

L'asma grave equino: un modello spontaneo di asma neutrofilico

Severe equine asthma: a naturally-occurring model of neutrophilic asthma



Michela Bullone

Dipartimento di Scienze Cliniche e Biologiche, Università degli Studi di Torino, AUO San Luigi, Orbassano (TO)

Parole chiave

Asma • Modello animale • Cavallo • Neutrofili • Rimodellamento • Biopsie

Key words

Asthma • Animal model • Horse • Neutrophils • Remodeling • Biopsy

Ricevuto il 1-12-2017.

Accettato il 11-1-2018.

Riassunto

I meccanismi patogenetici alla base dell'asma neutrofilico sono solo parzialmente conosciuti. Un'alterata risposta dell'immunità innata ed un incremento del metabolismo ossidativo sono altri stati associati al fenotipo neutrofilico. Esistono inoltre meccanismi immunologici che collegano la risposta allergica e infiammazione neutrofilica, ma la loro implicazione nell'asma è poco conosciuta. In questo contesto, lo studio del modello di asma grave equino potrebbe rivelare informazioni potenzialmente applicabili o traslabili in campo umano. L'asma grave equino è un modello di asma spontaneo ad insorgenza tardiva (in età adulta dell'animale), neutrofilico, in cui si riconoscono fenotipi infiammatori diversi: Th2, Th1 e/o Th17. Le esacerbazioni vengono indotte esponendo gli animali ad antigeni ambientali (fieno), mentre la remissione clinica si induce con trattamento farmacologico corticosteroidico oppure riducendo al minimo lo stimolo antigenico. Questo aspetto rende il modello equino particolarmente duttile e sfruttabile, pur restando un modello spontaneo. Inoltre, la longevità del cavallo, la sua docilità e le grandi dimensioni sono vantaggi che permettono di pianificare studi longitudinali non terminali. In questo articolo di revisione si presentano i caratteri comuni all'asma neutrofilico umano ed al modello equino, nonché alcune possibili applicazioni in campo di ricerca.

Summary

The pathological mechanisms leading to neutrophilic asthma are only partly understood. A dysregulated innate response and oxidative metabolism have been associated to the neutrophilic asthma phenotype. Other immune mechanisms linking the allergic response, commonly observed in asthma, to neutrophilic inflammation have been described. In this context, studying the severe equine asthma model could reveal biological processes that might be translated or applied to the human asthma field. Severe equine asthma is a naturally-occurring, late-onset, neutrophilic model. Different inflammatory phenotypes have been associated with the disease: predominantly Th2, Th1, and/or Th17. Disease exacerbations are triggered by exposure to environmental antigens such as those commonly found in hay and straw, and disease remission is achieved by means of corticosteroid treatment or prolonged antigen avoidance. This aspect, together with the horse's lifespan, dimensions and easy handling represent advantages of this animal model that allows prospective trials to be performed with no need to sacrifice the animal. In this review article, an overview of the current knowledge on severe equine asthma and its similarities with human neutrophilic asthma is presented, together with some possible research applications.

L'asma è un disordine infiammatorio cronico e ostruttivo che colpisce circa il 5% della popolazione italiana. L'infiammazione bronchiale è prevalentemente eosinofila. Ciononostante, sono oggi riconosciuti fenotipi della malattia caratterizzati da altri *pattern* infiammatori ¹ in circa il 50% dei casi (asma non-eosinofilo) ².

In particolare, l'implicazione dei granulociti neutrofili quali potenziali attori nella patogenesi asmatica è relativamente recente. I dati disponibili relativi al ruolo di queste cellule nei processi di rimodellamento tissutale sono estremamente li-

mitati, così come quelli riguardanti il loro contributo alla regolazione del processo infiammatorio.

Il modello equino può rivelarsi utile per comprendere alcuni meccanismi patogenetici alla base dell'asma neutrofilico umano.

L'asma grave equino è un modello animale spontaneo caratterizzato da neutrofilia broncoalveolare, rimodellamento tissutale e broncospasmo reversibile in



Michela Bullone
Dipartimento di Scienze Cliniche e Biologiche
Università degli Studi di Torino
AUO San Luigi
Regione Gonzole, 10
10043 Orbassano (TO)
michelabullone@gmail.com

seguito alla somministrazione di farmaci broncodilatatori^{3,4}.

Il modello equino può rivelarsi utile per comprendere alcuni meccanismi patogenetici alla base dell'asma neutrofilico umano.

Asma neutrofilico

Il fenotipo di asma non-eosinofilo è stato descritto per la prima volta nel contesto dell'asma grave, sottolineando il possibile contributo dei neutrofilici in questo fenotipo della malattia⁵. Precedenti lavori avevano dimostrato la presenza di neutrofilia durante le esacerbazioni asmatiche, in pazienti affetti da asma notturno ed in pazienti deceduti a causa di una crisi severa della malattia (asma fatale). La neutrofilia è stata quindi associata ad un fenotipo grave della patologia. Successivi lavori hanno confermato questi dati dimostrando inoltre che il fenotipo di asma neutrofilico è associato all'insorgenza tardiva della malattia (adulti/anziani, "asma geriatrico"), ad una ridotta risposta ai broncodilatatori, alla terapia corticosteroidica per inalazione, e ad una peggiore funzionalità polmonare. Il fenotipo neutrofilico è più frequentemente riscontrato in pazienti non atopici; è stato inoltre associato all'obesità nelle donne¹. Da un punto di vista patogenetico, i meccanismi alla base della neutrofilia nell'asma non sono del tutto chiariti. Alcuni studi hanno messo in luce caratteri immunologici che sembrano collegare la presenza di neutrofilia alla risposta allergica asmatica, quali: 1) l'osservazione di recettori ad alta affinità per le immunoglobuline E (IgE) in neutrofilici di pazienti affetti da asma⁶, 2) l'incremento della loro espressione durante la stagione dei pollini ed in presenza di citochine del tipo Th2 (IL-4) *in vitro*⁷, e 3) la capacità delle IgE di ritardare l'apoptosi neutrofilica tramite legame con questo recettore⁸.

La presenza di neutrofilia ed eosinofilia bronchiale non è mutualmente esclusiva e può coincidere in un fenotipo infiammatorio misto, possibilmente associato a manifestazioni cliniche più gravi.

La presenza di neutrofilia ed eosinofilia bronchiale non è infatti mutualmente esclusiva e può coincidere in un fenotipo infiammatorio misto, possibilmente associato a manifestazioni cliniche più gravi della malattia⁹. In questo contesto, è importante sottolineare che i granulociti neutrofilici non sono una popolazione di cellule omogenee¹⁰, sebbene l'implicazione dei diversi fenotipi cellulari nella patogenesi asmatica non sia ancora stata chiarita¹¹.

I granulociti neutrofilici sono cellule dell'immunità innata, la cui funzione principale è quella di partecipare alla risposta infiammatoria acuta contro diversi agenti dannosi, infettivi e non. I neutrofilici sono cellule in grado di migrare attraverso i tessuti seguendo un gradiente chemotattico per raggiungere i loro target. Nell'asma,

le principali molecole chemotattiche per i granulociti neutrofilici sono l'interleuchina (IL)-8, il fattore di necrosi tumorale α (TNF- α), il leucotriene B4 (LTB4), l'IL-6 e l'IL-17⁹. Una volta reclutati ed attivati, i neutrofilici svolgono le loro funzioni innescando gli enzimi dell'esplosione respiratoria (generando stress ossidativo tramite attivazione di NADPH ossidasi e mieloperossidasi) e liberando prodotti di degradazione proteica e di inibizione batterica (elastasi, proteasi, lattoferrina, NETs [*Neutrophil Extracellular Traps*]). L'asma neutrofilico è caratterizzato da elevati livelli di IL-8, IL-17, TNF- α , IFN- α , IL-1 β , e proteine del complesso dell'inflammasoma nell'escreato⁹. Dati recenti sottolineano un ruolo determinante dell'immunità innata e dello stress ossidativo nella patogenesi del fenotipo di asma neutrofilico. La neutrofilia tissutale è aumentata in campioni di biopsie endobronchiali in cui si riscontra la presenza di metalloproteasi (MMP)-9¹² ed è correlata a livelli elevati di elastasi neutrofilica¹³. L'asma neutrofilico è inoltre caratterizzato da uno stato pro-infiammatorio sistemico come dimostrato dai livelli elevati di proteina C reattiva e IL-6 riscontrati nel siero in questi pazienti¹⁴ e dalla presenza di infezioni respiratorie subcliniche in circa il 50% dei casi^{15,16}. Gli studi diretti all'identificazione delle caratteristiche di rimodellamento tissutale correlate al fenotipo di asma neutrofilico sono rari. La neutrofilia sembrerebbe essere legata all'assenza di ispessimento della membrana basale, diversamente rispetto a quanto riscontrato in pazienti eosinofilici⁵. In termini di funzionalità polmonare, la neutrofilia nei pazienti asmatici è associata ad una ridotta funzionalità periferica¹⁷ e ad una minore reversibilità post-broncodilatatore espressa come volume espiratorio massimo in 1 secondo (FEV₁)¹⁸. Per questo motivo si suppone che la neutrofilia possa avere un ruolo nella progressione di un *pattern* ostruttivo persistente e irreversibile. La possibile implicazione del rimodellamento/ispessimento delle vie aeree periferiche in questo processo non è stata ad oggi valutata.

Infine, da un punto di vista terapeutico, i pazienti asmatici caratterizzati da un'elevata neutrofilia mostrano una risposta attenuata alla terapia corticosteroidica inalatoria, sia in termini di infiammazione sia in termini di funzionalità polmonare e controllo della malattia. La terapia con macrolidi sembra invece poter avere un ruolo nel trattamento di questi pazienti¹⁹.

Nonostante i significativi avanzamenti delle conoscenze avvenuti negli ultimi anni, l'asma neutrofilico risulta essere un fenotipo non ben caratterizzato. L'implicazione della presenza concomitante di eosinofilia non è inoltre chiarita. Nonostante si ipotizzi un fenotipo più grave della patologia in caso di compresenza dei due *pattern* infiammatori (eosinofilo e neutrofilico)⁹, questo dato deve ancora essere dimostrato così come i meccanismi patogenetici alla base del suo sviluppo.

In questo contesto, l'impiego e lo studio di un modello animale di asma neutrofilico potrebbe rivelarsi interessante. I tipici modelli murini di asma offrono limitate possibilità in quanto caratterizzati da un'infiammazione tipicamente eosinofila e periferica, così come il model-

lo spontaneo di asma felino. Il modello di asma severo equino è invece caratterizzato da neutrofilia broncoalveolare e da lesioni presenti sia nei bronchi centrali che periferici.

Data l'elevata prevalenza di asma neutrofilico in pazienti anziani, la longevità del modello equino potrebbe rappresentare un vantaggio dal punto di vista traslazionale.

Data l'elevata prevalenza di asma neutrofilico in pazienti anziani, la longevità del modello equino potrebbe rappresentare un vantaggio dal punto di vista traslazionale.

Asma equino, definizioni e contestualizzazione

“Asma equino” è una definizione recente²⁰ che raggruppa una pletera di disordini infiammatori ostruttivi di diversa gravità precedentemente classificati in base alla sintomatologia clinica o all'agente eziologico responsabile della riaccutizzazione²¹. Le tre principali forme di asma equino sono quelle che negli anni 2000 erano note come IAD (*Inflammatory Airway Disease*), RAO (*Recurrent Airway Obstruction*) e SPAOPD (*Summer Pasture-Associated Obstructive Pulmonary Disease*). Queste tre forme si differenziano per la severità dei segni clinici e per i fattori scatenanti le riaccutizzazioni. IAD definisce il fenotipo ora noto come asma lieve equino, caratterizzato da infiammazione neutrofilica (> 5-10%, a seconda degli studi), eosinofila (> 1%) e/o mastocitica (> 2%) all'esame citologico del Lavaggio Broncoalveolare (LBA) e dalla presenza di segni clinici lievi cronici in assenza di febbre e di uno sforzo respiratorio a riposo. RAO e SPAOPD definiscono invece il fenotipo ora noto come asma grave equino, caratterizzato da un'elevata neutrofilia broncoalveolare (> 20-25%, a seconda degli studi),

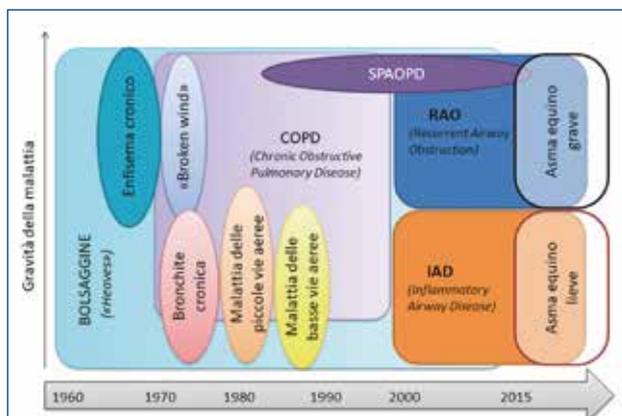


Figura 1. Evoluzione temporale delle definizioni utilizzate per descrivere i diversi fenotipi di asma equino (lieve e grave).

dalla presenza di rimodellamento bronchiale centrale e periferico, e da una ridotta funzionalità polmonare. RAO e SPAOPD si differenziano per i fattori scatenanti le riaccutizzazioni, che sono l'esposizione agli allergeni/fattori irritanti presenti nel fieno nel primo caso ed i pollini e gli aeroallergeni tipici della stagione primaverile nel secondo caso. Negli articoli precedenti il 2000, la divisione tra questi fenotipi non era riconosciuta ed i cavalli affetti erano indiscriminatamente classificati come soggetti affetti da *heaves*, *COPD*, *chronic bronchiolitis*, oppure *chronic emphysema*. La Figura 1 riporta le caratteristiche cliniche e l'evoluzione temporale delle definizioni associate ai fenotipi di asma equino.

Asma grave equino: caratterizzazione del modello e conoscenze attuali

La natura simil-asmatica della patologia equina era riconosciuta dalla comunità medica già negli anni '60²². Studi più recenti, sia in campo veterinario che medico, hanno portato a nuove conoscenze permettendoci oggi di proporre l'asma grave equino come un modello animale spontaneo per il fenotipo di asma neutrofilico umano. L'asma grave equino è una patologia cronica ed incurabile. Clinicamente, periodi di remissione della malattia si presentano alternati a periodi di esacerbazione, durante i quali gli animali vengono trattati sino a remissione dei segni clinici. Le esacerbazioni sono scatenate dall'esposizione a diversi antigeni ambientali, principalmente quelli che si trovano nel fieno di bassa qualità come lipopolisaccaridi e antigeni di *Aspergillus fumigatus*, sebbene non vi sia un singolo agente eziologico ritenuto responsabile della patologia⁴. Diversi altri aeroallergeni sembrano avere un ruolo nella patogenesi della malattia²³. L'implicazione di meccanismi allergici nella patobiologia dell'asma grave equino è controversa. Diversi lavori riportano una maggiore frequenza di soggetti sensibilizzati contro antigeni ambientali in cavalli affetti rispetto ai soggetti sani²⁴ e un aumento delle mast cellule nel LBA o nell'epitelio di animali in esacerbazione della malattia^{25,26}.

L'asma grave equino si caratterizza clinicamente per la presenza di episodi ricorrenti e reversibili di ostruzione respiratoria, in presenza di neutrofilia all'esame citologico broncoalveolare ed in assenza di concomitanti infezioni respiratorie.

L'asma grave equino si caratterizza clinicamente per la presenza di episodi ricorrenti e reversibili di ostruzione respiratoria (sforzo respiratorio a riposo), in presenza di neutrofilia all'esame citologico broncoalveolare ed in assenza di concomitanti infezioni respirato-

rie. Tali segni clinici si accompagnano ad un'eccessiva produzione di muco e, in alcuni casi, a tosse cronica. La patologia è inoltre caratterizzata da rimodellamento dei bronchi centrali e periferici, parzialmente reversibile durante i periodi di remissione della malattia.

La disfunzione respiratoria è definita sulla base dei valori di resistenza ed elastanza polmonare (R_L ed E_L , rispettivamente) misurati in soggetti non sedati tramite misura della pressione esofagea (tratto intra-toracico) e dei flussi respiratori. Valori di $R_L > 1$ cmH₂O/L/s ed $E_L > 1$ cmH₂O/L sono considerati patologici. Sebbene test di spirometria siano stati eseguiti su cavalli per la misura dei flussi e volumi espiratori, il cavallo deve essere sedato e la manovra eseguita passivamente (inspirazione profonda simulata tramite la somministrazione di aria a pressione attraverso un tubo nasale fino a capacità polmonare totale e successiva connessione del tubo con un sistema a vuoto)²⁷. La stimolazione con metacolina ed istamina è un altro protocollo comunemente eseguito nei cavalli affetti da asma lieve ma non grave²⁸, perché eticamente non ammissibile e potenzialmente pericoloso se eseguito in animali non sedati. Lo sforzo respiratorio cronico si manifesta con un'esagerata attivazione dei muscoli addominali durante la fase espiratoria (definita "torchio addominale"), che nel tempo ne causa un'ipertrofia, concomitante ad una dilatazione delle narici ed all'assunzione di una postura "a fame d'aria" nei casi più gravi (Figura 2).



Figura 2. Presentazione clinica dell'asma grave equino durante un episodio di esacerbazione. **A)** Ipertrofia dei muscoli addominali obliqui, nota come "heave line" o "linea della bolsaggine", segno clinico tipico di questa patologia. **B)** Dilatazione delle narici che perdura durante tutte le fasi respiratorie. **C)** Postura "a fame d'aria". Si osserva nei casi più gravi ed è caratterizzata dal mantenimento del collo e della testa in posizione quasi orizzontale rispetto al tronco, in modo da ridurre al minimo le resistenze dell'albero respiratorio. Spesso la bocca è mantenuta aperta, nonostante i cavalli siano animali respiratori nasali obbligati.

All'auscultazione, si sentono sibili espiratori a cui possono essere associati rantoli. Nei casi più gravi, i suoni respiratori possono essere attutiti per la presenza di intrappolamento d'aria (*air trapping*) periferico. L'auscultazione tracheale può rivelare la presenza di muco.

La neutrofilia broncoalveolare è relativa (> 20-25%) ed è presente nella maggioranza dei casi. Sono riportati sporadici casi caratterizzati da un *pattern* infiammatorio paucigranulocitico associato a mucostasi periferica e a lesioni bronchiali/bronchiolari periferiche gravi²⁹.

Il reclutamento dei neutrofili nel lume bronchiale avviene a poche ore dall'esposizione dei cavalli e precede il picco di alterazione della funzionalità polmonare e di danno epiteliale.

Il reclutamento dei neutrofili nel lume bronchiale avviene a poche ore dall'esposizione dei cavalli ad un ambiente in cui sia presente fieno polveroso, e precede il picco di alterazione della funzionalità polmonare e di danno epiteliale³⁰⁻³¹. I neutrofili reclutati nel lume dimostrano un incremento di attività relativa al fenomeno dell'esplosione respiratoria e di espressione di elastasi neutrofilica rispetto ai neutrofili periferici, indice di attivazione cellulare³¹. Tra le possibili cause possono esservi l'aumentata espressione di diverse molecole in grado di attirare/attivare i neutrofili nel lume bronchiale (IL-8, IL-17, IL-1 β , TNF- α , LTB₄) così come la ridotta espressione di molecole anti-infiammatorie come la secretoglobina³². I neutrofili periferici mostrano invece un ridotto tasso di apoptosi ed un'aumentata produzione di IL-1 β e TNF- α rispetto alle stesse cellule di cavalli sani³¹⁻³³. Nel cavallo, così come nell'uomo, sono stati descritti due fenotipi di neutrofili: a bassa densità e a densità normale¹⁰⁻³⁴. I neutrofili a bassa densità, pur mantenendo la stessa funzione nei cavalli sani e asmatici, sono aumentati nel sangue periferico di cavalli affetti da asma severo³⁴. Anche i neutrofili a densità normale sono aumentati nel sangue periferico durante le esacerbazioni, sebbene i valori non superino la soglia considerata normale in questa specie³⁴.

L'asma grave equino è associato ad uno stato pro-infiammatorio sistemico e ad un'attivazione dell'immunità innata, come dimostrato dall'ipercoagulabilità e dall'elevata concentrazione di TNF- α , fibrinogeno, aptoglobina e amiloide sierica A nel sangue periferico³³⁻³⁵⁻³⁶.

L'asma grave equino è associato ad uno stato pro-infiammatorio sistemico e ad un'attivazione dell'immunità innata.

Come nell'asma umano, si riscontrano casi di asma grave equino caratterizzati da un fenotipo infiammatorio di tipo prevalentemente Th2 ed altri di tipo prevalentemente Th1³⁷⁻³⁸. L'espressione di molecole di tipo Th17 sembra invece essere comune ai due fenotipi. Mentre il legame tra neutrofilia e risposta infiammatoria di tipo Th1 e Th17 è giustificato, i meccanismi immunologici

che legano la neutrofilia ad una risposta immunitaria di tipo Th2 (o viceversa) non sono ancora del tutto chiariti. La presenza di recettori per l'IL-5 sui neutrofili equini e la loro attivazione in seguito a stimolazione con IL-4, con conseguente aumento dell'espressione del recettore a bassa affinità per le IgE, suggeriscono l'esistenza di meccanismi immunologici in grado di correlare questi due processi^{39 40}.

Le vie aeree inferiori dei pazienti asmatici sono caratterizzate da alterazioni morfologiche strutturali osservate a livello di epitelio, tessuto connettivo e muscolo liscio delle pareti bronchiali, collettivamente chiamate rimodellamento bronchiale (Figura 3). Ad oggi, non sono stati realizzati studi volti a caratterizzare il rimodellamento bronchiale in pazienti umani affetti da asma neutrofilico, ad eccezione di uno studio in cui si riporta un normale spessore della membrana basale in presenza di neutrofilia in confronto all'ispessimento comunemente osservato nei pazienti eosinofili⁵. La componente strutturale delle vie aeree che risulta essere maggiormente collegata alla funzionalità polmonare ed alla presentazione clinica della malattia è invece la massa di muscolo liscio bronchiale periferico.

Il modello di asma grave equino è caratterizzato da un aumento della massa di muscolo liscio sia nei bronchi periferici sia nei bronchi centrali.

Il modello di asma grave equino è caratterizzato da un aumento della massa di muscolo liscio sia nei bronchi periferici (< 2 mm di diametro) sia nei bronchi centrali (corrispondenti a bronchi lobari, segmentali e submesogentali)^{26 41}. È stato inoltre osservato che la massa di muscolo liscio periferico è associata alla severità della malattia⁴². La funzionalità stessa del muscolo liscio bronchiale equino è alterata nell'asma grave in associazione con l'aumentata espressione dell'isoforma rapida della catena pesante della miosina⁴³. Questo potrebbe portare ad un'accelerata contrazione muscolare e contribuire quindi allo sviluppo di broncospasmo in questa malattia⁴⁴. La recente dimostrazione che il muscolo liscio bronchiale periferico equino è ipercontrattile in soggetti asmatici supporta quest'ipotesi⁴⁵. La produzione da parte di neutrofili equini di esosomi che vengono internalizzati dalle cellule muscolari lisce potrebbe essere un meccanismo che lega l'infiammazione al rimodellamento tissutale in questo modello⁴⁶. Diversi lavori hanno riportato alterazioni a carico della matrice collagene della lamina propria – aumentata nei cavalli affetti da asma grave rispetto ai controlli, sia nei bronchi centrali che periferici – e la loro correlazione con la funzionalità polmonare durante le fase di remissione della malattia^{47 48}. Infine, vi sono lavori che dimostrano l'attivazione dell'epitelio bronchiale nei cavalli affetti da asma grave, con una iperespressione di *Toll-Like Receptor 4* (TLR4) e di citochine proinfiammatorie quali IL-1 β , IL-8, IL-17, TSLP (linfopoietina timica stromale)³.

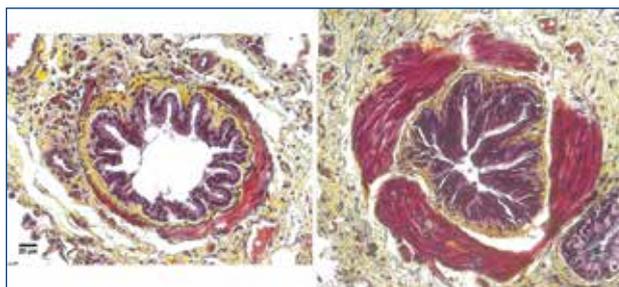


Figura 3. Campione istologico di un bronchiolo periferico di un animale sano (sinistra) e di un bronchiolo periferico in cui si apprezza la presenza di rimodellamento bronchiale in un cavallo affetto da asma grave (destra). Si noti la differenza di tessuto muscolare liscio e di deposizione di matrice collagene sia nella lamina propria sia all'esterno dello strato muscolare (avventizia). La morfologia epiteliale è alterata. Le cellule infiammatorie sono aumentate nelle lamina propria dei bronchioli di animali asmatici.

Per quanto riguarda il trattamento e la risposta al trattamento, il modello equino è caratterizzato da una risposta clinica alla terapia corticosteroidica più rapida e marcata in seguito alla somministrazione di corticosteroidi orali⁴⁹, ma che comunque è evidente anche quando i corticosteroidi vengono somministrati per via inalatoria per lunghi periodi⁵⁰. Di rilievo è la presenza di broncocostrizione residua osservata in animali trattati per 12 mesi con fluticasone per inalazione e con una funzionalità polmonare nella norma⁵⁰.

Il modello equino è caratterizzato da una risposta clinica alla terapia corticosteroidica più rapida e marcata in seguito alla somministrazione di corticosteroidi orali.

La risposta alla terapia per inalazione è invece rapida e marcata con la somministrazione combinata di corticosteroidi e broncodilatatori β_2 -agonisti⁴². La neutrofilia broncoalveolare comunque persiste anche in caso di remissione clinica farmacologica se gli animali non vengono rimossi dall'ambiente polveroso. Dati preliminari di un recente lavoro sembrano supportare un effetto positivo della somministrazione di macrolidi nel controllo della neutrofilia in questo modello animale. Altre terapie sono state testate nel modello di asma grave equino con limitato effetto terapeutico³. Come nell'asma umano, la sola terapia broncodilatatoria sembra produrre effetti negativi peggiorando l'iperreattività bronchiale⁴². Nel modello equino è stata inoltre studiata la reversibilità del rimodellamento polmonare in seguito a trattamento. In questa specie, il trattamento corticosteroidico riduce significativamente la massa di muscolo liscio bronchiale a livelli che rimangono però sempre maggiori rispetto a quelli osservati in animali sani^{42 50}. Questi risultati sono in linea con quanto osservato nei pazienti umani e indicativi del fatto che una parte del rimodellamento muscolare nell'asma è

irreversibile. La deposizione di collagene nella lamina propria invece sembra essere completamente reversibile con il trattamento, ma solo nelle vie aeree centrali⁴².

Vantaggi del modello e potenziali applicazioni in ricerca

Nel contesto della ricerca sull'asma neutrofilico umano, l'asma grave equino risulta essere interessante per la sua possibile applicabilità come modello traslazionale³.

Nel contesto della ricerca sull'asma neutrofilico umano, l'asma grave equino risulta essere interessante per la sua possibile applicabilità come modello traslazionale.

L'insorgenza spontanea della malattia in questa specie e la sua longevità (un cavallo ha una vita media di 25-30 anni) lo avvicinano molto alla patologia umana. Inoltre, date le grandi dimensioni degli animali e la loro natura generalmente docile, è possibile prelevare diversi campioni senza dover sacrificare l'animale. Questo permette la realizzazione di studi prospettici ed il monitoraggio nel tempo di uno stesso animale. La presenza di tecniche consolidate per il prelievo e lo studio di campioni biotici di polmone periferico *intra vitam* è un ulteriore vantaggio di questo modello. Da un punto di vista patogenetico, lo studio dell'asma equino potrebbe risultare utile per la comprensione dei meccanismi immunologici che regolano neutrofilia e risposta allergica nell'asma umano. Infine, lo studio comparativo degli eosinofili equini ed umani potrebbe permettere di identificare i fattori responsabili della mancata risposta eosinofila nel modello equino e studiare la loro implicazione nell'asma umano. Gli svantaggi di questo modello sono invece legati agli spazi e alla strumentazione necessarie per il mantenimento e lo svolgimento delle procedure su questi animali, ed alla limitata disponibilità di prodotti biomolecolari validati per questo modello.

In conclusione, il modello di asma grave equino potrebbe rappresentare un modello interessante e potenzialmente sfruttabile per lo studio dei meccanismi patogenetici infiammatori alla base dell'asma neutrofilico umano. La facilità di prelievo di biopsie tissutali permette anche l'impiego di questo modello per lo studio del rimodellamento tissutale e della sua risposta ai farmaci comunemente utilizzati per il trattamento dell'asma umano.

Bibliografia

- Carr TF, Zeki AA, Kraft M. *Eosinophilic and non-eosinophilic asthma*. Am J Respir Crit Care Med 2018;197:22-37.
- Douwes J, Gibson P, Pekkanen J, Pearce N. *Non-eosinophilic asthma: importance and possible mechanisms*. Thorax 2002;57:643-8.
- Bullone M, Lavoie JP. *Asthma "of horses and men"-how can equine heaves help us better understand human asthma immunopathology and its functional consequences?* Mol Immunol 2015;66:97-105.
- Leclere M, Lavoie-Lamoureux A, Lavoie JP. *Heaves, an asthma-like disease of horses*. Respirology 2011;16:1027-46.
- Wenzel SE, Schwartz LB, Langmack EL, et al. *Evidence that severe asthma can be divided pathologically into two inflammatory subtypes with distinct physiologic and clinical characteristics*. Am J Respir Crit Care Med 1999;160:1001-8.
- Gounni AS, Lamkhioued B, Koussih L, et al. *Human neutrophils express the high-affinity receptor for immunoglobulin E (Fc epsilon RI): role in asthma*. FASEB J 2001;15:940-9.
- Alphonse MP, Saffar AS, Shan L, et al. *Regulation of the high affinity IgE receptor (Fc epsilonRI) in human neutrophils: role of seasonal allergen exposure and Th-2 cytokines*. PLoS One 2008;3:e1921.
- Saffar AS, Alphonse MP, Shan L, et al. *IgE modulates neutrophil survival in asthma: role of mitochondrial pathway*. J Immunol 2007;178:2535-41.
- Ray A, Kolls JK. *Neutrophilic inflammation in asthma and association with disease severity*. Trends Immunol 2017;38:942-54.
- Scapini P, Marini O, Tecchio C, Cassatella MA. *Human neutrophils in the saga of cellular heterogeneity: insights and open questions*. Immunol Rev 2016;273:48-60.
- Bruijnzeel PL, Uddin M, Koenderman L. *Targeting neutrophilic inflammation in severe neutrophilic asthma: can we target the disease-relevant neutrophil phenotype?* J Leukoc Biol 2015;98:549-56.
- Wenzel SE, Balzar S, Cundall M, Chu HW., *Subepithelial basement membrane immunoreactivity for matrix metalloproteinase 9: association with asthma severity, neutrophilic inflammation, and wound repair*. J Allergy Clin Immunol 2003;111:1345-52.
- Simpson JL, Scott RJ, Boyle MJ, Gibson PG. *Differential proteolytic enzyme activity in eosinophilic and neutrophilic asthma*. Am J Respir Crit Care Med 2005;172:559-65.
- Wood LG, Baines KJ, Fu J, et al. *The neutrophilic inflammatory phenotype is associated with systemic inflammation in asthma*. Chest 2012;142:86-93.
- Alam R, Good J, Rollins D, et al. *Airway and serum biochemical correlates of refractory neutrophilic asthma*. J Allergy Clin Immunol 2017;140:1004-14.
- Liu W, Liu S, Verma M, et al. *Mechanism of TH2/TH17-predominant and neutrophilic TH2/TH17-low subtypes of asthma*. J Allergy Clin Immunol 2017;139:1548-58.
- Farah CS, Keulers LA, Hardaker KM, et al. *Association between peripheral airway function and neutrophilic inflammation in asthma*. Respirology 2015;20:975-81.
- Shaw DE, Berry MA, Hargadon B, et al. *Association between neutrophilic airway inflammation and airflow limitation in adults with asthma*. Chest 2007;132:1871-5.
- Brusselle GG, Vanderstichele C, Jordens P, et al. *Azithromycin for prevention of exacerbations in severe asthma (AZISAST): a multicentre randomised double-blind placebo-controlled trial*. Thorax 2013;68:322-9.
- Lavoie JP. *Is the time primed for equine asthma?* Equine Vet Educ 2015;27:225-6.
- Couetil LL, Cardwell JM, Gerber V, et al. *Inflammatory airway disease of horses-revised consensus statement*. J Vet Intern Med 2016;30:503-15.
- Lowell FC. *Observations on heaves. An asthma-like syn-*

- drome in the horse. *J Allergy Clin Immunol* 1964;35:322-30.
- 23 Bullone M, Murcia RY, Lavoie JP. *Environmental heat and airborne pollen concentration are associated with increased asthma severity in horses*. *Equine Vet J* 2016;48:479-84.
- 24 Wagner B. *IgE in horses: occurrence in health and disease*. *Vet Immunol Immunopathol* 2009;132:21-30.
- 25 Dacre KJ, McGorum BC, Marlin DJ, et al. *Organic dust exposure increases mast cell tryptase in bronchoalveolar lavage fluid and airway epithelium of heaves horses*. *Clin Exp Allergy* 2007;37:1809-18.
- 26 Leclere M, Lavoie-Lamoureux A, Gelinias-Lymburner E, et al. *Effect of antigenic exposure on airway smooth muscle remodeling in an equine model of chronic asthma*. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2011;45:181-7.
- 27 Couetil LL, Rosenthal FS, Simpson CM. *Forced expiration: a test for airflow obstruction in horses*. *J Appl Physiol* (1985) 2000;88:1870-9.
- 28 Mazan MR, Hoffman AM, Manjerovic N. *Comparison of forced oscillation with the conventional method for histamine bronchoprovocation testing in horses*. *Am J Vet Res* 1999;60:174-80.
- 29 Bullone M, Joubert P, Gagné A, et al. *Bronchoalveolar lavage fluid neutrophilia is associated with the severity of pulmonary lesions during equine asthma exacerbations*. *Equine Vet J* 2018; Jan 17 [Epub ahead of print].
- 30 Tessier L, Cote O, Clark ME, et al. *Impaired response of the bronchial epithelium to inflammation characterizes severe equine asthma*. *BMC Genomics* 2017;18:708.
- 31 Brazil TJ, Dagleish MP, McGorum BC, et al. *Kinetics of pulmonary neutrophil recruitment and clearance in a natural and spontaneously resolving model of airway inflammation*. *Clin Exp Allergy* 2005;35:854-65.
- 32 Côté O, Clark ME, Viel L, et al. *Secretoglobin 1A1 and 1A1A differentially regulate neutrophil reactive oxygen species production, phagocytosis and extracellular trap formation*. *PLoS One* 2014;9:e96217.
- 33 Lavoie-Lamoureux A, Beauchamp G, Quessy S, et al. *Systemic inflammation and priming of peripheral blood leukocytes persist during clinical remission in horses with heaves*. *Vet Immunol Immunopathol* 2012;146:35-45.
- 34 Herteman N, Vargas A, Lavoie JP. *Characterization of circulating low-density neutrophils intrinsic properties in healthy and asthmatic horses*. *Sci Rep* 2017;7:7743.
- 35 Lavoie-Lamoureux A, Leclere M, Lemos K, et al. *Markers of systemic inflammation in horses with heaves*. *J Vet Intern Med* 2012;26:1419-26.
- 36 Leclere M, Bedard C, Cortes-Dubly ML, Lavoie JP. *Blood hypercoagulability and systemic inflammation in horses with heaves*. *Veterinary Journal* 2015;206:105-7.
- 37 Cordeau ME, Joubert P, Dewachi O, et al. *IL-4, IL-5 and IFN-gamma mRNA expression in pulmonary lymphocytes in equine heaves*. *Vet Immunol Immunopathol* 2004;97:87-96.
- 38 Ainsworth DM, Wagner B, Franchini M, et al. *Time-dependent alterations in gene expression of interleukin-8 in the bronchial epithelium of horses with recurrent airway obstruction*. *Am J Vet Res* 2006;67:669-77.
- 39 Dewachi O, Joubert P, Hamid Q, et al. *Expression of interleukin (IL)-5 and IL-9 receptors on neutrophils of horses with heaves*. *Vet Immunol Immunopathol* 2006;109:31-6.
- 40 Lavoie-Lamoureux A, Moran K, Beauchamp G, et al. *IL-4 activates equine neutrophils and induces a mixed inflammatory cytokine expression profile with enhanced neutrophil chemotactic mediator release ex vivo*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2010;299:L472-82.
- 41 Bullone M, Beauchamp G, Godbout M, et al. *Endobronchial ultrasound reliably quantifies airway smooth muscle remodeling in an equine asthma model*. *PLoS One* 2015;10:e0136284.
- 42 Bullone M, Vargas A, Elce Y, et al. *Fluticasone/salmeterol reduces remodelling and neutrophilic inflammation in severe equine asthma*. *Sci Rep* 2017;7:8843.
- 43 Boivin R, Vargas A, Lefebvre-Lavoie J, et al. *Inhaled corticosteroids modulate the (+)insert smooth muscle myosin heavy chain in the equine asthmatic airways*. *Thorax* 2014;69:1113-9.
- 44 Bullimore SR, Siddiqui S, Donovan GM, et al. *Could an increase in airway smooth muscle shortening velocity cause airway hyperresponsiveness?* *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2011;300:L121-31.
- 45 Matusovsky OS, Kachmar L, Ijpmma G, et al. *Peripheral airway smooth muscle but not the trachealis is hypercontractile in an equine model of asthma*. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2016;54:718-27.
- 46 Vargas A, Roux-Dalvai F, Droit A, et al. *Neutrophil-derived exosomes: a new mechanism contributing to airway smooth muscle remodeling*. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2016;55:450-61.
- 47 Setlakwe EL, Lemos KR, Lavoie-Lamoureux A, et al. *Airway collagen and elastic fiber content correlates with lung function in equine heaves*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2014;307:L252-60.
- 48 Bullone M, Chevigny M, Allano M, et al. *Technical and physiological determinants of airway smooth muscle mass in endobronchial biopsy samples of asthmatic horses*. *J Appl Physiol* (1985) 2014;117:806-15.
- 49 Robinson NE, Berney C, Behan A, et al. *Fluticasone propionate aerosol is more effective for prevention than treatment of recurrent airway obstruction*. *J Vet Intern Med* 2009;23:1247-53.
- 50 Leclere M, Lavoie-Lamoureux A, Joubert P, et al. *Corticosteroids and antigen avoidance decrease airway smooth muscle mass in an equine asthma model*. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2012;47:589-96.

L'Autore dichiara di non avere alcun conflitto di interesse con l'argomento trattato nell'articolo.