

1.3.1. VENTILAZIONE

La ventilazione consiste nel passaggio di aria dall'esterno all'interno del sistema respiratorio e viceversa.

Sebbene il cavallo abbia la capacità di introdurre una quantità d'aria corrispondente alla completa capacità polmonare al termine dell'inspirazione, e di farla fuoriuscire fino al volume residuo in espirazione, il volume tidalico effettivamente utilizzato è decisamente minore (in un cavallo di 500 kg è di circa 4 litri).

Per valutare la ventilazione al minuto è sufficiente calcolare il prodotto tra volume tidalico e frequenza respiratoria.

E' importante ricordare che in realtà solo una parte dell'aria introdotta raggiunge la porzione respiratoria dove avvengono gli scambi gassosi (ventilazione alveolare). La parte rimanente della ventilazione, viene persa nel "dead space" (vie nasali, laringe, trachea, bronchi, bronchioli ed alveoli non perfusi) in cui non hanno luogo gli scambi gassosi. Il rapporto tra dead space e volume tidalico nel cavallo a riposo è di circa il 50-60% (Art et al., 2002).

Per comprendere al meglio i meccanismi ventilatori devono essere introdotti i concetti di elasticità polmonare, resistenza polmonare e forze inerziali.

1.3.1.1 ELASTICITA' POLMONARE

L'elasticità polmonare, permessa dalla presenza di elastina e collagene, deve essere necessariamente controbilanciata dalla rigidità della parete toracica al fine di ostacolare la tendenza polmonare al collasso.

I polmoni, durante la loro attività, effettuano un movimento di ritorno dalla parete toracica verso l'interno. Tale tendenza (coadiuvata dalla differenza tra pressione intrapleurica ed intrapolmonare) è dovuta allo stiramento delle forze elastiche ed alla tensione del surfactante alveolare.

Lo stiramento delle forze elastiche è chiaramente riconducibile alla presenza dell'elastina e del collagene sopracitati, la tensione del surfactante alveolare, invece, è permessa dalle sostanze tensioattive, che sono lipoproteine complesse che contengono circa il 70% di lipidi (è in realtà un fosfolipide, dipalmitoil-lecitina) e il 30% di proteine, che si trovano sulla superficie dell'epitelio alveolare e che vengono sintetizzate dagli stessi alveolociti di tipo II (Art et al., 2002).

Il surfactante determina una riduzione delle forze di attrazione tra le molecole d'acqua, che quindi si accumulano in superficie determinando un abbassamento della tensione superficiale.

Questo concetto è fondamentale per comprendere la promozione dell'insufflamento del lume

alveolare durante l'inspirazione: quando il raggio alveolare si riduce al termine dell'espiazione, il surfactante si condensa aumentando la sua capacità tensioattiva e quindi diminuendo la tensione superficiale. Tale meccanismo favorisce in ultima analisi l'entrata dell'aria negli alveoli.

A fine inspirazione, gli alveoli si presenteranno chiaramente espansi e quindi il surfactante verrà maggiormente distribuito lungo l'epitelio alveolare, riducendone la capacità tensioattiva, così da aumentare la tensione superficiale, coadiuvando l'azione delle fibre elastiche nel ritorno elastico necessario per l'espiazione. Si ritiene necessario inoltre ricordare la differenza tra elasticità, ora affrontata, e compliance (distendibilità) polmonare. Quest'ultima si determina misurando le variazioni di volume del polmone per ogni unità di variazione della pressione ($\Delta V/\Delta P$) la cui unità di misura è espressa in millilitri (o litri) /cm di pressione d'acqua.

1.3.1.2. RESISTENZA POLMONARE

Tale forza è maggiore durante l'espiazione rispetto all'inspirazione poiché l'espansione dei polmoni, in quest'ultima fase, distende le vie aeree in modo da favorirne l'apertura. La resistenza al flusso d'aria è, come detto in precedenza, notevole soprattutto nei primi tratti delle vie aeree, e può essere descritta applicando la legge di Poiseuille:

$$R=8\mu L/r^4$$

In cui μ è il coefficiente di viscosità, L ed r rispettivamente la lunghezza ed il raggio del condotto.

Ne deriva che ad un restringimento delle prime vie aeree determinato per esempio da ostruzione mucosa, consegue un aumento delle resistenze al flusso d'aria, come detto sopra, prevalentemente in fase espiratoria; ciò avviene precisamente nei soggetti affetti da RAO in cui il raggio delle vie aeree è ridotto dalla presenza di essudato infiammatorio ed edema a cui consegue un notevole coinvolgimento dei muscoli espiratori addominali che caratterizzano il particolare tipo di respiro con aumentata componente addominale (Couetil et al., 2007; Derkesen et al., 2002).

1.3.2. DISTRIBUZIONE DELL'ARIA NEI POLMONI

Per permettere gli scambi gassosi a livello alveolare, l'aria inspirata deve essere distribuita nei polmoni in maniera ottimale. Il maggior responsabile di tale distribuzione è la pressione superficiale delle pleure.

Nel cavallo si instaura un gradiente di pressione verticale per cui la pressione intrapleurica, nelle porzioni dorsali, è inferiore a quella atmosferica.

D'altra parte le regioni polmonari ventrali vengono maggiormente distese e a ciò consegue la distribuzione della maggior parte dell'aria inspirata proprio a questo livello.

La distribuzione dell'aria nel polmone è inoltre influenzata dal tempo di distribuzione.

In realtà ciò assume particolare rilievo nei soggetti affetti da patologie respiratorie, per cui alcune zone polmonari richiederanno un tempo più lungo per essere perfuse dal flusso aereo, mentre negli animali sani, da un punto di vista respiratorio, questa variabile è in realtà abbastanza omogenea.

1.3.3. DIFFUSIONE

Anzitutto si rende necessario ricordare che la composizione dell'aria atmosferica è di circa 21 % di O_2 , 0,03% di CO_2 e 79,0% di N_2 .

La PO_2 dell'aria alveolare è molto più bassa del valore riferito all'aria atmosferica, ciò dipende dal consumo di ossigeno da parte dei tessuti, dalla diluizione dell'ossigeno determinato dall'umidificazione dell'aria che causa una P_{H_2O} di 47 mmHg a 37° C, e dal continuo pervenire di anidride carbonica.

La diffusione di tali gas avviene secondo un meccanismo di diffusione semplice secondo gradiente di concentrazione, attraverso la membrana che separa l'ambiente alveolare dall'ambiente vascolare. Tale membrana è costituita dall'epitelio alveolare, la membrana basale, lo spazio interstiziale, l'endotelio della membrana basale capillare e dall'endotelio capillare.

La velocità di diffusione (DR) del gas attraverso la membrana respiratoria dipende dalla differenza di pressione (PD), dall'aria di superficie (A), dalla distanza di diffusione (D), dalla solubilità del gas (S) e dal suo peso molecolare (MW) secondo la seguente relazione:

$$DR = \frac{PD * A * S}{D * \sqrt{MW}}$$

Il coefficiente di diffusione attraverso la membrana è di circa venti volte maggiore per l'anidride carbonica rispetto all'ossigeno; inoltre quando aumenta la distanza di diffusione (edema polmonare) si riduce la velocità di diffusione a cui può conseguire uno stato di ipossia.

Questo meccanismo avviene sia a livello dell' interfaccia alveolo-basale che in quella arterioso-tissutale (Fig. 4).

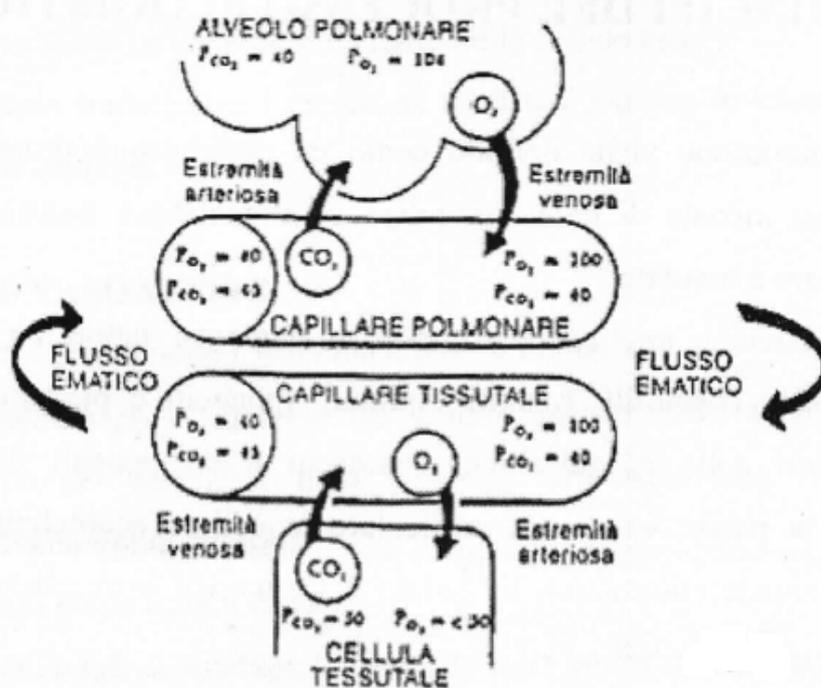


Figura 4. La diffusione dell'ossigeno e dell'anidride carbonica sono indicate dalle frecce centrali; le frecce a destra e sinistra indicano invece il flusso ematico. Tratto da *Physiology of domestic animals*, Reece, Lea & Febiger, 1991.

Il trasporto di ossigeno è strettamente connesso alla quantità di emoglobina ematica. Questa cromoproteina è costituita da una parte proteica composta da 4 catene polipeptidiche ciascuna delle quali contiene un gruppo eme; ciascuno di essi è caratterizzato da un atomo di ferro ferroso che è in grado di combinarsi con l'ossigeno (ogni molecola di emoglobina, se saturata al 100%, lega quattro molecole di ossigeno) e quindi di trasportarlo ad ogni organo e tessuto.

In sostanza l'ossigeno contenuto nell'aria atmosferica ed introdotto durante l'inspirazione, diffonde dagli alveoli al liquido interstiziale, da qui al plasma ed agli eritrociti in cui si lega all'atomo di ferro ferroso emoglobinico.

1.4. Recurrent Airway Obstruction (RAO)

L'ostruzione ricorrente delle vie aeree nel cavallo è una patologia respiratoria a carattere cronico che colpisce prevalentemente soggetti adulti di età compresa tra i 9 e i 12 anni e non presenta prevalenza di incidenza legata al sesso.

Si tratta di una malattia comune che colpisce il 10%-14% della popolazione equina (Ramseyer et al., 2007; Hotchkiss et al., 2007), determinando la completa esclusione dall'attività agonistica dei soggetti affetti.

Tale patologia è causata sia da una predisposizione genetica, che da componenti ambientali.

Per quanto concerne il primo punto, l'ereditabilità della patologia è stata avvalorata da alcuni studi che riportano una maggiore incidenza (44%) di RAO in cavalli i cui genitori, uno o entrambi, fossero affetti dalla medesima patologia, rispetto alla progenie di cavalli non affetti da RAO (10%) (House, 2010).

Dati di letteratura riportano infatti che nel caso in cui uno dei due genitori presenti ostruzione cronica delle vie aeree, l'incidenza di RAO nella progenie aumenta di tre volte rispetto a quella di cavalli sani, mentre sale fino a cinque volte se entrambi i genitori sono affetti da RAO (Gerber et al., 1989; Marti et al., 1991).

Tra i fattori ambientali che favoriscono l'ostruzione delle vie aeree, acquistano un ruolo importante il tipo di stabulazione, di alimentazione e, dipendente dai primi due, la presenza di potenziali allergeni nell'aria inspirata.

Da un punto di vista clinico, i soggetti RAO mostrano un aumento della frequenza respiratoria a riposo, tosse cronica, scolo nasale mucoso ed intolleranza all'esercizio. Nei casi più gravi si presenta, inoltre, una marcata insufficienza respiratoria causata da broncocostrizione e broncospasmo, associata ad ipersecrezione mucosa nelle vie aeree superficiali e profonde ed edema tracheale e bronchiale (Fig. 5). In tali casi, si può notare anche anoressia e dimagrimento cronico (Robinson et al., 1995; Gerber et al., 2004).

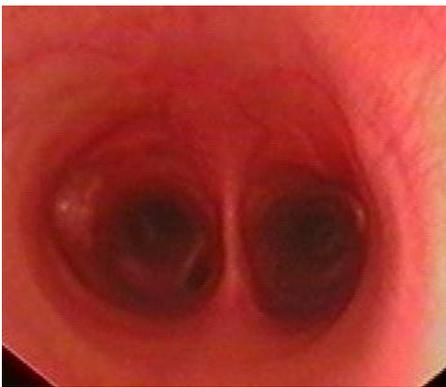


Figura 5: A sinistra, immagine della biforcazione tracheale, ottenuta da esame endoscopico, di un cavallo sano da un punto di vista respiratorio. A destra, immagine della biforcazione tracheale, caratterizzata da marcato edema, di un cavallo affetto da RAO (tratto da I.V.I.S , www.ivis.org)

Generalmente, i cavalli affetti da RAO non presentano rialzo febbrile a meno che non si instauri una secondaria infezione batterica, abbastanza comune in questi soggetti a causa della riduzione delle difese immunitarie a carico dell'albero respiratorio.

Tale patologia è presente epidemiologicamente in tutto il mondo, e può essere distinta in due diverse forme: la forma più diffusa e frequente di RAO è associata alla stabulazione e all'alimentazione con fieno (Hotchkiss et al., 2007; Kimbell-Dunn et al., 1999); esiste tuttavia una

forma estiva, associata al pascolo (SPAOPD, *Summer Pasture-Associated Obstructive Pulmonary Disease*), maggiormente presente nel sudest degli Stati Uniti.

L'albero respiratorio dei cavalli affetti da RAO è caratterizzato da infiltrato infiammatorio neutrofilico che si presenta generalmente associato ad aumento del numero di macrofagi alveolari caratterizzati da alterazioni nucleari e citoplasmatiche.

Negli ultimi anni sono stati condotti numerosissimi studi allo scopo di individuare i meccanismi patogenetici che stanno alla base di questa malattia respiratoria, ponendo maggiore attenzione ai mediatori dell'infiammazione coinvolti nello sviluppo della patologia (Sweeney et al., 1992; Hoffman et al., 1995; Riihimaki et al., 2008; Moran et al., 2011; Cordeau et al., 2004; Franchini et al., 2000).

Alcuni studi riportano un aumento dei livelli di espressione di mRNA di citochine caratterizzanti la risposta di tipo Th1-mediata (Horohov et al., 2005), mentre altri dimostrano una sovra-espressione di mediatori infiammatori Th2-specifici (Hinsworth et al., 2003; Horohov et al., 2005; Cordeau et al., 2004).

Inoltre, più recentemente, è stato riportato un aumento dell'espressione di mRNA di IL-8 sia nelle cellule epiteliali bronchiali che nel BAL, durante le fasi acute di RAO (Riihimaki et al., 2008; Berndt et al., 2007).

Alcuni autori hanno evidenziato, nel corso della suddetta patologia, aumenti di espressione di fattori trascrizionali (Sweeney et al., 1992; Hoffman et al., 1995; Saunders et al., 2001; Couetil et al., 2006) e recettori transmembrana (Ainsworth et al., 2006; Berndt et al., 2007).

D'altra parte, eccetto che per l'aumento di espressione di IL-8 in corso di RAO, i mediatori infiammatori indagati dai diversi autori, non sono caratterizzati da livelli di espressione comparabili.

Quindi, le informazioni ottenute ad oggi, risultano ancora molto scarse, eccessivamente variabili ed insufficienti per far luce sui meccanismi che stanno alla base della malattia stessa.

Ciò si traduce, nella pratica ippiatrica, in uno scarso successo terapeutico dei cavalli affetti da RAO, con conseguente insoddisfazione da parte del proprietario e del veterinario e scarsa qualità di vita dell'animale stesso.

1.5. Inflammatory Airway Disease (IAD)

L' *Inflammatory Airway Disease* è una patologia respiratoria acuta che colpisce cavalli giovani, prevalentemente entro i 6-8 anni di età.

Essa è comune in tutte le razze ed alcuni studi riportano che l' 11,3% -50% di cavalli da corsa purosangue e trottatori (Burrell, 1985; Wood et al., 1999; MacNamara et al., 1990) presentano infiammazione delle vie aeree nella giovane età indipendentemente dal sesso.

Negli ultimi anni tale patologia ha acquisito progressivamente importanza, poiché colpisce soggetti in età corrispondente, potenzialmente, all'apice delle performance atletiche (Christley et al., 2001; Burrell, 1985). A ciò consegue una notevole perdita economica da parte di proprietari o allenatori di cavalli da competizione che, se affetti da IAD, non possono essere sottoposti ad allenamento e quindi ad agonismo, ed in aggiunta devono essere sottoposti a terapie farmacologiche generalmente molto dispendiose.

La riduzione delle performance atletiche è determinata da accumulo di essudato mucoso nelle vie aeree superficiali e profonde che causa deficit nella capacità di scambi gassosi a livello alveolare e.

Generalmente tali alterazioni non causano, come avviene invece in corso di RAO, un aumento della frequenza respiratoria a riposo o alterazioni nel tipo di respiro.

L'*inflammatory airway disease* può essere distinta in due grandi gruppi, l'uno caratterizzato da infiltrato infiammatorio prevalentemente mastocitario delle vie aeree, che suggerisce un'eziologia su base allergica, e l'altro da infiltrato neutrofilico, generalmente ad eziologia batterica.

I cavalli colpiti da quest'ultimo sottotipo di IAD presentano, nella maggior parte dei casi, aumento della temperatura corporea.

Tra i fattori di rischio più importanti, acquistano un ruolo decisivo il tipo di stabulazione, corrispondente alla potenziale presenza di allergeni ambientali, ed il contatto con altri soggetti

affetti da patologia respiratoria (Sweeney et al., 1992; Hoffman et al., 1995; Christley et al. 2001; Holcombe et al., 2001).

Da molti anni numerosi autori si sono posti l'obiettivo di definire le caratteristiche salienti di tale malattia, soffermandosi però maggiormente sugli aspetti clinici, endoscopici, citologici e sui risultati dei test di funzionalità polmonare (Farrow et al., 1981; Mazan et al., 2003; Vrins et al., 1991; Bedenice et al., 2008; Couetil et al., 2001).

In realtà, in questo modo, non sono state acquisite informazioni che facessero luce sui meccanismi immunologici attivati in corso di IAD, per questo motivo negli ultimi anni sono stati condotti studi di valutazione dei profili di espressione di alcuni geni immuno-correlati nel liquido di lavaggio bronco-alveolare ottenuto da cavalli affetti da IAD.

I risultati di tali studi, però sono altamente variabili, infatti, sebbene le diverse ricerche siano caratterizzate dall'indagine di alcuni geni in comune, i loro profili di espressione a volte non sono comparabili.

Infatti, eccetto che per l'IL-1 β , molecola sovra-espressa nei soggetti IAD nei diversi studi, la differenza di espressione degli altri mediatori d'inflammation elencati, non viene confermata in tutti gli studi in maniera omogenea (Burrell et al., 1996; Beekman et al., 2012; Lavoie et al., 2011).

Ciò potrebbe essere determinato da molti fattori, tra cui le diverse fasi della patologia in cui sono stati effettuati i campionamenti, la mancata differenziazione citologica dell'infiltrato infiammatorio delle vie aeree, la mancata comparazione con esami microbiologici o le differenze individuo-specifiche.

D'altra parte, l'unico studio (Beekman et al., 2012) che abbia considerato come due gruppi distinti i cavalli caratterizzati da infiltrato mastocitario e quelli aventi infiltrato neutrofilico a carico delle vie aeree, ha sottolineato la differenza di espressione solo di IL-17 ed IL-4 tra le due popolazioni.

La comprensione dei meccanismi immunologici alla base dei due fenotipi può condurre al miglioramento dell'iter diagnostico ed all'impostazione di un approccio terapeutico mirato, allo

scopo di ridurre i tempi di guarigione dei cavalli e migliorarne la qualità di vita, riducendo, d'altra parte, le perdite economiche causate dalla loro esclusione dall'ambiente agonistico.

CAPITOLO 2

SCOPO DEL LAVORO

La scarsa informazione riguardo all'eziologia ed ai meccanismi immunologici che stanno alla base di patologie respiratorie su base infiammatoria che colpiscono il cavallo, conduce ad una scarsa capacità diagnostica e terapeutica da parte del veterinario ippiatra ed ad una perdita economica ingente da parte di proprietari, allevatori ed allenatori.

Infatti, tutti i cavalli affetti da IAD vengono esclusi dall'allenamento e dall'agonismo per tutta la durata della malattia e, per un periodo variabile, anche successivamente alla remissione dei sintomi clinici per il rispetto dei tempi di attesa dei trattamenti farmacologici.

Ancora peggiori sono le conseguenze per i soggetti affetti da RAO, che vengono esclusi definitivamente dall'attività agonistica per incapacità a sostenere un esercizio fisico prolungato.

Ad oggi, non vi sono trattamenti farmacologici che permettano la risoluzione della sintomatologia di cavalli colpiti da RAO, se non ausili cortisonici e sostanze ad azione bronco-dilatatoria che permettono una riduzione della tosse cronica o della broncoostrizione, somministrati quindi all'unico scopo di migliorare la qualità di vita del soggetto.

In alcuni casi, però non vi è nemmeno più risposta alla terapia cortisonica, e questo porta alcuni proprietari ed ippatri alla scelta eutanastica per grave insufficienza respiratoria a riposo, incoercibilità della sintomatologia e scarsissima qualità di vita dei soggetti affetti da RAO.

Il presente lavoro si prefigge lo scopo di analizzare i profili di espressione di mediatori infiammatori e molecole potenzialmente coinvolte nella patogenesi di IAD e RAO, nell'albero respiratorio di cavalli affetti da suddette patologie.

Tale analisi sarà effettuata utilizzando metodiche di biologia molecolare quali *real time* RT-PCR e DNA microarray, specifico per il cavallo. Quest'ultimo applicato per la prima volta allo studio delle malattie respiratorie equine.

I valori di espressione saranno comparati con i parametri clinici, endoscopici, citologici e batteriologici da *Broncho-Alveolar Lavage* (BAL).

Inoltre, in uno primo studio, verrà valutata l'eventuale utilità dell'analisi molecolare ed istologica su biopsie del tessuto bronchiale ottenute per via endoscopica.

L'applicazione del DNA microarray, grazie alla valutazione di un numero elevato di trascritti *target*, potrebbe condurre a considerare non solo alcuni dei geni coinvolti nella risposta infiammatoria (come permette lo studio mediante *real time* RT-PCR) ma di avere una visione d'insieme dei meccanismi immunologici attivati in corso di IAD e RAO.

Ovviamente, far luce sui meccanismi patogenetici, potrebbe condurre ad una miglior comprensione della patologia in sé. Inoltre, tali indagini potrebbero permettere di ottenere informazioni maggiormente dettagliate per lo sviluppo di nuovi ausili terapeutici che portino al miglioramento della qualità di vita dei cavalli affetti da patologia respiratoria acuta o cronica.

L'analisi di comparazione tra i segni clinici, endoscopici, citologici, microbiologici e di espressione genica, potrebbe permettere di valutare il miglior approccio clinico al paziente affetto da IAD e RAO, grazie all'interpretazione dei dati forniti dalle analisi di biologia molecolare.

Ci si attende, quindi, di ottenere informazioni relative ai meccanismi patogenetici alla base delle patologie RAO e IAD, comparandole con analisi cliniche applicate quotidianamente in ippatria, allo scopo di migliorare l'approccio clinico-diagnostico al paziente e di meglio comprendere le due malattie respiratorie equine maggiormente diffuse in tutto il mondo ed ancora scarsamente delucidate.

CAPITOLO 3

*ANALISI DEI PROFILI DI ESPRESSIONE DI MEDIATORI
INFIAMMATORI IN CAVALLI AFFETTI DA RAO MEDIANTE
REAL TIME RT-PCR*

3.1. INTRODUZIONE

L'ostruzione ricorrente delle vie aeree (*Recurrent Airway Obstruction*, RAO) è una malattia infiammatoria ostruttiva del tratto respiratorio del cavallo, che si manifesta clinicamente con maggior frequenza in cavalli di età adulta piuttosto che in soggetti giovani.

I cavalli affetti da RAO sviluppano ipersensibilità del tratto respiratorio broncocostrizione, infiammazione neutrofilica a carico delle vie aeree.

Infatti, l'esposizione a particelle inalabili organiche, dei cavalli predisposti all'insorgenza della malattia, determina l'incremento del numero di neutrofili ed eosinofili nel lavaggio bronco-alveolare (BAL) e l'accumulo di muco nelle vie aeree, a cui conseguono episodi di ostruzione acuta associati a broncospasmo (Kunzle et al., 2007; Riihimaki et al., 2008).

Ad oggi, la diagnosi di RAO viene effettuata valutando i segni clinici (es. intolleranza all'esercizio, tosse cronica, dilatazione delle narici, respiro marcatamente addominale) (Moran et al., 2011) in associazione alle caratteristiche citologiche del BAL, del *brushing* bronchiale, del lavaggio tracheale, all'analisi del sedimento esalato e/o all'istologia del tessuto bronchiale o polmonare (Ainsworth et al., 2003).

In medicina umana le biopsie bronchiali vengono eseguite, in corso di malattie respiratorie come l'asma o la *Chronic Obstructive Pulmonary Disease* (COPD), allo scopo di valutare il quadro infiammatorio e la risposta immunitaria conseguente all'esposizione a vari contaminanti ambientali (Di Stefano et al., 2001; Di Stefano et al., 2004). Tale metodica, infatti, può fornire informazioni riguardo a potenziali alterazioni strutturali delle vie aeree, grazie alle quali può esser fatta maggior chiarezza sia sulla gravità della patologia, sia sulla relativa prognosi (Jeffery et al., 2003). Solo negli ultimi anni, è stata riportata l'utilità delle biopsie bronchiali nello studio della RAO equina (Ainsworth et al., 2006).

L'infiammazione cronica e l'ostruzione delle vie aeree, alterazioni tipiche di RAO, hanno molte similitudini con le alterazioni delle vie aeree nell'asma umano, suggerendo la potenziale comune attivazione di meccanismi immunologici di base.

Tuttavia, l'asma è una patologia cronica in cui predomina la risposta infiammatoria Th2-mediata e che sembra caratterizzata da un infiltrato prevalentemente eosinofilo delle vie aeree, mentre, nelle ricorrenti riacutizzazioni infiammatorie in corso di RAO, l'infiltrato flogistico delle vie aeree si presenta prevalentemente neutrofilo (Franchini et al., 1998) e la risposta citochinica infiammatoria non sembra polarizzata ad una risposta Th1 o Th2-specifica.

Alcuni studi riportano un aumento dei livelli di espressione di IL-8 ed interferone (IFN)- γ nelle cellule del sedimento isolate da BAL, durante le crisi acute di RAO, senza un concomitante aumento dell'espressione di IL-4 ed IL-13 (Ainsworth et al., 2003).

Sebbene Horohov e colleghi (Horohov et al., 2005) abbiano evidenziato un aumento dei livelli di mRNA di IFN- γ , tipico di una risposta caratterizzata dalla differenziazione di Th1, riportano evidenze di una attivazione della risposta Th2 caratterizzata da un aumento della trascrizione di IL-4 e IL-13, ma non di IL-5, nelle cellule del BAL, suggerendo una risposta Th1/Th2 mista.

Tale differenza di risultati, potrebbe essere ascritta sia a differenze individuo-specifiche, sia al campionamento eseguito in diversi stadi della malattia (Horohov et al., 2005).

Più recentemente Berndt e collaboratori (Berndt et al., 2007), hanno riportato che l'espressione di IL-8 nelle cellule epiteliali bronchiali aumenta se cavalli sani o affetti da RAO vengono esposti a polveri di stabulazione. Tali risultati sono stati confermati da un ulteriore studio (Riihimaki et al., 2008) che riporta un aumento nell'espressione di IL-8, durante le fasi acute di RAO, sia nelle cellule isolate da BAL che in biopsie bronchiali.

E' stato inoltre dimostrato, da parte di numerosi autori, un ruolo fondamentale di alcuni fattori di trascrizione che, legandosi alla regione promotrice di specifici geni *target*, modulano l'espressione di citochine infiammatorie a livello delle vie aeree superficiali e profonde (Sweeney et al., 1992; Hoffman et al., 1995).

In particolare, l'espressione del fattore nucleare (NF)- κ B risulta essere aumentata nelle cellule epiteliali di cavalli affetti da RAO esposti a fieno contenete muffe (Saunders et al., 2001).

Tra i fattori di trascrizione è stata inoltre evidenziata, successivamente all'esposizione prolungata ad allergeni, la sovra-espressione di elementi leganti l'AMP ciclico (CREB) e la sotto-espressione della proteina attivatrice 1 (AP1) (Couetil et al., 2006).

Recentemente, Cordeau e collaboratori (Cordeau et al., 2004) hanno indagato, in linfociti isolati da BAL, i profili temporali di espressione di citochine Th1 e Th2 e la loro correlazione con la sintomatologia clinica in seguito all'inalazione di contaminati ambientali naturali. I risultati ottenuti hanno dimostrato che, durante le crisi acute, i cavalli presentavano una predominante risposta citochinica di tipo Th2 e che tale risposta si mostrava concomitante ad un aumento dell'ostruzione delle vie aeree.

Infine, è stato evidenziato che il meccanismo dell'immunità innata, comprendente sia la regolazione del recettore Toll-like 4 (TLR4) (Ainsworth et al., 2006; Berndt et al., 2007) sia la sintesi di citochine da parte dei neutrofili, nelle biopsie bronco-alveolari e nel BAL (Kunzle et al., 2007; Moran et al., 2011; Franchini et al., 2000), contribuisce alla complessità della malattia.

Le evidenze raccolte sino ad oggi suggeriscono che la componente infiammatoria di RAO risulta da un contributo sia della risposta immunitaria innata che adattativa, che sfociano in una reazione di ipersensibilità di tipo I e tipo III con un aumento dell'espressione sia di citochine Th1 che Th2.

Il meccanismo per cui, in corso di RAO, si sviluppa la risposta infiammatoria sembra essere un processo multifattoriale e sono, quindi, necessarie maggiori informazioni per meglio definire la sequenza di eventi che sfociano nello sviluppo dell'infiammazione delle vie aeree.

Nel presente studio, sono stati studiati i profili di espressione genica di importanti mediatori della risposta infiammatoria, TLR4, NF- κ B, IL1 β , IL6, IL8, IL13, IL17, INF γ , TGF β e TNF α , sia nel BAL sia nel tessuto bronchiale di cavalli sani ed affetti da RAO. Lo studio di espressione di tali mediatori, selezionati sulla base di precedenti studi condotti su RAO equina ed asma e COPD umane, è stato eseguito due volte a distanza di 15 giorni in tutti i cavalli affetti da RAO inclusi nello

studio, allo scopo di valutarne l'evoluzione temporale e la loro correlazione con i segni clinici osservati.

3.2. MATERIALI E METODI

3.2.1. ANIMALI INCLUSI NELLO STUDIO

Per lo svolgimento del presente lavoro, sono stati esaminati 13 (tredici) soggetti: sette cavalli trottatori clinicamente sani di età 6 ± 1 anni, costituenti il gruppo di controllo, e sei soggetti affetti da RAO, di età 10 ± 1 anni tra cui quattro trottatori e due cavalli da sella.

I cavalli sono stati destinati ad uno dei due gruppi conseguentemente alla determinazione del loro stato clinico (vedi paragrafo 3.2.2). I soggetti affetti da patologia respiratoria sono stati campionati due volte, al momento della diagnosi (T0) e dopo quindici giorni (T1). Nell'arco del tempo intercorso tra i due campionamenti, nessuno dei soggetti è stato sottoposto ad ulteriori visite cliniche e/o endoscopiche o a trattamenti farmacologici.

3.2.2. ESAME CLINICO

Tutti i cavalli inclusi nello studio sono stati sottoposti a visita clinica da parte del medesimo veterinario, come suggerito da Couetil (Couetil et al., 2007). Lo stato clinico è stato determinato considerando diversi parametri tra cui: frequenza cardiaca, frequenza respiratoria (Van Erck et al., 2005), murmure vescicolare, esame emocromocitometrico ed endoscopia delle vie aeree superficiali e profonde successivamente a sedazione (xylazina 1.1 mg/kg).

I cavalli su cui sono state evidenziate i) aumento della frequenza respiratoria a riposo, ii) tosse, iii) scolo nasale ed iv) alterazioni all'esame endoscopico, sono stati inclusi nel gruppo RAO.

Durante l'esame endoscopico, a ciascun cavallo è stato assegnato un punteggio al grado di iperemia ed ipersecrezione mucosa presenti nel lume tracheale e nella porzione esplorabile dei bronchi principali come descritto da Gerber et al (Gerber et al., 2004) e rappresentato in Figura 6.

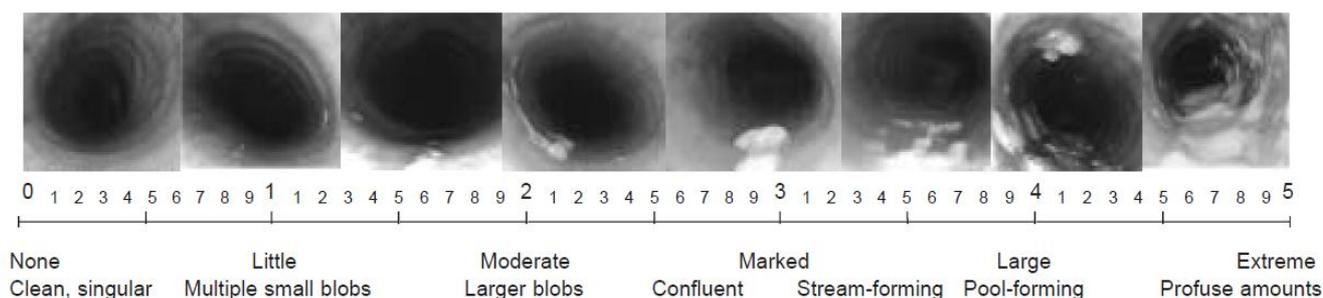


Figura 6: Immagini endoscopiche di ipersecrezione mucosa nel lume tracheale di equini. Viene riportato il punteggio attribuibile a ciascun quadro di ipersecrezione. Tratto da “Endoscopic scoring of mucus quantity and quality: observer and horse variance and relationship to inflammation, mucus viscoelasticity and volume” V. Gerber, *Equine vet. J.* (2004) 36 (7) 576-582.

Nei cavalli affetti da RAO, tutte le valutazioni incluse nello studio sono state ripetute due volte nell’arco di 15 giorni, allo scopo di monitorare l’espressione di mediatori infiammatori nel tempo, ed eventuali variazioni delle caratteristiche istologiche, citologiche e dei segni clinici.

Tutti i soggetti affetti da patologia respiratoria, sono stati stabulati in stalle con lettiera in paglia ed alimentati con fieno sia prima della diagnosi sia nell’intero periodo tra il primo campionamento (T0) ed il secondo (T1).

Nessuno dei cavalli inclusi nel gruppo RAO, ha mostrato una remissione della sintomatologia al momento del secondo campionamento continuando a presentare segni clinici (i.e. tosse, scolo nasale ed aumento della frequenza respiratoria a riposo) e caratteristiche citologiche tipiche della patologia RAO.

3.2.3. LAVAGGIO BRONCO-ALVEOLARE (BAL)

Il lavaggio bronco alveolare è stato eseguito instillando a livello della biforcazione tracheale, attraverso il canale accessorio sterile dell’endoscopio, 90 ml di soluzione fisiologica sterile associati a 30 ml di lidocaina al 2%. Il fluido così ottenuto è stato suddiviso in tre aliquote destinate all’esame batteriologico e micologico, all’esame citologico ed al saggio in *Real time* RT-PCR.

Per l'analisi dei profili di espressione il liquido ottenuto da BAL è stato filtrato attraverso una garza sterile e poi centrifugato a 2500 rpm per 10 minuti. Il sedimento così ottenuto è stato immerso in 1 ml di *RNAlater*[®] (Ambion), mantenuto per una notte a +4° C e poi stoccato a -20° C fino all'estrazione dell'RNA totale.

Per l'esame batteriologico, 20 µl della soluzione di lavaggio sono stati equamente divisi in due, aggiunti sia al terreno McConkey Agar che Agar sangue, ed incubati a 37° C ±1° C per 24 ore. Inoltre, 100 µl del fluido da BAL, sono stati aggiunti ad un brodo di arricchimento ed incubati a 37° C ±1° C per 24 ore.

Le colonie batteriche cresciute in questo ultimo terreno, sono state successivamente trasferite in agar sangue ed incubate a 37° C ±1° C per 24-48 ore per la caratterizzazione (vedi paragrafo 3.3.1). Immediatamente dopo il prelievo del BAL, una aliquota di fluido è stata usata per le preparazioni citologiche. In un primo momento, sono stati centrifugati 450 µl del BAL a 1500 rpm per 10 minuti, e, con il sedimento così ottenuto, è stato eseguito uno striscio. Ulteriori 450 µl di BAL, sono stati inseriti nelle *cuvette* per metodica *cyto-spin*, e quindi centrifugati a 500 rpm per 10 minuti. Tutti i preparati citologici sono stati colorati con *May-Grünwald Giemsa*.

Utilizzando un vetrino di *Burker* come camera conta-globuli, è stata eseguita una conta cellulare su liquido tal quale, tenendo in considerazione, oltre alle cellule infiammatorie, anche gli eritrociti e le cellule di sfaldamento epiteliali. Le valutazioni citologiche sono state eseguite sui preparati colorati, durante le quali è stata ripetuta un'ulteriore conta cellulare differenziale tenendo in considerazione un totale di 200 cellule a preparato.

3.2.4. BIOPSIE DELL'EPITELIO RESPIRATORIO

A tutti gli animali inclusi nello studio sono state eseguite due biopsie dell'epitelio respiratorio a livello dell'origine del bronco principale di destra, attraverso il canale di lavoro dell'endoscopio grazie all'ausilio di una pinza biptica.

Un campione, destinato all'esame istologico, è stato immesso in una provetta contenete 5 ml di formalina al 10%. L'altro tessuto biotico, è stato immediatamente congelato in azoto liquido e conservato a -80°C fino all'estrazione dell'RNA.

L'esame istologico del tessuto è stato eseguito assegnando un punteggio, da 0 a 3, per ciascuna delle seguenti caratteristiche: iperemia/emorragia, edema, danno epiteliale e quantità di cellule infiammatorie.

Considerando ciascuna caratteristica, se non veniva apprezzata alcuna alterazione, si attribuiva al tessuto punteggio 0, mentre 1 per poche alterazioni, 2 se moderate, ed infine 3 se le alterazioni si presentavano marcate. Tali punteggi sono poi stati sommati ottenendo un valore totale da 0 a 12.

I campioni sono stati quindi suddivisi in 4 gradi istologici: grado I, punteggio totale <4; grado II, punteggio totale da 4 a 6; grado III, punteggio totale da 7 a 9; grado IV, punteggio totale ≥ 10 (Fig. 7).

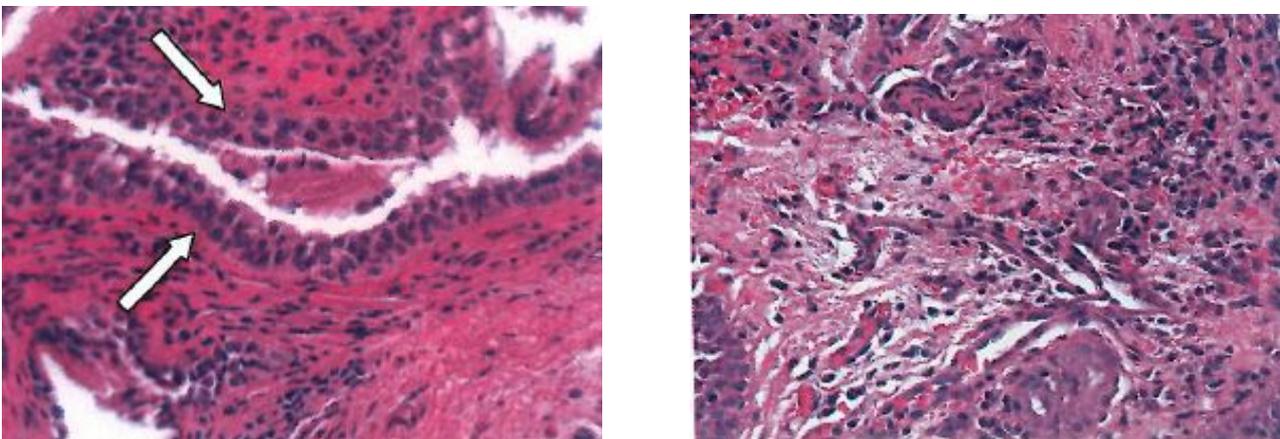


Figura 7: Esempi di grado istologico II, a sinistra, e grado istologico, III a destra.

3.2.5. ESTRAZIONE DELL'RNA TOTALE

L'estrazione dell'RNA totale dalle cellule da BAL e dal tessuto respiratorio epiteliale, è stato eseguito utilizzando il kit *RNeasy® Mini Kit* (Qiagen Inc.), in accordo con le istruzioni riportate nel manuale per l'estrazione dell'RNA totale da cellule animali.

Tutti i campioni di RNA sono stati digeriti con DNAsi durante l'estrazione. Per ciascun campione, è stata determinata la concentrazione di RNA mediante uno spettrofotometro UV-Vis, *NanoDrop*[®] *ND-1000* (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA).

3.2.6. SAGGIO DI QUANTIFICAZIONE RELATIVA IN *Real Time* RT-PCR.

L'espressione genica di un totale di 10 geni immunocorrelati (IL1 β , IL6, IL8, IL13, IL17, INF γ , TGF, NF κ β , TNF α , and TLR4), è stata indagata mediante qRT-PCR, nei campioni di RNA isolati da BAL e da biopsie, allo scopo di verificare potenziali differenze tra soggetti affetti da RAO e cavalli clinicamente sani.

Per ciascun gene *target* e per il gene scelto come *reference* (HPRT), il saggio di espressione è stato progettato utilizzando il sistema di sonde *Universal Probe Library* (UPL) (www.universalprobelibrary.com) (RocheDiagnostic, Mannheim, Germany). I *primer* gene-specifici (vedi Tabella 2), nonché la sonda UPL corrispondente, sono stati determinati col *software ProbeFinder*.

Tabella 2: *Primer* utilizzati per il saggio in *real-time* RT-PCR.

<i>Gene</i>	<i>Numero di accesso</i>	<i>Forward primer(5'→ 3')</i>	<i>Reverse primer(3'→ 5')</i>	<i>Amp(bp)</i>
IL-1 β	NM_001082526	GGGATGAAAGATGGGAAGC	TTCCATTTTCCTCTTTGGGTA	78
IL-6	ECU64794	TCCAGATCCTGATGCAAAAGA	TTCAGCCACTCATTCTGTGAA	106
IL-8	gi3126972	GCTGGCTGTTGCTCTCTTG	CCGAAGCTCTGCAGTAATTCTT	88
IL-13	DQ889711	GTGGAGCGTCAACCTGACA	CTTCCGCGTGTTTTGGAT	39
IL-17	AY014959	GGCCTCAGATTACCACAACC	ATCTCTCAGGGTCCTCGTTG	68
TNF α	NM_001081819	AGGAGCCACCACGCTCTT	CTGGAAGGCATTCGGTAACT	82
INF- γ	EU000433	TCAAGGAGGACCTGTTCGTT	CGCTGGACCTCAGATCATT	103
TGF β 1	Ec_TGF-B1	TGACAGCAAAGATAACACAC TCC	TCAATGGTGGCCAGATCA	78
TLR4	AY005808	TCCTCTCCTGCCTGAGACC	CATGCATTGGTAAGTAGTGTTAG GA	78
NF- κ B	XM_001490817	GACGGCTTCTATGAGGCTGA	GCTCCAGGTCTCGCTTCTT	94
HPRT	AY372182	AGTCAACAGGGGACATAAAA GTG	CCAGTGTCAATTATATCTTCAAC AATC	94

Un totale di 300 ng dell'RNA estratto da ciascun campione al T0 e T1 è stato retrotrascritto a cDNA utilizzando l'enzima *Superscript II* (InvitrogenTM, Carlsbad, California).

Un'aliquota (2.5 μ l) di cDNA diluito (1:50 e 1:20 rispettivamente per BAL e biopsie) è stato amplificato in un volume finale di 10 μ l, contenenti 5 μ l di *Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG 2 \times* (InvitrogenTM) e 0.25 μ l di ciascun *primer* gene-specifico (10 μ M).

Tutti gli esperimenti sono stati effettuati con lo strumento *LightCycler[®] 480* (Roche Diagnostics); il protocollo di amplificazione è stato sviluppato con in uno step iniziale di 2 minuti a 50° C e 2 minuti a 95° C, seguiti da 45 cicli di 10 secondi a 95° C e 30 secondi a 60° C .

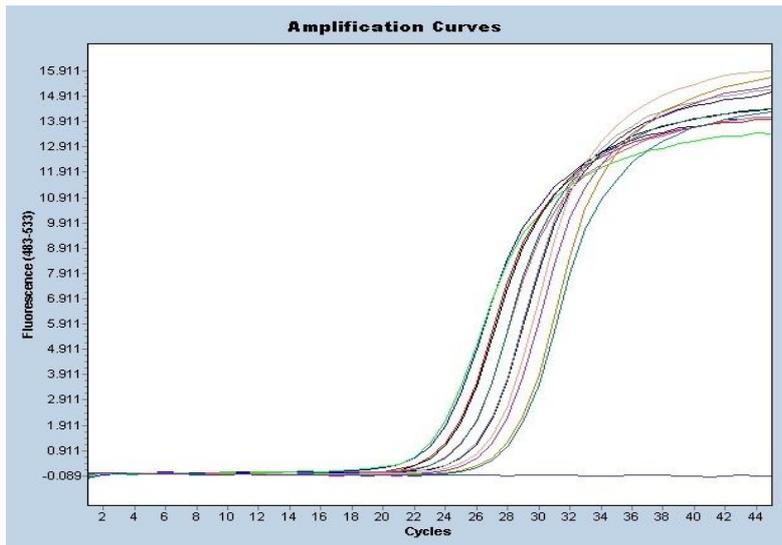


Figura 8: Curva standard per il gene NF-kB

Per valutare l'efficienza di ciascun saggio, curve standard sono state costruite amplificando diluizioni seriali (1:2) del medesimo cDNA utilizzato come calibratore per le analisi di espressione genica (un esempio in Figura 6). Il valore di Cp (*Crossing point*) è stato utilizzato per determinare la quantità relative di ciascun gene *target*; tutte le misurazioni sono state eseguite in duplicato e normalizzate al gene *reference* (HPRT), che è stato a sua volta misurato in duplicato.

3.2.7. ANALISI STATISTICHE

Le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il software SPSS v20.0. Tenendo conto del limitato numero di animali, i dati sono stati analizzati usando un approccio statistico non parametrico.

La significatività statistica delle differenze di espressione citochinica tra gruppi è stata valutata mediante il test di Mann-Whitney utilizzando i valori di espressione di ciascun campione, mentre per confrontare i valori di espressione dei 10 geni analizzati tra i campioni del gruppo RAO a T0 e T1 è stato applicato il test di Wilcoxon per campioni appaiati. Il test non parametrico di Spearman è stato infine impiegato allo scopo di valutare le potenziali correlazioni tra l'espressione dei geni immuno-correlati, le caratteristiche citologiche, il livello di secrezione mucosa, la frequenza

respiratoria ed il *grading* attribuito alle biopsie. Per tutti i test è stato scelto come limite di significatività un valore di $p < 0.05$.

3.3. RISULTATI

3.3.1. ESAME CLINICO, EMOCROMOCITOMETRICO E MICROBIOLOGICO

Gli esami batteriologico e micologico, su fluido da BAL, sono risultati negativi sia per i cavalli clinicamente sani che per quelli affetti da RAO, indicando che nessun cavallo era affetto da infezione batterica secondaria al momento del campionamento.

I parametri clinici considerati in tutti i soggetti (vedi Metodi), sono stati testati statisticamente, per valutare la presenza di differenze significative tra il gruppo di controllo e i cavalli affetti da patologia respiratoria.

La frequenza respiratoria e la quantità di muco nelle vie aeree, sono state caratterizzate da un aumento significativo ($p < 0,05$ e $p < 0,01$ rispettivamente) nella popolazione RAO. Mentre altri parametri clinici (come la temperatura rettale e l'iperemia della mucosa nelle vie aeree) non hanno mostrato differenze significative tra i due gruppi. Non sono state evidenziate differenze significative tra i risultati degli esami emocromocitometrici dei due gruppi.

3.3.2. CITOLOGIA DEL FLUIDO DA BAL ED ISTOLOGIA DELLE BIOPSIE BRONCHIALI

L'analisi citologica è stata eseguita su tutti i campioni da BAL, allo scopo di determinare la percentuale di neutrofili, eosinofili, linfociti e macrofagi (riportate in tabella 3) e di verificare la presenza differenze significative tra gli esemplari sani (Ctrl) e quelli affetti da RAO.

Tabella 3: Comparazione e significatività statistica delle analisi citologiche del liquido da BAL, tra la popolazione RAO ed il gruppo di controllo.

	Eosinofili %	Linfociti %	Macrofagi %	Neutrofili %	
<i>EcS1</i>	0	8	91	1	
<i>EcS2</i>	0	15	83	2	
<i>EcS3</i>	1	9	87	3	
<i>EcS4</i>	0	13	84	3	
<i>EcS5</i>	0	2	96	2	
<i>EcS6</i>	0	15.8	42.1	42.1	
<i>EcS7</i>	0	16	63	21	
<i>T0</i>	<i>EcM1</i>	1	5	44	50
	<i>EcM2</i>	1	3	15	81
	<i>EcM3</i>	1	1	7	91
	<i>EcM4</i>	0	4.4	10.7	84.9
	<i>EcM5</i>	0	2	40	58
	<i>EcM6</i>	0	3.9	27.3	68.8
<i>T1</i>	<i>EcM1</i>	1	4	11	84
	<i>EcM2</i>	1	2	5	92
	<i>EcM3</i>	1	3	15	82
	<i>EcM4</i>	0	1.4	4.4	94.2
	<i>EcM5</i>	4	3	31	62
	<i>EcM6</i>	1	6	29	64
<i>Sig. T0 vs Ctrl</i> <i>(EcS6 ed EcS7 esclusi)</i>	0.18 (0.33)	0.02 (0.052)	0.004 (0.004)	0.003 (0.004)	
<i>Sig. T1 vs Ctrl</i> <i>(EcS6 ed EcS7 esclusi)</i>	0.016 (0.044)	0.018 (0.054)	0.003 (0.006)	0.003 (0.006)	
<i>Sig. T0 +T1 vs Ctrl</i> <i>(EcS6 ed EcS7 esclusi)</i>	0.56 (0.86)	0.004 (0.026)	<0.001 (0.02)	<0.001 (0.02)	

L'analisi citologica ha messo in evidenza che, 2 cavalli appartenenti al gruppo dei controlli (EcS6 and EcS7) erano caratterizzati una elevata percentuale di neutrofili. Entrambi i soggetti, tuttavia, non avevano presentato alcuna alterazione respiratoria all'esame clinico e, per queste ragioni, non sono stati esclusi dalle successive analisi. Tutte le analisi statistiche sono state eseguite due volte inserendo od omettendo i due soggetti sopracitati (vedi Tabella 3).

Nessuna differenza significativa è stata evidenziata tra i soggetti affetti da RAO campionati a T0 e T1, e questo conferma la simile condizione citologica durante tutto il periodo della malattia considerato. La percentuale di neutrofili si è presentata superiore di 7.1 volte nei cavalli affetti da RAO. La differenza osservata è risultata essere statisticamente significativa sia considerando gli esemplari al T0 e T1 separatamente che costituenti un unico gruppo (vedi tabella 3). Escludendo dalle analisi EcS6 ed EcS7, la differenza tra le due popolazioni di cavalli (controlli vs RAO), è stata confermata essere significativa sia per la percentuale di macrofagi che di neutrofili, mentre è stata riscontrata una significatività solo marginale ($p=0.052$ e 0.054 rispettivamente per T0 e T1) per la conta linfocitaria. L'esame istologico del tessuto respiratorio da biopsie, non ha fornito alcuna differenza statisticamente significativa tra i cavalli affetti da RAO ed il gruppo di controllo.

3.3.3. ANALISI MEDIANTE *Real Time* RT-PCR SU BAL E TESSUTO BIOPTICO

I profili di espressione di 10 geni immuno-correlati (elencati in Tabella 2) sono stati valutati sia nel fluido da BAL sia nel tessuto respiratorio bronchiale ottenuto mediante biopsia, allo scopo di valutare eventuali differenze tra i cavalli clinicamente sani ed i soggetti affetti da RAO.

Nei cavalli affetti da RAO, i livelli di mRNA, sono stati valutati per tutti i geni sia al T0 che al T1 (Fig. 9), al fine di valutare le variazioni temporali dell'espressione genica nel corso della patologia e per testare la loro eventuale correlazione con i parametri clinici.

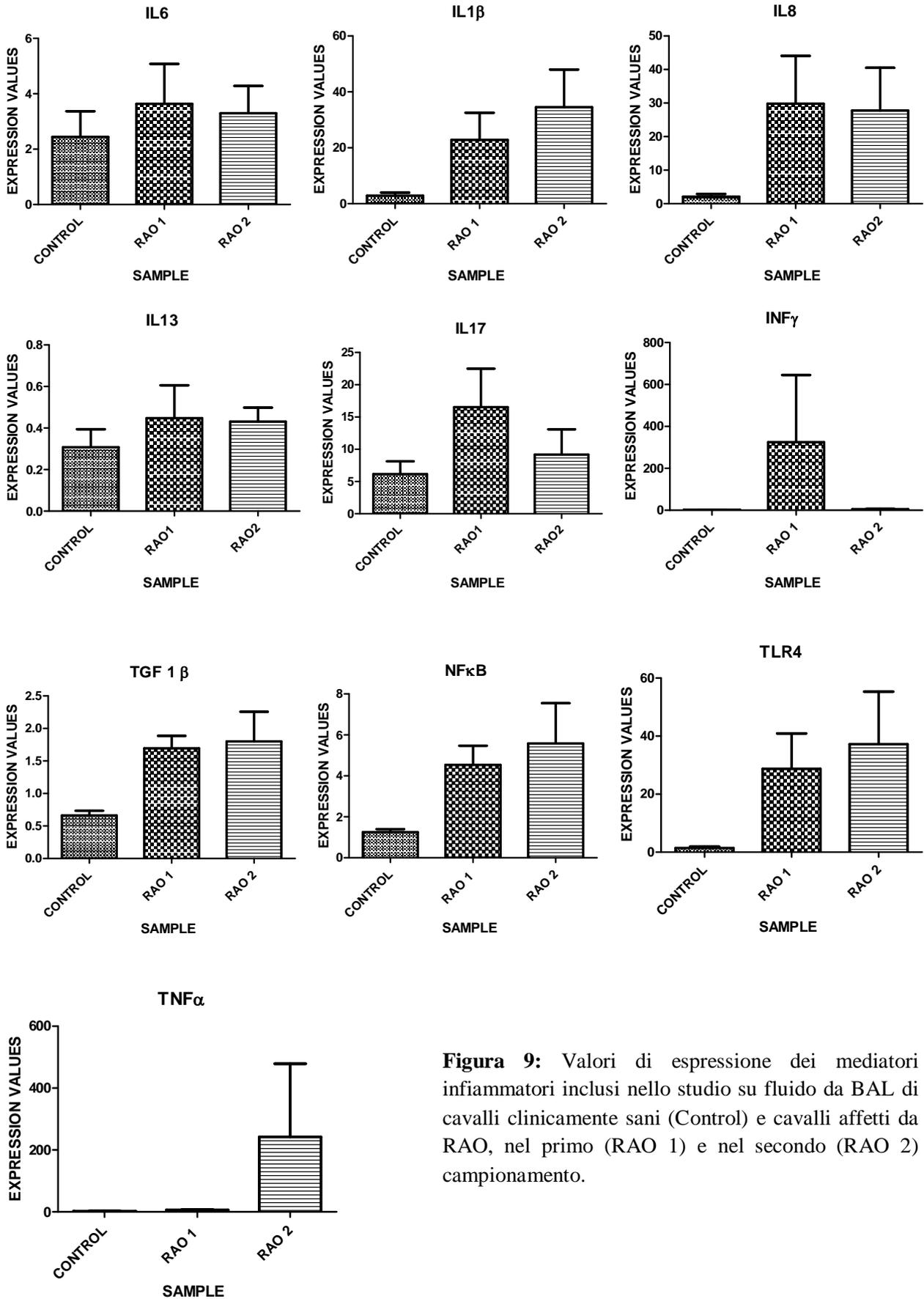


Figura 9: Valori di espressione dei mediatori infiammatori inclusi nello studio su fluido da BAL di cavalli clinicamente sani (Control) e cavalli affetti da RAO, nel primo (RAO 1) e nel secondo (RAO 2) campionamento.

Analogamente ai risultati ottenuti per le valutazioni cliniche e citologiche, il test di *Wilcoxon* per campioni appaiati non ha evidenziato alcuna differenza significativa nei profili di espressione nel fluido da BAL tra il T0 ed il T1 negli individui RAO. Non essendoci differenze significative tra i due tempi di campionamento né nei parametri clinici/citologici, né nei valori di espressione genica è si è deciso di eseguire le analisi statistiche sia considerano i campioni a T0 e T1 separatamente, che considerandoli come un unico gruppo (T0+T1 in Tabella 4). Comparando i livelli di espressione genica tra i cavalli affetti da RAO ed il gruppo di controllo, 5 dei 10 geni testati, sono risultati essere significativamente sovra-espressi nei soggetti patologici (vedi Tabella 4) sia a T0 che T1.

IL-1 β è risultata essere significativa al T0 ed anche considerando entrambi i campioni a T0 e T1 come unico gruppo (T0+T1), mentre solo una marginale significatività è stata riscontrata ($p=0.06$) al T1. L'incremento maggiore di espressione è stato osservato per i trascritti IL-1 β , IL-8 e TLR4, con un *fold-change* (FC) di 11.9, 16.5 e 28 rispettivamente (vedi Tabella 4), mentre un più moderato aumento è stato apprezzato per TNF α (FC 2.9), TGF- β 1 (FC 2.8) e NF-k β (FC 4).

Tabella 4: *Fold-change* dei 10 geni immuno-correlati nei campioni da BAL nei cavalli affetti da RAO rispetto ai soggetti clinicamente sani (Ctrl).

	IL1β	IL6	IL8	IL13	IL17
RAO T0 vs Ctrl	10.06*	1.18	17.93*	1.64	2.29
RAO T1 vs Ctrl	13.72	1.32	15.05*	1.40	1.49
RAO T0+T1 vs Ctrl	11.9*	1.2	16.5**	1.5	1.9
	INFγ	TGFβ1	NFKβ	TLR4	TNFα
RAO T0 vs Ctrl	2.07	2.50**	3.34**	25.3**	3.26**
RAO T1 vs Ctrl	2.53	3.01**	4.71**	30.64*	2.52*
RAO T0+T1 vs Ctrl	2.3*	2.8**	4.0**	28.0**	2.9**

* $p \leq 0.05$ ** $p \leq 0.01$

Un simile andamento, anche se non significativo, è stato riscontrato per IL-17 ed INF γ , che si sono presentati sovra-espressi (FC ~2) nei cavalli affetti da RAO, rispetto al gruppo di controllo (Tabella 4). Sebbene i valori di espressione di INF γ non siano risultati essere statisticamente significativi considerando i campioni a T0 e T1 singolarmente, un valore di significatività inferiore a 0.05 può essere apprezzato considerando T0 e T1 come un unico gruppo di campioni.

L'analisi dei campioni biotici del tratto respiratorio, ha messo in evidenza livelli di mRNA molto bassi (da -5,55 a -588,23 volte rispetto al BAL) per tutti i 10 geni inclusi nello studio. Non è stata, inoltre, evidenziata alcuna differenza di espressione significativa tra il gruppo di controllo ed i cavalli affetti da patologia respiratoria.

3.3.4. CORRELAZIONI TRA I PARAMETRI CLINICI ED I LIVELLI DI ESPRESSIONE GENICA

Grazie alla stima del coefficiente *rho di Spearman*, è stata valutata la correlazione tra i livelli di espressione genica nei campioni BAL ed i parametri clinici. I coefficienti di correlazione calcolati per tutte le comparazioni sono riportate in Appendice 1.

In breve, l'analisi dei parametri clinici ha evidenziato una correlazione positiva statisticamente significativa (*Spearman's rho* 0.623, $p < 0.01$) tra la quantità di muco presente nel lume tracheale e la frequenza respiratoria.

La percentuale di neutrofili nel fluido da BAL, è risultata essere negativamente correlata sia con la percentuale di linfociti (*Spearman's rho* -0.633, $p < 0.01$), che con la percentuale di macrofagi (*Spearman's rho* -0.987, $p < 0.01$), mentre si è presentata positivamente correlata ($p < 0.01$) con i livelli di mRNA di IL-1 β , IL-8, TGF- β 1, NFk β , TLR4 ed INF γ .

Inoltre, i livelli di espressione di tutti i geni *target*, sono stati comparati con i parametri clinici valutati per ciascun animale.

IL-6, IL-13 e IL-17 non risultano essere correlati con nessun segno clinico, mentre INF γ , anche se differenzialmente espresso in modo non significativo tra le due popolazioni di cavalli, ha mostrato

una significativa correlazione negativa con la percentuale di linfociti nel fluido ottenuto da BAL (vedi Appendice 1).

Una notevole correlazione positiva, è stata riscontrata tra il *pattern* di espressione di IL-1 β , IL-8, TGF- β 1, NF- κ β , TRL4 ed INF γ (vedi Appendice 1), come anche tra tali trascritti ed i parametri clinici. In particolare, tutti i geni elencati, correlano positivamente con la percentuale di neutrofilo nel BAL, mentre è stata evidenziata una loro correlazione negativa con la percentuale di linfociti e macrofagi. La significatività statistica delle correlazioni elencate nel presente paragrafo, è stata confermata anche escludendo dalle analisi i campioni ottenuti da EcS6 ed EcS7, che avevano riportato una anormale percentuale di neutrofilo nell'albero respiratorio.

2. DISCUSSIONE

Negli ultimi anni, l'indagine sulla patogenesi della *Recurrent Airway Obstruction*, è stata focalizzata sulla valutazione dell'espressione di mediatori infiammatori nel BAL.

Le informazioni riguardo ad eziologia, patogenesi ed evoluzione della RAO sono ancora molto scarse, e l'indagine dei mediatori infiammatori coinvolti nella malattia potrebbe far maggiore chiarezza sui meccanismi immunologici implicativi.

Tra le molecole coinvolte nella risposta immunitaria, studi precedenti (Giguère et al., 2002; Laan et al., 2006) hanno preso in considerazione i livelli di espressione di diversi mediatori della risposta immunitaria tra cui IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-13, IL-17, TNF α , INF γ , TGF-1 β , NF- κ β e TRL4. Tuttavia, essi non sono mai stati valutati tutti insieme né in comparazione con i segni clinici, i parametri citologici o le informazioni microbiologiche.

Il nostro studio è basato su un'analisi globale del quadro patologico di esemplari affetti da RAO tramite la valutazione dei reperti clinici ed endoscopici, le valutazioni citologiche e microbiologiche nel fluido da BAL, l'esame istologico del tessuto bronchiale e l'espressione di mediatori infiammatori nel BAL e nelle biopsie del tessuto respiratorio.

Tutte le analisi sono state ripetute a distanza di due settimane dal primo prelievo per valutare l'evoluzione della patologia e l'alterazione dei profili di espressione genica ad essa associati, nessuna differenza significativa è stata osservata tra T0 e T1 confermando, quindi, il carattere cronico della patologia.

Studi precedenti, condotti sia su RAO equina che su COPD ed asma umani, hanno cercato di fare luce su quali siano i principali meccanismi immunologici alla base delle patologie ostruttive dell'apparato respiratorio senza però ottenere risultati univoci. Diversi studi, infatti, hanno raccolto evidenze in supporto ad una risposta principalmente Th2-mediata associata ad un possibile ruolo della risposta allergica allo sviluppo della patologia (Bowles et al. 2002, Cordeau et al. 2004), mentre altri lavori hanno riscontrato un aumento di espressione di trascritti Th1-specifici o di una risposta mista Th1/Th2 (Giguère et al. 2002, Horohov et al. 2005). Nel presente studio, IL-1 β , IL-8, TGF- β 1, NF-k β , TLR4 e TNF α sono risultati essere significativamente sovra-espressi negli animali affetti da RAO rispetto ai sani ed un aumento dell'espressione, sebbene non significativo, è stato osservato anche per IL-17 ed INF γ , questa evidenza sembra escludere una risposta polarizzata dei linfociti T-helper indicando, invece, un coinvolgimento di entrambe le risposte Th1 e Th2.

L'aumento di espressione delle citochine pro-infiammatorie IL-1 β e TNF α è in totale accordo con quanto riportato da Laan e collaboratori (2006) che suggeriscono un loro ruolo di rilievo nello sviluppo della patologia e nell'attivazione della risposta immunitaria. L'aumentata espressione di queste citochine suggerisce l'azione di neutrofili e mastociti nel processo infiammatorio; ipotesi che trova conferma, indirettamente, nell'aumentata espressione di IL-8 e, direttamente, nella percentuale di neutrofili presenti nel BAL dei cavalli RAO, significativamente maggiore (6.8 volte in T0 e 7.5 volte in T2, $p < 0.01$) rispetto a quella osservata nei cavalli sani.

Il notevole aumento dell'espressione di IL-8 (FC 16.5, $p < 0.01$) nel BAL di cavalli affetti da RAO, è infatti simile a quello di studi precedenti (Ainsworth et al., 2006; Franchini et al., 1998; Franchini et al., 2000) e conferma il ruolo chiave di tale chemochina nel meccanismo di reclutamento neutrofilico nel tratto respiratorio dei cavalli affetti da RAO.

Ainsworth e colleghi (Ainsworth et al., 2006), hanno dimostrato una sovra-espressione di IL-8 nel BAL ed un aumento dell'immuno-reattività nelle biopsie bronchiali di cavalli affetti da RAO. La sovra-espressione, anche se non significativa, di IL-8 è stata evidenziata anche nelle cellule epiteliali bronchiali dopo esposizione a polveri di stabulazione sia in cavalli affetti da RAO che in soggetti sani (Jeffrey et al., 2003). Nel 2008, Riihimaki e collaboratori (Riihimaki et al., 2008), hanno dimostrato che i livelli di mRNA di IL-8 si presentavano elevati sia nel BAL che nei campioni biotici bronchiali durante le crisi respiratorie, associate a migrazione neutrofilica a livello polmonare. Tuttavia, nel nostro studio non è stata evidenziata una relazione tra l'espressione di IL-8 nel BAL e nei campioni biotici bronchiali. E' da notare però che nessuno dei mediatori infiammatori inclusi nello studio è risultato essere differenzialmente espresso, tra i cavalli affetti da RAO ed il gruppo di controllo, nel liquido di lavaggio bronco-alveolare che nelle biopsie del tessuto respiratorio. La mancanza di significatività può tuttavia essere imputata alla piccola dimensione dei campioni biotici o al sito in cui è stata effettuata la biopsia stessa.

La correlazione riscontrata tra IL-8, IL-1 β e TNF α , può trovare giustificazione nella funzione di TNF α di stimolare il rilascio di IL-1 β (Abbas et al., 1994) e nella capacità di IL-1 β di stimolare a sua volta il rilascio di IL-8 da parte di fagociti mononucleati. Inoltre, la correlazione tra IL-8 e TNF α potrebbe suggerire una loro azione sinergica. La prima, infatti, svolge un ruolo di chemotassi neutrofilica verso il sito di infiammazione, mentre la seconda rende le cellule endoteliali vascolari in grado di esprimere molecole di adesione che favoriscono, per l'appunto, la migrazione delle cellule neutrofiliche (Abbas et al., 1994).

Se l'aumento di espressione di IL-8 può essere considerata la causa del reclutamento di neutrofili nel lume bronchiale, la persistenza dell'infiammazione è da addebitarsi ad altri fattori. E' stato infatti ipotizzato che IL-1 β e TNF α rivestano un ruolo nel mantenimento dell'infiammazione tramite l'attivazione di NF-k β , che a sua volta determina un aumento dell'espressione di numerose citochine infiammatorie, incluse IL-1 β e TNF α , che possono ulteriormente riattivare il meccanismo di segnale di NF-k β generando, quindi, un circuito di auto-attivazione (*auto-activating loop*).

E' stato dimostrato che NF- κ B ricopre un ruolo importante nella patogenesi sia dell'asma e della COPD umane (Imanifooladi et al., 2010) che della rinite allergica nel ratto (Zheng et al., 2011). Recentemente, è stato proposto l'utilizzo di inibitori di NF- κ B come terapia per le alterazioni respiratorie (Larocca et al., 2011; Barnes, 2010).

Elevati livelli di NF- κ B sono stati osservati in cavalli affetti da RAO, rispetto a cavalli sani, anche a settimane di distanza da crisi respiratorie (Bours et al., 2000), inoltre, una diretta correlazione è stata osservata tra l'attività di NF- κ B e la resistenza polmonare suggerendo un effetto indiretto a carico del quadro clinico tramite il rilascio di fattori infiammatori e broncospastici.

Inoltre, Wang e colleghi (Wang et al., 2011) hanno dimostrato che la via di segnale di NF- κ B è in grado di inibire la sintesi di *Aquaporin 5* (AQP5) nei ratti affetti da rinite allergica, questo potrebbe avvenire anche nelle vie respiratorie più profonde determinando un minore richiamo componente acquosa causando la produzione di muco più denso rendendone più difficile l'eliminazione da parte delle cilia presenti sull'epitelio dell'apparato respiratorio.

Evidenze a supporto di quanto riscontrato in questi studi sono state osservate anche nel presente lavoro, NF- κ B infatti si presenta sovra-espresso, a T0 e T1, nei cavalli affetti da RAO (FC 4, p-value <0.01) e significativamente correlato (p-value <0.01) sia alla frequenza respiratoria, riconducibile all'aumento della resistenza polmonare, sia alla quantità di muco nel lume bronchiale. Nel presente lavoro, è stato osservato, un elevato accumulo di muco nelle vie aeree dei cavalli affetti da RAO rispetto agli esemplari sani. Inoltre, è stata riscontrata una forte correlazione del *grading* assegnato alla quantità di muco sia con la percentuale di neutrofili presenti nelle vie aeree sia con i livelli di espressione di IL-1 β , IL-8, TGF- β 1, NF- κ B, TLR4 ed INF γ . Recentemente, è stato dimostrato che l'espressione genica di diverse mucine è regolata da alcuni mediatori immunitari ed, in particolare, è stato riportato un ruolo di IL-8, IL-1 β e TNF α , sia a livello trascrizionale che post-trascrizionale, nell'aumento dei livelli di espressione di MUC5AC in corso di COPD (*Chronic Obstructive Pulmonary Disease*) ed asma umani (Bautista et al., 2009).

Inoltre, è stato riconosciuto un ruolo di TLR4 e NFκ-β nell'ipersecrezione mucosa indotta da LPS nei ratti ed è stata riportata la loro correlazione con l'aumento dei livelli di espressione di MUC5AC (Chen et al., 2009; Ou et al., 2008).

In questo studio, la differenza di espressione più marcata è stata osservata per il *Toll-like receptor 4* (TLR4), risultato essere sovra-espresso nei cavalli RAO rispettivamente 25.3 e 30.6 volte a T0 e T1. I TLR sono attivati nei meccanismi di difesa delle vie aeree essendo le prime molecole deputate al riconoscimento dei costituenti dell'aria, soprattutto particolati, e svolgono un ruolo di primaria importanza nel coordinare la risposta immunitaria, tramite il rilascio di citochine e chemochine, e nella produzione di muco protettivo e molecole antimicrobiche (Pace et al., 2011).

E' stato dimostrato che TLR4 gioca un ruolo nel mantenere l'integrità e la corretta architettura del polmone (Zhang et al., 2006). Inoltre, tale recettore viene sovra-espresso nei neutrofili del BAL di pazienti affetti da COPD ed inibisce l'apoptosi neutrofilica tramite l'espressione, di *defensin beta 2* (HBD2) (Pace et al., 2011).

I dati di letteratura trovano conferma anche nell'elevata correlazione riscontrata in questo studio tra IL-8, TLR4 e la percentuale di neutrofili nel BAL ($0.71 < \rho < 0.92$, $p\text{-value} < 0.01$), che suggerisce un'azione concertata di queste due molecole nella migrazione e nella sopravvivenza delle cellule neutrofiliche nel lume bronchiale.

Il TLR4 stimola, inoltre, la maturazione delle cellule dendritiche (DCs) (Hemmi et al., 2005), che giocano un ruolo importante nella patogenesi della RAO. Le DCs, in risposta a stimoli patogeni, espongono molecole co-stimolatrici (CD80 and CD86), che a loro volta stimolano l'attivazione e la differenziazione dei linfociti in Th1 o Th2 (Singh et al., 2006). La differenziazione linfocitaria, è stimolata sia nelle reazioni di tipo allergico, che nelle infezioni batteriche polmonari.

Il ruolo della reazione di ipersensibilità allergica nello sviluppo della RAO non è ancora stato elucidato. Negli ultimi anni un numero sempre maggiore di studi ha identificato le citochine Th2-specifiche come i principali mediatori coinvolti nell'allergia e nell'asma umano (Kupperman et al., 2002; Ngoc et al., 2005). In particolare, IL-4, IL-13 e IL-5 sono responsabili della produzione di

IgE da parte dei linfociti B nonché dell' attivazione e reclutamento degli eosinofili. Inoltre, sebbene la risposta di tipo allergico sia caratterizzata da una componente Th2 dominante, è stato recentemente riportato che la citochina Th1-specifica $INF\gamma$ sembrerebbe concorrere con le citochine Th2 nel mantenimento della risposta infiammatoria cronica nelle patologie allergiche delle vie aeree (Ngoc, 2005).

Nel presente lavoro si è cercato di esplorare il potenziale coinvolgimento della componente allergica nello sviluppo della RAO tramite l'osservazione della presenza di infiltrato eosinofilo e l'analisi dell'espressione genica di IL-13 ed $INF\gamma$ nel BAL. Nessuna differenza né nella percentuale di eosinofili né nei livelli di espressione di IL-13 è stata osservata confrontando i cavalli affetti da RAO e gli esemplari sani, mentre un aumento di espressione (FC 2), sebbene non significativo, è stato riscontrato per $INF\gamma$. Queste evidenze porterebbero ad escludere una componente di tipo allergico nella RAO equina, tuttavia è possibile che questa sia coinvolta nelle prime fasi dello sviluppo della patologia piuttosto che in quella cronica. La sovra-espressione di IL-8 ed $INF\gamma$ e la lieve differenza di espressione di IL-13 tra i cavalli affetti da RAO ed i soggetti sani, suggeriscono infatti che la popolazione RAO nel nostro studio sia in uno stadio cronico della malattia piuttosto che in una fase precoce. Questa ipotesi è supportata anche da quanto riportato da Horohov e collaboratori, (Horohov et al., 2005), i quali hanno dimostrato che i cavalli nella fase precoce di RAO mostrano un aumento della produzione di IL-4 ed IL-13, mentre, successivamente ad un'esposizione prolungata agli allergeni, tale risposta entra in una fase cronica caratterizzata da un aumento della produzione di IL-8 ed $INF\gamma$.

Inoltre, è stato riportato che anche TGF- β 1 viene coinvolto nello stadio avanzato della RAO. Tale molecola induce la proliferazione dei fibroblasti e delle cellule della muscolatura liscia delle vie aeree nonché la deposizione di matrice extracellulare, essa quindi potrebbe essere coinvolta nel meccanismo che sta alla base della fibrosi peri-bronchiale e peri-bronchiolare che caratterizza le malattie respiratorie a carattere cronico (Barnes, 2008). I neutrofili rilasciano TGF- β 1, che a sua volta attiva i fibroblasti coinvolti nel meccanismo che sfocia nella fibrosi tissutale. L'espressione di

TGF- β 1 nel liquido da BAL, la percentuale di neutrofili, il grado di ipersecrezione mucosa, la frequenza respiratoria ed il punteggio attribuito alle biopsie, correlano positivamente e significativamente. Inoltre, nel presente studio, è stata evidenziata anche una relazione significativa ($p=0.01$) tra l'espressione di IL-8 e di TGF- β 1.

Per concludere, sei dei dieci geni immuno-correlati indagati nel presente studio si sono dimostrati differenzialmente espressi tra la popolazione RAO studiata ed il gruppo di controllo.

Tutti i geni differenzialmente espressi sono coinvolti nei meccanismi che conducono alle alterazioni patologiche delle vie respiratorie nei cavalli affetti da RAO, come nei pazienti umani affetti da asma o COPD.

In modo particolare, essi sono coinvolti, sia nel meccanismo che sta alla base dell'aumento del numero delle cellule neutrofiliche nelle vie aeree, sia nel meccanismo fibrotico che caratterizza le affezioni respiratorie croniche umane ed equine, oltre che nell'attivazione di vie di trascrizione che sottendono all'espressione di numerose altre citochine pro-infiammatorie.

Sebbene il ruolo delle molecole incluse nello studio nella patogenesi di RAO sia stato confermato dalle validazioni statistiche, sono necessarie ulteriori indagini allo scopo di comprendere i complessi meccanismi immunologici coinvolti nello sviluppo della patologia respiratoria cronica ricorrente del cavallo.

CAPITOLO 4

ANALISI DEI PROFILI DI ESPRESSIONE

DELL'IMMUNOTRASCRIPTOMA NELL'ALBERO RESPIRATORIO IN

CORSO DI IAD E RAO

4.1. INTRODUZIONE

Tra le patologie respiratorie su base infiammatoria che colpiscono gli equini, acquistano un ruolo di notevole importanza l'*Inflammatory Airway Disease* (IAD) e la *Recurrent Airway Obstruction* (RAO).

La IAD è una patologia su base infiammatoria acuta che colpisce prevalentemente cavalli giovani, fino ai 6-8 anni di età e non è caratterizzata da prevalenza di incidenza legata al sesso. I cavalli affetti da IAD evidenziano riduzione delle performance atletiche associate a difficoltà respiratorie durante lo sforzo fisico, scolo nasale e tosse. Nel corso di tale patologia, l'infiammazione a carico delle vie aeree profonde può essere caratterizzata da infiltrato neutrofilico (Wood et al., 2005; Burrell et al., 1996), generalmente ad eziologia batterica, o infiltrato costituito prevalentemente da mastociti, che suggerisce l'instaurarsi di una risposta di tipo allergico (Beekman et al., 2012). Tra i fattori predisponenti, acquistano maggior importanza il tipo di stabulazione, che potrebbe promuovere la presenza di polveri allergizzanti o di contaminati microbiologici, ed il contatto con altri cavalli affetti dalla medesima patologia (Sweeney et al., 1992; Hoffman et al., 1995; Christley et al., 2001; Holcombe et al., 2001).

Poiché la IAD rappresenta una patologia di grande interesse veterinario ed economico, da molti anni numerosi studi si sono posti l'obiettivo di definire le caratteristiche salienti di tale malattia, soffermandosi però maggiormente sugli aspetti clinici, endoscopici, citologici e sui risultati dei test di funzionalità polmonare (Farrow et al., 1981; Mazan et al., 2003; Vrins et al., 1991; Bedenice et al., 2008; Couetil et al., 200). Solo negli ultimi anni sono stati condotti studi di valutazione dei profili di espressione di alcuni geni immuno-correlati nel liquido di lavaggio bronco-alveolare (BAL) ottenuto da cavalli affetti da IAD allo scopo di individuare i meccanismi immunologici alla base della risposta infiammatoria acuta caratteristica di questa patologia. I risultati di tali studi sono, però, altamente controversi in quanto differenze di espressione osservate per diversi trascritti, tra cui citochine e chemochine quali IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, TNF α ed IL-17, non trovano conferma univoca nei diversi lavori. Un'unica eccezione è data da IL-1 β , la cui sovra-espressione in

corso di IAD, è stata provata da diversi autori (Burrell et al., 1996; Beekman et al., 2012; Lavoie et al., 2011).

Questa disomogeneità di risultati potrebbe essere determinata da molti fattori, tra cui le diverse fasi della patologia in cui sono stati effettuati i campionamenti, la mancata differenziazione citologica dell'infiltrato infiammatorio delle vie aeree, la mancata comparazione con esami microbiologici o le differenze individuo-specifiche.

Infatti, come detto poc'anzi, alcuni cavalli affetti da IAD, sono caratterizzati da una maggiore presenza di mastociti nelle vie aeree, altri da neutrofili, ed in alcuni casi si può verificare la copresenza di entrambi i tipi cellulari in percentuali molto simili. Studi precedenti hanno dimostrato una differenza di segni clinici tra i cavalli caratterizzati da infiltrato mastocitario, neutrofilico, od eosinofilo (anomalo), suggerendo un coinvolgimento di diversi mediatori infiammatori in relazione al fenotipo. Inoltre, a dispetto della flogosi mastocitaria ed eosinofila, solo l'infiltrato neutrofilico sembra essere statisticamente correlato con la tosse (Bedenice et al., 2008; Hoffman et al., 1998; Hare et al., 1998).

L'unico studio (Beekman et al., 2012) che abbia considerato come due gruppi distinti i cavalli caratterizzati da infiltrato mastocitario e quelli aventi infiltrato neutrofilico a carico delle vie aeree, ha riscontrato una differenza di espressione solo a carico di IL-17 ed IL-4 tra le due popolazioni, sebbene sia stato indagato un totale di 10 geni.

Le valutazioni cliniche, e la analisi citologiche, i rari studi sulle alterazioni microbiologiche associate all'insorgenza della malattia, e le analisi di espressione di un limitato numero di geni non hanno finora, permesso di far luce sui meccanismi immunologici che sottendono allo sviluppo della IAD. Si è reso perciò necessario uno studio più ampio e approfondito in grado di esaminare con completezza i diversi meccanismi molecolari alla base della risposta immunitaria sia innata che acquisita e che cerchi allo stesso tempo di mettere in relazione tali meccanismi con i parametri clinici fino ad oggi considerati.

La RAO è una patologia respiratoria su base infiammatoria cronica che colpisce cavalli adulti senza alcuna predisposizione legata al sesso. Si tratta di una malattia altamente diffusa in tutto il mondo caratterizzata sia da predisposizione genetica (House, 2010), che da un coinvolgimento di fattori di tipo ambientale (Ramseyer et al., 2007). I cavalli affetti da RAO sviluppano broncocostrizione, infiammazione neutrofilica delle vie aeree ed ipersensibilità del tratto respiratorio associato ad ipersecrezione mucosa e, nei casi più gravi, ad edema tracheale e bronchiale. Da un punto di vista clinico, essi sono caratterizzati da scolo nasale, aumento della frequenza respiratoria a riposo, tosse cronica ed intolleranza all'esercizio.

L'infiammazione cronica e l'ostruzione delle vie aeree, tipiche di RAO, hanno molte similitudini con le alterazioni del tratto respiratorio nell'uomo in corso di asma, suggerendo la potenziale attivazione di meccanismi immunologici comuni.

Sebbene alcuni studi, condotti sulla RAO (Ainsworth et al., 2003), abbiano evidenziato un aumento dei livelli di mRNA di citochine Th1 specifiche, altri (Horohov et al., 2005) riportano un'attivazione della risposta Th2 caratterizzata dalla sintesi di mRNA di IL-4 e IL-13 nelle cellule del BAL.

Tale differenza di risultati, potrebbe essere determinata sia dalle differenze individuo-specifiche, che dal campionamento eseguito in diversi stadi della malattia (MacNamara et al., 1990).

Inoltre, numerose ricerche (Riihimaki et al., 2008; Berndt et al., 2007), hanno evidenziato un aumento dei livelli di espressione di IL-8 sia nel sedimento ottenuto dal BAL che nelle cellule epiteliali del tessuto respiratorio.

Oltre ad un coinvolgimento di numerosi fattori di trascrizione nella modulazione dell'espressione di citochine infiammatorie in corso di RAO (NF- κ B, CREB, AP-1) (Sweeney et al., 1992; Hoffman et al., 1995; Saunders et al., 2001; Couetil et al., 2006), è stato dimostrato anche l'aumento dell'espressione di alcuni recettori transmembrana, come Toll-like receptor 4 (Kunzle et al., 2007; Moran et al., 2001; Franchini et al., 2000).

Quindi, le conoscenze ad oggi, suggeriscono che la componente infiammatoria di RAO risulta da un contributo sia della risposta immunitaria innata che adattativa, che sfociano in una reazione di ipersensibilità di tipo I e tipo III con un aumento dell'espressione sia di citochine Th1 che Th2.

Il meccanismo per cui, in corso di RAO, si sviluppa la risposta infiammatoria sembra essere un processo multifattoriale, e sono necessarie maggiori informazioni per meglio definire la sequenza di eventi che sfociano nello sviluppo dell'infiammazione cronica delle vie aeree.

E' chiaro, infatti, che l'analisi dell'espressione di singoli trascritti *target*, non permetta di avere una visione ampia e completa dei processi biologici e dei *pathway* regolati in tali patologie. Di conseguenza, maggiori informazioni potrebbero essere raccolte utilizzando approcci volti alla valutazione degli effetti di tali patologie sul trascrittoma, o più specificatamente sull'immuno-trascrittoma, della specie di interesse.

L'uso della tecnologia microarray, permette di valutare contemporaneamente il livello trascrizionale di numerosi geni presenti nel genoma e quindi di valutare l'effetto di farmaci su *target* specifici, di individuare nuovi *pattern* trascrizionali, di classificare a livello molecolare le patologie e di individuare nuovi marcatori a valenza diagnostica e/o prognostica.

La miriade di applicazioni e le sfide sperimentali ad esse connesse, sono state ampiamente documentate in medicina umana (Butte, 2002; Staudt et al., 2001; Staudt et al., 2000; Stoughton et al., 2004). Una delle caratteristiche maggiormente importanti degli esperimenti sviluppati con l'ausilio dei microarray, è che essi sfociano nella scoperta di innovative informazioni riguardo l'espressione genica caratterizzante diverse malattie (Rolph et al., 2006).

Numerosi studi hanno sfruttato tale tecnologia per lo studio delle patologie respiratorie. In particolare, in uno studio del 2007 è stata comparata l'espressione genica in *brushing* epiteliali bronchiali di soggetti asmatici prima e dopo il trattamento con corticosteroidi, evidenziando l'effetto inibitorio dei corticosteroidi su alcuni geni caratterizzanti tali pazienti, come *Chloride Channel*, *Calcium-Activated, family member 1* (CLCA1), *Periostin*, *Serine Peptidase Inhibitor*, *clade B member 2* (SERPINB2) e *FK506-binding protein 51* (FKBP51) (Woodruff et al., 2007).

I meccanismi immunologici alla base di malattie respiratorie croniche umane sono stati inoltre valutati mediante l'analisi microarray in modelli animali (tessuto polmonare di topi), in cui lo sviluppo iatrogeno della malattia fosse comparabile alla sintomatologia respiratoria umana (Kim et al., 2008).

Fino ad oggi tale tecnologia è stata molto meno utilizzata nell'ambito della medicina veterinaria. In particolar modo nello studio delle patologie che colpiscono il cavallo, essa è stata applicata solo per la valutazione dell'espressione genica nelle alterazioni di tipo ortopedico (Gu et al., 2004; Smith et al., 2004; Zachos et al., 2006).

L'unico studio pioniere per la valutazione dell'applicabilità del microarray alle malattie respiratorie del cavallo è stato condotto da Ramery e collaboratori (Ramery et al., 2008), che hanno utilizzato un *gene chip* umano per la valutazione della differenza di espressione genica nel BAL e nel sangue periferico di cavalli affetti da RAO in comparazione a soggetti sani. In tale studio sono stati identificati solo 3 geni sovraespressi e 10 sottoespressi nel sedimento ottenuto da BAL di cavalli affetti da RAO, rispetto al gruppo di controllo, e ciò ha condotto gli autori a concludere che la valutazione dei profili di espressione genica nel cavallo affetto da RAO non possa essere ottenuta mediante l'utilizzo di una piattaforma microarray disegnata per l'uomo. Il nostro studio ha previsto l'utilizzo di un oligo-DNA-microarray specifico per il cavallo, costruito selezionando circa 7000 geni immuno-correlati equini scelti sia sulla base di dati di letteratura nell'ambito di patologie respiratorie equine ed umane sia includendo i trascritti presenti in microarray immuno-specifici precedentemente disegnati per altre specie. E' stato dunque valutato, per la prima volta, il profilo di espressione dell'immuno-trascrittoma di cavallo nel liquido di lavaggio broncoalveolare sia di cavalli affetti da RAO che da IAD ed i risultati ottenuti sono stati comparati con valutazioni cliniche, endoscopiche, citologiche e microbiologiche. Ciò ha permesso di approfondire i meccanismi immunologici che sottendono allo sviluppo di tali patologie e di valutare eventuali correlazioni con le analisi condotte quotidianamente in ippatria.

4.2.MATERIALI E METODI

4.2.1. ANIMALI INCLUSI NELLO STUDIO

Il presente lavoro è stato sviluppato campionando un totale di 54 soggetti, tra cui: 8 cavalli trottatori clinicamente sani di età 6 ± 1 anni, costituenti il gruppo di controllo, 20 affetti da RAO di età 12 ± 1 anni, di cui 10 trottatori e 10 soggetti da sella, ed infine 26 cavalli affetti da IAD di età 6 ± 1 anni, di cui 13 trottatori e 10 soggetti da sella. I cavalli sono stati destinati ad uno dei tre gruppi conseguentemente alla determinazione del loro stato clinico (capitolo 4.2.2.).

Tutti i cavalli affetti da patologia respiratoria inclusi nello studio sono stati sottoposti a terapia farmacologica per via sistemica o mediante aerosol. La terapia è stata effettuata per un totale di 15 giorni somministrando ceftiofur sodico (2.2 mg/kg BID IV, 2.2 mg/kg SID aerosol) ed acetilcisteina (5mg/kg BID IV, 1g/capo BID aerosol) (Lekeux, 2001; Robinson et al., 2003).

Sui cavalli affetti da malattia respiratoria (sia RAO che IAD) i campionamenti sono stati eseguiti al tempo 0 (T0), cioè nel momento in cui veniva presentato il caso clinico, ed al tempo 1 (T1) al termine della terapia farmacologica.

Nell'arco del tempo intercorso tra i due campionamenti, nessuno dei soggetti è stato sottoposto ad ulteriori visite cliniche e/o endoscopiche.

4.2.2. ESAME CLINICO

Tutti i cavalli inclusi nello studio, sono stati sottoposti a visita clinica da parte del medesimo veterinario, come suggerito da Couetil (Couetil et al., 2007). Lo stato clinico è stato determinato considerando diversi parametri, tra cui: frequenza cardiaca, frequenza respiratoria (Van Erck et al., 2005), murmure vescicolare, ed endoscopia delle vie aeree superficiali e profonde successivamente a sedazione (xylazina 1.1 mg/kg).

I cavalli su cui sono state evidenziate aumento della frequenza respiratoria a riposo, *wheezes* all'auscultazione, tosse, scolo nasale ed alterazioni all'esame endoscopico, accompagnate da

anamnesi remota di patologia respiratoria cronica, sono stati inclusi nel gruppo RAO, mentre i soggetti caratterizzati da anamnesi di riduzione delle performance sportive, alterazione del murmure vescicolare apprezzata con l'ausilio della *re-breathing bag*, ipersecrezione mucosa all'esame endoscopico ed esame citologico caratterizzato da flogosi neutrofilica, sono stati inclusi nel gruppo IAD.

Durante l'esame endoscopico, a ciascun cavallo è stato assegnato un punteggio al grado di iperemia ed ipersecrezione mucosa presenti nel lume tracheale e nella porzione esplorabile dei bronchi principali (Gerber et al., 2004). Nei cavalli affetti da RAO e IAD, tutte le valutazioni incluse nello studio, sono state ripetute due volte nell'arco di 15 giorni.

4.2.3. LAVAGGIO BRONCO-ALVEOLARE (BAL)

Il lavaggio bronco alveolare (BAL) è stato eseguito instillando a livello della biforcazione tracheale, attraverso il canale accessorio sterile dell'endoscopio, 90 ml di soluzione fisiologica sterile associati a 30 ml di lidocaina al 2%. Il fluido così ottenuto è stato filtrato attraverso una garza sterile e distinto in tre aliquote destinate all'esame batteriologico, citologico ed alla valutazione dei profili di espressione genica mediante oligo-DNA microarray. La prima aliquota è stata centrifugata a 2500 rpm per 10 minuti. Il sedimento così ottenuto è stato immerso in un millilitro di *RNAlater*[®] (Ambion), mantenuto per una notte a +4° C e poi stoccato a -20° C fino all'estrazione dell'RNA totale.

Per l'esame batteriologico, 20 µl della soluzione di lavaggio sono stati equamente divisi in due aliquote ed aggiunti sia al terreno McConkey Agar che Agar sangue, incubati a 37° C ±1° C per 24 ore. Inoltre, 100 µl del fluido da BAL, sono stati aggiunti ad un brodo di arricchimento ed incubati a 37±1° C° per 24 ore. Le colonie batteriche cresciute in questo ultimo terreno, sono state successivamente trasferite in agar sangue ed incubate a 37±1° C per 24-48 ore per la caratterizzazione.

La terza aliquota di fluido è stata usata per le preparazioni citologiche. In un primo momento, sono stati eseguiti gli strisci con il BAL tal quale, successivamente, ne sono stati centrifugati 5 ml a 1500 rpm per 10 minuti e, con il sedimento così ottenuto, sono stati preparati degli strisci da centrifugato. Tutti i preparati sono stati colorati con *May-Grünwald Giemsa*. Oltre alla valutazione del tipo di infiltrato infiammatorio presente, di eventuali alterazioni cellulari, e della presenza/assenza di microrganismi, è stata eseguita una conta cellulare differenziale tenendo in considerazione un totale di 200 cellule a preparato.

La conta cellulare differenziale, in associazione ai risultati dell'esame batteriologico, hanno permesso di confermare che i cavalli considerati patologici dai segni clinici erano effettivamente affetti da RAO o IAD.

4.2.4. ESTRAZIONE DELL' RNA TOTALE

L'estrazione dell'RNA totale dalle cellule da BAL, è stato eseguito utilizzando il *Qiagen RNeasy[®] Mini Kit* (Qiagen Inc.), in accordo con le istruzioni riportate nel manuale per l'estrazione dell'RNA totale da cellule animali.

Tutti i campioni di RNA sono stati digeriti con DNAsi durante l'estrazione allo scopo di eliminare possibili contaminazioni da DNA genomico presenti nel campione. Per ciascun campione, è stata determinata la concentrazione di RNA mediante lo spettrofotometro UV-Vis, *NanoDrop[®] ND-1000* (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA).

4.2.5. ANALISI QUALITATIVA DELL'RNA ESTRATTO

L'RNA estratto è stato sottoposto a controllo qualitativo mediante elettroforesi capillare grazie allo strumento *Agilent 2.100 Bioanalyzer System* (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Tale analisi si è resa necessaria, data l'elevata sensibilità della metodica oligo-DNA-microarray, per evitare potenziali *bias* dovuti ad una scarsa qualità dell'RNA.

Considerando le concentrazioni degli RNA estratti da BAL, sono stati utilizzati *Agilent RNA 6000 Pico chip*, chip con elevata sensibilità che permettono quindi l'ottenimento di dati maggiormente attendibili sulla qualità dell'acido nucleico anche a basse concentrazioni.

Al termine dell'analisi lo strumento restituisce, per ciascun campione, un'elettroferogramma ed un *RNA Integrity Number* (RIN) che corrisponde alla qualità dei campioni processati.

Si riportano di seguito alcuni esempi di elettroferogrammi (Fig. 10).

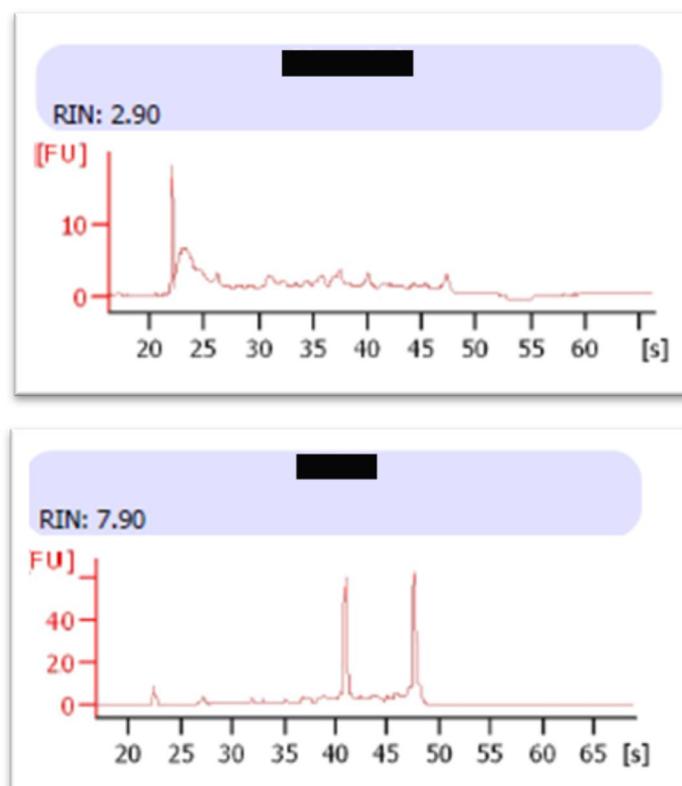


Figura 10 : In alto, grafico elettroforetico ottenuto sottoponendo un RNA degradato allo strumento Bioanalyzer, a tale RNA è stato attribuito RIN 2.9; In basso grafico elettroforetico ottenuto sottoponendo un RNA di buona qualità allo strumento Bioanalyzer, a tale RNA è stato attribuito RIN 7.9.

Solo i campioni che avessero presentato $RIN \geq 6.5$ sono stati sottoposti all'analisi mediante microarray.

4.2.6. SELEZIONE DEI GENI PER IL DISEGNO DELLA PIATTAFORMA MICROARRAY

Il processo di selezione dei geni per la progettazione di una piattaforma microarray focalizzata sui geni del sistema immunitario e della mucosa è descritto in Figura 11. Brevemente, sono stati integrati 3 diversi approcci: i) sono stati selezionati i geni inclusi in 3 diversi "immuno- e mucosal-chip" depositati nel database pubblico GEO (*Gene Expression Omnibus*): *Rat Immuno Microarray* (GPL9092), *Ruminant Immuno-inflammatory Array* (GPL6954) e *Mouse mucosal/immuno* (GPL1072); ii) è stata raccolta la lista *ImmPort's (Comprehensive List of Immune-Related Genes*, 5378 geni non ridondanti) dei geni coinvolti nella risposta immunitaria dell'uomo; iii) per aumentare ulteriormente il numero di trascritti, è stata condotta una ricerca bibliografica per individuare tutti i geni studiati fin'ora nelle alterazioni respiratorie equine ed umane. La combinazione dei tre approcci ha permesso di ottenere, una volta eliminate le voci ridondanti, una lista di 11297 *gene symbols*, per i quali è stato quindi necessario ottenere le sequenze dei trascritti equini corrispondenti.

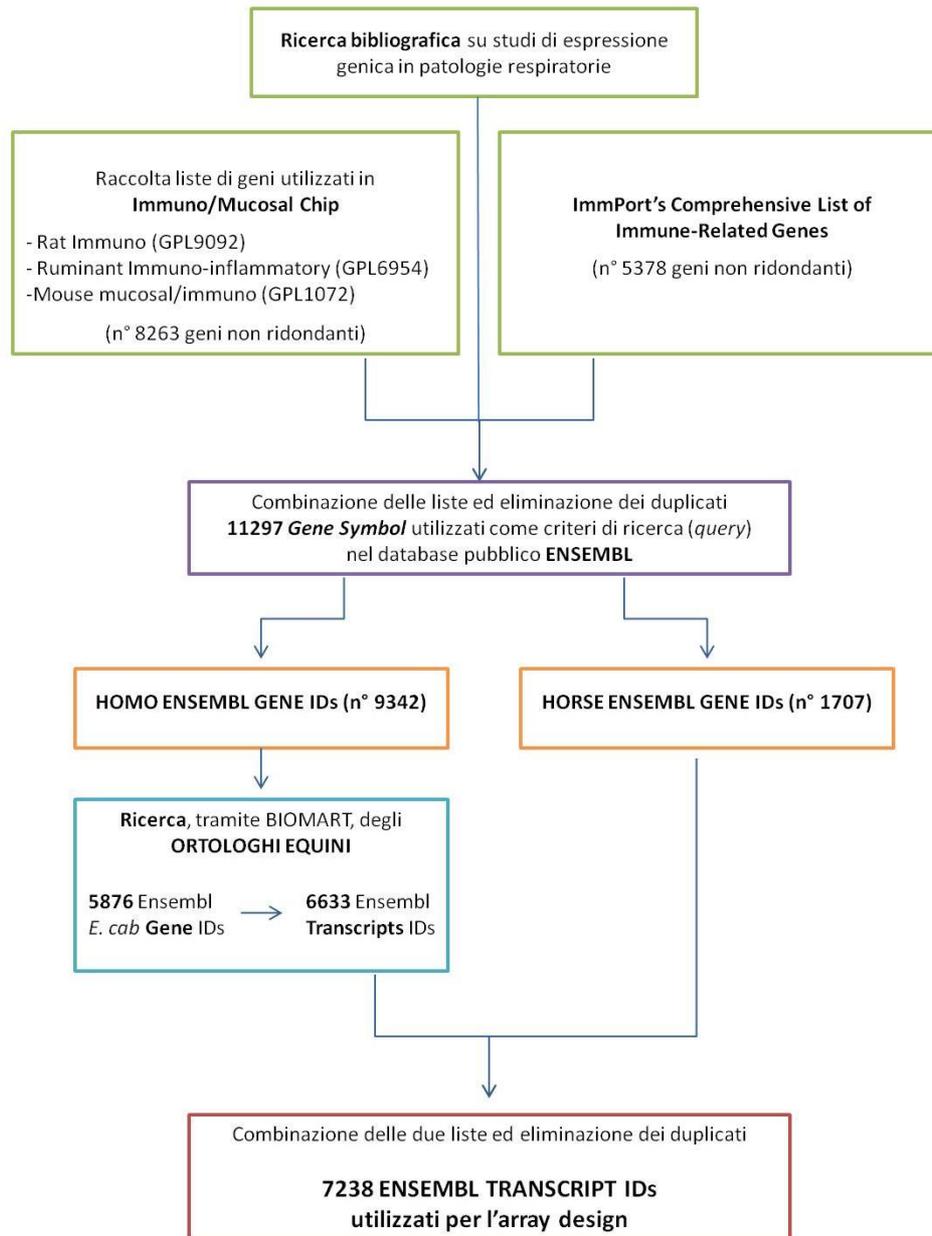


Figura 11: Rappresentazione schematica dell'approccio utilizzato per la selezione dei trascritti di *Equus caballus* da includere nella piattaforma microarray.

Il totale dei *gene symbols* selezionato, è stato quindi utilizzato come *query* nel database pubblico *Ensembl* (<http://www.ensembl.org/index.html>), che include i genomi ed i trascrittomi delle specie sequenziate ad oggi, allo scopo di identificare i trascritti equini corrispondenti. Due ricerche parallele sono state effettuate tramite lo strumento BIOMART: i) ricerca diretta dei *Gene IDs* di *Equus caballus* e ii) ricerca dei *Gene IDs* di *Homo sapiens*.

Tale software ha permesso di identificare un totale di 1707 *Gene IDs* di *Equus caballus* e di 9342 *Gene IDs* di *Homo sapiens*.

I 9342 *Gene IDs* umani sono stati utilizzati, sempre tramite BIOMART, allo scopo di risalire ai rispettivi ortologi equini considerando solo i geni che mostrassero una identità di sequenza uomo-cavallo $\geq 30\%$. Questo approccio ha permesso di risalire a 5876 *gene ID* di cavallo, i cui trascritti corrispondenti sono risultati essere 6633. L'aggiunta dei 1707 *gene IDs* identificati in precedenza e l'eliminazione dei ridondanti ha infine permesso di ottenere un numero totale di 7238 *transcript IDs* di cavallo utilizzati per il disegno delle sonde

Un totale di 7238 sonde (60-meri) sono state disegnate tramite il software *eArray* e sintetizzate in doppio mediante la tecnologia *SurePrint* (Agilent) in modo da ottenere un microarray di formato 8 x 15k.

4.2.7. AMPLIFICAZIONE DELL'RNA, MARCATURA ED IBRIDAZIONE

Nel presente studio, per la marcatura e l'ibridazione di ciascun campione di RNA totale, è stato seguito il protocollo *Agilent One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis*.

Per ciascun campione, 25 ng di RNA totale sono stati amplificati e marcati con Cy3-dCTP dCTP.

Prima dell'amplificazione e della marcatura, è stata aggiunta una miscela di 10 diversi RNA virali poli-adelinati (*Agilent Spike-In Mix*), allo scopo monitorare, a posteriori, l'andamento di ciascuna fase dell'esperimento. L'RNA marcato è stato purificato mediante l'utilizzo di *Qiagen RNeasy Mini Kit*, e la concentrazione del campione e la sua attività specifica (pmol Cy3/ μ g cRNA) sono state misurate mediante lo spettrofotometro NanoDrop[®] ND-1000.

Un totale di 600 ng di cRNA marcato è stato quindi frammentato aggiungendo 5 μ l di *Blocking Agent* 10X e 1 μ l di *Fragmentation Buffer* 25X, incubato a 60°C per 30 minuti ed infine diluito aggiungendo 25 μ l di *GE Hybridization buffer* 2X.

Un volume totale di 40 μ l della soluzione di ibridazione è stato poi dispensato nel vetrino definito *gasket-slide* (Fig. 12) ed assemblato al vetrino microarray.

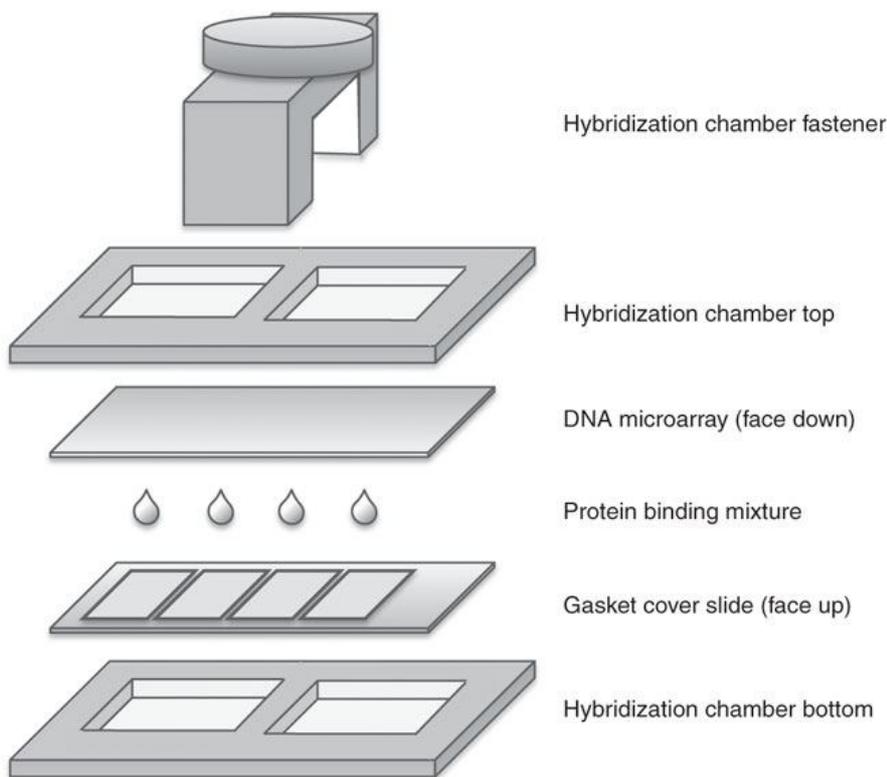


Figura 12: Immagine esplicativa delle componenti sopradescritte costituenti il complesso vetrino microarray e guarnizione-contenitore. Tratto da <http://www.nature.com/nprot/journal>.

I vetrini sono stati incubati per 17 ore a 65°C all'interno di un forno di ibridazione *Agilent*; successivamente la camera di ibridazione è stata rimossa, ed i vetrini sono stati immersi in una soluzione di lavaggio *GE Wash Buffer 1*, per facilitare il loro disassemblaggio, e poi lavati in *GE Wash Buffer 1* per circa un minuto, seguito da un ulteriore minuto in una soluzione pre-riscaldata a 37°C *over-night* di *GE Wash Buffer 2*.

Lo scanner *Agilent "G2565BA DNA microarray scanner"* è stato utilizzato per la scansione degli *array* ad una risoluzione di 5 µm; ciascuna *slide* è stata sottoposta a una duplice scansione utilizzando due diversi livelli di sensibilità del laser (XDR Hi 100% and XDR Lo 10%).

4.2.8. NORMALIZZAZIONE DEI DATI DI MICROARRAY

Le due immagini generate per ciascun vetrino dallo scanner, sono poi state analizzate tramite il software per l'analisi di immagini *Agilent Feature Extraction 9.5.1*.

Il software fornisce una serie di misurazioni per ciascuno *spot* incluso nell'array, allo scopo di valutarne la qualità e l'attendibilità. Tra questi, la voce "*glsFound*" (corrispondente a 1 se lo *spot* ha un valore di intensità significativamente superiore al *background*, altrimenti equivalente a 0) è stata utilizzata per sostituire i valori di fluorescenza delle sonde non attendibili con "NA" in sede di analisi statistica.

Tutti i campioni (controlli, IAD e RAO) sono stati normalizzati assieme in modo da evitare l'introduzione di *bias*. Allo scopo di identificare la procedura di normalizzazione migliore per il *dataset*, sono state utilizzate le intensità degli *Spike-In*. Infatti essi dovrebbero essere caratterizzati da intensità uniforme tra i diversi esperimenti del *dataset*. Nel presente studio, in base ai segnali delle sonde per gli *spike-in* tra i diversi array dopo normalizzazione, è stato scelto il metodo *cyclic loess*.

E' stato inoltre eseguito un ulteriore controllo di qualità rimuovendo tutte le sonde caratterizzate da un valore di intensità inferiore alla seconda concentrazione di *spike-in* più bassa, poiché tale valore era prossimo al limite di rivelazione della metodica. Le sonde caratterizzate da un valore di intensità <4,5 nel 70% dei campioni sono state, quindi, escluse dalle analisi statistiche. Il filtro per valori di intensità delle sonde e le procedure di normalizzazione sono state condotte mediante il software statistico R (www.r-project.org).

4.2.9. ANALISI STATISTICHE

Utilizzando la *suite* di software statistici MeV, è stata eseguita l'analisi per componenti principali (*Principal Component Analysis*) che permette di eseguire una trasformazione lineare delle variabili originarie (nel nostro caso i valori di fluorescenza forniti dallo scanner) in un sistema cartesiano tenendo conto di variabili latenti (*feature reduction*).

Allo scopo di identificare i geni differenzialmente espressi tra il gruppo di controllo ed i cavalli affetti da IAD o RAO, è stato eseguito un test non parametrico a due classi per dati non appaiati mediante il software SAM (*Significant Analysis of Microarray*). A tale scopo sono stati impostati *False Discovery Rate* (FDR) 10% e *Fold-Change* (FC) 1,5.

4.2.10. GENE SET ENRICHMENT ANALYSIS (GSEA)

Allo scopo di identificare eventuali *pathway* arricchiti in corso di IAD e RAO, è stata eseguita l'analisi di arricchimento per *set* di geni (GSEA, *Gene Sets Enrichment Analysis*) (Subramanian et al., 2005; Mootha et al., 2003).

Tale analisi consiste in un metodo di calcolo che determina se *gene set* definiti a priori dimostrano differenze statisticamente significative tra due stati biologici (ad es. fenotipi). GSEA ordina tutti i geni sulla base di differenze di espressione utilizzando una statistica basata sul rapporto segnale-rumore e questo risulta in una lista di geni sovra-espressi in cima o in fondo alla lista. Ciascun *gene set* predefinito viene confrontato con questa lista ed il software calcola se è distribuito casualmente oppure arricchito in cima o in fondo a questa "*ranked list*". Il vantaggio di questo approccio è che non viene stabilito un valore soglia per determinare i geni differenzialmente espressi ma i *gene set* vengono confrontati con l'intero *dataset* dei valori di espressione.

Le permutazioni vengono effettuate sui *gene set* e quelli che presentano un p value <0.05 ed un FDR <25% sono considerati arricchiti significativamente.

In una prima fase, sono stati selezionati i *gene set* presenti nel *Molecular Signature Database* di GSEA (*C2:curated gene sets, Canonical Pathways*) ed implicati nella risposta immunitaria (Tab 5).

Tabella 5: Elenco dei *gene set* (Canonical Pathways) immuno-correlati presenti nel database di GSEA.

CANONICAL PATHWAYS		
BIOCARTA	KEGG	REACTOME
1. IL6_PATHWAY	1. ENDOCYTOSIS	1. TRNA_AMINOACYLATION
2. IL5_PATHWAY	2. MAPK_SIGNALING_PATHWAY	2. REGULATION_OF_GENE_EXPRESSION_IN_BETA_CELLS
3. IL4_PATHWAY	3. NATURAL_KILLER_CELL_MEDIATED_CYTOTOXICITY	3. SIGNAL_AMPLIFICATION
4. IL2_PATHWAY	4. P53_SIGNALING_PATHWAY	4. SIGNAL_ATTENUATION
5. IL1R_PATHWAY	5. PPAR_SIGNALING_PATHWAY	5. SIGNALING_BY_TGF_BETA
6. GRANULOCYTES_PATHWAY	6. RNA_DEGRADATION	6. SIGNALING_BY_VEGF
7. FAS_PATHWAY	7. APOPTOSIS	7. SIGNALING_IN_IMMUNE_SYSTEM
8. EGF_PATHWAY	8. ANTIGEN_PROCESSING_AND_PRESENTATION	8. TOLL_LIKE_RECEPTOR_3_CASCADE
9. CYTOKINE_PATHWAY	9. CYTOKINE_CYTOKINE_RECEPTOR_INTERACTION	9. TOLL_LIKE_RECEPTOR_4_CASCADE
10. CTL_PATHWAY	10. COMPLEMENT_AND_COAGULATION_CASCADES	10. TOLL_LIKE_RECEPTOR_9_CASCADE
11. CASPASE_PATHWAY	11. CHEMOKINE_SIGNALING_PATHWAY	11. TRAF6_MEDIATED_INDUCION_OF_THE_ANTIVIRAL_CYTOKINE_IFN_ALPHA_BETA_CASCADE
12. B_LYMPHOCYTE_PATHWAY	12. ASTHMA	12. TOLL_RECEPTOR_CASCADES
13. TNFR1_PATHWAY	13. ARACHIDONIC_ACID_METABOLISM	13. POST_TRANSLATIONAL_PROTEIN_MODIFICATION
14. TGFB_PATHWAY	14. T_CELL_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY	14. NF_KB_IS_ACTIVATED_AND_SIGNALS_SURVIVAL
15. THELPER_PATHWAY	15. TGF_BETA_SIGNALING_PATHWAY	15. MAPK_TARGETS_NUCLEAR_EVENTS_MEDIATED_BY_MAP_KINASES
16. TH1_TH2_PATHWAY	16. TOLL_LIKE_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY	16. BY_MAP_KINASES
17. TCYTOTOXIC_PATHWAY	17. VASCULAR_SMOOTH_MUSCLE_CONTRACTION	17. INNATE_IMMUNITY_SIGNALING
18. TCRA_PATHWAY	18. VEGF_SIGNALING_PATHWAY	18. INACTIVATION_OF_APC_VIA_DIRECT_INHIBITION_OF_THE_APCOMPLEX
19. TCR_PATHWAY	19. LEUKOCYTE_TRANSENDOTHELIAL_MIGRATION	19. IMMUNOREGULATORY_INTERACTIONS_BETWEEN_A_LYMPHOID_AND_A_NON_LYMPHOID_CELL
20. TC_APOPTOSIS_PATHWAY		20. GENES_INVOLVED_IN_APOPTOTIC_CLEAVAGE_OF_CELLULAR_PROTEINS
21. STRESS_PATHWAY		21. GENE_EXPRESSION
22. RELA_PATHWAY		22. EGFR_DOWNREGULATION
23. P53_PATHWAY		23. DEATH_RECEPTOR_SIGNALLING
24. NK_CELLS_PATHWAY		24. SIGNAL_ATTENUATION
25. IL22B_PPATHWAY		25. COMPLEMENT_CASCADE
26. IL17_PATHWAY		26. CLASSICAL_ANTIBODY_MEDIATED_COMPLEMENT_ACTIVATION
27. INFLAM_PATHWAY		27. CHEMOKINE_RECEPTORS_BIND_CHEMOKINES
28. IL12_PATHWAY		28. CELL_SURFACE_INTERACTIONS_AT_THE_VASCULAR_WALL
29. LYM_PATHWAY		29. CD28_CO_STIMULATION
30. MAPK_PATHWAY		30. CASPASE_MEDIATED_CLEAVAGE_OF_CYTOSKELETAL_PROTEINS
31. IL10_PATHWAY		31. BIOLOGICAL_OXIDATIONS
32. MONOCYTE_PATHWAY		32. ACTIVATED_TAK1_MEDIATES_P38_MAPK_ACTIVATION
33. IL7_PATHWAY		
34. NFKB_PATHWAY		
35. TNFR2_PATHWAY		
36. VEGF_PATHWAY		
37. TOLL_PATHWAY		

Inoltre, sono stati creati dei nuovi *gene set*, costruiti selezionando dalla letteratura i *gene IDs* dei trascritti indagati ad oggi nelle malattie respiratorie umane ed equine, e ricercando gli *HUGO name* corrispondenti nel *database Genecards* (<http://www.genecards.org>).

Infine, sono stati utilizzati dei *gene set* arricchiti nelle principali alterazioni respiratorie umane e depositati recentemente da Chowdhary e collaboratori (Chowdhary et al., 2012), classificati con il nome della patologia corrispondente. E' stata quindi effettuata un'analisi di arricchimento tramite GSEA utilizzando i valori di espressione ottenuti nel presente studio tramite DNA-microarray ed i *gene set* relativi a bronchite, bronchiolite, bronchiectasia, asma, *Chronic Obstructive Pulmonary Disease* (COPD) ed enfisema umani. Ciò al fine di valutare un potenziale arricchimento di *pathway* comuni tra alterazioni respiratorie equine ed umane (Leclere et al., 2011).

4.3. RISULTATI

4.3.1. ESAME CLINICO E MICROBIOLOGICO

I risultati dell'esame batteriologico condotto su BAL ottenuto dai cavalli affetti da RAO inclusi nello studio, si è dimostrato negativo per tutti i soggetti.

I cavalli affetti da IAD erano caratterizzati da un' infezione comune sostenuta da *Streptococcus Zooepidemicus*, ed alcuni di essi presentavano una concomitante sovrainfezione causata da ulteriori specie batteriche (*Klebsiella spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Staphilococcus spp.*).

L'esame batteriologico condotto sul BAL eseguito sui cavalli appartenenti al gruppo di controllo, ha fornito risultato negativo.

Confrontando le due diverse patologie da un punto di vista clinico, è stata apprezzata una notevole differenza della frequenza respiratoria a riposo tra la popolazione RAO, caratterizzata da una frequenza più alta, ed il gruppo IAD. Tale differenza si è dimostrata statisticamente significativa all'analisi mediante *t Test* ($p= 0.009$).

Inoltre, i due gruppi costituiti da cavalli affetti da malattia respiratoria differivano per la quantità di muco rilevata nel lume tracheale e nella porzione esplorabile dei bronchi durante l'esame endoscopico. Infatti, i cavalli affetti da RAO erano caratterizzati da un punteggio di muco di media $3 \pm 0,7$, mentre i cavalli affetti da IAD presentavano ipersecrezione mucosa con media $2 \pm 0,9$. Tale differenza si è dimostrata statisticamente significativa ($p= 0.03$).

4.3.2. ANALISI CITOLOGICA

La valutazione citologica dei preparati di sedimento ottenuto da BAL è stata distinta in due diverse fasi: la prima rappresentata da una valutazione del tipo di flogosi presente e dall'individuazione di eventuali alterazioni cellulari o di eventuali microrganismi presenti, mentre la seconda è stata rappresentata da conta cellulare differenziale su un totale di 200 cellule infiammatorie.

La valutazione citologica ha condotto all'esclusione di un soggetto appartenente al gruppo di controllo poiché, sebbene le considerazioni cliniche ed endoscopiche non avessero rilevato alcun tipo di alterazione respiratoria nel paziente sopraindicato, esso presentava un infiltrato infiammatorio lievemente neutrofilico (neutrofili $\approx 4\%$) a carico delle vie aeree.

I cavalli affetti da RAO sono stati accumulati da flogosi neutrofilica delle vie aeree, mentre tra i cavalli affetti da IAD è stato riscontrato un caso di infiammazione prevalentemente sostenuta da mastociti (*mast cells* $> 4\%$). Tale campione è stato escluso delle successive analisi di espressione genica, allo scopo di uniformare la popolazione IAD come caratterizzata da infiltrato flogistico prevalentemente neutrofilico a livello dell' albero respiratorio.

Inoltre, dall'analisi citologica è emerso che tre dei soggetti inclusi nel gruppo IAD, in base alle valutazioni cliniche ed endoscopiche, presentavano un moderato numero di emosiderofagi o cristalli di emosiderina nel liquido di lavaggio bronco-alveolare (Fig.13).

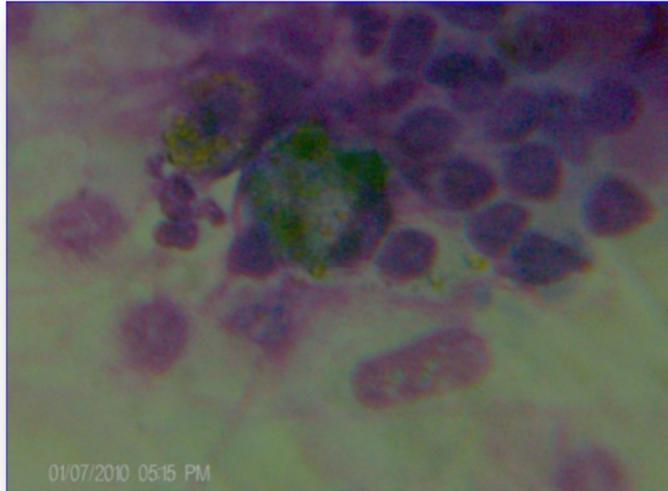


Figura 13: Emosiderofagi nel liquido da BAL di uno dei cavalli affetti da IAD.

Poiché tali caratteristiche suggeriscono l'instaurarsi di fenomeni emorragici a carico delle vie aeree profonde e quindi la potenziale co-presenza della patologia definita *Exercise Induced Pulmonary Hemorrhage* (EIPH), i cavalli caratterizzati da tali alterazioni sono stati esclusi dalle successive analisi.

I risultati della conta cellulare differenziale, dei campioni sottoposti alle successive analisi di espressione genica, sono riportati in tabella 6.

Tabella 6: Valori ottenuti dalla conta cellulare differenziale per i tre gruppi di cavalli inclusi nello studio

		Neutrofili	Macrofagi	Eosinofili	Mastociti	Linfociti
Controlli	EcS_1	0%	98,6%	0%	0%	1,4%
	EcS_2	1,5%	96,8%	0,7%	0%	1%
	EcS_3	0%	99%	0,3%	0%	0,7%
	EcS_4	0,2%	99,6%	0%	0%	0,2%
	EcS_5	2%	97,1%	0,6%	0%	0,3%
	EcS_6	0,2%	99,6%	0%	0%	0,2%
	EcS_7	0,83%	91,73%	6,61%	0%	0%
	<i>Media e D.S.</i>	<i>1 ± 0.007</i>	<i>98% ± 0.028</i>	<i>1% ± 0.025</i>	<i>0% ± 0</i>	<i>1% ± 0.005</i>
IAD	EcIAD_1	12,2%	86,3%	1%	0%	3,2%
	EcIAD_2	11,6%	85,5%	0%	0%	2,9%
	EcIAD_3	6,1%	89,8%	0%	0%	4,1%
	EcIAD_4	5,3%	89,7%	0%	0%	5%
	EcIAD_5	5,9%	91,3%	0%	0%	2,8%
	EcIAD_6	10,2%	83,9%	1%	0%	3,9%
	EcIAD_7	6,8%	88,9%	0%	0%	4,3%
	EcIAD_8	8,2%	89,7%	0%	0%	2,1%
	EcIAD_9	6,8%	91,3%	0%	0%	1,9%
	EcIAD_10	5,6%	88,8%	1,2%	0,8%	3,6%
	<i>Media e D.S.</i>	<i>7.9% ± 0.025</i>	<i>88.5% ± 0.024</i>	<i>0% ± 0.771</i>	<i>0% ± 0.002</i>	<i>3.5% ± 0.009</i>
RAO	EcRAO_1	81%	15%	1%	0%	1%
	EcRAO_2	78,50%	21,50%	0%	0%	0%
	EcRAO_3	97,43%	1,71%	0%	0%	0,86%
	EcRAO_4	92,8%	7,2%	0%	0%	0%
	EcRAO_5	86,9%	12,8%	0%	0%	0,3%
	EcRAO_6	56,2%	38,2%	3,2%	0%	3,4%
	EcRAO_7	82,6%	17,2%	0%	0%	0,2%
	EcRAO_8	98,5%	1,2%	0%	0%	0,3%
	<i>Media e D.S.</i>	<i>84% ± 0.135</i>	<i>14% ± 0.120</i>	<i>0% ± 0.011</i>	<i>0% ± 0</i>	<i>1% ± 0.011</i>

4.3.3. ANALISI DELLA QUALITA' DELL'RNA ESTRATTO

L'analisi condotta mediante Bioanalyzer ha permesso di valutare la qualità dell'RNA estratto da tutti i campioni di BAL inclusi nello studio.

Sono stati dunque esclusi dalle successive analisi mediante DNA-microarray i campioni che non possedevano $RIN \geq 6.5$.

Nello specifico, tra i soggetti affetti da RAO, sono stati esclusi 10 campioni prelevati al tempo 0, mentre nella popolazione IAD, sono stati esclusi 11 campioni ottenuti al medesimo tempo di campionamento.

Purtroppo, per alcuni soggetti sia del gruppo RAO che del gruppo IAD, l'RNA presentava un RIN ≥ 6.5 al T0 ma non al T1 (Fig. 14).

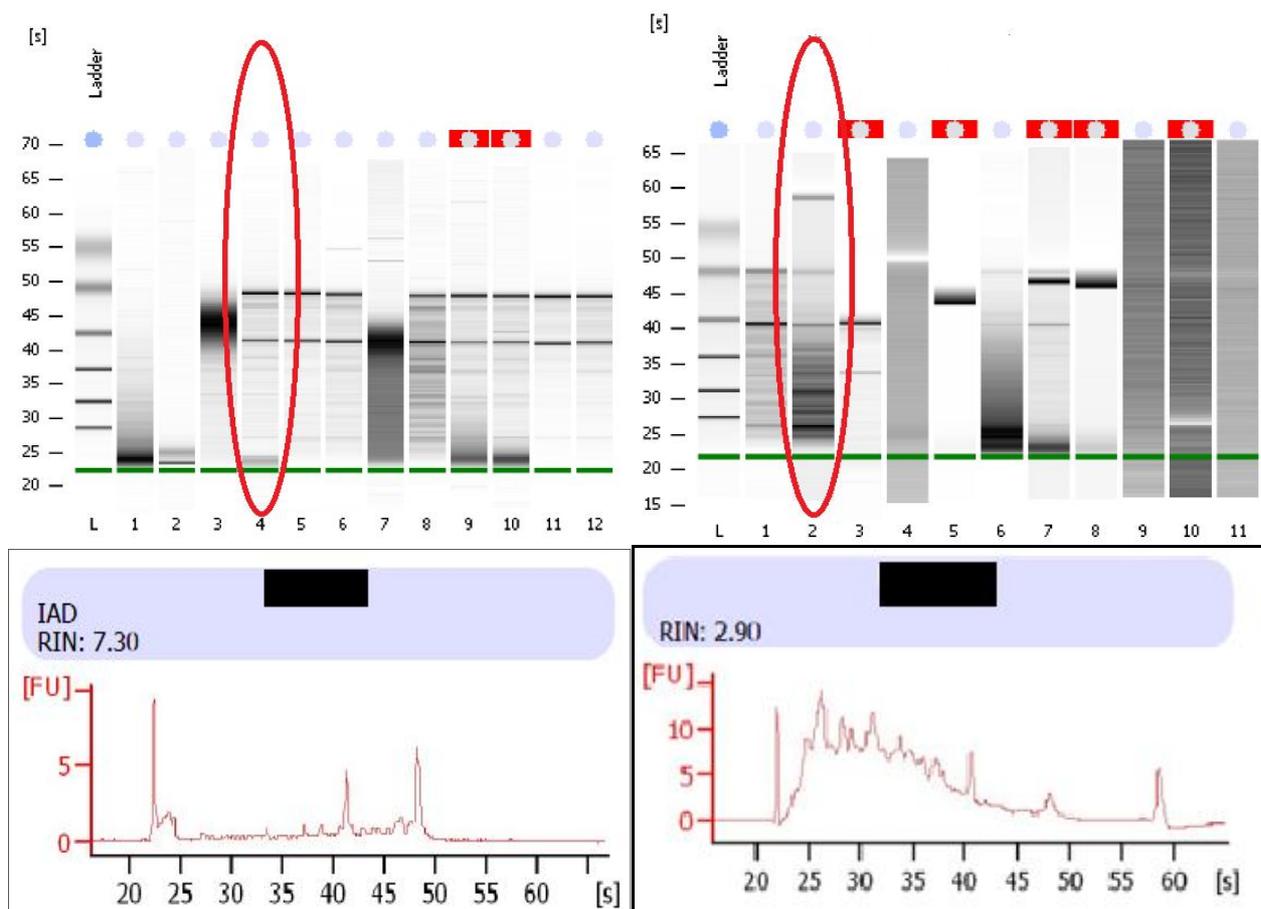


Figura 14 : Corsa (in alto) ed elettroforesi (in basso) per T0 (a sinistra) e T1 (a destra) di RNA estratto da BAL di uno stesso soggetto caratterizzato da RIN estremamente diversi tra primo e secondo campionamento.

Ciò non ha permesso di raggiungere un numero statisticamente significativo di cavalli per la valutazione dell'effetto del trattamento farmacologico sui profili di espressione genica nell'albero tracheo-bronchiale di cavalli affetti da tali patologie respiratorie.

4.3.4. ANALISI DEI PROFILI DI ESPRESSIONE GENICA MEDIANTE DNA-MICROARRAY

In totale sono stati analizzati, tramite DNA-microarray, 22 campioni di BAL provenienti da 7 cavalli sani, 8 affetti da IAD e 7 affetti da RAO.

Sono stati dunque ottenuti valori di fluorescenza per 7238 trascritti che sono stati poi normalizzati e filtrati sulla base del secondo valore di fluorescenza degli *spike* (limite di sensibilità). Questo procedimento ha permesso di eliminare 1193 trascritti.

I dati di espressione di 6045 trascritti sono stati dunque analizzati tramite PCA. Si tratta di un tipo di analisi esplorativa che permette di ridurre la multidimensionalità dei dati microarray ed, evitando assunzioni relative alla classificazione dei campioni, fornisce una rappresentazione grafica esclusivamente sulla base dei valori di espressione genica. Tale analisi ha confermato una separazione tra i gruppi di cavalli precedentemente distinti mediante valutazione clinica, endoscopica e citologica rispetto ai controlli, seppure la separazione osservata risultava meno netta per quanto riguarda il gruppo IAD nei confronti dei controlli (Fig. 15).

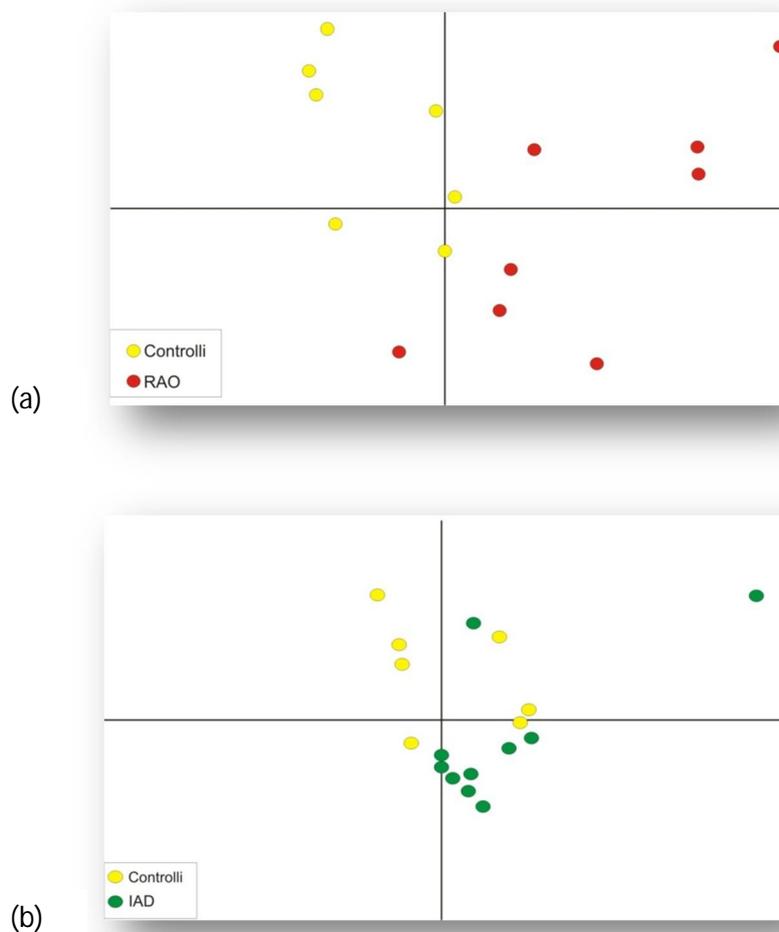


Figura 15: Output dell'analisi PCA sulla base dei valori di espressione ottenuti nell'analisi tramite microarray a) confronto tra cavalli sani (in giallo) e la popolazione RAO (in rosso); la varianza è rappresentata per il 55% dall'asse x e per l'11% dall'asse y b) confronto tra cavalli sani (in giallo) e la popolazione IAD (in verde); la varianza totale è rappresentata per il 40 % dall'asse x e per 21% dall'asse y.

Nella comparazione tra il gruppo di controllo ed i soggetti affetti da RAO, l'asse x rappresentava il 55% di varianza totale e ciò potrebbe riflettere l'effetto della patologia sui valori di espressione genica, mentre la separazione osservata lungo l'asse y, che giustificava l'11% della varianza totale, sembrerebbe suggerire che altri fattori intrinseci (quali il sesso, l'età e la razza) e/o estrinseci hanno contribuito alle differenze osservate.

Comparando invece il gruppo di controllo ed i cavalli affetti da IAD, la varianza totale veniva rappresentata per il 40% dall'asse x che quindi potrebbe spiegare l'effetto della patologia sui profili

di espressione genica e per il 21% dall'asse y che rifletterebbe l'effetto di altri fattori individuali sulla varianza osservata.

Allo scopo di esplorare la significatività statistica della separazione osservata, è stato effettuato un unpaired T test tramite il software *Significant Analysis of Microarray* (SAM). Utilizzando un *false discovery rate* (FDR) del 10% e un *fold change* (FD) di 1.5 sono state ottenute le liste di geni differenzialmente espressi tra il gruppo di controllo ed i cavalli affetti da RAO e IAD (Fig. 16).

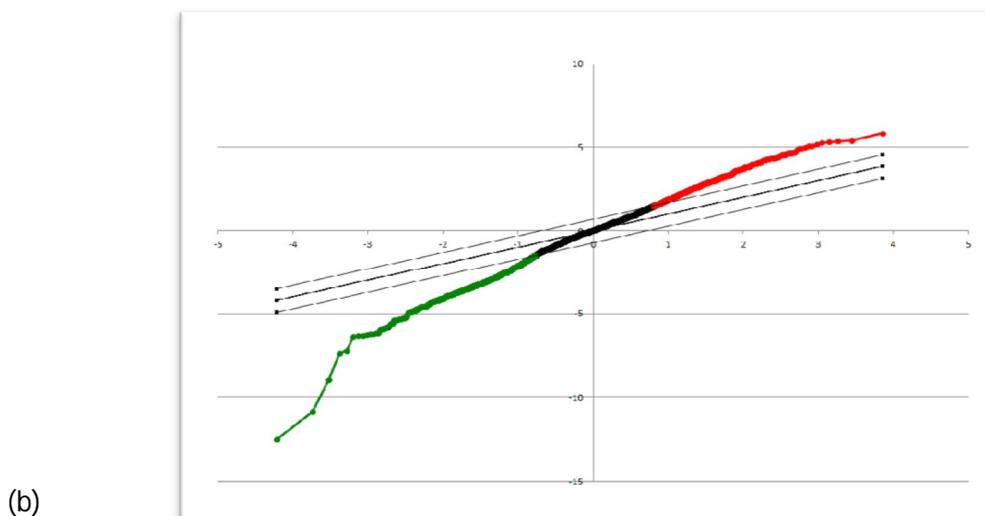
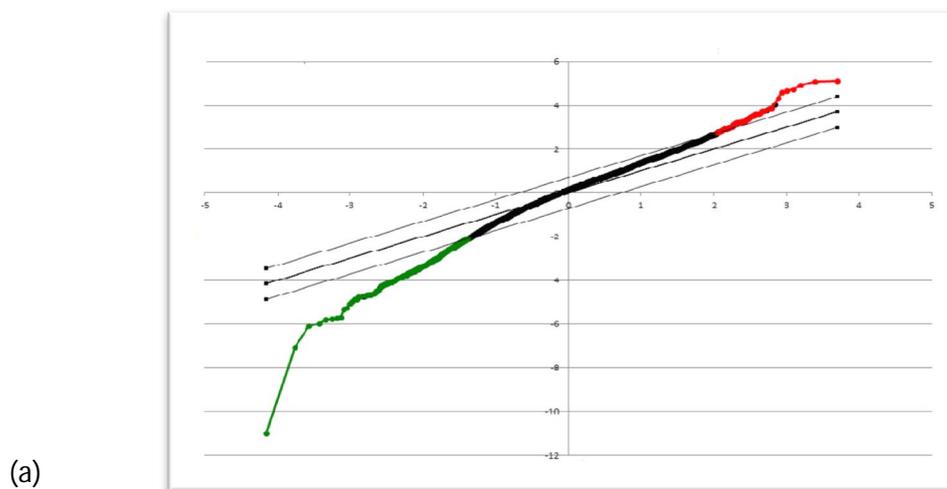


Figura 16 : *Plot* ottenuto dall' analisi SAM; a) comparazione tra soggetti sani ed affetti da RAO, b) comparazione tra i soggetti sani ed affetti da IAD. In rosso sono rappresentati i geni che risultano sovraespressi ed in verde i sottoespressi rispettivamente nel gruppo RAO o nel gruppo IAD rispetto ai controlli.

Tra il gruppo di controllo ed i cavalli affetti da RAO, sono stati evidenziati 1763 geni differenzialmente espressi. Nello specifico, 903 trascritti risultavano sovraespressi e 860 sottoespressi nei soggetti RAO rispetto ai cavalli clinicamente sani.

La comparazione tra gruppo di controllo ed i cavalli affetti da IAD invece, ha fornito un numero totale di 379 geni differenzialmente espressi, tra cui 55 sovraespressi e 324 sottoespressi nei cavalli affetti da malattia respiratoria.

Le liste dei trascritti sottoespressi e sovraespressi in IAD e RAO sono state confrontate allo scopo di evidenziare l'eventuale presenza di geni in comune tra le due patologie, utilizzando dei diagrammi di Venn (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>). Tra i trascritti sottoespressi, 248 risultavano in comune tra i due gruppi di cavalli affetti da malattia respiratoria. Mentre tra i geni sovraespressi, 29 erano comuni alle due popolazioni. I risultati di tale valutazione sono riportati in figura 17 .

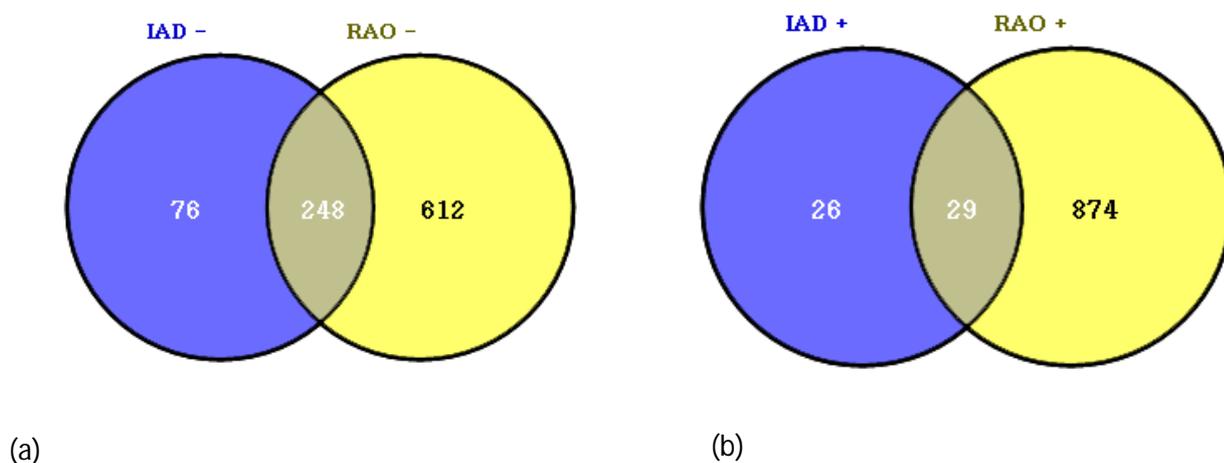


Figura 17 : Diagrammi di Venn ottenuti nel confronto delle liste di geni differenzialmente espressi rispetto ai controlli tra le due patologie a) comparazione tra geni sotto-espressi nella popolazione IAD (IAD-) e nella popolazione RAO (RAO-), b) comparazione tra i trascritti sovra-espressi nel gruppo IAD (IAD+) e nel gruppo RAO (RAO+).

4.3.5. GSEA

I risultati ottenuti tramite GSEA, utilizzando i *gene set* relativi a *pathway* coinvolti nell'immunità e disponibili nel software, hanno evidenziato che 71 degli 80 *gene set* risultavano arricchiti nei cavalli affetti da RAO rispetto al gruppo di controllo. Tra questi, 46 erano caratterizzati da un FDR < 25% ma solo 3 con p value < 0,01 e 19 con p value < 0,05

D'altra parte, per quanto riguarda la patologia IAD sono stati evidenziati 67 *gene set* arricchiti ma nessuno con un FDR < 25%.

Tra i *pathway* indagati con l'utilizzo dei *gene set* caratterizzanti le più frequenti alterazioni respiratorie umane, è stato evidenziato un arricchimento in RAO, anche se non statisticamente significativo, di quelli riconducibili ad enfisema, asma (Fig. 18) (FDR= 19,4%), bronchite e COPD (FDR= 23,7%). I medesimi *gene set* non hanno evidenziato arricchimento nella popolazione IAD.

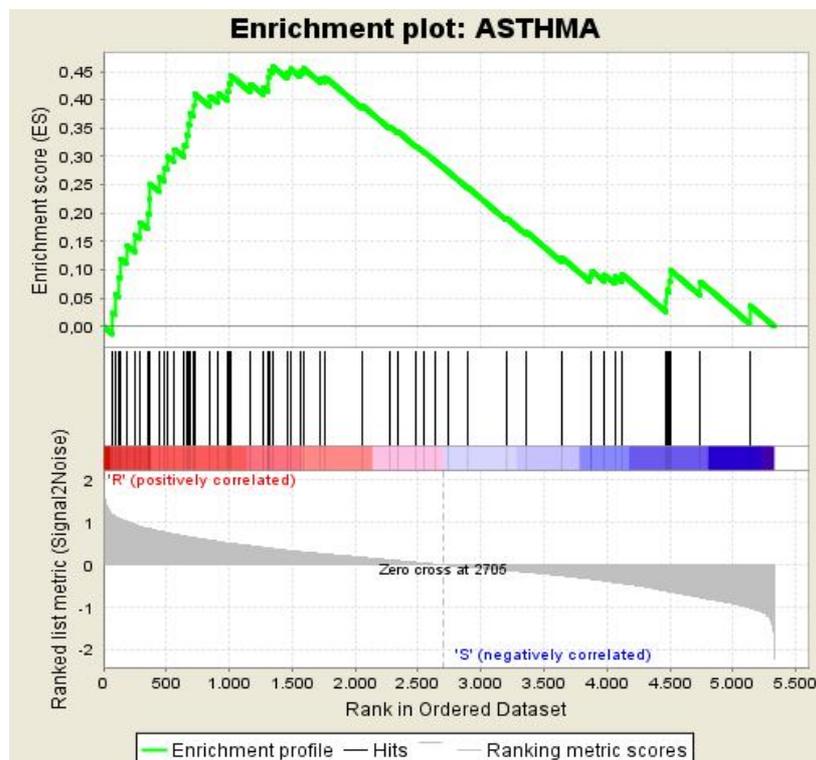


Figura 18: *Enrichment plot* relativo all'asma umano ottenuto tramite l'analisi GSEA, utilizzando i valori di fluorescenza dei controlli e dei cavalli affetti da RAO (FDR < 25%, p value 0.08).

4.4. DISCUSSIONE

Le malattie respiratorie degli equini rappresentano un argomento di notevole importanza in medicina veterinaria, poiché esse determinano un peggioramento della qualità di vita degli animali affetti da tali alterazioni e rappresentano una delle più importanti cause di perdita economica nell'industria equina.

Numerosi autori si sono posti l'obiettivo di indagare i meccanismi patogenetici alla base delle più frequenti patologie respiratorie equine, come IAD e RAO, poiché le informazioni in questo ambito sono ancora molto scarse. Questo spiega almeno in parte, lo scarso successo terapeutico dei trattamenti farmacologici applicati nella pratica ippiatrica.

Inoltre, la variabilità fenotipica che caratterizza IAD e la cronicizzazione caratteristica di RAO, limitano l'efficacia dei metodi diagnostici attuali quali la visita clinica e l'esame endoscopico. La caratterizzazione dei casi mediante l'utilizzo di metodi molecolari quali l'analisi dei profili di espressione genica potrebbe contribuire ad una maggiore accuratezza diagnostica. Ad oggi, gli studi sui profili di espressione genica sono stati condotti maggiormente sulla RAO, con un numero molto esiguo di lavori sui profili di espressione di geni immuno-correlati nella IAD (Beekman et al., 2011; Beekman et al., 2012; Correa et al., 2011; Zhang et al., 2012; Hughes et al., 2011). Inoltre, nella maggior parte di questi studi è stata utilizzata la qRT-PCR, il che ha permesso di valutare gli effetti di tali patologie solo su alcuni geni specifici, ma non di approfondire in maniera completa i *pathway* immunologici attivati nella risposta dell'individuo in corso di IAD e RAO. L'unico studio (Ramery et al., 2008) che abbia applicato in precedenza l'analisi in microarray alle patologie respiratorie equine, per la valutazione dell'espressione genica in BAL in corso di RAO, è stato condotto mediante l'utilizzo di una piattaforma array con sonde specifiche per la specie umana, la cui utilità per la valutazione delle alterazioni respiratorie equine è stata messa in discussione dagli stessi autori. Si è, infatti, evidenziata una differenza dell'espressione di soli 13 geni nel BAL di cavalli affetti da RAO, rispetto al gruppo di controllo. Di questi, 3 risultavano sovra-espressi e 10 sotto-espressi nei cavalli affetti da malattia respiratoria.

Nel presente studio è stato invece utilizzata per la prima volta una piattaforma contenente sonde disegnate su sequenze di trascritti appartenenti alla specie equina, selezionando geni immuno-correlati sulla base di informazioni disponibili per varie specie (cavallo, topo, ratto, uomo, ruminanti). Grazie a tale approccio è stato identificato un numero totale di 1763 geni differenzialmente espressi nel BAL di cavalli affetti da RAO rispetto al gruppo di controllo, tra cui 860 sottoespressi e 903 sovraespressi nei pazienti colpiti da malattia respiratoria cronica. Inoltre, sono stati identificati 379 trascritti differenzialmente espressi tra gruppo IAD e gruppo di controllo, tra di essi 55 geni si sono mostrati sovraespressi e 324 sottoespressi nei cavalli affetti da patologia respiratoria.

Poichè i trascritti indagati erano rappresentati quasi esclusivamente da geni relativi all'immunità, l'applicazione di metodiche di annotazione funzionale (es. DAVID) non ha permesso di evidenziare la presenza di specifici *pathway* arricchiti significativamente nelle due patologie rispetto ai controlli. Di conseguenza, le liste dei geni differenzialmente espressi sono state analizzate valutando singolarmente i trascritti potenzialmente significativi in termini di FC e di ruolo in malattie, respiratorie e non, di cavallo ed altre specie (Tikhmyanova et al., 2010; Johnstone et al., 2004; Kobayashi et al., 2002; Franchini et al., 2006; Rose et al., 2012; Coradini et al., 2012). Tra i geni sottoespressi in corso di IAD, acquistano particolare rilievo *Radial Spoke Head 9* (RSPH9, FC -3,3), *Intraflagellar Transport 57* (IFT57, FC-3,4), IFT74 (FC-2,9), IFT27 (FC -2,3), IFT871 (FC -2,1), IFT88 (FC-2,0) ed IFT20 (FC-1,6). Tali geni codificano per la lunghezza, la motilità e la cinesia delle cilia cellulari (Hidebrandt et al., 2009; Rosenbaum et al., 2002; Baker et al., 2003; Haycraft et al., 2003; Quarmby et al., 2005; Mahjoub et al., 2005). Una riduzione dell'espressione di tali trascritti potrebbe suggerire una riduzione della capacità di *clearance* mucociliare nell'albero respiratorio dei cavalli colpiti da IAD, determinata da una riduzione della formazione, lunghezza e movimento delle cilia presenti sulla superficie apicale delle cellule respiratorie.

Gli stessi geni, oltre ad IFT52 (FC-2,0), IFT122 (FC -3,1), IFT140 (FC -2,9), IFT 80 (FC -2,8), IFT172 (FC -2,7), *Never in Mitosis Gene Related Kinase 3* (NEK3, FC -2,23), NEK4 (FC -3,21),

NEK11 (FC -3,05), si sono dimostrati sottoespressi anche nei cavalli affetti da RAO. Il maggior numero di geni codificanti per le caratteristiche delle cilia cellulari sottoespressi in RAO rispetto a IAD, potrebbe suggerire un aggravamento della riduzione di *clearance* mucocilare nella patologia respiratoria cronica equina, rispetto a quella acuta, in accordo con la maggiore quantità di muco nel lume delle vie aeree osservata nei cavalli affetti da RAO, rispetto ai soggetti affetti da IAD.

L'accumulo di muco nelle vie aeree di cavalli affetti da RAO è una delle più importanti peculiarità di tale patologia (Schatzmann et al., 1972; Robinson et al., 1996; Dixon, 1992; Dixon et al., 1995). Tale alterazione potrebbe essere determinata sia da un aumento della secrezione di muco, che da una riduzione della *clearance* mucociliare (Gerber et al., 2000). L'effettiva alterazione della capacità di *clearance* mucocilare nei cavalli affetti da RAO rappresenta una questione controversa. Alcuni autori hanno dimostrato, mediante indagini cliniche, una riduzione della capacità di *clearance* nel corso di tale patologia (Coombs et al., 1987; Turgut et al., 1989), mentre altri non hanno identificato differenze del medesimo meccanismo, in comparazione a cavalli sani (Willoughby et al., 1991). Alla base dell'aumento della secrezione di muco sono diversi e complessi processi, che includono la regolazione dei geni MUC, la secrezione di mucine e l'iperplasia delle *globet cells* (Fig. 19) (Callaghan et al., 2001).

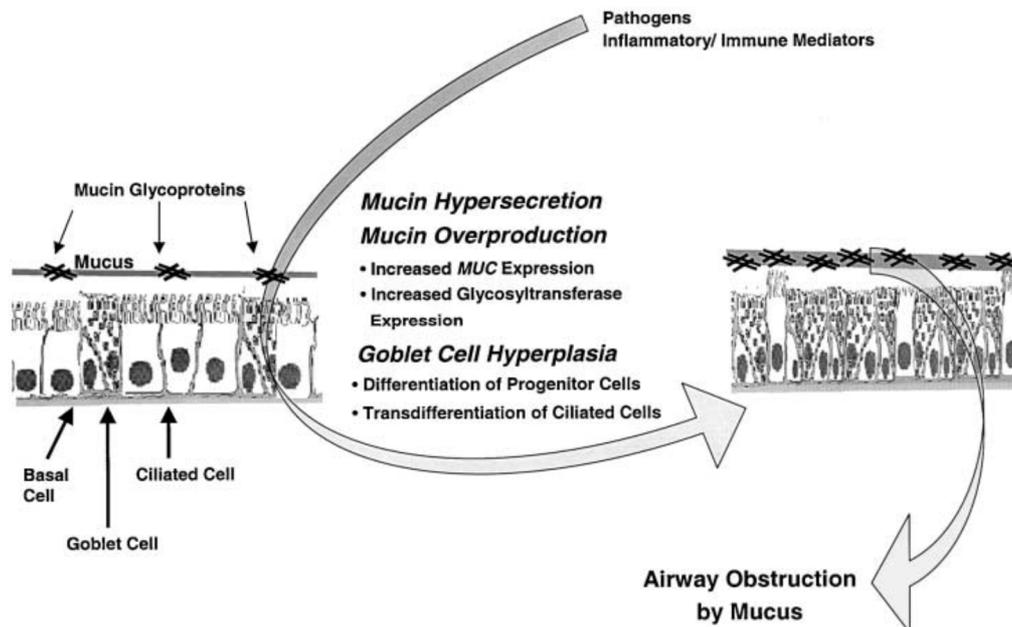


Figura 19: Processi biologici che portano all'ostruzione delle vie aeree a causa del muco. Un normale epitelio respiratorio umano (a sinistra), esposto a patogeni o ad agenti inquinanti, attiva i mediatori infiammatori e/o immunitari e può rispondere inizialmente con un'ipersecrezione di mucine da parte delle *goblet cells* o delle cellule ghiandolari della sottomucosa. L'iperproduzione di mucine è mantenuta da un aumento dell'espressione di geni MUC. Nelle condizioni croniche, si nota un'iperplasia dell'epitelio respiratorio (a destra) Tratto da "Airway Mucus Obstruction: Mucin Glycoproteins, MUC Gene Regulation and Goblet Cell Hyperplasia", Callaghan R. M., Nickola T. J., Voynow J. A., American Journal of respiratory cells and molecular biology, Vol. 25 2001

Nel presente studio, oltre ad una riduzione dell'espressione di geni coinvolti nella mobilità delle ciglia, a carico dei soggetti affetti da RAO, è stata osservata la sotto-espressione di *Mucin 1* (MUC 1, FC - 3,6), MUC 4 (FC - 3,6), e MUC 5 (FC - 4,9), geni codificanti per la produzione del film mucoproteico a livello dell'apparato respiratorio. I risultati del nostro studio suggerirebbero dunque l'ipotesi, che l'aumento patologico di muco nelle vie aeree non venga determinato da una reale ipersecrezione mucosa, ma piuttosto da una riduzione di capacità di *clearance* muco-ciliare. Come ipotesi alternativa, è possibile che la diminuzione dell'espressione di geni codificanti per le caratteristiche ciliari dell'epitelio respiratorio, sia in realtà determinata da un aumento, all'interno del campione di BAL raccolto, della popolazione di cellule dell'infiammazione a scapito di quelle di tipo epiteliale. Va infatti ricordato che l'analisi di espressione genica si riferisce a tutte le cellule presenti nel campione. Questa ipotesi tuttavia è contraddetta dal fatto che non si osserva alcuna

correlazione tra il numero di cellule epiteliali riscontrato all'esame citologico ed i valori di espressione dei trascritti in esame (*Spearman's rank correlation test*).

Nei pazienti affetti da IAD o RAO rispetto al gruppo di controllo, è stata dimostrata una riduzione dei livelli di espressione di *Serpin Peptidase Inhibitor, Clade A* (SERPINA 1), rispettivamente con FC di -3,6 e -2,3. Tale trascritto codifica per un inibitore dell'elastasi, che svolge un ruolo protettivo del tratto respiratorio profondo contro la distruzione proteolitica causata dalle elastasi leucocitarie (Papatheodorou et al., 2010; Kilty et al., 2010; Wadsworth et al., 2004; Ianbaeva et al., 2004). La riduzione dei livelli di espressione di tale trascritto nei cavalli affetti da IAD e RAO potrebbe avere un ruolo importante nel meccanismo di rimodellamento tissutale che sta alla base della fibrosi peribronchiale e peribronchiolare, tipica delle malattie respiratorie che vanno incontro a cronicizzazione.

Tra le molecole sottoesprese in entrambe le malattie, inoltre, sono state identificate *Immunoglobulin Heavy Constant Gamma 4* (IGHG4), con un FC pari a -4,9 nella patologia IAD ed a -4,6 nella RAO, ed *Immunoglobulin Lambda Constant 1* (IGLC1), sotto-espressa 3,6 volte in IAD e 2,9 volte in RAO. La riduzione dei geni codificanti per una delle due catene leggere ed una delle cinque catene pesanti, costituenti le immunoglobuline, potrebbe suggerire un deficit della risposta immunitaria locale in corso di patologia respiratoria negli equini (Oxelius et al., 2008).

La maggior parte dei trascritti sovraespressi nella patologia IAD, tra cui *K(lysine) acetyltransferase 2A* (KATA2A) con FC 2,8, *Leukocyte Receptor Cluster (LRC) member 8* (LENG 8) con FC 2,4, *Synaptojanin1* (SYNJ1) con FC 2,2, *tRNA Splicing Endonuclease 15 homolog* (TSNEN15) con FC 2,1, *Tripartite Motif Containing 23* (TRIM23) con FC 1,9, *N-acetyltransferase 10* (NAT10) con FC 1,7 ed il *Pre-mRNA Processing Factor 39 homolog* (PRPF39) con FC 1,6, viene coinvolta nei processi di metabolismo cellulare. Infatti, KATA2A è un enzima con funzione di acetilazione dei residui di lisina, LENG8, SYNJ1 ed PRPF39 sono coinvolti nella riparazione del DNA e nello *splicing* dell'RNA e TRIM23 svolge un ruolo nel trasporto delle vescicole intracitoplasmatiche (Baillat et al., 2005; Goswami et al., 2012; Shen et al., 2009; Huang et al., 2007; Malhotra et al., 80

2012). La sovra-espressione di tali trascritti potrebbe essere ricondotta all'aumento delle attività cellulari in corso di risposta infiammatoria.

Inoltre, è stato evidenziato un aumento di espressione di *Interferon-Induced Protein 44-like* (IFI44L) con FC 2,6, *Sialic Acid Binding Ig-like lectin 1* (SIGLEC1) con FC 2, *Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2* (PTGS2) e *Moesin* (MSN) entrambe con FC 2,2. Tali geni vengono coinvolti nella risposta infiammatoria. Infatti, sia IFI44L che SIGLEC1, si inseriscono nel *pathway* attivato da INF (Malhotra et al., 2012). Inoltre SIGLEC1 codifica per una molecola di superficie che si presenta esclusivamente in macrofagi e cellule dendritiche, e MSN, localizzata nei filopodi, è importante per l'interazione cellula-cellula. Quest'ultimo trascritto, inoltre, fa parte dei *cluster* di proteine che facilita il riconoscimento di LPS da parte dei macrofagi, a cui consegue il rilascio di citochine pro-infiammatorie (Zawawi et al., 2010). Infine, PTGS2, meglio conosciuta come ciclossigenasi 2 (COX2), è la forma inducibile dell'enzima chiave nella biosintesi di prostaglandine. D'altra parte, tra le molecole sovra-regolate nella IAD è stato dimostrato l'aumento di espressione di *Interleukin 10 Receptor, alpha* (IL10RA) con FC 1,72. Esso media il segnale immunosoppressivo dell' IL-10 e ciò inibisce la sintesi di citochine pro-infiammatorie e di mediatori infiammatori, tra cui PTGS2 (Heuze-Vourc'h et al., 2010). La sovra-espressione di tale molecola, quindi, potrebbe rappresentare un meccanismo di regolazione della risposta infiammatoria in corso di IAD.

Tra i trascritti sovra-espresi nella patologia RAO, acquista un notevole rilievo *Chemokine, C-C Motif, Ligand 17* (CCL17) caratterizzato da un FC 15,8. Tale chemochina viene rilasciata dai macrofagi M2, attivati da IL-4 o IL-13, ed agisce promuovendo la migrazione dei linfociti T, a dispetto di macrofagi e granulociti, verso il sito di infiammazione. In uno studio condotto da Staples e collaboratori (Staples et al., 2012), è stata documentata la sovra-espressione di CCL17 in soggetti asmatici umani. Inoltre, nel medesimo studio è stata evidenziata l'incapacità da parte dei corticosteroidi di ridurre l'espressione di tale chemochina, che avviene però conseguentemente all'inibizione di *phosphoinositide-3-kinase* (PIK3).

Nei pazienti RAO, inclusi nel presente studio, è stata evidenziata una sovra-espressione di *Phosphoinositide-3-Kinase, Catalytic, Gamma Polypeptide* (PIK3CG) con FC 1,8 e *Phosphoinositide-3-Kinase, Regulatory Subunit 5* (PIK3R5) con FC 2,6. In alcuni studi condotti sulle alterazioni asmatiche umane, è stato dimostrato che l'inibizione dell'espressione di PIK3CG, permette la riduzione della sintomatologia respiratoria sia determinando una diminuzione della differenziazione dei linfociti Th17, che riducendo la proliferazione delle cellule muscolari lisce (Jiang et al., 2010). Tali processi si traducono in una riduzione dell'infiammazione a carico delle vie aeree ed in un miglioramento della broncocostrizione; lo stesso risultato non si ottiene se si inibiscono, con concentrazioni del farmaco inibitorio anche 40 volte superiori, le altre classi della stessa famiglia di chinasi: *Phosphoinositide-3-Kinase, Catalytic, Beta Polypeptide* (PIK3CB), *Phosphoinositide-3-Kinase, Catalytic, Alpha Polypeptide* (PIK3CA) e *Phosphoinositide-3-Kinase, Catalytic, Delta Polypeptide* (PIK3CD). Ciò potrebbe suggerire il possibile impiego di PIK3CG come *target* di inibizione allo scopo di ridurre la sintomatologia clinica nella patologia respiratoria equina. PIK3CG, inoltre, agisce promuovendo l'attivazione dei *pathway* di IL-17, IL-2 e *Transforming Growth Factor, beta1* (TGF1 β). Quest'ultimo mediatore, sovra-espresso in RAO con FC 1,6, riveste un ruolo fondamentale nell'induzione del meccanismo di transizione da tessuto epiteliale a tessuto mesenchimale, stimolando la conversione delle cellule epiteliali in fibroblasti e miofibroblasti. Tale meccanismo, associato alla sovrapproduzione di collagene, sembra essere alla base della fibrosi bronchiale caratterizzante asma e COPD nell'uomo (Yang et al., 2012). Il legame tra TGF1 β ed il proprio recettore può causare l'attivazione di due vie di segnale, una *Small Mother Against Decapentaplegic* (SMAD)-dipendente e l'altra SMAD- indipendente (Yang et al., 2012). È stato dimostrato *in vitro* che, la stimolazione da parte di TGF1 β , della conversione delle cellule epiteliali respiratorie umane (ed in particolare delle cellule epiteliali bronchiali) in tessuto mesenchimale, sembra seguire la via SMAD-dipendente, che prevede l'attivazione di SMAD3 e SMAD4 (Camara et al., 2010; Hackett et al., 2009). Nel presente studio i trascritti di SMAD3 e SMAD4 non si sono presentati differenzialmente espressi tra gruppo di controllo e cavalli affetti da

malattia respiratoria, sebbene questo risultato non escluda un coinvolgimento della via SMAD-dipendente. D'altra parte, è stata riscontrata una sovraespressione di *TNF Receptor-Associated Factor 6* (TRAF6) e *TGF-beta Activated Kinase 1* (TAK1), dalla cui attivazione consegue la stimolazione della via di segnale SMAD-indipendente. L'ipotesi di un coinvolgimento prevalente di questa via di segnale trova sostegno anche dalla sovra-espressione di SMAD7 (FC 2,60) che funge da molecola inibitoria dell'attivazione della via di segnale SMAD-dipendente (Crosby et al., 2010; Willis, 2007). Inoltre, la mancata differenza di espressione di *Mitogen-Activated Protein Kinase 14* (p38) tra gruppo di controllo e cavalli RAO, associata ad un aumento dei livelli di espressione di *c-Jun N-terminal kinase 1* (JNK) in questi ultimi, potrebbe suggerire che, in corso di RAO, venga attivata preferenzialmente la via di segnale SMAD-indipendente MKK4/JNK-specifica (Fig. 20).

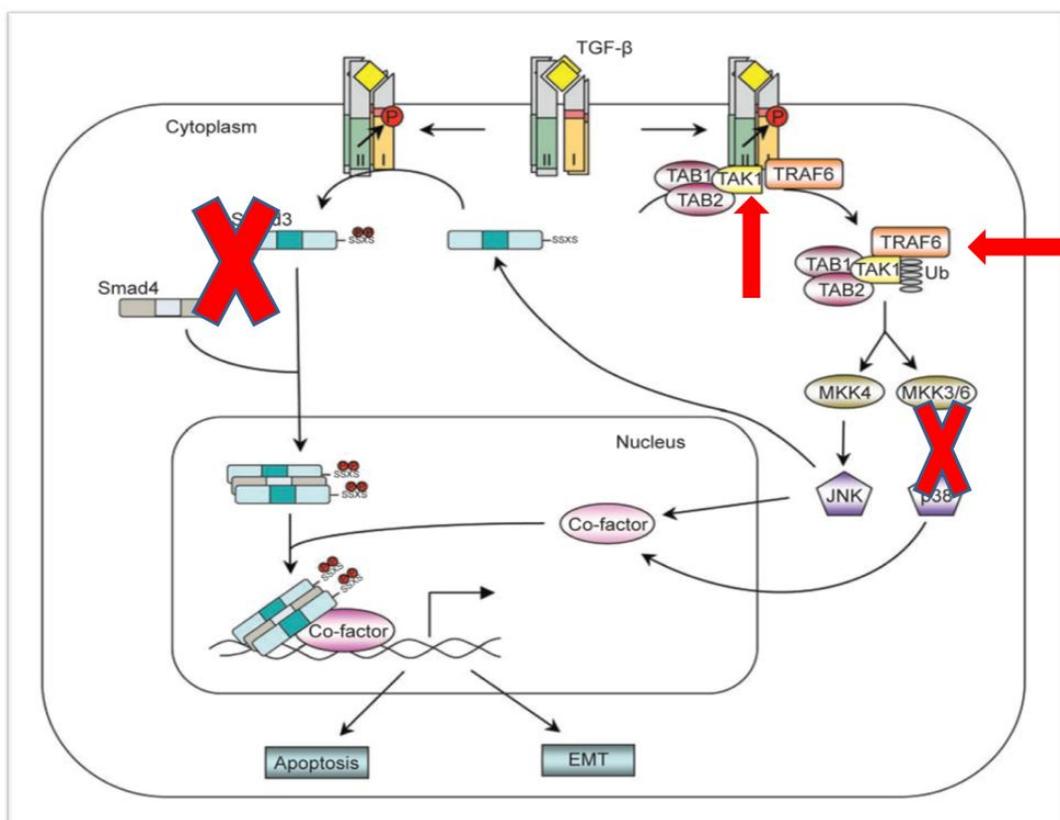


Figura 20 : Il pathway JNK/p38 Smad indipendente . Il recettore di TGF-β interagisce con TRAF6 ed induce la formazione delle catene K63-linked poly-ubiquitin su TRAF6. Il TRAF6 poli-ubiquitinato recluta TAK1 e promuove la sua attivazione allo scopo di attivare il pathway JNK/p38. Il JNK/p38 attivato, può agire in congiunzione con le molecole SMAD per regolare l'apoptosi e la conversione dell'epitelio in tessuto mesenchimale controllando l'attività dei fattori di trascrizione.

Nel meccanismo che sta alla base della broncocostrizione, sembrano inoltre essere implicati *Matrix Metalloproteinase 9* (MMP-9) e *TIMP Metalloproteinase Inhibitor 1* (TIMP-1), caratterizzanti il rimodellamento delle vie aeree nei pazienti umani asmatici (Watelet et al., 2004; Ohbayashi et al., 2005) e sovra-espressi anche nei cavalli affetti da RAO inclusi nel nostro studio, con un FC di 2,8 e 1,9 rispettivamente. La sovra-espressione, nei cavalli affetti da RAO, di *Inhibin, beta A* (INHBA) con FC 9,46, potrebbe suggerire un suo ruolo nel medesimo processo. Tale molecola, sovra-espressa anche in corso di forme asmatiche umane (Karagiannidis et al., 2006), stimola infatti la proliferazione delle cellule bronchiali ed il rimodellamento della matrice extracellulare. L'INHBA deriva dalla famiglia di TGF β e può essere attivata sia da quest'ultimo sia, da IL-1 β (sovra-espressa in RAO con FC 1,6), in seguito all'attivazione di NF-k β , MAPK e PGE2.

La sovra-espressione di alcuni geni coinvolti nel meccanismo apoptotico, quali *TNF Receptor Superfamily Member 6* (FAS), *Caspase 8 Apoptosis-Related Cysteine Peptidase* (CASP8) e *Mitogen-Activated Protein Kinase 8* (MAPK8) e di alcune molecole implicate nell'attivazione cellulare in risposta a lipopolisaccaridi batterici, come *Toll-Like Receptor 4* (TLR4), *Tumor Necrosis Factor alpha* (TNF α) ed IL1 β , potrebbero suggerire la co-attivazione delle due vie di segnale in corso di RAO (Fig. 21).

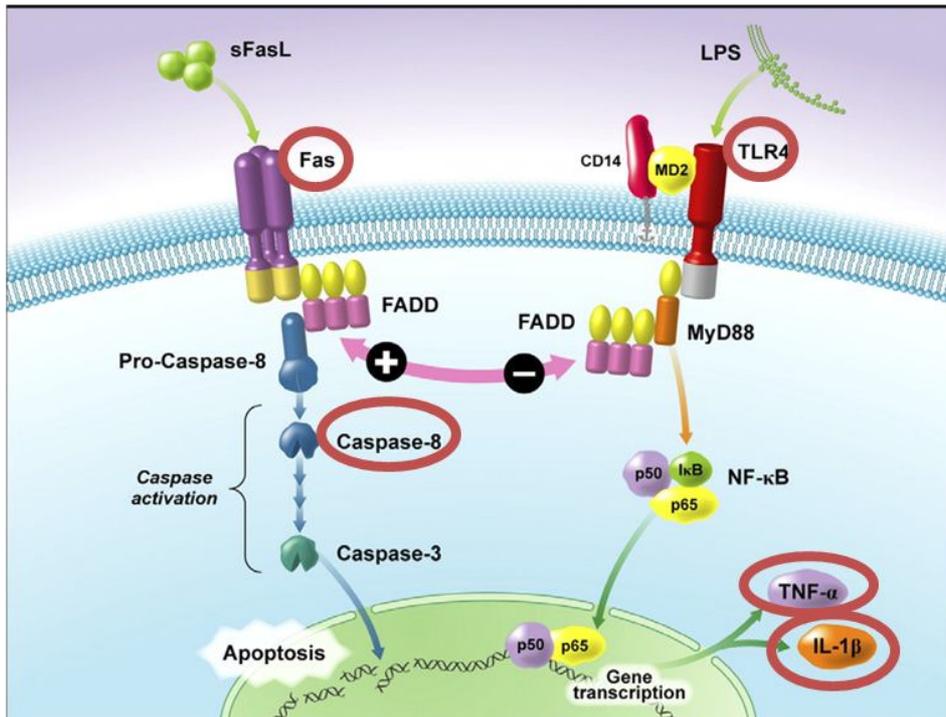


Figura 21: Interazione tra il *pathway* dell'apoptosi Fas-dipendente ed il *pathway* TLR4 che media l'attivazione cellulare in risposta a lipopolisaccaridi batterici. Tratto da "Apoptosis and Epithelial Injury in the Lungs", Proc. Am. Thorac. Soc. Vol. 2, pp. 214–220, 2005

L'attivazione del *pathway* dell' ipossia viene, invece, suggerita dall'aumento di livelli di espressione di *Matrix Metalloproteinase 1* (MMP-1, FC 7,14), *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF, FC 4,02), *Myelin Basic Protein* (MBP, FC 14,26) e *Hypoxia Inducible Factor 1, alpha subunit inhibitor* (HIF1 α N, FC 2,77).

La sovra-espressione di MMP-1 in condizioni ipossiche è stata confermata recentemente in alterazioni articolari umane (Lee et al., 2012). Tale MMP riveste un ruolo di fondamentale importanza nella degradazione del collagene, di cui sono costituite in gran parte anche le strutture bronchiali, poiché svolge una particolare funzione di clivaggio della tripla elica del collagene, mantenendo scisse le catene, favorendo quindi l'azione di degradazione svolta dalle altre MMP.

Uno dei maggiori processi di adattamento cellulare nei fenomeni ipossici è rappresentato dalla conversione delle reazioni da fosforilazione ossidativa a reazione glicolitica, allo scopo di produrre ATP necessario per il corretto svolgimento delle funzioni cellulari stesse. MBP, trascritto a

funzione ancora non nota, viene stimolato da *Enolasi 1* (ENO1) che agisce favorendo le reazioni di tipo glicolitico a dispetto della fosforilazione ossidativa. Esso, come d'altra parte anche VEGF, inoltre, presenta numerosi siti di legame per *Hypoxia Induced Factor 1* (HIF1), fattore di trascrizione i cui livelli di espressione aumentano quando le cellule animali vengono esposte a condizioni ipossiche. Tale molecola attiva la trascrizione di geni codificanti l'eritropoietina, il VEGF, ed altre proteine necessarie al mantenimento dell'omeostasi dell'ossigeno (Semenza et al., 1996). Di conseguenza, la sovra-espressione di MMP-1, VEGF, e MBP potrebbe suggerire una azione sinergica di tali molecole nelle condizioni di ipossia che si instaurano conseguentemente all'alterazione degli scambi gassosi alveolari, determinata dall'insorgenza di malattie respiratorie delle vie aeree profonde.

La lista dei geni regolati in modo significativo è stata inoltre confrontata con quella riportata da Ramery e collaboratori (Ramery et al., 2012), evidenziando che due dei tre geni sovra-espressi in quest'ultimo lavoro, *Growth Arrest and DNA-damage-inducible alpha* (GADD45A, FC 5.7) e *Pentraxin 3, long* (PTX3, FC 5.03) mostrano un aumento dei livelli di espressione anche nei soggetti RAO inclusi nel presente studio, così come quello delle isoforme *beta* e *gamma* del gene GADD45 (GADD45B e GADD45G) con FC di 3.7 e 1.5 rispettivamente. I livelli di espressione di GADD45 aumentano nelle condizioni di stress, anche ipossico, che possano determinare arresto della crescita cellulare e danni al DNA, e mediano la via di segnale, discussa in precedenza, p38/JNK (Luo et al., 2011). PTX3 è invece coinvolto nella risposta innata in reazione a stimoli patogeni, agendo soprattutto nel sito di infezione ed infiammazione. E' stato ipotizzato che la sovraespressione di tale gene possa essere responsabile dell'aumento dell'ossido nitrico e delle citochine pro-infiammatorie, oltre che del reclutamento neutrofilico nelle vie aeree dei cavalli affetti da RAO (Ramery et al., 2012).

Nessuno, invece, dei geni sotto-espressi nei soggetti RAO inclusi nello studio di Ramery, ha mostrato, nella nostra ricerca, una significativa differenza di espressione tra i cavalli affetti da malattia respiratoria ed il gruppo di controllo.

Un secondo confronto, effettuato mediante il metodo GSEA, ha permesso di dimostrare che il *pathway* di espressione genica attivato in corso di asma umano, risulta arricchito anche in cavalli affetti da RAO sebbene la significatività statistica sia marginale (FDR < 25% e p value 0.08). Questa evidenza suggerisce che la patogenesi delle due malattie respiratorie croniche sia simile e caratterizzata dall'aumento dei livelli di espressione di alcuni specifici mediatori infiammatori. Tra di essi assumono un ruolo di notevole importanza, PIK3CG (FC 1,84), discusso precedentemente, ed *Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase 3* (IRAK3, FC 3,09). In pazienti umani affetti da asma, è stata evidenziata la presenza di *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) nella sequenza del gene IRAK3, a cui viene supposta essere correlata una predisposizione genetica all'insorgenza di tale patologia (Balaci et al., 2007). Sarebbe interessante valutare la presenza di polimorfismi genetici a carico dello stesso gene nei cavalli affetti da RAO, per valutare un possibile ruolo di tali polimorfismi nella predisposizione genetica allo sviluppo della malattia respiratoria cronica recidivante in questa specie.

4.5. CONCLUSIONI

Nel presente studio è stata applicata la metodica DNA-microarray allo scopo di approfondire le conoscenze sulla patogenesi di RAO e IAD e sui meccanismi immunologici che si instaurano in corso di tali patologie. Per la prima volta quest'approccio è stato applicato mediante l'utilizzo di un array di geni immuno-correlati, specifico per il cavallo. Ciò ha permesso di evitare di restringere le indagini esclusivamente a specifici *target* molecolari selezionati a priori e di evidenziare gli effetti di queste patologie respiratorie equine sull'intero immuno-trascrittoma, ottenendo dunque informazioni non più relative ai singoli geni ma alle vie di segnale e/o ai processi biologici

coinvolti. In particolare, è stato evidenziato che l'aumento della quantità di muco nelle vie aeree di cavalli affetti da IAD o RAO potrebbe essere maggiormente dipendente da una potenziale riduzione delle *clearance* muco-ciliare piuttosto che da una reale ipersecrezione mucosa.

Inoltre, sono stati identificati alcuni geni coinvolti nei processi che conducono alla broncocostrizione tipica di entrambe le malattie. Infatti, l'aumento di espressione di MMP-9, TIMP-1, INHBA, IL-1 β , SERPINA1 e TGF1 β sembrerebbe suggerire una loro azione sinergica nel meccanismo del rimodellamento tissutale e della proliferazione cellulare che sta alla base del fenomeno di ostruzione delle vie aeree, conseguente alla riduzione del lume dell'albero tracheo-bronco-alveolare. Nel medesimo contesto, in corso di RAO, il presente studio ha evidenziato una potenziale induzione preferenziale della via di attivazione SMAD-indipendente da parte di TGF1 β . Sono stati, inoltre, identificati per la prima volta alcuni geni coinvolti nel metabolismo cellulare e nella risposta infiammatoria che si instaura in corso di IAD.

E' stato evidenziato un possibile ruolo di geni implicati nel *pathway* dell'ipossia (MMP-1, VEGF, MBP), conseguente alla riduzione degli scambi gassosi a livello alveolare, oltre che nel meccanismo che conduce al quadro infiammatorio ed al rimodellamento tissutale nei cavalli affetti da RAO.

Inoltre, l'individuazione di geni comuni tra la RAO equina e l'asma umano, potrebbe suggerire la possibilità di utilizzo di alcune molecole inibitorie, già utilizzate in medicina umana, nei cavalli affetti da RAO allo scopo di ridurre la sintomatologia clinica. Ciò potrebbe permettere un miglioramento della qualità di vita dei pazienti equini ed un loro potenziale ritorno all'attività agonistica in tempi più brevi rispetto a quelli permessi dalla tradizionale terapia farmacologica ad oggi utilizzata.

CAPITOLO 5

CONCLUSIONI GENERALI

In medicina veterinaria, ed in particolar modo in ippatria, le malattie respiratorie equine rappresentano un argomento di notevole interesse. Esse infatti determinano sia gravi ripercussioni sulla qualità di vita dei soggetti affetti, che ingenti perdite economiche per proprietari ed allenatori. Sebbene molti autori negli ultimi anni si siano dedicati allo studio di IAD e RAO, malattie respiratorie equine per eccellenza, le informazioni sulla loro eziologia e patogenesi sono ancora molto scarse. Ciò si traduce in un relativo successo di applicazione delle tecniche diagnostiche ad oggi utilizzate, quali la visita clinica, l'esame endoscopico e l'analisi citologica, ed in uno scarso successo dei trattamenti farmacologici disponibili.

Sulla base di tali considerazioni, è stato sviluppato il presente lavoro di ricerca che si è posto, in un primo momento, l'obiettivo di analizzare l'espressione genica, su BAL e tessuto bronchiale da biopsia, di alcuni trascritti *target* immuno-correlati selezionati sulla base della letteratura e, successivamente, di indagare i profili di espressione dell'intero immuno-trascrittoma su BAL di cavalli affetti da IAD e RAO. Nella prima fase, le analisi effettuate tramite qRT-PCR su specifici geni *target*, hanno permesso di evidenziare che il reclutamento di neutrofili ad opera di fattori chemotattici (IL8) e la persistenza della reazione infiammatoria ad opera di citochine (IL-1 β e TNF α) e fattori di trascrizione (NF-k β) giocano un ruolo di primaria importanza nella patogenesi della RAO, mentre non sono state riscontrate evidenze che la componente allergica giochi un ruolo nello sviluppo della patologia.

Grazie al completamento dello *Human Genome Project* nel 2003, la tecnica DNA-microarray, come metodo di analisi globale dei profili di espressione genica, è ad oggi ampiamente utilizzata in medicina umana per lo studio dei meccanismi immunologici implicati in alterazioni patologiche di diversa natura. Sebbene un progetto simile (*Horse Genome Project*) sia stato applicato allo studio del genoma equino, e si sia concluso nel 2007, la tecnologia DNA-microarray è ancora scarsamente applicata all'indagine delle malattie in questa specie.

Nel presente studio, l'applicazione di tale metodica e lo sviluppo di una piattaforma microarray specifica per il cavallo, hanno permesso di individuare delle liste di geni differenzialmente espressi tra i cavalli sani ed i soggetti affetti da RAO o IAD.

La regolazione di geni che codificano per la lunghezza, la motilità e la cinesia delle cilia cellulari sembrerebbe suggerire che l'aumento della quantità di muco nelle vie aeree di cavalli affetti da IAD o RAO potrebbe essere dipendente da una potenziale riduzione della *clearance* muco-ciliare piuttosto che da una reale ipersecrezione mucosa.

Inoltre, è stato possibile identificare la regolazione di alcuni geni coinvolti nel meccanismo del rimodellamento tissutale e della proliferazione cellulare che sta alla base del fenomeno di ostruzione delle vie aeree e quindi della broncocostrizione tipica di entrambe le malattie, oltre a trascritti implicati nella risposta infiammatoria, nella via apoptotica e nel *pathway* dell'ipossia.

Le informazioni ottenute, hanno rappresentato un importante passo in avanti per l'approfondimento della conoscenza dei meccanismi immunologici attivati in corso di IAD e RAO, facendo luce su alcuni importanti aspetti di queste patologie. La presenza di numerosi geni in comune nei *pathway* immunitari attivati in corso di asma umano e RAO equina, potrebbe rappresentare la conferma dell'ipotesi, sostenuta da numerosi autori negli ultimi anni, di una possibile sovrapposizione della risposta infiammatoria tra l'alterazione respiratoria cronica umana e quella equina. Tali informazioni potrebbero condurre all'utilizzo del cavallo come modello animale per lo studio dell'asma umana. In particolare, è stata osservata la sovra-espressione di una molecola coinvolta nel meccanismo della broncocostrizione (PIK3CG) e già studiata in umana come *target* da inibire in corso di asma allo scopo di ridurre la reazione infiammatoria e la broncocostrizione. Un'eventuale inibizione di questo gene potrebbe, dunque, ridurre la sintomatologia clinica dei cavalli affetti da RAO e, di conseguenza, migliorarne la qualità di vita, rappresentando un importante ausilio terapeutico nel trattamento dei segni clinici, ad oggi scarsamente coercibili.

Infine, il presente studio ha evidenziato una sovra-espressione di un gene (IRAK3), nel cui omologo umano è stata evidenziata la presenza di *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) che

sembrerebbero essere implicati nella predisposizione genetica all' asma. La valutazione dell'eventuale presenza di *SNPs* nel medesimo trascritto di cavallo potrebbe, dunque, essere utilizzata a scopo predittivo, per l'individuazione di soggetti predisposti all'insorgenza di RAO.

Concludendo, la tecnologia DNA-microarray, ed in particolar modo la piattaforma array disegnata nel corso del presente progetto, contenente trascritti codificanti per geni immuno-correlati, potrebbe essere applicata allo studio di numerose altre patologie equine su base infiammatoria, prima tra tutte in ordine di frequenza ed impatto economico l'osteoartrite, che viene riconosciuta tra le più importanti cause di zoppia in questa specie.

BIBLIOGRAFIA

1. Abbas A.K., Lichtman A.H., Pober, J. S., *Immunologia cellulare e molecolare*, Piccin Ed. 1994
2. Ainsworth, D.M., Grunig, G., Matychak, M.B., Young, J., Erb, H.N., Antczak, D.F., Chronic recurrent airway obstruction (heaves) in horses is characterized by a Th-1 response, *Proceedings of the 2003 International Conference, ATS, Seattle, WA, May 20, 2003.*
3. Ainsworth D.M., Grunig G., Matychak M.B., Young J., Wagner B., Erb H.N., Antczak D.F., Recurrent airway obstruction (RAO) in horses is characterized by IFN-gamma and IL-8 production in bronchoalveolar lavage cells, *Vet Immunol Immunopathol* 96, 83–91, 2003.
4. Ainsworth D.M., Wagner B., Franchini M., Grunig G., Erb H.N., Tan J.Y., Time-dependent alterations in gene expression of interleukin-8 in the bronchial epithelium of horses with recurrent airway obstruction. *Am J Vet Res* 67, 669–677, 2006
5. Akira S., Toll-like Receptors Signaling; *The journal of Biological Chemistry* 278 (40): 38105-38108; 2003.
6. Akira S., Toll receptor families: structure and function,. *Seminars in Immunology* 16: 1-2; 2004
7. Art T., Bayly W. M., Lekeux P., *Pulmonary Function in the Exercising Horse, Equine Respiratory Diseases*, Lekeux P. (Ed.), International Veterinary Information Service, Ithaca NY (www.ivis.org), 2002.
8. Aughey E., Frye F.L., *Comparative Veterinary Histology: with Clinical Correlates*, Manson Publishing, 2001
9. Baillat D., Hakimi M.A., Näär A.M., Shilatifard A., Cooch N., Shiekhattar R., Integrator, a Multiprotein Mediator of Small Nuclear RNA Processing, Associates with the C-Terminal Repeat of RNA Polymerase II, *Cell*, Vol. 123, 265–276, October 21, 2005.
10. Baker S.A., Freeman K., Luby-Phelps K., Pazour G.J., Besharse J.C., IFT20 links kinesin II with a mammalian intraflagellar transport complex that is conserved in motile flagella and sensory cilia. *J Biol Chem* 278: 34211–34218, 2003
11. Balaci L., Spada M.C., Olla N., Sole G., Loddo L., Anedda F., Naitza S., Zuncheddu M.A., Maschio A., Altea D., Uda M., Pilia S., Sanna S., Masala M., Crisponi L., Fattori M., Devoto M., Doratiotto S., Rassu S., Mereu S., Giua E., Cadeddu N.G., Atzeni R., Pelosi U., Corrias A., Perra R., Torrazza P.L., Pirina P., Ginesu F., Marcias S., Schintu M.G., Del Giacco G.S., Manconi P.E., Malerba G., Bisognin A., Trabetti E., Boner A., Pescollderung L., Pignatti P.F., Schlessinger D., Cao A., Pilia G., *IRAK-M Is Involved in the Pathogenesis of Early-Onset Persistent Asthma*, *Am J Hum Genet.* ; 80(6):1103-14, 2007
12. Barnes P.J., New molecular targets for the treatment of neutrophilic diseases ; *Molecular mechanisms in allergy and clinical immunology*; 2007
13. Barnes P.J., New therapies for chronic obstructive pulmonary disease. *Med Princ Pract.* ;19(5):330-8, 2010
14. Barnes P.J., The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Invest.*;118(11):3546-56, 2008
15. Barton G.M., Medzhitov R. Toll-Like Receptors Signaling Pathways., *Science* 300:1524-152; 2003
16. Bautista M.V., Chen Y., Ivanova V. S., Rahimi M. K., Watson A. M., Rose M. C., “IL-8 regulates mucin gene expression at the posttranscriptional level in lung epithelial cells”, *J. Immuno.l.*; 183:2159-2166, 2009

17. Bedenice D., Mazan M.R., Hoffman A.M., Association between Cough and Cytology of Bronchoalveolar Lavage Fluid and Pulmonary Function in Horses Diagnosed with Inflammatory Airway Disease , *Journal of Veterinary Internal Medicine* Volume 22, Issue 4, pages 1022–1028, July–August 2008
18. Beekman L., Tohver T., Dardari R., Lé guillette R., Evaluation of suitable reference genes for gene expression studies in bronchoalveolar lavage cells from horses with inflammatory airway disease,. *BMC Molecular Biology*, 12:5, 2011
19. Beekman L., Tohver T., Le´ guillette R., Comparison of Cytokine mRNA Expression in the Bronchoalveolar Lavage Fluid of Horses with Inflammatory Airway Disease and Bronchoalveolar Lavage Mastocytosis or Neutrophilia Using REST Software Analysis, *J Vet Intern Med*;26:153–161, 2012
20. Berndt A., Derksen F.J., Venta P.J., Ewart S., Yuzbasiyan-Gurkan V., Robinson N. E., Elevated amount of Toll-like receptor 4 mRNA in bronchial epithelial cells is associated with airway inflammation in horses with recurrent airway obstruction; *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292, L936–L943, 2007.
21. Bonneau O., Wyss D., Ferretti S., Blaydon C., Stevenson C.S., Trifilieff A., Effect of adenosine A2A receptor activation in murine models of respiratory disorders. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*; 290:L1036–1043, 2006
22. Burrell M.H., Endoscopic and virological observations on respiratory disease in a group of young Thoroughbred horses in training. *Equine Vet J* 17:99-103, 1985
23. Burrell, M.H., Wood, J.L., Whitwell, K.E., Chanter, N., Mackintosh, M.E., Mumford, J.A., Respiratory disease in thoroughbred horses in training: the relationships between disease and viruses, bacteria and environment. *Vet. Rec.* 139, 308–313, 1996.
24. Butte A., The use and analysis of microarray data. *Nat Rev Drug Discov*, 1, 951– 960, 2002.
25. Callaghan R.M., Nickola T.J., Voynow J.A., Airway Mucus Obstruction: Mucin Glycoproteins, *MUC* Gene Regulation and Goblet Cell Hyperplasia, *American Journal of respiratory cells and molecular biology* , Vol. 25, 2001
26. Camara J., Jarai G., Epithelial-mesenchymal transition in primary human bronchial epithelial cells is Smad-dependent and enhanced by fibronectin and TNF-alpha. *Fibrogenesis Tissue Repair*; 3:2, 2010
27. Chen L., Wang T., Zhang J.Y., Zhang S.F., Liu D.S., Xu D., Wang X., Chen Y.J., Wen F.Q., Toll-like receptor 4 relates to lipopolysaccharide-induced mucus hypersecretion in rat airway, *Arch Med Res. Jan*;40(1):10-7, 2009
28. Chowdhary R., Tan S.L., Pavesi G., Jin J., Dong D., Mathur S.K., Burkart A., Narang V., Glurich I., Raby B.A., Weiss S.T., Wong L., Liu J.S., Bajic V.B., A database of annotated promoters of genes associated with common respiratory and related diseases. *Am J Respir Cell Mol Biol*.;47(1):112-9, 2012
29. Christley R.M., Hodgson D.R., Rose R.J., A case-control study of respiratory disease in Thoroughbred racehorses in Sydney, Australia. *Equine Vet J*; 33:256-264, 2001
30. Christley R.M., Hodgson D.R., Rose R.J., Hodgson J.L. ,Wood J.L.N., Reid S.W.J., Coughing in thoroughbred racehorses: risk factors and tracheal endoscopic and cytological findings. *Vet Rec*; 148:99-104, 2001.
31. Conners S. E., Couetil L., Furdek J. M., Russell M. A., *Indiana Equine Industry Economic Impact and Health Study* , Lecture presso Purdue University, Settembre 2011

32. Coombs S.L., Webbon, P.M., Observations on tracheal mucociliary clearance in horses. *Tierarztl. Prax. Suppl.* 2, 5-9, 1987
33. Coradini D., Fornili M., Ambrogi F., Boracchi P., Biganzoli E., TP53 Mutation, Epithelial-Mesenchymal Transition, and Stemlike Features in Breast Cancer Subtypes, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, Volume 2012
34. Cordeau M.E., Joubert P., Dewachi O., Hamid Q., Lavoie J.P., IL-4, IL-5 and IFN-gamma mRNA expression in pulmonary lymphocytes in equine heaves. *Vet. Immunol. Immunopathol* 97, 87–96, 2004.
35. Correa A., Brass K.E., Loreto E., Vinocur M.E., Pozzobon R. Azevedo M. , Spi2 gene polymorphism is not associated with recurrent airway obstruction and inflammatory airway disease in thoroughbred horses, *Genetics and Molecular Biology*, 34, 3, 456-458, 2011
36. Couëtil L., *Respiratory Diseases by Clinical Signs*, Edited by International Veterinary Information Service, Ithaca NY (www.ivis.org), 2007
37. Couetil L.L., Art T., De Moffarts B., Becker M., Melotte D., Jaspard F., Bureau F., Lekeux P., DNA binding activity of transcription factors in bronchial cells of horses with recurrent airway obstruction-2, *Veterinary Immunology and Immunopathology* 113, 11–20, 2006.
38. Couëtil L.L., Rosenthal F.S., DeNicola D.B., Chilcoat C.D., Clinical signs, evaluation of bronchoalveolar lavage fluid, and assessment of pulmonary function in horses with inflammatory respiratory disease, *American Journal of Veterinary Research* , Vol. 62, No. 4, Pages 538-546, 2001
39. Crosby L.M., Waters C.M., Epithelial repair mechanisms in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*;298:L715–L731, 2010
40. Dellmann Horst D., Eurell J.A., *Istologia e anatomia microscopica veterinaria CEA*, 2000
41. Derksen F.J., Robinson N.E., Overview of the Equine Respiratory System, *Equine Respiratory Diseases*, Lekeux P. (Ed.), International Veterinary Information Service, Ithaca NY (www.ivis.org), 2002
42. Di Stefano A., Capelli A., Lusuardi M., Caramori G., Balbo P., Ioli F., Sacco S., Gnemmi I., Brun P., Adcock I.M., Balbi B., Barnes P.J., Chung K.F., Donner C.F. , Decreased T lymphocyte infiltration in bronchial biopsies of subjects with severe chronic obstructive pulmonary disease; *ClinExp Allergy.*, vol. 31(6), 893-902, 2001
43. Di Stefano A., Caramori G., Ricciardolo F.L., Capelli A., Adcock I.M., Donner C.F., Cellular and molecular mechanisms in chronic obstructive pulmonary disease: an overview ; *ClinExp Allergy.*, vol. 34(8), 1156-67, 2004
44. Dixon P.M., Respiratory mucociliary clearance in the horse in health and disease, and its pharmaceutical modification. *Vet. Rec.* 131, 229-235, 1992
45. Dixon P.M., Railton D.I., McGorum, B.C. Equine pulmonary disease: a case control study of 300 referred cases. Part 2: details of animals and historical and clinical findings. *Equine vet. J.* 27, 422-427, 1995
46. E.P.M.A., *Il contributo economico e sociale del settore dell'ippica in Europa*, settembre 2009
47. Farrow S.C., Radiographic aspects of inflammatory lung disease in the horse, *Veterinary Radiology*, Volume 22, Issue 3, pages 107–114, May 1981
48. Fei C., Shou-Cong S., Douglas C.K., Lesley J.G., Laurence M.D.; Essential role of NF-kB activation in silica-induced inflammatory mediator production in macrophages ; *Biochemical and Biophysiological Research Communications*; Vol. 214, N. 3, 985-992; 1995

- 49.** Fossiez F., Djossou O., Chomarat P., Flores-Romo L., Ait-Yahia S., Maat C., T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med*;183:2593-603, 1996.
- 50.** Fozard J.R., Ellis K.M., Villela Dantas M.F., Tigani B., Mazzoni L., Effects of CGS 21680, a selective adenosine A2A receptor agonist, on allergic airways inflammation in the rat. *Eur J Pharmacol*;438:183–188, 2002.
- 51.** Franchini M., Gilli U., Von Fellenberg R., Bracher V.D., Interleukin-8 concentration and neutrophil chemotactic activity in bronchoalveolar lavage fluid of horses with chronic obstructive pulmonary disease following exposure to hay, *Am. J. Vet. Res.*,61,1369–1374, 2000
- 52.** Franchini M., Gilli U., Akens M.K., Fellenberg R.V., Bracher V., The role of neutrophil chemotactic cytokines in the pathogenesis of equine chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Vet. Immunol Immunopathol.* 66, 53–65, 1998.
- 124.** Franchini C., Fontana F., Minuzzo M., Babbio F., Privitera E., Apoptosis promoted by up-regulation of TFPT (TCF3 fusion partner) appears p53 independent, cell type restricted and cell density influenced, *Apoptosis*, 11:2217–2224, 2006
- 53.** Galdi R., Galli M., *Equitazione, sette candidature per i WEG 2018, rivista on-line cavallo* 2000
- 54.** Gerber H., The genetic basis of some equine diseases (Sir Frederick Hobday Lecture). *Equine Veterinary Journal* 21, 244–8, 1989.
- 55.** Gerber V., King M., Schneider D. A., Robinson N. E., Tracheobronchial mucus viscoelasticity during environmental challenge in horses with recurrent airway obstruction, *Equine vet. J.*, 32 (5) 411-417, 2000
- 56.** Gerber V., Straub R., Marti E., Hauptman J., Herholz C., King M., Imhof A., Tahon L., Robinson N.E., Endoscopic scoring of mucus quantity and quality: observer and horse variance and relationship to inflammation, mucus viscoelasticity and volume. *Equine Veterinary Journal* 36, 576–82, 2004
- 57.** Giguère S., Viel L., Lee E., MacKay R.J., Hernandez J., Franchini M., Cytokine induction in pulmonary airways of horses with heaves and effect of therapy with inhaled fluticasone propionate, *Vet Immunol Immunopathol.*;85(3-4):147-58, 2002
- 58.** Goswami R. and Kaplan M.H., Gcn5 Is Required for PU.1-Dependent IL-9 Induction in Th9 Cells, *J Immunol*; 189:3026-3033, 2012
- 59.** Gu W., Bertone A.L., Generation and performance of an equinespecific large-scale gene expression microarray. *Am. J. Vet. Res.* 65, 1664–1673, 2004
- 60.** Gupta A., Hawker G.A., Laporte A., Croxford R., Coyte P.C., The economic burden of disabling hip and knee osteoarthritis (OA) from the perspective of individuals living with this condition. *Rheumatology (Oxford)*; 44:1531–1537, 2005
- 61.** Hackett T.L., Warner S.M., Stefanowicz D., Shaheen F., Pechkovsky D.V., Murray LA et al. Induction of epithelial-mesenchymal transition in primary airway epithelial cells from patients with asthma by transforming growth factor-beta1. *Am J Respir Crit Care Med*;180:122–133, 2009
- 62.** Hare J.E., Viel L., Pulmonary eosinophilia associated with increased airway responsiveness in young racing horses. *J Vet Intern Med*;12:163–170, 1998
- 63.** Hatada E.N., Krappmann D., Scheiderei C., NF-kB and the innate immune response ; *Current Opinion in Immunology*, 12:52–58, 2000

64. Haycraft C.J., Schafer J.C., Zhang Q., Taulman P.D., Yoder B.K., Identification of CHE-13, a novel intraflagellar transport protein required for cilia formation. *Exp Cell Res* 284: 251–263, 2003
65. Hemmi H., Akira S., TLR signalling and the function of dendritic cells, *Chem. Immunol. Allergy*;86:120-35, 2005
66. Heuze-Vourc'h N., Zhu L., Krysan K., Batra R.K., Sharma S., Dubinett S.M., Abnormal interleukin 10R alpha expression contributes to the maintenance of elevated cyclooxygenase-2 in non-small cell lung cancer cells., *Cancer Res.* 15;63(4):766-70, 2003
67. Hildebrandt F., Attanasio M., Otto E, Nephronophthisis: Disease mechanisms of a ciliopathy. *J Am Soc Nephrol* 20: 23–35, 2009
68. Hoffman A.M., Small airway inflammatory disease in equids. In: *Proceedings of the Am Col Vet Int Med*; 13:754- 757, 1995.
69. Hoffman A.M., Mazan M.R., Ellenberg S., Association between bronchoalveolar lavage cytologic features and airway reactivity in horses with a history of exercise intolerance. *Am J Vet Res*;59:176–181, 1998
70. Holcombe S.J., Jackson C., Gerber V., Stabling is associated with airway inflammation in young Arabian horses, *Equine Vet J*, 33:244-249, 2001.
71. Horohov D.W., Beadle R.E., Mouch S., Pourciau S.S., Temporal regulation of cytokine mRNA expression in equine recurrent airway obstruction., *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 108, 237–245, 2005
125. Hotchkiss J.W., Reid S.W., Christley R.M. A survey of horse owners in Great Britain regarding horses in their care. Part 2: risk factors for recurrent airway obstruction. *Equine Veterinary Journal* 39, 301–8, 2007.
72. House A., *Respiratory Conditions* - Feb 4th, 2010.
73. Huang B., Ahn Y.A., McPherson L., Clayberger C. Krensky A.M., Interaction of PRP4 with Krüppel-Like Factor 13 Regulates CCL5 Transcription, *J Immunol*; 178:7081-7087, 2007
74. Hughesa K.J., Nicolsonb L., Da Costaa N., Franklinc S.H., Allenc K.J., Dunhamb S.P., Evaluation of cytokine mRNA expression in bronchoalveolar lavage cells from horses with inflammatory airway disease, *Veterinary Immunology and Immunopathology* 140, 82–89, 2011
126. Ianbaeva D.G., Korytina G.F., Viktorova T.V., Complex search for antiprotease-protease enzyme gene polymorphisms in patients with chronic obstructive pulmonary diseases, *Mol Biol (Mosk)*.;38(6):973-9, 2004
127. Imanifooladi A.A., Yazdani S., Nourani M.R., The role of nuclear factor-kappaB in inflammatory lung disease. *Inflamm Allergy Drug Targets*., 9(3):197-205, 2010
75. Jeffcott L., On the back of the horse - from evolution to athletic performance, *Proceedings of the 50th British Equine Veterinary Association Congress, BEVA, Liverpool, United Kingdom, Sep. 7 – 10, 2011*
76. Jeffery, P., Holgate, S., Wenzel, S., Methods for the assessment of endobronchial biopsies in clinical research: application to studies of pathogenesis and the effects of treatment. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 168, S1–S17, 2003
77. Jiang H., Abel P.W., Toews M.L., Deng C., Casale T.B., Xie Y., Tu Y., Phosphoinositide 3-Kinase γ Regulates Airway Smooth Muscle Contraction by Modulating Calcium Oscillations, *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, Vol. 334, No. 3, 2010

78. Johnstone C.N., Castellví-Belc S., Changa L.M., Bessac X., Nakagawa H., Harada H., Sung R.K., Piqué J.M., Castells A., Anil K. Rustgi, ARHGAP8 is a novel member of the RHOGAP family related to ARHGAP1/CDC42GAP/p50RHOGAP: mutation and expression analyses in colorectal and breast cancers, *Gene* 336, 59–71, 2004
79. Karagiannidis, C., Hense, G., Martin, C., Epstein, M., Ruckert, B., Mantel, P.Y., Menz, G., Uhlig, S., Blaser, K. and Schmidt-Weber, C.B. Activin A is an acute allergen-responsive cytokine and provides a link to TGF-beta-mediated airway remodeling in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 117, 111–118, 2006.
80. Kilty S.J., Bossé Y., Cormier C., Endam L.M., Desrosiers M.Y., Polymorphisms in the SERPINA1 (Alpha-1-Antitrypsin) gene are associated with severe chronic rhinosinusitis unresponsive to medical therapy., *Am J Rhinol Allergy.* ;24(1):e4-9, 2010
81. Kim E. Y., Battaile J. T., Patel A. C., You Y., Agapov E., Grayson M. H., Benoit L. A., Byers D. E., Alevy Y., Tucker J., Swanson S., Tidwell R., Tynern J.W., Morton J. D., Castro M., Polineni D., Patterson G.A., Schwendener R.A., Allard J.D., Peltz G., Holtzman M.J. Persistent activation of an innate immune axis translates respiratory viral infection into chronic lung disease *Nat Med.* ; 14(6): 633–640, 2008
82. Kimbell-Dunn M., Bradshaw L., Slater T., Erkinjuntti-Pekkanen R., Fishwick D., Pearce N., Asthma and allergy in New Zealand farmers, *American Journal of Industrial Medicine* 35, 51– 7. 1999
83. Kobayashi K., Hernandez L.D., Galán J.E., Janeway C.A., Medzhitov R., Flavell R.A., IRAK-M Is a Negative Regulator of Toll-like Receptor Signaling, *Cell*, Vol. 110, 191–202, July 26, 2002.
84. Künzle F., Gerber V., Van der Haegen A., Wampfler B., Straub R., Marti E., IgE-bearing cells in bronchoalveolar lavage fluid and allergen-specific IgE levels in sera from RAO-affected horses, *J. Vet. Med. A*, 54 (1), 40-47, 2007.
85. Kuperman D.A., Huang X., Koth L.L., Chang G.H., Dolganov G.M., Zhu Z., Elias J.A., Sheppard D., Erle D.J. Direct effects of interleukin-13 on epithelial cells cause airway hyperreactivity and mucus overproduction in asthma ; *Nat Med.*, vol.8, 885-889, 2002
86. Laan T.T., Bull S., Van Nieuwstadt R.A., Fink-Gremmels J., The effect of aerosolized and intravenously administered clenbuterol and aerosolized fluticasone propionate on horses challenged with *Aspergillus fumigatus* antigen, *Vet Res Commun.* Aug;30(6):623-35, 2006
87. Larocca N.E., Moreno D., Garmendia J.V., De Sanctis J.B., Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov..Inhibitors of phosphoinositol 3 kinase and NFκB for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease, 5(3):178-83, 2011
88. Lavoie J.P., Cesarini C., Lavoie-Lamoureux A., Moran K., Lutz S., Picandet V., Jean D., Marcoux M., Bronchoalveolar lavage fluid cytology and cytokine messenger ribonucleic Acid expression of racehorses with exercise intolerance and lower airway inflammation. *J Vet Intern Med.* Mar-Apr;25(2):322-9, 2011
89. Le Pen C., Reygrobelle C., Gerentes I., Financial cost of osteoarthritis in France the COART France study. *Joint Bone Spine*;72:565–570, 2005
90. Lee Y.A., Choi H.M., Lee S.H., Hong S.J., Yang H.I., Yoo M.C., Kim K.S., Hypoxia differentially affects IL-1β-stimulated MMP-1 and MMP-13 expression of fibroblast-like synoviocytes in an HIF-1α-dependent manner, *Rheumatology*;51:443-450, 2012

91. Leclere M., Lavoie-Lamoureux A., Lavoie J.P. , Heaves, an asthma-like disease of horses, *Respirology* 16, 1027–1046, 2011
92. Lekeux P. , Duvivier D. H., Aerosol Therapy, Equine Respiratory Diseases, (www.ivis.org), 2001.
93. Luo X., Yao Z.W., Qi H.B., Liu D.D., Chen G.Q., Huang S., Li Q.S., Gadd45 α as an upstream signaling molecule of p38 MAPK triggers oxidative stress-induced sFlt-1 and sEng upregulation in preeclampsia., *Cell Tissue Res.* ;344(3):551-65, 2011
94. MacNamara B., Bauer S., Lafe J., Endoscopic evaluation of exercise-induced pulmonary hemorrhage and chronic obstructive pulmonary disease in association with poor performance in racing Standardbreds. *J Am Vet Med Assoc* 196:443-445, 1990.
95. Maestrelli P., Turato G., Saetta M., Cell And Tissue Dynamics In Chronic Lung Injury ; Proceedings of WEAS IVIS WebSite, 2001
96. Mahjoub M.R., Trapp M.L., Quarumby L.M., NIMA-related kinases defective in murine models of polycystic kidney diseases localize to primary cilia and centrosomes, *J Am Soc Nephrol.* Dec;16(12):3485-9, 2005
97. Malhotra S., Castelló J., Bustamante M.F., Vidal-Jordana A., Castro Z, Montalban X., Comabella M., SIGLEC1 and SIGLEC7 expression in circulating monocytes of patients with multiple sclerosis, *Mult Scler* published online 29 August 2012
98. Marti E., Gerber H., Essich G., Oulehla J., Lazary S., The genetic basis of equine allergic diseases. 1. Chronic hypersensitivity bronchitis. *Equine Veterinary Journal* 23, 457–60, 1991
99. Martin T.R., Hagimoto N., Nakamura M., Matute-Bello G., Apoptosis and Epithelial Injury in the Lungs, *Proc Am Thorac Soc Vol 2.* pp 214–220, 2005
100. Mazan M. R., Hoffman A. M., Clinical techniques for diagnosis of inflammatory airway disease in the horse, *Clinical Techniques in Equine Practice Volume 2, Issue 3, Pages 238–257,* 2003
101. Molet S., Hamid Q., Davoine F., Nutku E., Taha R., Pagé N., Olivenstein R., Elias J., Chakir J., IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines, *J Allergy Clin Immunol.*,108(3):430-8, 2001
102. Morán G., Folch H., Recurrent airway obstruction in horses – an allergic inflammation: a review, *Vet Med* 56, 1–13, 2011
103. Mootha V.K., Lindgren C.M., Eriksson K.F., Subramanian A., Sihag S., Lehar J., Puigserver P., Carlsson E., Ridderstråle M., Laurila E., Houstis N., Daly MJ., Patterson N., Mesirov J.P., Golub T.R., Tamayo P., Spiegelman B., Lander E.S., Hirschhorn J.N., Altshuler D., Groop L.C., PGC-1 α -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes., *Nat Genet.* ;34(3):267-73, 2003
104. Ngoc P.L., Gold D.R., Tzianabos A.O., Weiss S.T., Celedón J.C.. Cytokines, allergy, and asthma., *Curr Opin Allergy Clin Immunol.*, 5(2):161-6, 2005
105. Ohbayashi H., Shimokata K., Matrix metalloproteinase- 9 and airway remodeling in asthma. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*;4:177–181, 2005
106. Oke S.L., McIlwraith C.W., Review of the Economic Impact of Osteoarthritis and Oral Joint-Health Supplements in Horses, Proceedings of the 56th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, AAEP, December 4-8, 2010.
107. Oxelius V.A., Ochs H.D., Hammarström L., Restricted immunoglobulin constant heavy G chain genes in primary immunodeficiencies., *Clin Immunol.*, 128(2):190-8, 2008

- 108.** Ou X.M., Feng Y.L., Wen F.Q., Wang K., Yang J., Deng Z.P., Liu D.S., Li Y.P., Macrolides attenuate mucus hypersecretion in rat airways through inactivation of NF-kappaB., *Respirology*. Jan;13(1):63-72, 2008
- 109.** Pace E., Giarratano A., Ferraro M., Bruno A., Siena L., Mangione S., Johnson M., Gjomarkaj M., TLR4 upregulation underpins airway neutrophilia in smokers with chronic obstructive pulmonary disease and acute respiratory failure, *Hum Immunol.*, 72(1):54-62, 2011
- 110.** Papatheodorou A., Makrythanasis P., Kaliakatsos M., Dimakou A., Orfanidou D., Roussos C., Kanavakis E., Tzetis M., Development of novel microarray methodology for the study of mutations in the SERPINA1 and ADRB2 genes--their association with Obstructive Pulmonary Disease and Disseminated Bronchiectasis in Greek patients. *Clin Biochem.*;43(1-2):43-50, 2010.
- 111.** Poole E., Groves I., Macdonald A., Pang Y., Alcamì A., Sinclair J., Identification of TRIM23 as a Cofactor Involved in the Regulation of NF-B by Human Cytomegalovirus, *Journal of Virology*, p. 3581–3590, 2009
- 112.** Quarmby L.M., Mahjoub M.R., Caught Nek-ing: cilia and centrioles, *J Cell Sci*. Nov 15;118, 2005
- 113.** Ramery E., Closset R., Bureau F., Art T., Lekeux P., Relevance of using a human microarray to study gene expression in heaves-affected horses, *The Veterinary Journal* 177, 216–221, 2008
- 114.** Ramseyer A., Gaillard C., Burger D., Straub R., Jost U., Boog C., Marti E., Gerber V. Effects of genetic and environmental factors on Horse Owner Assessed Respiratory Signs Index (HOARSI). *Journal of Veterinary Internal Medicine* 21, 149–56, 2007.
- 115.** Riihimäki M., Raine A., Art T., Lekeux P., Couëtil L., Pringle J., Partial divergence of cytokine mRNA expression in bronchial tissues compared to bronchoalveolar lavage cells in horses with recurrent airway obstruction ; *Vet. Imm. Immunopath.*, 122(3-4):256-64, 2008
- 116.** Robinson N.E., Derksen F.J., Olszewski M.A., Buechner-Maxwell, V.A. The pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease of horses. *Br. vet. J.* 152, 283-306, 1996
- 117.** Robinson N.E., Kim A.S., *Current Therapy in Equine Medicine*, n.6, Appendice 1, pagg.940-955, 2003
- 118.** Rolph M.S., Sisavanh M., Liu S.M., Mackay C.R., Clues to asthma pathogenesis from microarray expression studies, *Pharmacology & Therapeutics* 109 284 – 294, 2006
- 119.** Rose A.M., Shah A.Z., Waseem N.H., Chakarova C.F., Alfano G. , Coussa R.G., Ajlan R., Koenekoop R.K., Bhattacharya S.S., Expression of PRPF31 and TFPT: regulation in health and retinal disease, *Human Molecular Genetics*, Vol. 21, No. 18 4126–4137, 2012
- 120.** Rosenbaum J.L., Witman G.B., Intraflagellar transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 813–825, 2002
- 121.** Saunders C., Bureau F., Turlej R., Fievez L., Dogne S., Kirschvink N., Lekeux P., p65 Homodimer activity distal airway cells determines lung dysfunction in equine heaves, *Veterinary Immunology and Immunopathology* 80, 315–326, 2001.
- 122.** Schatzmann U., Straub R., Gerber H. Transtracheal aspiration in the horse, *Schweizer Archiv fuer Tierheilkunde* 114, 395-403, 1972
- 123.** Sebban H., Courtois G., NF-kB and inflammation in genetic disease ; *Biomedical Pharmacology* vol. 72, 1153– 1160, 2006
- 124.** Semenza G.L., Jiang B.H., Leung S.W., Passantino R., Concordetti J.P., Mairei P., Giallongo A., Hypoxia Response Elements in the Aldolase A, Enolase 1, and Lactate

Dehydrogenase A Gene Promoters Contain Essential Binding Sites for Hypoxia-inducible Factor 1, *The Journal of biological chemistry*, Vol. 271, No. 51, Issue of December 20, pp. 32529–32537, 1996

- 125.** Shen Q., Zheng X., McNutt M. A., Guang L., Sun Y., Wang J., Gong Y., Hou L., Zhang B., NAT10, a nucleolar protein, localizes to the midbody and regulates cytokinesis and acetylation of microtubules, *Experimental cell research* 315, 1653-1667, 2009
- 126.** Singh Suri S., Janardhan K.S., Parbhakar O., Caldwell S., Appleyard G., Singh B. Expression of toll-like receptor 4 and 2 in horse lungs, *Vet Res* 37:541–551, 2006
- 127.** Smith, K.J., Bertone, A.L., Weisbrode, S.E., Radmacher, M., Gross, histologic, and gene expression characteristics of osteoarthritic articular cartilage of the metacarpal condyle of horses. *Am. J. Vet. Res.* 67, 1299–1306. 2004.
- 128.** Staples K.J., Hinks T.S., Ward J.A., Gunn V., Smith C., Djukanović R., Phenotypic characterization of lung macrophages in asthmatic patients: Overexpression of CCL17., *J Allergy Clin Immunol.* ;130(6):1404-1412, 2012
- 129.** Staudt L.M., Gene expression physiology and pathophysiology of the immune system. *Trends Immunol*, 22, 35– 40, 2001.
- 130.** Staudt L.M., Brown P. O., Genomic views of the immune system. *Annu Rev Immunol*, 18, 829–859, 2000.
- 131.** Stoughton R.B., Applications of DNA microarrays in biology. *Annu Rev Biochem*, 2004.
- 132.** Subramanian A., Tamayo P., Mootha V.K., Mukherjee S., Ebert B.L., Gillette M.A., Paulovich A., Pomeroy S.L., Golub T.R., Lander E.S., Mesirov J.P., Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles., *Proc Natl Acad Sci U S A.* ;102(43):15545-50, 2005
- 133.** Sweeney C.R., Humber K.A., Roby K.A., Cytologic findings of tracheobronchial aspirates from 66 Thoroughbred racehorses. *Am J Vet Res*; 53:1172-1175, 1992.
- 134.** Tikhmyanova N., Little J.L., Golemis E.A. Cas Proteins in Normal and Pathological Cell Growth Control, *Cell Mol Life Sci.*, 67(7): 1025–1048, 2010
- 135.** Turgut K., Sasse H.H., Influence of clenbuterol on mucociliary transport in healthy horses and horses with chronic obstructive pulmonary disease. *Vet. Rec.* 125, 526-530, 1989
- 136.** Van Erck E., Art T., Lekeux P., Normal Respiratory Values in Equine Respiratory Diseases, Edited by International Veterinary Information Service, Ithaca NY (www.ivis.org), 2005
- 137.** Vrins A., Doucet M., Nunez-Ochoa L., A Retrospective Study of Bronchoalveolar Lavage Cytology in Horses with Clinical Findings of Small Airway Disease, *Journal of Veterinary Medicine Series A*, Volume 38, Issue 1-10, pages 472–479, February-December 1991
- 138.** Wadsworth M.E., Vinall L.E., Jones A.L., Hardy R.J., Whitehouse D.B., Butterworth S.L., Hilder W.S., Lovegrove J.U., Swallow D.M., Alpha1-antitrypsin as a risk for infant and adult respiratory outcomes in a national birth cohort. *Am J Respir Cell Mol Biol.*, 31(5):559-64, 2004
- 139.** Wang W., Zheng M., *Eur Arch Otorhinolaryngol.*; Nuclear factor kappa B pathway down-regulates aquaporin 5 in the nasal mucosa of rats with allergic rhinitis. 268(1):73-81, 2011
- 140.** Watelet J.B., Bachert C., Claeys C., Van Cauwenberge P., Matrix metalloproteinases MMP-7, MMP-9 and their tissue inhibitor TIMP-1: expression in chronic sinusitis vs nasal polyposis. *Allergy*; 59:54–60, 2004.
- 141.** Willis B.C., Borok Z., TGF-beta-induced EMT: mechanisms and implications for fibrotic lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*;293:L525–L534, 2007

- 142.** Willoughby R.A., Ecker G.L., McKee S.L., Riddolls, L.J. Use of scintigraphy for the determination of mucociliary clearance rates in normal, sedated, diseased and exercised horses. *Can. J. vet. Res.* 55, 315-320, 1991
- 143.** Wood J.L.N., Newton J.R., Chanter N., A longitudinal epidemiological study of respiratory disease in racehorses: disease definitions, prevalence and incidence. In: Wernery U., Wade J.F., Mumford J.A., *Equine Infectious Diseases VIII*. Newmarket: R&W Publications Ltd.; 64-70, 1999
- 144.** Wood J. L. N., Newton J. R., Chanter N., Mumford J. A. Association between Respiratory Disease and Bacterial and Viral Infections in British Racehorses, *Journal of clinical microbiology* , p. 120–126 Vol. 43, No. 1, 2005
- 145.** Woodruff P.G., Boushey H. A., Dolganov G. M., Barker C. S., Yang Y. H., Donnelly S., Ellwanger A., Sidhu S. S., Dao-Pick T.P., Pantoja C., Erle D.J., Yamamoto K.R., Fahy J.V., Genome-wide profiling identifies epithelial cell genes associated with asthma and with treatment response to corticosteroids, *PNAS*, vol. 104 no. 40, 2007
- 146.** Yang Y.C., Zhang N., Van Crombruggen K., Hu G.H., Hong S.L., Bachert C., Transforming growth factor-beta1 in inflammatory airway disease: a key for understanding inflammation and Remodeling, *Allergy* 67 (2012) 1193–1202. 2012
- 147.** Zawawi K.H., Kantarci A., Schulze-Späte U., Fujita T., Batista E.L. Jr, Amar S., Van Dyke T.E., Moesin-induced signaling in response to lipopolysaccharide in macrophages., *J Periodontal Res.* ;45(5):589-601, 2010
- 148.** Zachos, T.A., Shields, K.M., Bertone, A.L., Gene-mediated osteogenic differentiation of stem cells by bone morphogenetic proteins-2 or -6. *J. Orthop. Res.* 24, 1279–1291. 2006.
- 149.** Zhang L., Franchini M., Werlieser M., Dip R., Enhanced IL-6 transcriptional response to adenosine receptor ligands in horses with lower airway inflammation, *Equine Veterinary Journal* 44 81–87, 2012
- 150.** Zhang X., Shan P., Jiang G., Cohn L., Lee P.J., Toll-like receptor 4 deficiency causes pulmonary emphysema, *J Clin Invest*, 116, pp. 3050–3059, 2006

APPENDICE 1

IL1β		Neutrofili %		Macrofagi %		Linfociti %		Eosinofili %		Muco		Freq. Resp.	
Sig. (2-tailed)	Rho	Sig. (2-tailed)	Rho	Sig. (2-tailed)	Rho	Sig. (2-tailed)	Rho						
0	.828(**)	0.002	.673(**)	0.001	-.684(**)	0.012	-.562(*)	0.05	.456(*)	0.004	.623(**)	.	1
0.006	.610(**)	0	.907(**)	0	-.903(**)	0.003	-.638(**)	0.232	0.288	.	1	0.004	.623(**)
0.193	0.313	0.123	0.366	0.179	-0.322	0.249	-0.278	.	1	0.232	0.288	0.05	.456(*)
0.059	-0.44	0.004	-.633(**)	0.008	.587(**)	.	1	0.249	-0.278	0.003	.638(**)	0.012	-.562(*)
0.001	-.685(**)	0	-.987(**)	.	1	0.008	.587(**)	0.179	-0.322	0	.903(**)	0.001	-.684(**)
0.001	.708(**)	.	1	0	-.987(**)	0.004	-.633(**)	0.123	0.366	0	.907(**)	0.002	.673(**)
.	1	0.001	.708(**)	0.001	-.685(**)	0.059	-0.44	0.193	0.313	0.006	.610(**)	0	.828(**)
0.124	0.365	0.665	0.106	0.579	-0.136	0.688	-0.099	0.302	-0.25	0.472	0.176	0.414	0.199
0	.916(**)	0.001	.711(**)	0.001	-.706(**)	0.014	-.553(*)	0.061	0.438	0.003	.640(**)	0	.912(**)
0.529	0.192	0.176	0.399	0.187	-0.391	0.774	0.088	0.172	-0.404	0.21	0.372	0.629	-0.148
0.056	0.446	0.081	0.41	0.116	-0.373	0.052	-0.452	0.511	0.161	0.244	0.281	0.133	0.357
0.005	.668(**)	0.094	0.433	0.092	-0.436	0.014	-.602(*)	0.129	0.396	0.157	0.371	0.003	.696(**)
0.058	0.441	0	.770(**)	0	-.777(**)	0.003	-.649(**)	0.061	0.438	0	.826(**)	0.007	.600(**)
0.004	.625(**)	0	.900(**)	0	-.871(**)	0.002	-.671(**)	0.167	0.33	0	.725(**)	0.009	.581(**)
0	.886(**)	0	.830(**)	0	-.792(**)	0.006	-.602(**)	0.033	.491(*)	0	.727(**)	0	.806(**)
0.001	.691(**)	0.006	.605(**)	0.005	-.616(**)	0.023	-.518(*)	0.799	0.063	0.001	.693(**)	0.007	.601(**)

NF-KB		TGFb		INFg		IL17		IL13		IL8		IL6	
Sig. (2-tailed)	Rho	Sig. (2-tailed)	Rho	Sig. (2-tailed)	Rho	Sig. (2-tailed)	Rho	Sig. (2-tailed)	Rho	Sig. (2-tailed)	Rho	Sig. (2-tailed)	Rho
0.009	.581(**)	0.007	.600(**)	0.003	.696(**)	0.133	0.357	0.629	-0.148	0	.912(**)	0.414	0.199
0	.725(**)	0	.826(**)	0.157	0.371	0.244	0.281	0.21	0.372	0.003	.640(**)	0.472	0.176
0.167	0.33	0.061	0.438	0.129	0.396	0.511	0.161	0.172	-0.404	0.061	0.438	0.302	-0.25
0.002	-.671(**)	0.003	-.649(**)	0.014	-.602(*)	0.052	-0.452	0.774	0.088	0.014	-.553(*)	0.688	-0.099
0	-.871(**)	0	-.777(**)	0.092	-0.436	0.116	-0.373	0.187	-0.391	0.001	-.706(**)	0.579	-0.136
0	.900(**)	0	.770(**)	0.094	0.433	0.081	0.41	0.176	0.399	0.001	.711(**)	0.665	0.106
0.004	.625(**)	0.058	0.441	0.005	.668(**)	0.056	0.446	0.529	0.192	0	.916(**)	0.124	0.365
0.943	-0.018	0.509	0.161	0.854	0.05	0.989	-0.004	0.138	0.434	0.307	0.247	.	1
0.002	.663(**)	0.006	.606(**)	0	.774(**)	0.025	.512(*)	0.789	-0.082	.	1	0.307	0.247
0.223	0.363	0.641	0.143	0.77	-0.1	0.344	-0.286	.	1	0.789	-0.082	0.138	0.434
0.115	0.374	0.213	0.299	0.064	0.474	.	1	0.344	-0.286	0.025	.512(*)	0.989	-0.004
0.043	.512(*)	0.113	0.412	.	1	0.064	0.474	0.77	-0.1	0	.774(**)	0.854	0.05
0.002	.657(**)	.	1	0.113	0.412	0.213	0.299	0.641	0.143	0.006	.606(**)	0.509	0.161
.	1	0.002	.657(**)	0.043	.512(*)	0.115	0.374	0.223	0.363	0.002	.663(**)	0.943	-0.018
0	.802(**)	0.001	.685(**)	0.009	.626(**)	0.013	.560(*)	0.817	0.071	0	.919(**)	0.684	0.1
0.038	.479(*)	0.006	.602(**)	0.176	0.356	0.26	0.272	0.117	0.456	0.001	.698(**)	0.001	.681(**)

TNF α		TLR4	
Sig. (2-tailed)	Rho	Sig. (2-tailed)	Rho
0.007	.601(**)	0	.806(**)
0.001	.693(**)	0	.727(**)
0.799	0.063	0.033	.491(*)
0.023	-.518(*)	0.006	-.602(**)
0.005	-.616(**)	0	-.792(**)
0.006	.605(**)	0	.830(**)
0.001	.691(**)	0	.886(**)
0.001	.681(**)	0.684	0.1
0.001	.698(**)	0	.919(**)
0.117	0.456	0.817	0.071
0.26	0.272	0.013	.560(*)
0.176	0.356	0.009	.626(**)
0.006	.602(**)	0.001	.685(**)
0.038	.479(*)	0	.802(**)
0.006	.604(**)	.	1
.	1	0.006	.604(**)

APPENDICE 2

			Conta
Rho di Spearman	Conta	Coefficiente di correlazione	1.000
		Sig. (2-code)	
		N	25
	ENSECAT00000000629 (RSPH9)	Coefficiente di correlazione	.006
		Sig. (2-code)	.977
		N	25
	ENSECAT00000000632 (RSPH9)	Coefficiente di correlazione	.006
		Sig. (2-code)	.977
		N	25
	ENSECAT00000000610 (RSPH9)	Coefficiente di correlazione	.029
		Sig. (2-code)	.892
		N	25
	ENSECAT00000012110 (IFT57)	Coefficiente di correlazione	-.109
		Sig. (2-code)	.605
		N	25
	ENSECAT00000022787 (IFT74)	Coefficiente di correlazione	-.200
		Sig. (2-code)	.339
		N	25
	ENSECAT00000021429 (IFT27)	Coefficiente di correlazione	.060
		Sig. (2-code)	.777
		N	25
	ENSECAT00000010354 (IFT88)	Coefficiente di correlazione	-.038
		Sig. (2-code)	.856
		N	25
	ENSECAT00000010229 (IFT20)	Coefficiente di correlazione	.192
Sig. (2-code)		.358	
N		25	
ENSECAT00000022340 (IFT52)	Coefficiente di correlazione	.055	
	Sig. (2-code)	.796	
	N	25	
ENSECAT00000017323 (IFT122)	Coefficiente di correlazione	.114	
	Sig. (2-code)	.587	
	N	25	
ENSECAT00000009801 (IFT140)	Coefficiente di correlazione	.009	
	Sig. (2-code)	.968	
	N	25	
ENSECAT00000010029 (IFT80)	Coefficiente di correlazione	.247	
	Sig. (2-code)	.234	
	N	25	
ENSECAT00000012176 (IFT172)	Coefficiente di correlazione	.092	
	Sig. (2-code)	.660	
	N	25	
ENSECAT00000012148 (IFT172)	Coefficiente di correlazione	.130	
	Sig. (2-code)	.535	
	N	25	
ENSECAT00000023337 (NEK3)	Coefficiente di correlazione	-.031	
	Sig. (2-code)	.885	
	N	25	
ENSECAT00000019049 (NEK4)	Coefficiente di correlazione	.093	
	Sig. (2-code)	.659	
	N	25	
ENSECAT00000019076 (NEK4)	Coefficiente di correlazione	.191	
	Sig. (2-code)	.361	
	N	25	
ENSECAT00000016560 (NEK11)	Coefficiente di correlazione	.010	
	Sig. (2-code)	.961	
	N	25	