



UNIVERSITÀ DI PISA

DIPARTIMENTO SCIENZE VETERINARIE

Corso di Laurea Magistrale in Medicina Veterinaria

Validazione analitica di un metodo per la determinazione
dell'enzima paraoxonasi (PON1) e intervalli di riferimento nel
cavallo

Candidato:

Irene Nocera

Relatori:

Prof. Micaela Sgorbini

Dott. Francesca Bonelli

ANNO ACCADEMICO 2015-2016

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare tutti coloro che hanno contribuito alla realizzazione della mia tesi, mettendo a mia disposizione la loro esperienza, le loro preziose osservazioni e suggerimenti, e soprattutto la loro fiducia.

Ringrazio anzitutto la professoressa Micaela Sgorbini, Relatore, e la dottoressa Francesca Bonelli, Co-relatore, che mi hanno dato la possibilità di seguire questo percorso di tesi e che sono state il mio punto di riferimento nei due anni trascorsi.

Un ringraziamento particolare va al professor Saverio Paltrinieri, alla dottoressa Alessandra Giordano, alla dottoressa Beatrice Ruggerone e ai colleghi del Dipartimento di Medicina Veterinaria dell'Università di Milano, che mi hanno dato la possibilità di realizzare questa tesi.

Estendo i miei ringraziamenti ai proprietari dei centri ai quali mi sono rivolta per la raccolta dei dati, ai dottori veterinari che mi hanno seguito in questo con pazienza e collaborazione.

Infine, vorrei ringraziare tutti i ragazzi del gruppo di tesi per la loro disponibilità e spirito di squadra.

E mio padre, sempre pronto a risolvere qualsiasi problema.

INDICE

| | |
|--|----|
| RIASSUNTO E ABSTRACT | 6 |
| CAPITOLO 1 – PARAOXONASI | 7 |
| 1.1 Introduzione | 7 |
| 1.2 Polimorfismo genetico di PON | 8 |
| 1.3 Ruolo fisiologico di PON1 | 10 |
| 1.4 Fattori che influenzano la PON1 | 17 |
| 1.4.1 Polimorfismo genetico | 17 |
| 1.4.2 Stile di vita | 19 |
| 1.4.3 Dieta alimentare | 19 |
| 1.4.4 Età | 20 |
| 1.4.5 Sesso | 22 |
| 1.4.6 Condizioni fisiologiche | 23 |
| 1.5 Metodi di dosaggio | 24 |
| 1.5.1 Tossicità | 26 |
| 1.5.2 Influenza del polimorfismo | 26 |
| 1.5.3 Velocità di idrolisi | 27 |
| 1.5.4 Performance diagnostiche | 27 |
| 1.5.5 Fonti che determinano interferenza | 28 |
| CAPITOLO 2 – STATO DELL'ARTE | 30 |

| | |
|---|-----------|
| 2.1 Medicina umana | 30 |
| 2.1.1 PON1 e l'aterosclerosi | 30 |
| 2.1.2 PON1 e il diabete | 32 |
| 2.1.3 PON1 e altre patologie infiammatorie | 33 |
| 2.1.4 PON1 e le HDL disfunzionali | 34 |
| 2.1.5 PON1 e l'intossicazione da organofosfati | 35 |
| 2.1.6 PON1 e l'infezione | 36 |
| 2.2 Medicina veterinaria | 38 |
| 2.2.1 Specie Bovina | 38 |
| 2.2.2 Specie Canina | 45 |
| 2.2.3 Specie Felina | 58 |
| 2.2.4 Specie Suina | 61 |
| CAPITOLO 3 – PARTE SPERIMENTALE | 65 |
| 3.1 Scopo del lavoro | 65 |
| 3.2 Materiali e metodi | 66 |
| 3.2.1 Selezione dei soggetti | 66 |
| 3.2.2 Prelievi e pre-processazione dei campioni di sangue | 66 |
| 3.2.3 Misurazione attività sierica di PON1 | 66 |
| 3.2.4 Validazione della misurazione dell'attività enzimatica di PON1 | 67 |
| 3.2.5 Individuazione intervalli di riferimento | 68 |

| | |
|--|----|
| 3.2.6 Analisi statistiche sulla divisione degli intervalli di riferimento | 69 |
| CAPITOLO 4 – RISULTATI | 70 |
| CAPITOLO 5 – DISCUSSIONE | 73 |
| CAPITOLO 6- CONCLUSIONE | 77 |
| BIBLIOGRAFIA | 78 |

RIASSUNTO

Scopo. Gli obiettivi dello studio sono stati quelli di validare un metodo automatizzato per la rilevazione dell'attività sierica di PON1 nella specie equina, basato sull'utilizzo del paraoxone come substrato e di determinare gli intervalli di riferimento (*reference intervals*, RIs) in cavalli e puledri sani.

Materiali e Metodi. Nel presente studio sono stati inclusi 120 cavalli e 55 puledri clinicamente sani. Su ogni soggetto è stato eseguito un prelievo di sangue e il siero è stato utilizzato per valutare l'attività di PON1 con metodo automatizzato e lettura spettrofotometrica utilizzando il paraoxone come substrato. Sono state valutate ripetibilità *intra-* e *inter-assay*, accuratezza tramite LUD (*evaluation of linearity under dilution*) e SRT (*spiking recovery test*). Sono stati determinati gli intervalli di riferimento in cavalli sani e analizzate le possibili differenze dipendenti da sesso, età e razza.

Risultati. I coefficienti di variazione risultati dagli studi *intra-* e *inter-assay* sono inferiori al 5% per tutte le condizioni di laboratorio esaminate. I test LUD e SRT hanno evidenziato un'ottima correlazione tra i valori attesi ed osservati. L'intervallo di riferimento registrato nell'intera popolazione è risultato di 38.1-80.8 U/mL. Nelle femmine adulte sono stati registrati valori più elevati rispetto ai maschi e ai castroni. Nei trottatori adulti sono stati registrati valori più elevati rispetto agli Warmbloods adulti.

Discussioni e Conclusioni. Il metodo automatizzato per la rilevazione dell'attività sierica di PON1 nella specie equina, basato sull'utilizzo del paraoxone come substrato è risultato accurato e preciso. Si suggerisce l'utilizzo di un unico intervallo di riferimento per giovani puledri e cavalli adulti, indipendentemente dal genere e razza.

Parole chiave. Cavallo, PON1, validazione, intervalli di riferimento.

ABSTRACT

Aim. The objectives of the study were to validate an automated paraoxon-based assay to measure PON1 activity in equine serum and to determine a reference interval (RI) in healthy horses and foals.

Materials and Methods. 120 healthy adult horses and 55 healthy foals were enrolled in this study. Blood samples were collected and serum was harvested. Serum PON1 activity was measured spectrophotometrically using an automated analyzer through paraoxon-based method. Intra-assay and inter-assay imprecision, linearity under dilution (LUD) and SRT (spiking recovery test), PON1 RIs were determined for healthy horses and the possible differences depending on gender, age and breed were investigated

Results. Intra- and inter-assay CVs (coefficients of variation) were lower than 5% for all the laboratory conditions explored in this study. LUD and SRT tests fitted the linear model. RI recorded in the whole caseload was 38,1-80,8 U/mL. Adult females' RI recorded was higher than males and geldings ones. In adults Trotters were recorded higher PON1 activity than in adults Warmbloods.

Discussion and Conclusions. The automated paraoxon-based method to assess serum equine PON1 activity was accurate and precise. It would be advisable to use a single reference interval for young foals and adult horses, independently on their gender or aptitude.

Key words. Horse, PON1, validation, reference intervals.

CAPITOLO 1 - PARAOXONASI

1.1 Introduzione

La paraoxonasi sierica è un'esterasi calcio-dipendente che catalizza l'idrolisi degli organofosfati, e di altri substrati quali gli esteri degli acidi carbossilici, e i carbamati. E' ampiamente diffusa in molti tessuti, come fegato, rene, intestino e nel siero è associata alle lipoproteine ad alta densità (HDL) (La Due et al., 1993; Nevin et al., 1996).

Mazur, nel 1946 è stato il primo a descrivere l'idrolisi enzimatica dei composti degli organofosfati da parte dei tessuti animali e durante gli anni '50 Aldrige ha descritto l'idrolisi del paraoxone nel siero di sangue umano e di altri mammiferi. Questo autore è stato il primo a proporre di chiamare "A-esterasi" le esterasi (come la paraoxonasi) capaci di idrolizzare i pesticidi organofosfati, distinguendole così dalle "B-esterasi", come carbolisterasi e colinesterasi, enzimi che sono inibiti dal paraoxone e da altri organofosfati. L'ampio uso del paraoxone come substrato per questi enzimi ha portato all'adozione del nome Paraoxonasi (PON) pressoché universale.

1.2 Polimorfismo genetico di PON

La PON1 è stata la prima paraoxonasi della famiglia multigenica ad essere stata scoperta, seguita da PON2 e PON3 (Primo-Parmo et al., 1996). I geni delle PON sono ampiamente espressi nei tessuti dei mammiferi (Rodriguez-Sanabria et al., 2010):

1. La sintesi di PON1 è prettamente epatica e nel circolo ematico questa proteina è legata quasi esclusivamente alle lipoproteine ad alta densità (HDL) (Durrington et al., 2001). Tale enzima è in grado di idrolizzare i metaboliti ossidi tossici di alcuni insetticidi, come per esempio il parathion, diazinone e clorpirifos-oxon (La Du, 1992), ed anche agenti nervini, come il sarin e il soman (Broomfield and Ford, 1991; Davis et al., 1996). La presenza di PON1 nei diversi tessuti garantisce una protezione contro l'esposizione cronica a bassi livelli di organofosfati; la sua efficienza però risulta essere di basso livello contro le esposizioni acute (Li et al., 2000). La PON1 è coinvolta nel processo antiossidante e antinfiammatorio ed esplica queste funzioni mediante tre attività enzimatiche: paraoxonasica, arilesterasica e lattonasica (Billecke et al., 2000).
2. I geni che codificano per la PON2 sono espressi da numerosi tessuti, in particolare dalle cellule associate alla parete vascolare e dai macrofagi, ma contrariamente agli altri membri di questa famiglia, la PON2 non viene rilasciata in circolo (Ng et al., 2001), perciò essa manifesta la propria attività antiossidante all'interno del citoplasma ritardando lo stress ossidativo cellulare e prevenendo l'apoptosi nelle cellule endoteliali vascolari (Horke et al., 2007).
3. I geni che codificano per la PON3 sono espressi sia a livello epatico sia renale e solo nell'uomo e nel coniglio è stato dimostrato il loro trasporto nel circolo ematico legato alle HDL (Draganov et al., 2000; Reddy et al., 2001). PON3 ha un'attività paraoxonasica e allisterasica

molto limitata, ma come PON1 idrolizza lattoni aromatici e alifatici a lunga catena, ed ha proprietà antiossidanti (Dragaov, dati personali).

Uno studio filogenetico tra vertebrati ha permesso la costruzione di uno schema basato sull'omologia strutturale e sulla distanza evolutiva tra le specie, mettendo così in evidenza che PON2 è il membro primitivo, mentre PON3 è stato il successivo, e molto più recentemente è comparso PON1 (Draganov e La Du, 2004). Basandosi sulla struttura di DNA complementare e sulla dedotta sequenza amminoacidica, si rileva più dell'80% di uguaglianza negli amminoacidi della PON1 di uomo, ratto e coniglio. All'interno di queste specie vi è per lo meno il 60% di uguaglianza tra PON 1, 2 e 3 (Primo-Parmo et al., 1996). Varianti polimorfiche sono comuni nelle PON di uomo e ratto. Da queste osservazioni è stato dedotto che questa famiglia di enzimi nasce da duplicazione genetica e che l'importante ruolo fisiologico di PON è assicurato dalla ridondanza e dal polimorfismo delle proteine (Draganov e La Du, 2004).

1.3 Ruolo fisiologico di PON1

La PON1 è una proteina glicosilata di 345 aminoacidi con peso molecolare di 43-47 kDa; l'enzima mantiene la sua sequenza segnale idrofobica nella regione N-terminale (con l'eccezione dell'iniziale metionina), la quale permette la sua associazione con HDL (Mackness et al., 1998). L'enzima possiede due siti per il legame con lo ione calcio con affinità differente: il più affine è essenziale per la stabilità della struttura enzimatica, l'altro è essenziale per l'idrolisi enzimatica (Harel et al., 2004, 2007).

Sebbene il substrato "naturale" per la PON1 sembrano essere i lattoni (Khersonsky e Tawfik, 2005), PON1 svolge la sua attività anche sui triesteri degli organofosfati, arilesteri, carbamatici ciclici, glucuronidi, esteri dell'estrogeno e tiolattone (Draganov et al., 2005).

Il ruolo fisiologico di PON1 sembra essere quello di offrire protezione contro la tossicità di alcuni organofosfati, ed esistono evidenze per gli effetti protettivi contro il danno ossidativo (Watson et al., 1995; Mackness et al., 1996, Banka, 1996), contribuendo alla protezione antiossidante conferita dalle HDL sull'ossidazione delle LDL e limitando la produzione di mediatori pro infiammatori (Watson et al., 1995; Banka, 1996).

Le lipoproteine ad alta densità (HDL) sono un agglomerato di proteine anfipatiche circolante (circa il 50% dell'intera massa molecolare) che stabilizza un'emulsione lipidica composta da un monostato di fosfolipidi (circa 25%) incorporato con colesterolo libero (circa 4%), con al centro trigliceridi (circa 3%) ed esteri del colesterolo (circa 12%).

I livelli plasmatici di colesterolo associato alle HDL sono ben conosciuti come fattore di rischio negativo per lo sviluppo di patologie cardiovascolari. Questo perché le HDL e la loro maggior costituente proteica l'apolipoproteina A-I, possiedono la capacità di mediare il trasporto inverso del colesterolo dai tessuti, dove è stato precedentemente trasportato da parte delle lipoproteine a

bassa densità (LDL), di nuovo al fegato, quando si verifica un eccesso di questo e di altri lipidi (Gordon et al., 2011).

Le LDL ossidate (ox-LDL) determinano l'*upregulation* della MCP-1 (*cell Monocyte Chemotactic Protein-1*) che svolge un ruolo importante negli stadi iniziali del processo infiammatorio nell'aterosclerosi. I monociti reclutati all'interno dello spazio sub-endoteliale si differenziano in macrofagi, i quali inglobano ox-LDL per diventare in seguito *foam cells*. Le *foam cells* andranno a costituire le cosiddette strie lipidiche, progenitrici dell'ateroma il quale può, in ultima analisi, condurre ad infarto miocardico e ictus (Lusis, 2000; Ross, 1993).

Tuttavia, studi recenti hanno rilevato che solo un terzo delle HDL è riconosciuto come mediatore del trasporto dei lipidi (Jahangiri, 2010; Van et al., 2010; Gordon et al., 2011). La restante parte gioca un ruolo nelle diverse aree di: inibizione delle proteasi, regolazione del complemento e della risposta infiammatoria di fase acuta. L'eterogeneità delle funzioni svolte dalle HDL risiede nel fatto che quest'ultime risultino un complesso di particelle singole, ciascuna delle quali conferisce una varia e distinta funzionalità alle HDL. Alcune di esse sono strettamente relazionate alla capacità delle lipoproteine di modificare il comportamento di determinate cellule o organismi rimuovendo parti lipidiche di questi (Gordon et al., 2011). In questa direzione è stata identificata PON1.

Le HDL ritardano l'ossidazione delle LDL, soprattutto grazie l'azione delle HDL associate a PON1 (Mackness et al., 2000; Mackness et al., 2002;), le quali idrolizzano i lipidi ossidati formatesi su LDL e HDL (Mackness et al., 1991; Aviram et al., 2000). Connessa a quest'attività, le HDL-PON1-associate sembrano essere responsabili di attenuare la stimolazione da parte delle ox-LDL alla migrazione intravascolare dei monociti, fornendo un'indiretta evidenza della soppressione della produzione di MCP-1 (Navab et al., 1991; Watson, 1995). La PON1 coniugata alle HDL è capace di idrolizzare i fosfolipidi ossidati a lunga catena che sono stati isolati da ox-LDL (Watson et al., 1995; Navab et al., 1996).

Sotto stress ossidativo, non solo le LDL sono suscettibili alla perossidazione dei lipidi, ma anche tutti gli altri lipidi sierici, inclusi quelli presenti nelle HDL, sono propensi all'ossidazione. Perciò l'inibizione dell'ossidazione delle HDL da parte di PON1 preserverebbe la funzione antiaterogenetica delle HDL nell'invertire il trasporto del colesterolo, così come la protezione verso l'ossidazione delle LDL. In particolare, in uno studio del 1998 (Aviram et al., 1998), gli autori rivelano che:

- è stata osservata una correlazione inversa tra l'attività sierica di HDL-PON1-associata e ossidabilità delle HDL (in soggetti volontari umani sani); quest'osservazione può spiegare il significato della relazione inversa tra l'attività sierica di PON1 e l'ossidazione delle HDL, in questo gruppo;
- è stato osservato un effetto inibitorio di PON1-purificata sull'ossidazione delle HDL;
- l'arricchimento di siero con PON1-purificata determina un aumento della resistenza all'ossidazione delle HDL;
- un'aumentata suscettibilità all'ossidazione delle HDL è stata osservata quando questa lipoproteina viene pretrattata con inibitori di PON1;
- è stata osservata una relazione diretta tra l'abilità dei vari inibitori di PON1 alla riduzione dell'attività sierica di PON1 e all'aumento dell'ossidabilità delle HDL;
- è stata osservata una correlazione inversa tra l'attività sierica di PON1 e lo stato ossidativo dei lipidi sierici in cavie con deficit dell'apolipoproteina E aterosclerotica.

La capacità di inibire l'ossidazione delle lipoproteine e la capacità di ridurre i perossidi associati alle lipoproteine, sembrano essere due proprietà separate di PON1: da una parte PON1 previene l'accumulo di lipidi ossidati durante il processo ossidativo e dall'altra utilizza e conseguentemente elimina lipoproteine ossidate preformate (Aviram et al., 1998). Perciò, entrambi questi

effetti determinano la capacità di PON1 di idrolizzare perossidi di specifiche lipoproteine (Navab et al., 1996, Watson et al., 1995).

L'aggiunta preventiva di PON1-purificata alle HDL dimostra il massimo effetto inibitorio sul processo di ossidazione delle lipoproteine, questo suggerisce che PON1 agisce sui piccoli quantitativi di perossidi associati alle HDL preesistenti (Aviram et al., 1998). L'incapacità di PON1 di inibire l'ossidazione delle HDL, quando essa viene aggiunta agli ultimi stadi dell'ossidazione delle lipoproteine, può essere relazionata all'inattivazione di PON1 da parte delle specie reattive dell'ossigeno (Hayek et al., 1997).

L'ossidazione delle LDL è considerata essere di importanza rilevante nella patogenesi dell'aterosclerosi (Steinberg et al., 1989; Aviram, 1996), perciò molti studi si sono riproposti di analizzare il meccanismo endogeno dell'inibizione dell'ossidazione delle LDL (Jialal e Grundy, 1992; Fuhrman et al., 1997). È stato suggerito come PON1 abbia un meccanismo che rimuova le lipoproteine ossidate aterogene dalla circolazione (e dagli spazi extracellulari) aumentandone l'*uptake* cellulare (soprattutto nel fegato), così come promuova la loro conversione a lipoproteine scarsamente aterogene (Aviram, 1993; Mitchinson et al., 1990). Inoltre anche solo un piccolo aumento nella concentrazione di HDL influenza molto il meccanismo aterogeno; questo effetto può essere relazionato all'aumento dell'attività di PON1 così come delle altre proteine associate alle HDL, quali l'apolipoproteina A-I, LCAT (Lecitina-Colesterolo Aciltransferasi), e PAF-AH (*Platelet-Activating Factor-Acetylhydrolase*) (Watson et al., 1995; Mackness et al., 1996).

Inoltre PON1 possiede proprietà antiinfiammatorie, poiché riduce produzione di fattori proinfiammatori. La protezione offerta da PON1 contro l'azione di ox-LDL sembra essere associata con la distruzione di fosfolipidi ossidati presenti nelle ox-LDL. Sia i fosfolipidi contenenti acido arachidonico ciclico e ossidato, sia prodotti frammentati di acido arachidonico rappresentano lipidi biologicamente attivi. In questa direzione è stata riconosciuta in PAF-AH

(*Platelet-Activating Factor-Acetylhydrolase*) e PON1 la capacità di distruggere i lipidi attivi in ox-LDL e che il loro effetto sia cumulativo. Da una parte PAF-AH inibisce la modificazione dell'apolipoproteina B100, dall'altra PON1 inibisce sia la produzione di lipoperossidi sia di TBARS (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances*, utilizzato per la misurazione dei prodotti della perossidazione lipidica). Entrambe le molecole, essendo associate a HDL, contribuiscono equamente alla protezione offerta dalle lipoproteine ad alta densità (Watson et al., 1995).

Le HDL sono state studiate per il loro ruolo protettivo contro la modificazione ossidativa di LDL, e per le loro proprietà antinfiammatorie grazie alla presenza di sistemi enzimatici associati alla lipoproteina (Van Lenten et al., 1995).

Ulteriori indagini sono state eseguite sul ruolo delle HDL durante la risposta infiammatoria di fase acuta (Van Lenten et al., 1995). La risposta infiammatoria di fase acuta è una reazione sistemica a processi infettivi e non infettivi di distruzione tissutale. Durante questa fase si verificano multipli adattamenti fisiologici, includendo in questo anche la sintesi epatica di varie proteine plasmatiche, denominate *markers* infiammatori della fase acuta. La proteina C reattiva (CRP) e la siero amiloide A (SAA) sono state riconosciute come *markers* infiammatori della fase acuta che interagiscono con le lipoproteine. CRP si lega con le lipoproteine contenenti apolipoproteina B, mentre SAA circola principalmente associata alle HDL (Benditt et al., 1979; Cabana et al., 1982; Rienhoff et al., 1990).

La ceruloplasmina è un altro reagente della fase acuta che presenta proprietà antiossidanti (Al-Timimi, 1977). Inoltre è stato dimostrato come essa possieda anche un effetto pro ossidante in situazioni in cui il pH tissutale assuma valori inferiori al *range* fisiologico, situazione attesa nei siti soggetti ad infiammazione. In questi casi la ceruloplasmina catalizza la reazione modificante le LDL (Lamb, 1994).

Le HDL hanno un ruolo protettivo nei confronti dell'endotelio vasale e delle cellule della muscolatura liscia, proteggendole dalla citotossicità delle ox-LDL

(Hessler et al., 1979). Estendendo questa considerazione, è stato dimostrato il ruolo protettivo delle HDL nei confronti dell'ossidazione delle LDL e soprattutto del ruolo svolto dai sistemi enzimatici associati alle HDL (Mackness, 1991; Stafforini, 1990). In quest'ottica uno studio della metà degli anni '90 (Van Lenten et al., 1995) ha dimostrato come le HDL si convertano da molecole antiinfiammatorie a molecole pro infiammatorie durante una risposta infiammatoria di fase acuta. In questa situazione particolare, in contrasto alle native molecole HDL che normalmente inibiscono la modificazione delle LDL e l'adesione dei monociti circolanti alle cellule endoteliali, sono state riscontrate HDL di fase acuta (AP-HDL) che potenziano l'adesione dei monociti. Durante la risposta di fase acuta, la composizione delle lipoproteine è modificata drasticamente: le HDL dimostrano un marcato aumento della proteina SAA con una concomitante perdita dell'apoA-I (ligando indispensabile per l'interazione delle HDL con le cellule e alla quale risulta strettamente associata PON1). Inoltre si ha una perdita dei sistemi enzimatici associati, quali PAF-AH e PON1, enzimi capaci di catalizzare l'idrolisi dei lipidi biologicamente attivi nelle ox-LDL. Queste alterazioni perciò possono essere considerati fattori contribuenti alla reazione infiammatoria di fase acuta.

Le situazioni fino ad ora discusse prendevano in considerazione condizioni di stress ossidativo determinato da cause non infettive, includendo in queste patologie cardiovascolari, diabete mellito, insufficienza renale cronica, infiammazione intestinale, chirurgie elettive.

In uno studio del 1998 (Feingold et al., 1998), gli autori hanno valutato in animali da laboratorio la SIRS (*Systemic Inflammatory Response Syndrome*) batterica indotta da lipopolisaccaridi. Lo studio ha dimostrato che l'attività di PON1 diminuisce in seguito alla somministrazione di LPS che mimano la reazione infiammatoria indotta da un'infezione batterica. La riduzione della PON1 circolante è dovuta sia a una diminuita produzione a livello epatico per riduzione del mRNA codificante la proteina, sia dal processo infiammatorio stesso mediato dalle citochine. La PON1, quindi, è stata classificata come una

proteina negativa della fase acuta (*negative Acute-Phase Protein, APP*) dell'inflammatione.

Novak e collaboratori (2010) hanno studiato l'attività della PON1 sierica in pazienti sani e settici ed hanno correlato i valori di questa proteina con la concentrazione di CRP e con i valori delle HDL. I risultati hanno mostrato una ridotta attività di PON1 nei pazienti settici in relazione ai valori osservati nei soggetti sani. Gli autori giustificano questo spiegando come l'ambiente ossidativo, indotto da uno stato di sepsi, determini un aumento dei legami fra radicali liberi e PON1, determinando perciò una riduzione dell'attività della stessa nel siero. Inoltre, i risultati hanno mostrato una correlazione fra la diminuzione dell'attività di PON1 e la diminuzione dei valori di HDL ed un aumento dei valori di CRP, nei pazienti settici.

1.4 Fattori che influenzano la PON1

Nell'uomo la PON1 è influenzata da (Jarvik et al., 2003):

1. polimorfismo genetico;
2. stile di vita;
3. dieta alimentare;
4. età;
5. sesso;
6. condizione fisiologica.

1.4.1 Polimorfismo genetico

Il gene codificante la PON1 contiene numerosi polimorfismi a nucleotide singolo (SNP) (Figura 1). Alcuni dei più comuni SNPs influenzano l'attività e la concentrazione di PON1, ciò permette di individuare soggetti con alta, media e bassa attività della paraoxonasi (Mueller et al., 1983).

Gli SNPs più comunemente studiati sono:

- la regione codificante Q192R, la quale determina un effetto substrato-dipendente sull'attività di PON1. Alcuni substrati, come il paraoxone, sono idrolizzati più velocemente dall'isoforma-R mentre altri, come il diazinone, il sarin e il soman, sono idrolizzati più velocemente dall'isoforma-Q (Mackness et al., 1998).

PON1_{Q192} è inoltre molto più efficiente a metabolizzare HDL o LDL ossidati di PON1_{R192} (Aviram et al., 2000);

- la regione codificante L55M, la quale è associata a differenti concentrazioni di PON1 nel siero, quindi a una sua differente attività. L'allele 55L determina un significativo aumento di mRNA per PON1 e dei livelli sierici della proteina, a differenza dell'allele 55M (Leviev et al., 1997);
- il promotore C-108T che è associato a differenti concentrazioni di PON1 nel siero e quindi a differenti attività. L'allele -108C ha una

grande attività promotrice rispetto all'allele -108T (Leviev et al., 1997; Leviev and James, 2000).

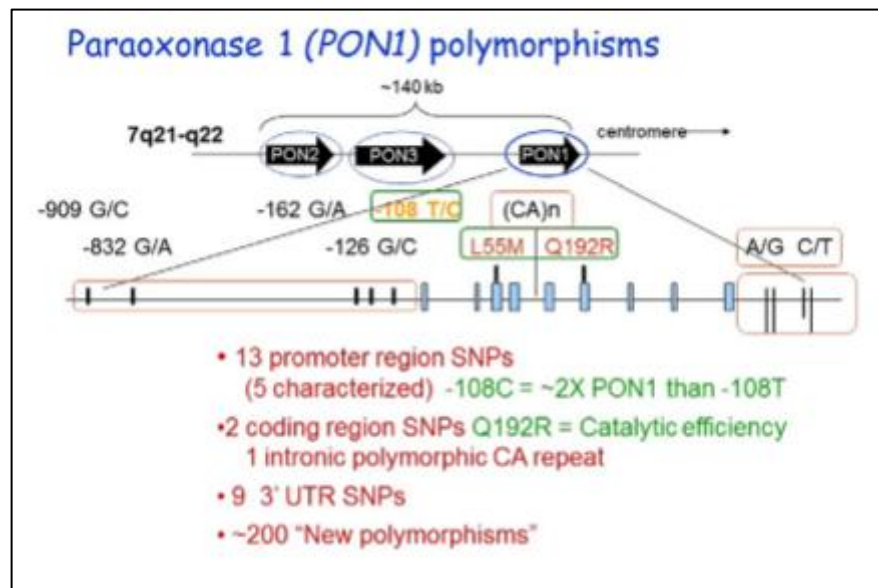


Figura 1. Polimorfismo di PON1 (da Mackness e Mackness, 2015)

Le due isoforme PON1Q e PON1R portano alla formazione di tre gruppi fenotipici: QQ, QR ed RR. Essi producono significative differenze nei valori di attività di PON1 tra gli individui che esprimono fenotipo QQ e RR. (Browne et al., 2007)

E' stato individuato che il polimorfismo di PON1 varia con l'etnicità; difatti la frequenza dell'allele 192R risulta essere del 15-30% tra la popolazione Caucasica, del 70-90% tra la popolazione dell'Estremo Oriente e dell'Africa Sub-Shariana (La Du, 1992). Negli stati del sud degli USA, gli Afro-americani risultano essere omozigoti per RR 5 volte di più dei Caucasici (McDaniel et al., 2014). Di contro l'allele 55M è molto meno frequente nella popolazione dell'Estremo Oriente e Africana rispetto ai Caucasici (Phuntuwate et al., 2005). Queste differenze etniche nella distribuzione del polimorfismo di PON1 possono portare ad una grande varietà nell'attività di PON1 tra le popolazioni (La Du, 1992), differenze di cui tenere conto nello studio dell'attività di questo enzima.

Solo un'analisi genomica riesce a fornire un'accurata valutazione degli effettivi livelli e attività di PON1 nel siero, prendendo in considerazione gli effetti che i polimorfismi hanno su questi.

1.4.2 Stile di vita

Per quanto riguarda la modulazione di PON1 da parte dello stile di vita, è risultato che (Costa et al., 2005a):

- il fumo di sigaretta inibisce l'attività plasmatica di PON1. I composti responsabili di ciò sono stati individuati in aldeidi reattivi e idrocarburi aromatici (Nishio et al., 1997);
- il consumo moderato di alcool determina un aumento dell'attività plasmatica di PON1, mentre un consumo elevato ne determina una diminuzione (Rao et al., 2003);
- il ruolo degli antiossidanti, somministrati con la dieta, nel modulare l'attività della PON1 è ancora dubbio. Alcuni studi sui flavonoidi riportano che questi antiossidanti possono aumentare l'attività di PON1 probabilmente proteggendo l'enzima dall'inattivazione ossidativa stress-indotta (Aviram et al., 1999).

Altri lavori però, riportano una correlazione negativa tra somministrazione di antiossidanti quali le Vit E e C e, l'attività sierica di PON1 (Rantala et al., 2002) o una non correlazione (Ferrè et al., 2003).

1.4.3 Dieta alimentare

Negli animali da laboratorio, una dieta aterogena (che prevede cioè un alto apporto di grassi saturi, idrogenati e colesterolo) determina una significativa diminuzione nell'attività e concentrazione di PON1, ed è associata ad una diminuzione nelle HDL-C (Shih et al., 1996; Forte et al., 2002). In medicina umana, una dieta con un alto contenuto di acidi grassi saturi porta ad una

diminuzione dell'attività di PON1 (De Roos et al., 2002). Al contrario, l'acido oleico, proveniente dall'olio di oliva, è associato ad un aumento della PON1 (Wallace et al., 2001; Tomas et al., 2001). In uno studio, nel quale uomini sani venivano alimentati con pasti ricchi di grassi cucinati, che contengono quindi un'alta concentrazione di lipidi ossidati, si mostrava una significativa diminuzione dell'attività dell'enzima (Sutherland et al., 1999). Questo risulta essere in accordo con studi condotti *in vitro*, dove PON1 risultava essere inattivata da lipidi ossidati e ox-LDL (Aviram et al., 1999).

In vitro, PON1 è protetta da polifenoli antiossidanti della quercitina e della glabridina, che suggerisce come una dieta ricca di alimenti antiossidanti possa giocare un ruolo simile *in vivo* (Aviram et al., 1999). Difatti, in uno studio condotto in umana e su animali da laboratorio, privati geneticamente dell'apoE, si è visto come il consumo di succo di melagrana, ricco di polifenoli e altri antiossidanti, possa innalzare l'attività di PON1 fino al 20% in più (Kaplan et al., 2001). Uno studio, condotto da Gouédard e colleghi (Gouédard et al., 2004), dimostra che una dieta ricca di polifenoli possa influenzare l'espressione genetica di PON1 (Gouédard et al., 2004). Difatti, la quercitina (somministrata alle stesse concentrazioni ottenute *in vivo* dopo un pasto ricco di polifenoli) induceva l'attività del promotore di PON1 in cellule in coltura. La quercitina agisce come ligando per AhR (*Aryl hydrocarbon Receptor*), esso attiva il fattore della trascrizione il quale lega a sua volta XRE (*Xenobiotic Responsive Element*). Una sovraespressione di AhR, determinata dai polifenoli, aumentava l'induzione genetica di PON1 (Gouédard et al., 2004).

1.4.4 Età

Studi effettuati su animali da laboratorio hanno mostrato che sia l'attività sierica sia l'espressione a livello epatico di PON1 sono molto basse alla nascita ed aumentano progressivamente fino al 21° giorno di vita (Li et al., 1997; Moser et al., 1998). Studi effettuati nell'uomo hanno mostrato una bassa

attività di PON1 alla nascita, che aumenta progressivamente fino a raggiungere un plateau tra il 6° e il 15° mese di vita (Ecobichon e Stephens, 1973; Mueller et al., 1983; Cole et al., 2003). L'attività di PON1 risulta essere costante nel tempo, una volta che ha raggiunto i valori dell'adulto (Zech et al., 1974; Karanth et al., 2000). A questo riguardo, negli animali da laboratorio, non sono state trovate differenze nei valori di questa proteina nei soggetti fra i 2 e i 24 mesi di vita (Karanth e Pope, 2000), mentre nell'uomo, l'attività di PON1 si stabilizza a livello dei valori dell'adulto intorno ai 7 anni di età.

Nel bovino, è stato individuato come nei vitelli sani l'attività di PON1 incrementava con l'età da 2 a 21 giorni di vita. D'altro canto non sono stati rilevati significativi aumenti dei valori dal 21 al 120 giorno di vita. I valori si presentavano significativamente elevati nei soggetti adulti (>12 mesi di età) rispetto ai vitelli di 21 giorni di vita, dove il valore mediano nei primi si attestava su 88,0 U/mL mentre nei secondi 40,4 U/mL (Giordano, 2013).

In medicina umana, l'attività di PON1 vede una progressiva diminuzione con l'invecchiamento del soggetto (Milochevitch e Khalil, 2001; Senti et al., 2001; Jarvik et al., 2002). Lo studio di Milochevitch e Khalil (2001), nel quale sono stati esaminati 95 soggetti di età compresa fra i 26 e i 77 anni, mostra una correlazione negativa significativa fra l'attività di PON1 nel plasma ed associata alle HDL e l'età dei soggetti (Figura 2). Questo declino può essere relazionato allo sviluppo di condizioni di stress ossidativo dovuto all'avanzare dell'età (Seres et al., 2004). Inoltre, essendo PON1 strettamente associata ad apoA-I, la diminuzione di quest'ultima proteina con l'invecchiamento può essere responsabile di una riduzione delle PON1 associate alle HDL (Frey et al., 1990; Milochevitch e Khalil, 2001).

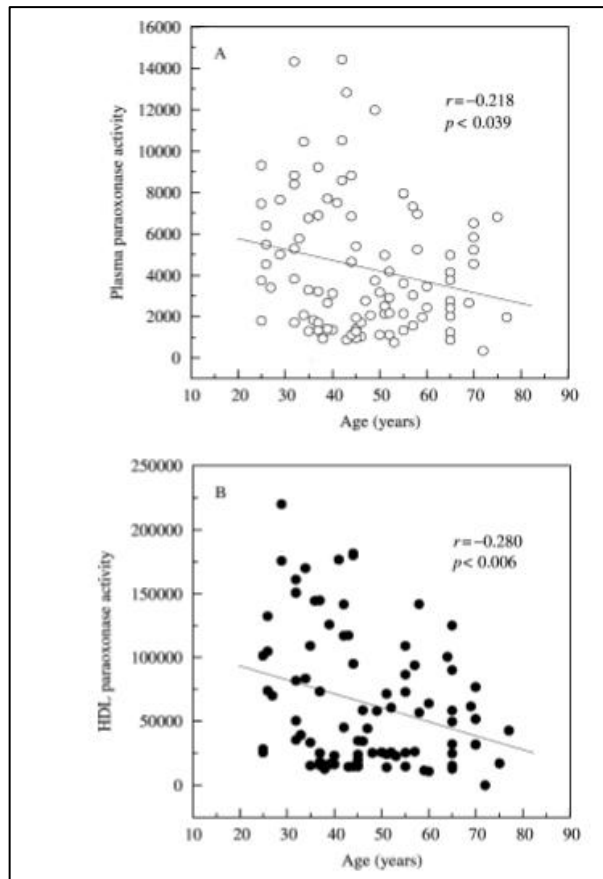


Figura 2. Correlazione dell'attività della paraoxonasi nel plasma (A) e associata alle HDL (B) con l'età. L'attività della paraoxonasi è stata determinata attraverso la misurazione della velocità d'idrolisi del paraoxone e normalizzata con le proteine totali attraverso la reazione di Pierce. Coefficiente di correlazione $r = -0.281$ ($P < 0.039$) e $r = -0.280$ ($P < 0.006$) rispettivamente per il grafico A e B (da Milochevitch e Khalil, 2001).

1.4.5 Sesso

Negli animali da laboratorio si riporta che le femmine presentano un'attività di PON1 più elevata del 14-26% rispetto ai maschi, e che i livelli di mRNA epatico siano più elevati del 40% nel genere femminile rispetto a quello maschile (Wehner et al., 1987; Ali et al., 2003). Tuttavia, nell'uomo l'eterogeneità genetica sembra mascherare l'influenza del sesso (Ali et al., 2003).

1.4.6 Condizioni fisiologiche

L'attività di PON1 può variare in base a diverse condizioni fisiologiche.

La gravidanza è stata associata con un basso livello di PON1 sia in studi effettuati in animali da laboratorio che nell'uomo (Weitman et al., 1983).

Soggetti praticanti una moderata attività fisica (definita come un consumo di circa 300 kcal/day), mostrano livelli di PON1 più elevati ed una minor concentrazione di perossidi di lipidi (Senti et al., 2003). Inoltre, l'attività fisica sembra aumentare i livelli di attività dell'enzima del 14% nei fumatori, i quali presentano bassi livelli di PON1, riportando la concentrazione ai livelli riscontrati nei non fumatori (Senti et al., 2003).

1.5 Metodi di dosaggio

La PON1 può essere valutata misurando la sua attività sierica, avvalendosi fondamentalmente dell'analisi spettrofotometrica (Costa et al., 2005a). Questa si basa sull'abilità di PON1 di idrolizzare substrati ed è, ad oggi, la tecnica più utilizzata, probabilmente per via del basso costo e della facilità di attuazione (Ceron et al., 2014).

La tecnica spettrofotometrica prevede l'unione del campione in analisi al substrato scelto, entrambi vengono poi dissolti in una soluzione buffer. Il prodotto generato dall'idrolisi del substrato viene attraversato da un raggio di luce artificiale, di lunghezza d'onda predefinita, monitorato in un determinato arco di tempo, con una determinata frequenza e ad una definita temperatura. Viene poi valutata l'intensità della luce trasmessa dopo il passaggio nella soluzione da dosare, che risulterà essere in funzione della concentrazione del substrato idrolizzato (Ceron et al., 2014).

Il buffer più utilizzato è il Tris-HCL, ma anche altri buffer, come la glicina, sono ampiamente utilizzati. Questi elementi mantengono il pH intorno a 8-8,5, in modo tale che la struttura di PON1 e la sua attività non ne siano influenzate (Dantoine et al., 1998).

La concentrazione del substrato dovrebbe essere stabilita e ottimizzata insieme al campione di analisi per assicurare una linearità alla reazione. Idealmente tale concentrazione dovrebbe essere sufficientemente alta da determinare la massima velocità in cui l'enzima è saturato dal substrato e così che l'attività dipenda esclusivamente dalla quantità di enzima nel campione (Main 1960).

A causa dell'assenza di un definitivo substrato "naturale", sono stati usati diversi substrati non fisiologici per misurare l'attività sierica di PON1 (Ceron et al., 2014).

PON1 è considerato un enzima "promiscuo" poiché possiede la capacità di idrolizzare differenti substrati come, i composti degli organofosfati, arilesteri

non fosforici ed anche lattoni, i quali sono considerati suo substrato primario (Khersonsky e Tawfik, 2006).

PON1 può essere valutata per le sue differenti attività (Ceron et al., 2014):

1. attività paraoxonasica, ovvero quando il paraoxone è usato come substrato;
2. attività arilesterasica, quando sono utilizzati substrati come il fenilacetato o 4-nitrofenilacetato;
3. attività lattonasica, quando il 5-tiobutil butirro lattone (TBBL) o altri lattoni sono usati come substrato.

Tuttavia questa terminologia non sembra essere accurata poiché aril- si riferisce a qualsiasi gruppo funzionale o sostituente derivato da un anello aromatico e perciò il paraoxone può essere considerato una arilesterasi e quindi incluso nel gruppo delle arilesterasi. Più in generale si può determinare l'attività di PON1 attraverso diversi substrati come il paraoxone, fenilacetato, 4-nitrofenilacetato, 5-tiobutilbutirro lattone (TBBL), o diidroocumarin (Ceron et al., 2014).

Correntemente nelle misurazioni descritte in letteratura, risulta esserci una grande eterogeneità nella selezione dei substrati, così come nelle condizioni in cui vengono utilizzati. Questa situazione può portare in definitiva ad una difficile possibilità di comparare i valori ottenuti dai diversi laboratori, generando risultati inappropriati per non aver usato adeguate procedure analitiche, o problemi nell'interpretazione dovuto al differente polimorfismo nell'attività dei substrati (Ceron et al., 2014).

Le caratteristiche dei diversi substrati sono state classificate tenendo conto di 4 fattori principali: tossicità, influenza del polimorfismo, velocità di idrolisi, performance diagnostiche (Ceron et al., 2014).

1.5.1 Tossicità

- Paraoxon. Esso è considerato estremamente instabile e tossico e che può determinare un rapido e grave avvelenamento da organofosfati. Esso è descritto come estremamente tossico per via inalatoria, al contatto con la pelle e può determinare cancro e danno genetico ereditabile. Perciò le soluzioni di paraoxone devono essere maneggiate sotto cappa e da personale che abbia preso le dovute misure di precauzione. Inoltre può determinare inquinamento del materiale di laboratorio, deve essere perciò maneggiato con strumenti propri e adeguati, e correttamente smaltito (Mogarekar, 2013);
- Fenilacetato. Esso non è considerato tossico quanto il paraoxone, ma necessita comunque di adeguate misure di sicurezza e di essere maneggiato sotto cappa. Inoltre risulta essere tossico se ingerito (Liao et al., 2007; Camps, 2009);
- 4-nitrofenilacetato. Esso è stato descritto come non tossico e non vi sono misure di sicurezza particolari che debbano essere applicate (Dantoine et al., 1998);
- 5-tiobutil butirro lattone. Esso è considerato come non tossico (Camps, 2009);
- Diidrocumarin. Esso è considerato estremamente tossico se inalato e al contatto con la pelle.

1.5.2 Influenza del polimorfismo

Come precedentemente spiegato, il polimorfismo genetico di PON1 determina un'importante differenza nell'attività dell'enzima stesso. Questa significativa differenza nei valori si verifica specialmente con le misurazioni attraverso il paraoxone (Davies et al., 1996).

Usando il fenilacetato, gli individui RR mostrano valori di PON1 1,46 volte più elevati degli individui QQ (Browne et al., 2007). Il 4-nitrofenilacetato

dimostra valori simili di PON1 quando è utilizzato come enzima purificato (Smolen et al., 1991).

Utilizzando TBBL i valori di PON1 variano notevolmente a seconda del polimorfismo così come il paraoxone (Marsillach et al., 2009).

1.5.3 Velocità di idrolisi

In medicina umana, la velocità d'idrolisi di PON1 risulta essere inferiore quando viene utilizzato il paraoxone come substrato piuttosto che fenilacetato o 4-nitrofenilacetato (Mackness et al., 1991). In medicina veterinaria, sebbene pochi studi siano stati effettuati, sembra che PON1 possa avere un differente spettro di attività non solo utilizzando diversi substrati ma anche secondo la specie in analisi (Aldridge, 1953; Main, 1960). Sebbene queste differenze, sembra che i lattoni siano considerati il substrato naturale e che meglio riflette l'attività fisiologica di PON1. Inoltre esso risulta strettamente correlato con l'attività riscontrata in medicina umana utilizzando il TBBL e il fenilacetato (Tawfik, 2006).

1.5.4 Performance diagnostiche

Possiamo individuare due situazioni principali:

- Condizioni o patologie in cui i substrati danno informazioni simili, per esempio: in medicina umana nei malati di HIV e nella diagnosi di insufficienza epatica il paraoxone e il TBBL hanno dato risultati simili (Parra et al., 2010; Marsillach et al., 2009); in veterinaria, nella diagnosi di lipidosi epatica, nelle vacche il dididrocumarin, fenilacetato e paraoxone hanno dato risultati simili (Farid et al., 2013).
- Condizioni o patologie in cui ci sono divergenze tra i substrati, per esempio: in medicina umana, comparando paraoxone, fenilacetato e 4-nitrofenilacetato è stato dimostrato che solo l'ultimo mostra significativi cambiamenti tra i pazienti con insufficienza renale e

individui sani (Dantoine et al., 1998). Inoltre, il fenilacetato è risultato essere un substrato più specifico e sensibile rispetto al paraoxone nell'identificazione in pazienti con insufficienza epatica (Keskin et al., 2009). Nel cane, il 4 nitrofenilacetato è risultato essere un substrato più specifico e sensibile rispetto al fenilacetato e TBBL nell'identificare soggetti con danno ossidativo (Tvarijonaviciute et al., 2012b).

1.5.5 Fonti che determinano interferenza

Le alterazioni del campione che determinano interferenza nella sua misurazione sono state riconosciute principalmente in:

- raccolta dei campioni in provette con EDTA. PON1 ha assoluto bisogno dello ione Ca^{2+} per la sua attività e stabilità, quindi l'uso di EDTA inattiverebbe l'enzima (Erdos, 1961). È riportato che anche il litio inibisce la sua attività (Aldrige, 1989). La raccolta e la conservazione dei campioni prevede l'utilizzo di provette da siero;
- gli effetti di emolisi e lipemia sembrano essere differenti in correlazione al metodo di analisi utilizzato. Per esempio, in uno studio su cani (Tvarijonaviciute et al., 2012b), nel quale sono state comparate diverse tipologie di metodi analitici, è stato valutato che:
 - Una significativa diminuzione di PON1 è ottenuta con una concentrazione di emoglobina elevata (> 8 g/dl, rappresentativa di grave emolisi) e di trigliceridi elevata (> 5 g/L), quando viene utilizzato TBBL come substrato.
 - Usando il fenilacetato, sono state rilevate simili interferenze per la presenza di trigliceridi ma non sono state rilevate interferenze per la presenza di emoglobina.
 - Usando il 4-nitrofenil acetato, sono state rilevate interferenze per la presenza di trigliceridi in quantità maggiore di 1,25 g/L, e per la presenza di emoglobina in quantità maggiore di 8 g/L.

In conclusione, sembra che solo un elevato grado di emolisi possa influenzare l'attività di PON1; similmente a quanto descritto in medicina umana, non sono state trovate sostanziali interferenze in presenza di emoglobina fino a 6 g/L, utilizzando come substrato il TBBL (Marsillach et al., 2009). Inoltre anche la lipidemia e l'ittero non sembrano avere influenza su analisi condotte con TBBL (Marsillach et al., 2009).

In ultima analisi, è generalmente riconosciuto il bisogno di una maggiore conoscenza su questa materia. Tuttavia, per le misurazioni di PON1, è consigliato cercare di selezionare il substrato più appropriato in termini di sensibilità e specificità clinica, con minore tossicità, e minore influenza del polimorfismo, e impostare adeguate condizioni per le reazioni enzimatiche, per evitare situazioni che possano influenzare negativamente le misurazioni, quali per esempio pH elevati, elevata concentrazione del substrato, e scorrette impostazioni dell'esame spettrofotometrico (Ceron et al., 2014).

CAPITOLO 2 – STATO DELL'ARTE

2.1 Medicina umana

In medicina umana, l'attività di PON1 è stata studiata approfonditamente in diverse condizioni patologiche e malattie.

2.1.1 PON1 e l'aterosclerosi

Il ruolo fisiologico della PON1 umana è stato prevalentemente studiato in relazione al processo patogenetico dell'aterosclerosi.

In situazioni fisiologiche, le HDL sono capaci di ritardare l'ossidazione delle LDL per prevenire lo sviluppo dell'aterosclerosi (Mackness et al., 2011). Numerose proteine associate alle HDL, inclusa PON1, contribuiscono a questa loro attività antiossidante.

La capacità di PON1 nel ritardare l'ossidazione delle LDL è stata dimostrata prima *in vitro* da Mackness e colleghi (1991 e 1993), e confermata successivamente da altri laboratori (Watson et al., 1995; Aviram et al., 1998; Ahmed et al., 2001; Draganov e La Du, 2004) ed estesa allo studio in associazione con HDL e membrane cellulari (Aviram et al., 1998; Deakin et al., 2011). In studi su culture cellulari, PON1 mostra una varietà di proprietà potenzialmente ateroprotettive, come ridurre lo stress ossidativo sui macrofagi e promuovere l'abilità dei macrofagi di ossidare le LDL, inibire la sintesi del colesterolo e promuovere l'efflusso del colesterolo (Aviram e Rosenblat, 2004; Berrougui et al., 2012).

Il meccanismo con cui PON1 ritardi l'ossidazione delle LDL non è ancora stato dimostrato ma sembra che coinvolga l'idrolisi degli acidi grassi ossidati troncati dai fosfolipidi, colesteril-esteri e idroperossidi dei trigliceridi, che porta alla produzione di lisolipidi, colesterolo, digliceridi, e acidi grassi ossidati (Tavori et al., 2011; Mackness, 2012; Mackness, 2015).

I lisolipidi e gli acidi grassi ossidati prodotti da PON1 sono loro stessi potenzialmente aterogeni, ma non sembrano tali quando prodotti sulle HDL (Mackness e Durrington, 1995). Gli idroperossidi non metabolizzati dei lipidi sono altamente infiammatori, ed inducono la produzione del fattore MCP-1 dalle cellule delle arterie, le quali attraggono monociti all'interno dell'intima del vaso all'inizio del processo ateroscleotico (Steinberg et al., 1989; Chisolm e Penn, 1996; Luisis, 2000).

In presenza di PON1, la concentrazione degli idroperossidi dei lipidi è ridotta, perciò la produzione delle MCP-1 è inibita (Navab et al., 1991; Mackness et al., 2004) e il processo aterosclerotico è attenuato. In esperimenti condotti su cavie, sulle quali venivano riprodotti modelli di aterosclerosi, i soggetti che esprimevano PON1 umana dimostravano un ritardato o annullato meccanismo di sviluppo dell'aterosclerosi che comprendeva una riduzione delle ox-LDL circolanti, una riduzione nello stress ossidativo dei macrofagi e della formazione di *foam cell*, un aumento nel trasporto inverso del colesterolo e una normalizzazione della funzione endoteliale (Shih et al., 1998; Tward et al., 2002; Rozenberg et al., 2005; Mackness et al., 2006; Guns et al., 2008).

Bassi livelli di PON1 sierica sono stati sempre associati con una maggiore suscettibilità allo sviluppo delle patologie coronariche (*Coronary Heart Disease*, CHD). Numerosi studi hanno dimostrato che una scarsa attività di PON1 è un fattore di rischio per lo sviluppo di CHD, indipendente dalla concentrazione delle HDL (Mackness et al., 2003; Bhattacharyya et al., 2008; Van Himbergen et al., 2008), dimostrando che i pazienti affetti da CHD possiedono un'attività di PON1 inferiore del 19% rispetto al gruppo di controllo ($P < 10^{-5}$). Un risultato simile è stato ritrovato in tutti i sottogruppi analizzati, che includono gruppi etnici e di età, di stenosi coronarica e infarto del miocardio (Wang et al., 2012).

In uno studio con il coinvolgimento di 3668 soggetti, sui quali era stata condotta un'angiografia elettiva coronarica senza la presenza di una sindrome coronarica acuta, è stata misurata ad ognuno di questi l'attività sierica di

PON1 (misurata in base alla capacità di idrolisi del paraoxone e del fenilacetato) e sono stati seguiti per tre anni consecutivi per possibili eventi cardiovascolari avversi di maggiore entità (MACE= *Major Adverse Cardiovascular Events*, quali per esempio: morte, infarto miocardico, ictus). Una bassa attività paraoxonastica e arilisterasica di PON1 sono associate entrambe con il rischio di MACE (Tang et al., 2012). Inoltre lo studio del polimorfismo di PON1 associato ai suoi livelli di attività non è stato associato al rischio di MACE, raggiungendo la conclusione che l'attività di PON1 è un determinante importante nello sviluppo di CHD e non è dipendente dal genotipo (Jarvik et al., 2000; Mackness et al., 2001). Sembra perciò, in base alle evidenze correnti, che l'attività di PON1 sia ateroprotettiva (Figura 3).

| Mechanism | Reference |
|--|---|
| Prevention of LDL and cell membrane oxidation | Aviram et al. (1998a), Mackness and Mackness (2012, 2014), Mackness et al. (1991, 1993b), Watson et al. (1995), Ahmed et al. (2001), Deakin et al. (2011) |
| Prevention of LDL glycation | Younis et al. (2013) |
| Prevention of diabetes development | Rozenberg et al. (2008), Koren-Gluzer et al. (2011) |
| Reduction of macrophage oxidative stress | Rozenberg et al. (2005) |
| Promotion of macrophage RCT | Berrougui et al. (2012), Rozenberg et al. (2005) |
| Normalisation of endothelial function | Besler et al. (2011), Guns et al. (2008) |
| Metabolism of homocysteine thiolactones ⁺ | Jakubowski (1999, 2000a,b) |
| Prevention of LCAT oxidative inactivation | Hine et al. (2012) |
| Disposal of toxic apoptosis products | Liu et al. (2012) |
| Prevention of apoptosis | Garcia-Heredia et al. (2013) |
| Reduction of monocyte macrophage inflammatory response | Rosenblat et al. (2011), Aharoni et al. (2013) |

⁺ A physiological role for PON1 in the detoxification of homocysteine thiolactone (HCTL) has recently been challenged with the discovery that biphenyl hydrolase-like protein has a catalytic efficiency towards HCTL $7.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ greater than PON1 indicating it to be the physiological detoxicant (Marsillach et al., 2014).

Figura 3. Potenziale meccanismo antiaterosclerotico di PON1 (da Mackness e Mackness, 2015).

2.1.2 PON1 e il diabete

Sia il diabete di Tipo 1, insulino-dipendente, sia quello di Tipo 2, non insulino-dipendente, sono stati associati con bassi livelli di attività di PON1 (Boemi et al., 2001; Mackness et al., 2002b).

Boemi e colleghi (2001) hanno dimostrato *in vitro* che quest'attività è ridotta fino al punto che possa alterare le capacità antiossidanti delle cellule, suggerendo un'associazione con la tendenza all'aumento dello stress ossidativo nei pazienti diabetici (Mackness et al., 1998; Mackness et al., 2002b).

Questa bassa attività è risultata indipendente dal genotipo (Boemi et al., 2001; Letellier et al., 2002; Mackness et al., 2002b; Agachan et al., 2004). Tuttavia, PON1_{55L} è stato frequentemente associato con comuni complicazioni del diabete, come la retinopatia (Kao et al., 1998; Mackness et al., 2000; Kordounori et al., 2001), e PON1_{192R} è stato più frequentemente associato con CHD in pazienti diabetici, rispetto alla popolazione generale (Pfohl et al., 1999; Aubo et al., 2000; Letellier et al., 2002).

Inoltre, il polimorfismo L55M è stato associato ad un non equilibrato meccanismo di deposito del glucosio (Deakin et al., 2002), un'alterata funzionalità delle cellule β (Deakin et al., 2002; Chiu et al., 2004) e un'aumentata insulino-resistenza nei soggetti sani (Barbieri et al., 2002).

In generale, i bassi livelli di attività di PON1 sono stati giustificati con un'alterazione nel processo di glicazione (glicosilazione non enzimatica) delle HDL e/o di PON1, con una diminuzione nell'attività di sintesi e un aumento del catabolismo, ed un aumento dello stress ossidativo (Boemi et al., 2001; Mackness et al., 2002b). In supporto a quanto sopra, i risultati di studi condotti *in vitro* mostrano come l'attività di PON1 e la sua concentrazione diminuiscano in soggetti con elevati livelli di glucosio a digiuno (Leviev et al., 2001; Kordounori et al., 2001). PON1 risulta trovarsi a bassi livelli anche in pazienti con sindrome metabolica, che presentano anormali livelli di glucosio a digiuno e un'aumentata insulino-resistenza (Senti et al., 2003).

2.1.3 PON1 e altre patologie infiammatorie

Una bassa concentrazione di PON1 nel siero è associata a molte altre patologie che possiedono un'importante componente infiammatoria, come patologie epatiche e renali (es. insufficienza renale), artrite reumatoide, ipertiroidismo, malattia di Alzheimer e demenza vascolare (Goswami et al., 2009).

Una diminuita attività sierica di PON1 è stata anche mostrata in pazienti con insufficienza renale cronica (sottoposti ad emodialisi) (Dantoine et al., 1998).

In uno studio, l'attività di PON1 ritorna a livelli normali in seguito a trapianto di rene, in soggetti con insufficienza renale cronica; questo suggerisce che l'effetto sui valori di PON1 è una conseguenza della patologia e non una causa sottostante (Dantoine et al., 1998).

L'ipertiroidismo è anch'esso associato a bassi livelli di attività dell'enzima (-40%) (Raiszadeh et al., 2004). I pazienti che successivamente al trattamento con metimazolo sono diventati eutiroidei, presentava livelli di attività inferiori solo del 14%, in relazione al gruppo sano di controllo (Raiszadeh et al., 2004). I pazienti che presentano la malattia di Alzheimer e demenza vascolare mostrano valori di PON1 inferiori del 30-40% (Paragh et al., 2002). Tuttavia, non è stato ancora riconosciuto se questa diminuzione sia causa o conseguenza di un aumento dello stato ossidativo, in quanto lo stress ossidativo è un fattore di rischio per lo sviluppo della demenza (Dantoine et al., 2002; Paragh et al., 2002).

In animali da laboratorio, ai quali era stato somministrato tetracloruro di carbonio epatotossico, presentavano valori dell'attività di PON1 diminuiti (Ferrè et al., 2001). Gli stessi autori hanno in seguito riscontrato nei pazienti che presentano patologia epatica cronica, come l'epatite cronica e la cirrosi, livelli di attività di PON1 diminuiti, i quali risultano essere più bassi in relazione alla gravità del danno epatico (Ferrè et al., 2002).

2.1.4 PON1 e le HDL disfunzionali

Le patologie precedentemente trattate sono ulteriormente caratterizzate dalla presenza di HDL disfunzionali (Mackness e Mackness, 2014). Questa terminologia è nata dall'osservazione di alcuni individui con elevata o normale concentrazione di HDL associate a colesterolo (HDL-C) ma con bassa attività sierica di PON1 che risultano essere suscettibili allo sviluppo di CHD, mentre altri individui con bassa concentrazione di HDL-C ma alta attività PON1 non lo erano (Navab et al., 1997).

Le HDL disfunzionali sono caratterizzate dalla riduzione della capacità di efflusso del colesterolo, ma anche e principalmente sono caratterizzate dalla perdita della loro funzione antinfiammatoria e antiossidativa (Mackness e Mackness, 2015). Perciò le HDL derivanti da pazienti con un'ampia varietà di patologie con un'importante componente infiammatoria, non inibiscono la chemiotassi dei monociti ma piuttosto la incrementano, si conclude perciò che questi HDL disfunzionali siano spesso pro infiammatori e promotori dello sviluppo di CHD (Navab et al., 2006). Analogamente, HDL da pazienti che presentano CHD (dovute ad una mancanza dell'attività di PON1) sono incapaci di attivare l'enzima eNOS (enzima responsabile della produzione di Ossido Nitrico) delle cellule endoteliali e perciò incapaci a mantenere una normale funzionalità dell'endotelio vascolare (Besler et al., 2011).

Al momento non è ancora noto se il basso livello di PON1 in queste patologie sia primariamente responsabile nell'eziologia di queste o se semplicemente sia una conseguenza della presenza della patologia (Mackness e Mackness, 2015). Saranno perciò necessari futuri studi epidemiologici per trovare risposta a questo quesito e per chiarire un possibile ruolo di PON1 come potenziale target terapeutico o come potenziale strumento diagnostico (Mackness e Mackness, 2015).

2.1.5 PON1 e l'intossicazione da organofosfati

Il rapporto tra PON1 e l'intossicazione da organofosfati è stato ampiamente studiato, con ricerche condotte sia nell'uomo sia negli animali (Mackness e Mackness, 2015).

I composti organofosfati (OPs) sono ampiamente utilizzati sia in ambienti rurali sia urbani, portando perciò la popolazione ad un'ampia esposizione. Gli OPs sono attivati nell'organismo da un processo noto come desolforazione ossidativa che conduce alla formazione dell'oxone tossico. La maggior parte degli OPs sono substrati di PON1, ed inoltre sono idrolizzati ad una diversa velocità dall'isoforma PON1-Q rispetto all'isoforma -R (Mackness e

Mackness, 2015). Perciò, la maggior parte degli studi condotti in quest'ambito si sono concentrati sulla determinazione genetica dell'intossicazione da OPs (Costa et al., 2013).

Studi condotti su animali hanno dimostrato abbondantemente che PON1 protegge dall'intossicazione da OPs (Mackness e Mackness, 2015). La somministrazione di PON1 esogena a cavie protegge contro la tossicità degli OPs, soprattutto l'isoforma che presenta una maggiore velocità nell'idrolisi di tali composti (Li et al., 2000). Al contrario cavie private del gene PON1 risultavano molto più suscettibili alla tossicità degli OPs e la somministrazione di PON1 esogeno ristabiliva la resistenza a questi composti (Shih et al., 1998). L'esposizione quotidiana a OPs è stata associata ad un aumento del rischio di sviluppo di Parkinson nei soggetti portatori di PON1-55M e nell'aumentato rischio di sviluppo di tumori cerebrali nei bambini con una bassa attività di PON1 (Nielsen et al., 2005; Manthripragada et al., 2010).

L'esposizione in utero a OPs di feti di madri con bassi livelli di PON1 è risultato nella nascita di bambini con una circonferenza della testa minore e un periodo gestionale più breve (Berkowitz et al., 2004; Harley et al., 2011). In bambini esposti in utero a OPs e con bassi livelli di PON1 sono stati associati a scarsi risultati nei test di sviluppo cognitivo (Eskenazi et al., 2010; Engel et al., 2011).

2.1.6 PON1 e l'infezione

In un recente studio, condotto nel 2015, da Simona Iftimie e colleghi, è stata investigata la relazione fra le alterazioni nei livelli sierici di PON1 e le caratteristiche d'infezione in un gruppo di pazienti con catetere venoso centrale permanente (CVC).

Lo studio ha dimostrato una significativa diminuzione dell'attività sierica di PON1 in questa tipologia di soggetti, misurando l'attività TBBLasica (attività lattonasica) e paraoxonasica (attività esterasica) di questo enzima. In particolare è risultato che i livelli di concentrazione di PON1 non erano

diminuiti ma rimanevano invariati, ciò implicava che la diminuzione della sua attività era dovuta all'inattivazione dell'enzima e come conseguenza, anche le attività specifiche di PON1 risultavano diminuite.

Tale inattivazione è stata spiegata con diverse motivazioni:

1. i pazienti facenti parte del gruppo di studio presentavano patologie strettamente associate a stress ossidativo (diabete mellito, patologie polmonari, patologie ischemiche cardiache, dislipidemia, cancro); degradando i perossidi lipidici, l'enzima PON1 veniva inattivato, ciò implicava una diminuzione totale dell'attività enzimatica;
2. alcuni batteri sono in grado di inattivare PON1, come per esempio la *quorum sensing* lattonasi prodotta dai batteri Gram-negativi che determina una rapida inattivazione e degradazione di PON1 (Schweikert et al., 2012).

La conclusione più importante a cui è arrivato questo studio è rappresentata dal fatto che le specifiche attività TBBLasica e paraoxonasica possiedono una buona precisione nella diagnosi di infezioni acute concomitanti (ACI) in pazienti con CVC permanente.

Questo preliminare studio è stato condotto su una popolazione eterogenea, i cui soggetti differivano fra di loro per l'eziologia e le co-morbilità; inoltre, il numero dei soggetti era relativamente basso. Risulta comunque notevolmente importante come punto di partenza per studi condotti su una popolazione più grande, per poter confermare l'ipotesi conclusiva avanzata.

2.2 Medicina veterinaria

In medicina veterinaria sono stati condotti, in anni più recenti, studi sul ruolo fisiologico di PON1 e sulla sua possibile utilità clinica, come mezzo diagnostico e come strumento per lo studio dell'andamento del trattamento terapeutico. Gli studi si sono maggiormente concentrati nelle specie canina e bovina, in minor misura anche nella specie felina; inoltre, preliminari studi sono stati effettuati anche nella specie suina.

2.2.1 Specie Bovina

In buiatria, PON1 è stata studiata in relazione soprattutto allo stato lipidico nella vacca da latte e in relazione allo stress ossidativo strettamente collegato all'impiego produttivo di tali animali.

Lo studio di M. Antoncic-Svetina e colleghi (2011), si concentra sull'analisi del livello sierico di lipidi e lipoproteine, sui parametri metabolici e sull'attività di PON1 in vitelle non gravide, in ottimo stato di salute e in vacche da latte nel periodo di lattazione, anch'esse in salute. Nelle prime è stato ragionevolmente supposto che si trovassero in un'ottimale condizione energetica, in comparazione con il secondo gruppo di vacche, valutate durante il periodo di lattazione, al quale sono difatti associati eventi di intenso stress ossidativo.

In studi precedentemente condotti, una riduzione dei trigliceridi sierici e un aumento della concentrazione di colesterolo è stata riconosciuta nelle vacche durante il periodo di lattazione (Mazur et al., 1988; Marcos et al., 1990).

Nello studio attuale sono stati ritrovati livelli di colesterolo totale molto più alti nelle vacche in lattazione rispetto alle vitelle. Inoltre, sono stati osservati anche livelli di HDL-C sierica più elevati nelle vacche in lattazione rispetto alle vitelle. Il concomitante aumento sia del colesterolo totale che quello legato alle HDL è in accordo con la nozione che le HDL sono le principali

trasportatrici del colesterolo nelle vacche, in contrasto con altre specie, soprattutto nell'uomo, dove le LDL rappresentano la principale classe di lipoproteine (Link et al., 2007).

Le HDL rappresentano più dell'80% delle lipoproteine totali nelle vacche, mentre le LDL rappresentano meno del 10% del totale, e le VLDL (*Very Low Density Lipoproteins*) risultano essere solo il 5% (Bauchart, 1993; Gardner et al., 2003). Collegato a questa particolarità fisiologica, vi è il fatto che la lecitina-colesterol aciltransferasi (LCAT), nelle vacche da latte, sembra promuovere l'accumulo degli esteri del colesterolo nelle HDL piuttosto che nelle altre lipoproteine circolanti (Bruss, 2008).

Nelle vacche in lattazione, la richiesta energetica per la produzione di latte spesso eccede il supporto energetico fornito dalla dieta alimentare. Perciò, si verifica un aumento nella mobilizzazione degli acidi grassi da parte del tessuto adiposo, che determinano un accumulo lipidico a livello del fegato e di conseguenza un'alterata funzionalità epatica. Nello studio è stata trovata una concentrazione sierica di bilirubina e di GGT (Gamma Glutamyltranspeptidasi) significativamente elevata nelle vacche da latte rispetto alle vitelle, indicativo dell'affaticamento epatico durante la lattazione. Sebbene il livello sierico di HDL-C sia risultato essere più elevato nelle vacche in lattazione, l'attività di PON1 ed il rapporto PON1/HDL è risultato significativamente più elevato nelle vitelle. Considerando che PON1 prende parte ai meccanismi antiossidanti, questi risultati vanno ad indicare come le vitelle si trovino in uno stato antiossidante rispetto alle vacche in lattazione. I livelli discrepanti tra PON1 e HDL-C nelle vitelle sembrano suggerire che l'attività di PON1 può essere diminuita indipendentemente dal livello delle HDL, come precedentemente dimostrato nelle vacche (Turk et al., 2004).

La ragione per i bassi livelli di attività di PON1 nelle vacche in lattazione può essere ricercata nell'inattivazione di tale enzima dovuto allo stress ossidativo provocato dalla gravidanza, dal parto e dall'inizio del periodo di lattazione. Nel presente studio, tale risultato è supportato dalla mancanza di correlazione

tra PON1, HDL-C e colesterolo totale sia nelle vitelle sia nelle vacche in lattazione.

Nell'ottica dello studio dei valori di PON1 nelle vacche da latte in relazione alle loro particolari condizioni di allevamento, si può citare un successivo lavoro di A. S. Farid et al., (2013), dove viene presa in considerazione la PON1 come *biomarker* per la diagnosi di fegato grasso (steatosi epatica) nelle vacche da latte.

La steatosi epatica è uno dei maggiori disordini metabolici che affligge le vacche da latte, coinvolgendo approssimativamente la metà dei soggetti in allevamento, nel periodo subito dopo il parto (Jorritsma et al., 2000).

È comunemente associata con una riduzione della produttività, della fertilità e della funzionalità immunitaria, e può portare ad insufficienza epatica e morte prematura (Katoh, 2002; Bobe et al., 2004).

Per lo più tutte le vacche da latte ad alta produzione si trovano in bilancio energetico negativo nelle prime fasi della lattazione, poiché la richiesta energetica eccede la capacità di assunzione di alimento (Collins e Reid, 1980). Perciò, la steatosi epatica si verifica principalmente nelle prime 4 settimane dopo il parto (Grummer, 1993; Cebra et al., 1997), quando l'*uptake* epatico dei lipidi eccede l'ossidazione lipidica e la secrezione da parte del fegato stesso. Inoltre, il fegato bovino risulta essere inefficiente all'esportazione dei trigliceridi (TG) nelle lipoproteine VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*) (Bobe et al., 2004).

Questo stato porta all'accumulo dei TG nel fegato, conducendo ad uno squilibrio nel metabolismo epatico (Katoh, 2002). Sebbene, vacche con steatosi epatica lieve-moderata non dimostrano necessariamente sintomatologia clinica, la condizione è stata associata con problemi di salute e di produzione (Gerloff et al., 1986). Nonostante sia molto rilevante dal punto di vista dell'economia di allevamento, questa patologia è spesso mal identificata e sottovalutata a causa della difficoltà nella diagnosi (Kalaitzakis et al., 2010).

La PON1 viene misurata nel bovino utilizzando due substrati che sono i più comunemente usati: il paraoxone e il fenilacetato (Antoncic-Svetina et al., 2011).

Poiché il fegato gioca un ruolo fondamentale nella sintesi della PON1, è stato ragionevolmente supposto che possa esistere un'associazione tra livelli sierici di attività di PON1 e lo sviluppo di scompenso epatico durante l'avanzamento della steatosi epatica nella vacche da latte.

Gli standard test biochimici per rilevare la funzionalità del fegato non sono sufficienti per diagnosticare con certezza la steatosi epatica nelle vacche da latte; perciò la diagnosi definitiva viene effettuata tramite lo studio citologico di una biopsia epatica. Purtroppo questa procedura risulta essere estremamente invasiva e costosa, rendendola poco praticabile nella realtà di allevamento (Bobe et al., 2004). Perciò, nell'ottica di trovare un metodo di diagnosi non invasivo e facilmente attuabile, è stato condotto questo studio per valutare il potere diagnostico nella misurazione dell'attività sierica di PON1, sia da sola sia in associazione ai test standard per la valutazione della funzionalità epatica, nella diagnosi di steatosi epatica.

Lo studio è stato condotto procedendo alla misurazione dell'attività lattonasica di PON1. Tale substrato è stato scelto per le seguenti motivazioni:

- a confronto con il paraoxone, risultava un substrato estremamente più stabile e non tossico, che risulta quindi essere adatto all'impiego nella normale routine quotidiana di analisi nella pratica veterinaria;
- inoltre, risulta essere discutibile in misura minore la sua interpretazione dei risultati a confronto con quelli misurati usando come substrato il paraoxone, che è notoriamente un substrato non biologico e innaturale;
- in più l'attività enzimatica sul paraoxone è estremamente influenzata dal polimorfismo di PON1, che non è ancora stato ben investigato nel bovino. (Camps et al., 2009).

Nel presente studio è risultato che l'attività sierica di PON1 è significativamente ridotta nelle vacche con steatosi epatica, in comparazione

con un gruppo di controllo sano. Tale risultato può essere spiegato come segue:

- La diminuzione di PON1 può essere spiegata come una diminuzione nella sua stessa sintesi da parte del fegato (Feingold et al., 1998; Kumon et al., 2003) possibilmente dovuta all'aumento epatico e sierico della citochina (TNF- α) pro infiammatoria nelle vacche con steatosi epatica (Ohtsuka et al., 2001; Bobe et al., 2004).
- La riduzione nell'attività sierica di PON1 può essere attribuita ai cambiamenti nella struttura delle HDL e nella loro composizione (James e Deakin, 2004); questo è supportato dalla diminuzione di LCAT che come PON1 è una proteina associata alle HDL (Sabesin et al., 1997).
- Le vacche che sviluppano steatosi epatica vanno incontro ad un aumento nella produzione dei radicali liberi, manifestata da un aumentato livello di malondialdeide (Mudron et al., 1999), ed è riconosciuto che PON1 viene consumata in seguito all'idrolisi dei perossidi lipidici (Aviram et al., 1999).

In vacche da latte sane, l'accumulo dei lipidi avviene principalmente sottoforma di TG, quest'accumulo raggiunge dieci volte il normale valore nelle vacche che soffrono di steatosi epatica (Reid, 1980; Kalaitzakis et al., 2010). Risulta perciò che l'enorme accumulo di trigliceridi nel citoplasma degli epatociti determina un disturbo nella struttura e funzionalità epatica (Reid, 1980).

La perdita di enzimi da parte degli epatociti è una delle manifestazioni di questa alterazione. L'AST (Aspartato Transaminasi) aumenta in maniera importante in accordo con la gravità del danno epatico, inducendo un ulteriore accumulo di grasso (Ohtsuka et al., 2001) ed è stato riscontrato inoltre un aumento della bilirubinemia nel gruppo di vacche in studio che suggerisce un danno epatico causato da un aumento della bilirubina non coniugata (Kaneko et al., 2008).

Gli alti livelli di bilirubina osservati si possono inoltre spiegare con i bassi livelli di sintesi degli enzimi epatici, necessari per rimuovere la bilirubina dal circolo ematico; questi enzimi possono anche essere considerati come proteine di fase acuta negative (Kamisako et al., 2000).

Nello studio sono stati perciò identificati come ottimi *biomarkers* per performance diagnostiche i NEFA (*Non Esterified Fatty Acids*), BHBA (*B-HydroxyButyric Acid*), AST e profilo lipidico, alle quali si può quindi aggiungere la valutazione dei livelli sierici di PON1, che conferisce una combinazione di alta sensibilità e specificità, e soprattutto di accuratezza nella diagnosi di steatosi epatica (AUC-ROC di PON1 per il riconoscimento di fegato grasso presentava un'accuratezza maggior del 98%) (Figura 4).

| Test/panel of tests | Sensitivity | | Specificity | | PPV | | NPV | | +LR | -LR | DOR | | Accuracy | | |
|-------------------------------|-------------|-----------|-------------|-----------|------|-----------|------|-----------|--------|------------|--------|---------|----------|----------------|------|
| | % | 95% CI | % | 95% CI | % | 95% CI | % | 95% CI | 95% CI | 95% CI | 95% CI | % | | | |
| PON | 86.7 | 75.7-94.2 | 93.5 | 80.9-97.5 | 92.8 | 81.0-98.3 | 87.7 | 72.5-94.4 | 12.2 | 4.1-36.7 | 0.1 | 0.0-0.2 | 93.1 | 21.8-398.0 | 90.1 |
| NEFA | 92.8 | 81.3-97.6 | 86.9 | 72.5-98.1 | 86.6 | 73.0-94.5 | 92.0 | 79.4-98.1 | 6.9 | 3.2-14.7 | 0.0 | 0.0-0.2 | 86.6 | 20.2-371.0 | 89.7 |
| NEFA+PON | 99.7 | 89.6-99.8 | 95.2 | 83.0-99.1 | 95.4 | 83.7-99.1 | 99.7 | 89.2-99.8 | 21.0 | 5.6-78.6 | 0.0 | 0.0-1.1 | 8440.0 | 14.6-4871511.6 | 97.7 |
| NEFA+BHBA | 92.8 | 81.3-97.6 | 90.9 | 77.4-96.1 | 90.6 | 77.4-97.0 | 93.0 | 79.4-98.1 | 9.5 | 3.7-24.2 | 0.0 | 0.0-0.2 | 123.3 | 25.8-588.2 | 91.8 |
| NEFA+BHBA+PON | 97.6 | 87.9-99.5 | 95.4 | 83.8-98.6 | 95.3 | 83.3-99.2 | 97.6 | 85.9-99.8 | 20.0 | 5.1-77.4 | 0.0 | 0.0-0.1 | 819.0 | 71.4-9393.6 | 96.5 |
| NEFA+BHBA+AST | 92.5 | 79.0-98.1 | 90.2 | 75.9-96.8 | 90.2 | 77.4-97.0 | 93.0 | 78.5-98.0 | 9.7 | 3.8-24.7 | 0.0 | 0.0-0.2 | 166.5 | 28.6-966.1 | 91.6 |
| NEFA+BHBA+AST+PON | 97.5 | 86.8-99.5 | 95.4 | 83.5-98.6 | 95.1 | 83.3-99.2 | 97.6 | 85.2-99.8 | 19.4 | 5.0-75.3 | 0.0 | 0.0-0.1 | 722.0 | 62.7-8301.8 | 96.4 |
| NEFA+BHBA+AST+LCAT | 94.8 | 82.7-98.5 | 90.0 | 77.4-96.1 | 90.2 | 75.4-96.7 | 94.7 | 81.3-99.1 | 9.7 | 3.8-24.7 | 0.0 | 0.0-0.2 | 166.5 | 28.6-966.1 | 92.4 |
| NEFA+BHBA+AST+LCAT+PON | 97.4 | 86.8-99.5 | 95.0 | 83.5-98.6 | 95.0 | 81.7-99.1 | 97.4 | 84.9-99.8 | 19.4 | 5.0-75.3 | 0.0 | 0.0-0.1 | 722.0 | 62.7-8301.8 | 96.2 |
| NEFA+BHBA+AST+LCAT+T.CHOL | 97.4 | 86.8-99.5 | 95.0 | 83.5-98.6 | 95.0 | 81.7-99.1 | 97.4 | 84.9-99.8 | 19.4 | 5.0-75.3 | 0.0 | 0.0-0.1 | 722.0 | 62.7-8301.8 | 96.2 |
| NEFA+BHBA+AST+LCAT+T.CHOL+PON | 99.7 | 88.4-99.8 | 97.2 | 84.9-99.8 | 97.2 | 84.9-99.8 | 99.7 | 88.4-99.8 | 36.4 | -5.7-230.2 | 0.0 | 0.0-1.2 | 13898.2 | 21.1-9140510.2 | 98.7 |

NPV, negative predictive value; PPV, positive predictive value; +LR, positive likelihood ratio; -LR, negative likelihood ratio; DOR, diagnostic odd ratio.
The cut-off values used for the tests were ≤ 53.22, 0.39, 1.28, 101.00, 3.31, 2.43 for PON (U/ml), NEFA (mmol/L), BHBA (mmol/L), AST (U/L), LCAT (470/390) and T.CHOL (mmol/L), respectively.

Figura 4. Caratteristiche performance dei principali test di analisi per la diagnosi di steatosi epatica (da Farid et al., 2013).

Da un punto di vista economico, la combinazione della misurazione di PON1 e NEFA potrebbe risultare ottima per la diagnosi poiché fornisce sensibilità e specificità e un'accuratezza paragonabile alla precedente.

In ultima analisi, è interessante prendere in esame lo studio di A. Giordano e collaboratori, del 2013, che concentra la sua attenzione sull'indagine dei cambiamenti nell'attività sierica di PON1 in relazione all'età nei vitelli neonati e sulla sua utilità clinica nei vitelli malati.

Il risultato ottenuto è stato quello di un mancato significativo aumento nell'attività di PON1 nei vitelli dalla nascita a 2 giorni di vita, mentre si rileva un significativo aumento al 3° giorno e così via fino all'età di 21 gironi. Non

sono stati riscontrati cambiamenti significativi da 21 a 120 giorni di vita. Inoltre negli adulti i livelli sono significativamente più elevati rispetto ai vitelli di 21 giorni e nei giovani vitelli (Figura 5).

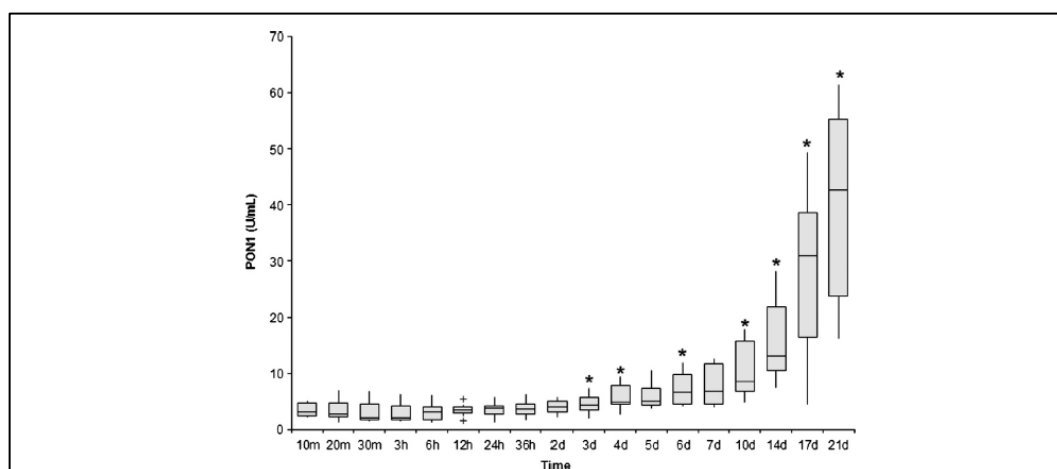


Figura 5. Cambiamento dell'attività della PON1 in vitelli neonati (n=9) in relazione all'età. I riquadri grigi indicano lo scarto interquartile e le linee orizzontali indicano il valore mediano. Le linee verticali indicano l'ampiezza della distribuzione dei valori, escludendo i valori anomali. Con il simbolo '+' si indicano i valori anomali tra 1,5 e 3,0 di scarto interquartile. Gli asterischi indicano valori che sono significativamente differenti dai precedenti campionamenti ($P < 0,05$) (da Giordano et al., 2013).

Facendo i confronti con i soggetti malati, è stato rilevato che l'attività di PON1 è significativamente più bassa nei vitelli di età inferiore ai 7 giorni in relazione ai soggetti sani della medesima età ed anche nei vitelli che si trovano fra i 28 e i 120 giorni; ciò non è valido per i soggetti patologici che hanno un'età di 10 gironi (Figura 6).

La bassa attività di PON1 registrata nei soggetti sani neonati può essere correlata all'imaturità del fegato o una differenza nel metabolismo lipidico nei vitelli in relazione a quello degli adulti. Inoltre, i vitelli risultano essere molto più soggetti allo stress ossidativo rispetto agli adulti, condizione che può perciò inattivare PON1.

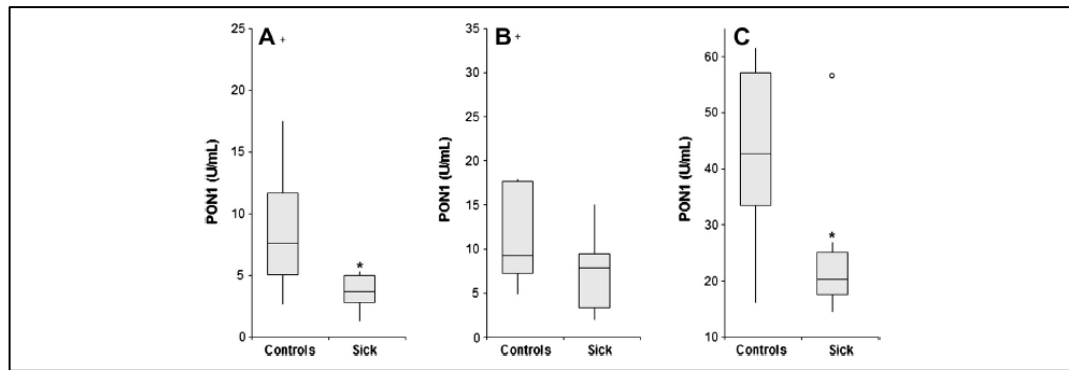


Figura 6. Comparazione dei valori di PON1 in vitelli malati e vitelli clinicamente sani in tre intervalli di età. I vitelli di 7 giorni (A) (malati: n=8; gruppo di controllo: n=20). I vitelli di 10 giorni di età (B) (malati: n=9; gruppo di controllo: n=10). Giovani vitelli (C) (malati: n=8; gruppo di controllo: n=15). I riquadri grigi indicano lo scarto interquartile e le linee orizzontali indicano il valore mediano. Le linee verticali indicano l'ampiezza della distribuzione dei valori, escludendo i valori anomali. Con il simbolo '+' si indicano i valori anomali "vicini" tra 1,5 e 3,0 di scarto interquartile. Con il simbolo '°' si indicano i valori anomali "lontani" oltre 3,0 di scarto interquartile. Gli asterischi indicano valori che sono significativamente differenti dai precedenti campionamenti ($P < 0,01$) (da Giordano et al., 2013).

Da questo studio si conclude che la bassa concentrazione di PON1 non deve essere relazionata ad uno stato infiammatorio o patologico del soggetto neonato. Tuttavia, si può considerare PON1 una APP negativa utile nella diagnosi di stato infiammatorio nei vitelli neonati, facendo riferimento però agli adeguati intervalli di riferimento.

2.2.2 Specie Canina

Nella specie canina sono stati effettuati studi riguardo PON1 e la sua attività sierica, individuandone i limiti di riferimento, valutando il suo possibile ruolo come proteina negativa di fase acuta, ed un suo possibile impiego nella valutazione di alcune importanti patologie della specie canina.

Gabriele Rossi ed i suoi collaboratori (2013) si sono posti come obiettivo dello studio quello di validare per PON1 un metodo di analisi automatico, usando il

paraoxone come substrato d'analisi e di determinare la sua stabilità nelle differenti condizioni di conservazione. Lo studio proseguiva con la determinazione degli intervalli di riferimento per PON1 in cani sani ed infine, con l'indagine su un possibile ruolo diagnostico attribuibile a PON1, paragonabile a quello della proteina C-reattiva (CRP) e α_2 -globulina.

I metodi di valutazione dell'attività esterasica di PON1, basati sull'utilizzo del paraoxone come substrato, presentano due svantaggi significativi: l'estrema tossicità del paraoxone e la scarsa stabilità della soluzione di lavoro. Nello studio questi due problemi sono stati ovviati preparando la soluzione di lavoro immediatamente prima del suo uso e seguendo le opportune regole di sicurezza. Inoltre nel presente studio, i risultati ottenuti utilizzando questa metodica sono risultati accurati e precisi.

Gli studi effettuati sull'interferenza portata dai fattori preanalitici hanno fornito i seguenti risultati:

- Per i campioni emolisati, è stato riconosciuto, come in altri studi, che l'iperemoglobinemia non influenza la misurazione dell'attività di PON1, mentre l'emolisi degli eritrociti aumenta l'attività di PON1.
- In presenza di lipemia o di campione lipemico (ad una concentrazione >5 g/L), si verifica una diminuzione dell'attività di PON1, dovuta semplicemente all'interferenza provocata nella misurazione di PON1 tramite spettrofotometro.

Gli studi effettuati sulla stabilità di PON1, nelle diverse condizioni di conservazione, hanno individuato come si verifici un aumento del 15% dal suo normale valore basale dopo:

- 12h a temperatura ambiente;
- 72h a temperatura di refrigerazione, 4°C;
- 6 mesi a temperatura di congelamento, -20°C.

Gli intervalli di riferimento sono stati determinati basandosi sull'analisi di campioni provenienti da 81 cani clinicamente sani: i valori ottenuti si distribuivano secondo una curva di tipo *gaussiano*, che presentava come valori minimo e massimo rispettivamente 112,3 e 217,4 U/mL, ed il cui valore medio risultante è stato $152,2 \pm 23,2$ U/mL (mediana: 151,7 U/mL) (Figura 7).

Non sono state riscontrate differenze significative fra i sessi e nei differenti *range* di età, mentre è emerso, da questo gruppo di studio, che la razza del Pastore Tedesco presentava generalmente valori più bassi rispetto alle altre razze.

| | Mean (95% CI) \pm SD | Median (95% CI) | I-III Interquartile Interval | Min-Max Range |
|---|---------------------------------|---------------------|------------------------------|---------------|
| Female (n = 61) | 150.3 (144.9–155.7) \pm 21.0 | 148.8 (142.1–155.3) | 134.6–161.1 | 113.6–217.4 |
| Male (n = 20) | 158.1 (144.7–171.5) \pm 28.7 | 160.6 (133.1–171.2) | 133.1–175.6 | 112.3–214.1 |
| 1–3 y (n = 38) | 144.5 (138.1–150.9) \pm 19.4 | 138.6 (132.3–152.6) | 130.3–159.3 | 112.3–194.2 |
| 4–6 y (n = 29 [4 y = 7; 5 y = 14; 6 y = 8]) | 162.4 (152.4–172.4) \pm 26.3* | 156.5 (147.2–164.6) | 145.8–175.6 | 113.6–217.4 |
| > 6 y (n = 10 [8 y = 3; 9 y = 3; 10 y = 4]) | 150.8 (136.8–164.9) \pm 19.7 | 151.8 (120.8–166.0) | 144.0–164.9 | 117.1–180.7 |
| German Shepherd (n = 50) | 143.8 (139.4–148.2) \pm 15.5† | 143.0 (134.8–153.5) | 131.7–156.4 | 113.6–174.0 |
| Other breeds (n = 31) | 165.9 (156.0–175.8) \pm 27.0 | 162.4 (150.1–178.7) | 147.4–183.3 | 112.3–217.4 |

y indicates years (age was known only for 77 dogs).
 *P < .001; vs 1–3 y.
 †P < .001 vs other breeds.

Figura 7. Intervalli di attività della paraoxonasi (U/mL) dopo la divisione dei cani clinicamente sani in base al sesso, età, razza (da Rossi et al., 2013).

Nell'ultima parte della ricerca, veniva investigato il possibile ruolo di PON1 come proteina negativa di fase acuta.

Non è risultata alcuna chiara associazione tra PON1 e la concentrazione sierica di CRP e α_2 -globulina. Questa mancanza di correlazione suggerisce che PON1 abbia un ruolo in minor misura rilevante nel riconoscimento dell'infiammazione sistemica nel cane rispetto alle altre specie (uomo, animali da laboratorio, bovino). Questo è stato spiegato anche con il fatto che CRP e PON1 presentano una differente cinetica di espressione nel siero, dove PON1 scompare molto più velocemente dell'aumento di CRP. Inoltre, PON1 è prevalentemente consumata durante lo stress ossidativo, causato dall'infiammazione o dai cambi metabolici, mentre CRP si comporta da

classica proteina della fase acuta, la cui concentrazione sierica aumenta in corso di stato infiammatorio.

Lo studio in una popolazione di soggetti clinicamente malati, sull'andamento dei valori di PON1 in rapporto alle due precedenti proteine di fase acuta, ha fallito nel dimostrare un chiaro ruolo di PON1 come *marker* infiammatorio negativo nel cane. Il limite del presente studio, su quest'ultimo aspetto di analisi dell'attività di PON1, è rappresentato dalla diversa eterogeneità del gruppo di studio dei soggetti malati, in termini di tipo e stadio della patologia, con solo alcuni soggetti che presentavano condizioni di sepsi, mentre molti altri erano affetti da leishmaniosi canina, la quale presenta un ampio spettro di possibili manifestazioni cliniche.

È perciò stato importante continuare su questa strada nello studio dell'utilità clinica di PON1, concentrandosi su particolari condizioni infiammatorie e possibili ruoli prognostici dell'enzima.

In un precedente studio, Tvarijonaviciute e collaboratori (2012c) si sono posti come obiettivo la valutazione dei valori di PON1 nella specie canina, in soggetti sottoposti ad un'induzione controllata di stato endotossiemico.

BChE (*Butyryl Cholin Esterase*) e PON1 sono due enzimi sierici sintetizzati dal fegato e che sono entrambi in relazione con il processo infiammatorio (Das, 2007). Entrambi gli enzimi sembrano essere relazionati fra di loro, in quanto BChE sembra protetto da PON1 in situazioni di stress ossidativo (Ofek et al., 2007).

Nel presente studio è stato utilizzato un modello sperimentalmente indotto di endotossemia nel cane, questo per poter riprodurre la condizione di risposta infiammatoria nei soggetti, utilizzando come mezzo di induzione l'inoculazione di LPS e andando a valutare i parametri fisiologici ed ematici dei soggetti.

Dopo 0,5 h dall'inoculazione di LPS, i soggetti presentavano: aumento della temperatura corporea, della frequenza respiratoria, della MAP (pressione

arteriosa media), e della conta totale dei globuli bianchi; questi risultati sono indicativi di sviluppo di SIRS nei soggetti trattati con LPS.

Nella presente ricerca, è stata valutata una significativa diminuzione dei valori di BChE dopo 24 h dalla somministrazione di LPS, che risulta concorde con precedenti studi (Ceron et al., 2005) condotti in umana in soggetti in sepsi o con infezione sistemica. Mentre l'attività di PON1 è risultata significativamente diminuita dopo 48 h dall'inoculazione; la spiegazione a questo è stata identificata nel fatto che PON1 presenta una stretta correlazione con le HDL. Quest'ultime risultano essere un ottimo complesso accettore in termini di stimolazione della secrezione e o stabilizzazione della proteina PON1; perciò modificazioni nella composizione lipidica e proteica delle HDL, in risposta allo stato infiammatorio, influenzano l'attività di PON1 e la sua funzione (James e Deakin, 2004). Durante la risposta di fase acuta, le HDL perdono l'apolipoproteina A-I e la maggior parte degli enzimi associati ad esse (inclusa PON1). PON1 viene quindi principalmente soppiantata dalla SAA, con la concomitante perdita delle proprietà antiossidative delle HDL (Van Lenten et al., 1995).

Negli anni successivi, gli studi hanno proseguito sull'indagine di un possibile ruolo di PON1 in alcune fra le più importanti patologie della specie canina.

Nel 2014, G. Rossi e collaboratori (2014a) hanno effettuato uno studio riguardante l'attività di PON1 come valore indicativo di recupero clinico in cani con leishmaniosi che avevano ricevuto trattamenti terapeutici standard, in rapporto con altri *markers* infiammatori, come CRP e lo studio del tracciato elettroforetico delle proteine.

La leishmaniosi canina è una patologia trasmessa dal protozoo *Leishmania infantum*, il quale si espande su ampie zone del Mediterraneo (Mancianti e Meciani, 1988). I cani affetti da questa patologia possono manifestare un'ampia gamma di segni clinici, dovuti sia all'azione diretta del parassita, sia alla risposta immunitaria dell'ospite. I sintomi possono variare da un'infezione

asintomatica ad una sintomatologia grave che coinvolge numerosi organi (Mancianti e Meciani, 1988). La leishmaniosi genera una risposta infiammatoria che promuove condizione di stress ossidativo nell'ospite contagiato, il quale risulta direttamente correlato con la sua condizione clinica (Martinez-Subiela et al., 2002; Martinez-Subiela et al., 2011; Heidarpour et al., 2012).

I soggetti dello studio presentavano differenti gradi di manifestazione clinica della patologia, perciò sono stati classificati all'ammissione in due diverse categorie: soggetti malati e gravemente malati (secondo la classificazione proposta dal CLWG, *Canine Leishmaniasis Working Group*) (Paltrinieri et al., 2010).

All'ammissione dei soggetti sono stati valutati i valori dei tradizionali *markers* infiammatori e di PON1. I risultati hanno evidenziato come i tradizionali *markers* infiammatori subivano modificazioni pressoché in tutti i cani affetti da leishmaniosi, indipendentemente dalla gravità della patologia. Al contrario, l'attività di PON1 è risultata essere per lo più un indicatore di un coinvolgimento sistemico del soggetto, diminuendo significativamente nei suoi valori solo nel gruppo dei soggetti con grave sintomatologia clinica. Questo risultato è stato spiegato in relazione al fatto che quando la sintomatologia clinica si aggrava, l'infiammazione diventa maggiormente intensa, e considerando il fatto che l'attività di PON1 diminuisce a causa del danno ossidativo associato all'infiammazione, questo spiega perché alcuni cani con una grave infiammazione presentavano bassi livelli di PON1.

Tuttavia il metabolismo ossidativo può essere lieve nei primi stadi dell'infezione, quando il parassita attiva i meccanismi antiossidanti dell'organismo (Bogdan e Rollinghoff, 1998; Panaro et al., 1998; Paltrinieri et al., 2010). Ciò quindi può spiegare perché valori normali di PON1 sono stati individuati nei soggetti con sintomatologia lieve o nei casi di condizioni infiammatorie non associate a grave danno ossidativo. D'altra parte, l'intensità della risposta da parte del soggetto è sufficiente ad indurre modificazioni nell'elettroforesi e aumenti dei valori di CRP, seppur in assenza di grave

sintomatologia clinica (Martinez-Subiela et al., 2002; Amusategui et al., 2003).

Nel presente studio, i soggetti sono stati successivamente testati per i medesimi parametri analitici dopo 3, 7, 14, 21, 28, 35 e 42 giorni dall'ammissione. I risultati di tali analisi hanno visto (Figura 8):

- i valori di PON1 normalizzarsi entro 2 settimane;
- i valori di CRP aumentare significativamente in 3-4 settimane, ma normalizzarsi completamente in circa 5-6 settimane;
- le proteine totali, albumina e γ -globuline cambiare significativamente in 4-6 settimane.

Questi risultati hanno suggerito che durante il trattamento lo stimolo infiammatorio continua a persistere, di conseguenza le concentrazioni sieriche di CRP e α_2 -globuline permangono elevate per più di 2 settimane. La normalizzazione rapida dei valori di PON1 può dipendere dal suo ruolo antiossidante (Feingold et al., 1998). Il trattamento riduce l'infiammazione e i fenomeni ossidativi entro pochi giorni, da questo si spiega come PON1 aumenti rapidamente grazie alla diminuzione dello stato ossidativo e di conseguenza al suo consumo periferico.

Dallo studio emerge che l'attività di PON1, quando subisce una diminuzione, può essere considerata un indicatore della gravità della leishmaniosi canina, anche se non si verifica costantemente in tutti i soggetti affetti, ma è in dipendenza della gravità del fenomeno ossidativo. Inoltre, come altri *markers* infiammatori, PON1 misurata all'ammissione dei soggetti non riesce a predire l'evoluzione della patologia. In aggiunta, PON1 risulta normalizzarsi precocemente rispetto ai tradizionali *markers*, grazie a questo riesce a fornire entro circa 2 settimane informazioni utili sull'andamento del trattamento terapeutico dei soggetti malati, risulta quindi utile nell'identificazione precoce dei soggetti che rispondono con successo ai trattamenti.

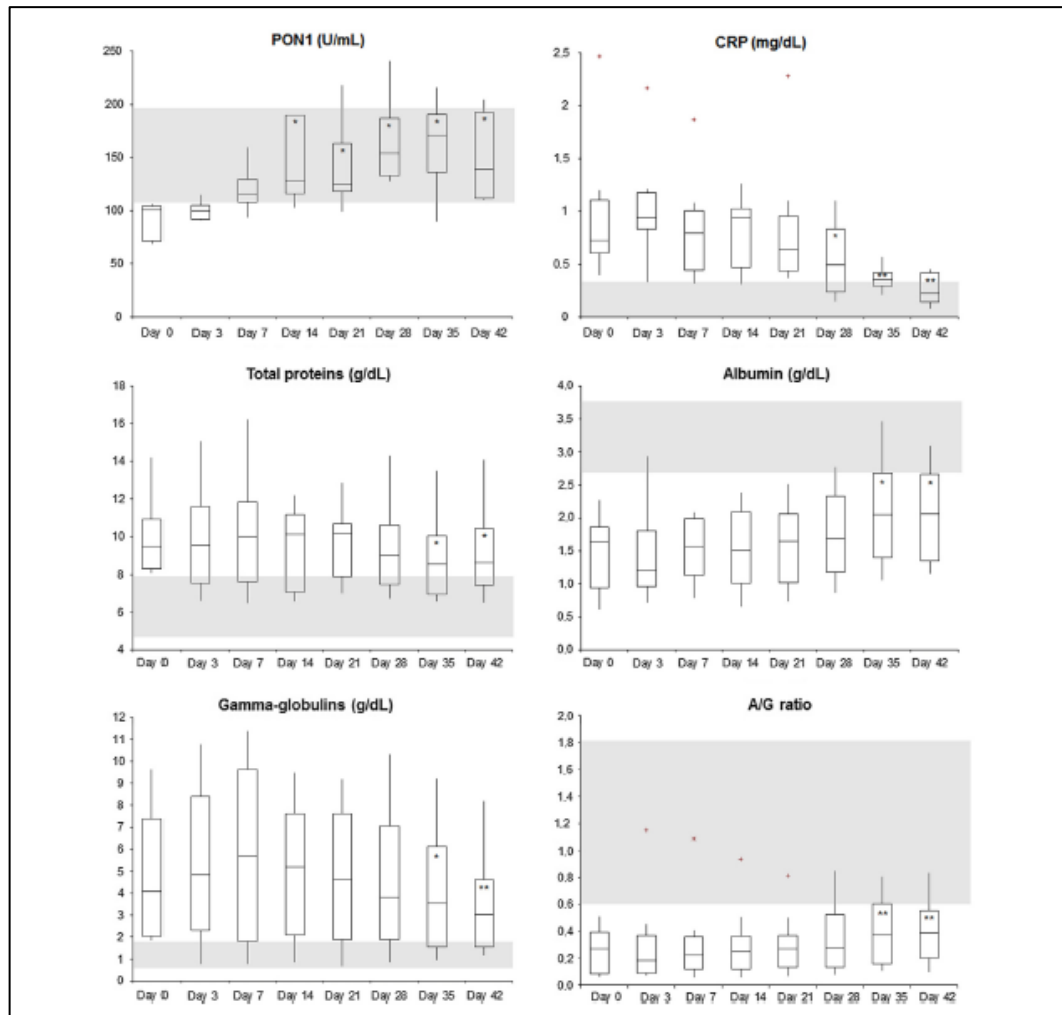


Figura 8. Risultati registrati nei cani che presentavano valori anormali all'ammissione, che erano sopravvissuti alla fine del periodo di studio e che erano stati prelevati dal giorno 0 al giorno 42. I dati riguardanti α_2 -globulina non sono stati inclusi in questa figura poiché non sono stati riscontrati significativi cambiamenti durante il *follow up*. Gli asterischi indicano differenze significative (*P<0,05; **P<0,01) in relazione con il giorno 0 (da Rossi et al., 2014a).

Riguardo l'analisi dell'attività di PON1 in relazione alla patologia della leishmaniosi, si può fare riferimento ad un'ulteriore ricerca effettuata da S. Martinez-Subiela (2014).

Nel presente studio sono stati presi in considerazione fondamentalmente due parametri, la ferritina sierica e l'attività di PON1, i cui valori sono stati valutati in un gruppo di cani sperimentalmente infettati con *Leishmania infantum* e successivamente trattati per questa. Lo studio comprendeva inoltre

l'analisi delle due molecole in un gruppo di soggetti naturalmente infettati dal patogeno, che presentavano differenti gradi di proteinuria.

La ferritina è una proteina per lo stoccaggio del ferro intracellulare (Chikazawa et al., 2013). Essa è considerata una APP durante lo stato infiammatorio (Vanarsa et al., 2012) e, in medicina umana, è stata anche proposta come *marker* dello stress ossidativo, con un ruolo riconosciuto nella modulazione del danno ossidativo rilasciando o chelando il ferro libero (Reif, 1992; Torti e Torti, 2002).

Nello studio in analisi, è risultato che l'infezione sperimentale con *L. infantum* è associata ad un marcato aumento dei valori della ferritina sierica. Il meccanismo che determina l'aumento della concentrazione di ferritina nel siero è risultato essere strettamente paragonabile al meccanismo riportato per le proteine positive di fase acuta, come CRP o la SAA, con un significativo aumento dopo 2 mesi dall'infezione, seguito da una progressiva diminuzione. Questi risultati hanno suggerito che la ferritina agisce come APP durante questa patologia.

Per quanto riguarda i valori di PON1, è stata rilevata una significativa diminuzione di questi solo al secondo mese dopo l'infezione. La diminuzione dei valori di tale enzima si è verificata in concomitanza con un significativo aumento delle proteine positive di fase acuta.

I risultati del presente studio suggeriscono al riguardo che lo svilupparsi di uno stato infiammatorio e un aumento dello stress ossidativo indotto da *L. infantum* possono contribuire alla riduzione dell'attività di PON1.

In seguito al successivo trattamento terapeutico dei soggetti sperimentalmente infettati, i valori di ferritina hanno visto una significativa diminuzione, mentre si è registrato un aumento dell'attività di PON1, situazione che ha portato entrambi i *markers* agli originari valori, osservati prima dell'infezione.

Nella seconda parte dello studio invece si sono andati a valutare ferritina e PON1 in soggetti naturalmente infettati da *L. infantum* che presentavano però differenti gradi di proteinuria, per valutare se questi due *biomarkers* fossero influenzati dalla presenza di proteinuria nei cani con leishmaniosi.

Difatti i valori di ferritina sono risultati significativamente aumentati nei soggetti che presentavano proteinuria rispetto a quelli che non ne presentavano. Allo stesso modo, PON1 ha dimostrato una diminuzione significativamente maggiore nei primi soggetti rispetto ai secondi. Nonostante il meccanismo patogenetico sottostante rimanga ancora non chiaro, per PON1 questo meccanismo è stato spiegato come un possibile aumento dello stress ossidativo (Soyoral et al., 2011) e/o l'effetto delle tossine uremiche sull'attività di PON1 che vanno ad inibire direttamente l'enzima o ne modificano la sintesi e la secrezione (Dantoine et al., 1998; Dirican et al., 2004; Gugliucci et al., 2012).

A supporto del possibile ruolo di PON1 come indicatore di uno stato di stress ossidativo durante specifiche patologie e utile *marker* indicativo dell'andamento del trattamento terapeutico in soggetti malati, si può portare ad esempio un altro studio effettuato da G. Rossi (2014b). L'obiettivo dello studio è stato quello di valutare la relazione fra PON1 e HDL nella babesiosi canina.

I parametri PON1, HDL e CRP sono stati misurati in 15 soggetti sani facenti parte del gruppo di controllo e in 29 cani con babesiosi, al momento dell'ammissione e al giorno 1 e 7 dopo il trattamento.

La babesiosi canina è una patologia trasmessa dalle zecche, il cui agente eziologico è un protozoo intra-eritrocitario, appartenente al genere *Babesia*, che presenta una distribuzione mondiale (Boozer and Macintire, 2003). Fondamentalmente, il meccanismo patogenetico vede la distruzione meccanica degli eritrociti parassitati, l'attivazione del meccanismo di emolisi immunomediato e l'attivazione della risposta infiammatoria sistemica (Carson e Philips, 1981; Kawamura et al., 1987; Murase e Maede, 1990).

Negli studi *in vitro*, i monociti dei cani sperimentalmente infettati da *Babesia* rilasciano un quantitativo significativamente alto di prodotti intermedi attivi dell'ossigeno, così come di prodotti della perossidazione dei lipidi delle membrane degli eritrociti (Otsuka et al., 2002). Il danno ossidativo degli

eritrociti è indotto dalla replicazione del parassita (Murase et al., 1996). Inoltre, è stata osservata l'aumentata attività dei macrofagi nei confronti degli eritrociti (Murase e Maede, 1990) che contribuisce ad indurre danno ossidativo a carico degli eritrociti stessi (Otsuka et al., 2002). In aggiunta, la risposta di fase acuta (*Acute-Phase Response*, APR), che si sviluppa durante la babesiosi, contribuisce al rilascio di composti ossidativi e all'attivazione dei macrofagi. Essa conduce alla SIRS associata alla quale si instaura MODS (*Multiple Organ Dysfunction Syndrome*), ma solo nelle forme più complesse, per lo più in relazione ad infezioni da parte di *B. rossi* e raramente *B. canis* (Jacobson, 2006; Solano-Gallego et al., 2008).

Nel presente studio, al momento dell'ammissione sia PON1 che le HDL presentavano valori bassi nei cani affetti con babesiosi acuta, in rapporto con i cani sani. Questo risultato può essere spiegato grazie al fatto che la sintomatologia clinica di questi soggetti supportava l'ipotesi che questi si trovassero in uno stato infiammatorio acuto e quindi in fase di stress ossidativo. Tuttavia non è stata riconosciuta una correlazione significativa fra i due *biomarkers* al momento dell'ammissione, suggestiva del fatto che, sebbene il metabolismo di queste due molecole sia in qualche modo relazionato, ulteriori fattori vanno ad influenzare i valori nel siero di questi due elementi. Difatti, sebbene entrambi siano influenzati dallo stato ossidativo del soggetto in esame, solo per PON1 è stato riconosciuto una diminuzione nella sintesi epatica durante l'infiammazione (Feingold et al., 1998), mentre le HDL sono influenzate dalla presenza della sindrome da disfunzione multi organica (MODS) associata alla SIRS (Mrljak et al., 2014).

I valori che sono stati rilevati nei due prelievi successivi al 1° e 7° giorno di trattamento hanno rilevato un aumento nel tempo dei valori di HDL e PON1. I valori di HDL risultavano ritornare a valori normali già dopo il primo giorno dopo il trattamento, mentre i valori di PON1 non subivano cambiamenti prima del 6° giorno. Questo può essere spiegato ipotizzando che, nonostante la persistenza dello stato infiammatorio nel 1° giorno dopo il trattamento, le HDL aumentano rapidamente grazie all'efficacia dell'attività antiossidante di

PON1 che riconverte ox-LDL in HDL, ma tutto ciò porta ad un consumo della stessa PON1, cosa che quindi può contribuire alla presenza di bassi livelli dell'enzima fino al 6° giorno dopo il trattamento.

Un recente studio di Tvrijonaviciute e collaboratori (2015) va ad analizzare PON1 prendendo in considerazione la sua potenzialità come *marker* infiammatorio e di danno ossidativo. Lo studio retrospettivo si è posto come obiettivo quello di valutare il comportamento dell'enzima in soggetti con pancreatite acuta, mettendo in relazione l'analita con altri parametri i cui valori si alterano in questa patologia.

La pancreatite è una patologia la cui diagnosi certa risulta difficile sia nella sua forma acuta sia nella sua forma cronica (Xenoulis et al., 2008). Le ragioni della difficoltà nell'accuratezza della diagnosi sono da ricercarsi nell'ampia varietà delle possibili manifestazioni cliniche e nella mancanza di test di laboratorio affidabili (Mansfield et al., 2008). In particolare, la pancreatite acuta è un'inflammatione che può essere associata o meno a necrosi del tessuto pancreatico o peripancreatico (Xenoulis et al., 2008). Inoltre, è considerata una condizione completamente reversibile poichè non si istaurano modificazioni istopatologiche permanenti, come la fibrosi e l'atrofia del tessuto esocrino pancreatico (Mansfield, 2012). La fisiopatogenesi di questa patologia, anche se non è stata del tutto determinata, vede come causa principale l'interazione tra citochine pro-infiammatorie e stress ossidativo che conduce all'amplificazione della cascata infiammatoria e all'innescò della risposta infiammatoria sistemica (Mansfield, 2012; Pereda et al., 2006). Una delle maggiori conseguenze dello stress ossidativo è la perossidazione dei lipidi (Franco-Pons et al., 2008).

In quest'ottica è stato ipotizzato che, in seguito ai cambiamenti descritti, l'attività di PON1 nei cani affetti da pancreatite acuta possa subire una diminuzione e che questa possa essere messa in relazione con la gravità della patologia stessa (Tvrijonaviciute et al., 2015).

Lo studio ha raccolto e confrontato i dati raccolti da due gruppi di soggetti: cani che presentavano pancreatite acuta e cani clinicamente sani. I due gruppi erano omogenei per genere, razza, età, e peso corporeo.

I soggetti classificati come patologici sono stati considerati tali basandosi su tre criteri (Mansfield, 2012):

- segni clinici compatibili con pancreatite acuta, quali anoressia, letargia, dolore addominale, vomito;
- analisi di laboratorio compatibili, come aumento dell'attività di lipasi e amilasi e dei livelli di proteine di fase acuta;
- esame ecografico addominale compatibile con un quadro di pancreatite acuta, quale presenza di tessuto pancreatico ipoecogeno circondato da mesentere peripancreatico iperecogeno, con o senza versamento peritoneale (Hess et al., 1998).

La misurazione dell'attività sierica di PON1 è stata effettuata utilizzando il p-nitrofenilacetato come substrato, secondo il metodo proposto da Tvrijonaviciute e collaboratori (2012b).

Nei soggetti patologici lo studio ha riportato una diminuzione dell'attività di PON1 di circa il 30% a confronto con i valori ottenuti nei cani sani. L'enzima risultava negativamente correlato con le proteine di fase acuta, in particolare con la CRP e Hp (*Haptoglobin*). Questo risultato si trova in accordo con quanto riportato precedentemente in medicina umana (Novak et al., 2010) e nel cane (Tvrijonaviciute et al., 2012c), dove PON1 è stata descritta come proteina negativa di fase acuta. Inoltre, PON1 risultava positivamente correlata con la concentrazione di colesterolo totale in accordo con quanto già riportato in precedenti ricerche (Tvrijonaviciute et al., 2012c).

Infine, la gravità della patologia risultava negativamente correlata con l'attività di PON1. In particolare, i cani sopravvissuti presentavano valori dell'enzima più alti dei soggetti deceduti. Questi risultati suggeriscono come PON1 possa assumere un potenziale ruolo come *marker* nella valutazione della gravità della pancreatite acuta canina. Tale potenzialità di PON1 può

essere posta in relazione a quanto individuato da Rossi e collaboratori (2012a) in uno studio condotto sulla leishmaniosi canina, precedentemente citato.

2.2.3 Specie Felina

Nel gatto, così come si è visto nella specie canina e bovina, lo studio di PON1 si è indirizzato verso l'analisi del suo ruolo fisiologico al fine di un suo possibile uso nella pratica clinica quotidiana.

A questo proposito un recente studio di Tecles e collaboratori (2015) si è posto come obiettivo quello di indagare la condizione di stress ossidativo che si può sviluppare in caso di FIP (*Feline Infectious Peritonitis*), avvalendosi dell'utilizzo di due *biomarkers* antiossidanti sierici: paraoxonasi-1 (PON1) e la capacità antiossidante totale (*Total Antioxidant Capacity*, TAC).

Il gatto sembra essere molto suscettibile allo stress e al danno ossidativo. Durante questa condizione patologica, si verifica una rottura dell'equilibrio tra il sistema ossidante e quello antiossidante, a favore del primo (Suresh et al., 2009). In questa situazione l'organismo è incapace di detossificarsi dai prodotti reattivi dell'ossigeno, i quali vanno ad accumularsi, producendo un effetto dannoso sull'integrità funzionale e strutturale dei tessuti (Yilmaz, 2012).

Nel gatto, condizioni di stress ossidativo sono state riscontrate in diverse patologie, come per esempio nel diabete mellito (Webb e Falkowski, 2009), nell'insufficienza renale cronica (Keegan e Webb, 2010) ed in caso di FIV (*Feline Immunodeficiency Virus*) (Webb et al., 2008).

Nel presente studio, è stato ipotizzato che una condizione di stress ossidativo possa essere presente nei gatti affetti da FIP.

L'agente eziologico, in questa patologia, è il FCoV (*Feline Coronavirus*), nella sua variante responsabile di FIP viene indicato come FIPV (*Feline Infectious Peritonitis Virus*), il quale colonizza e replica nei macrofagi determinando un'infezione sistemica. Secondo gli autori, la situazione di

grave reazione infiammatoria porterebbe allo sviluppo di una condizione di stress ossidativo e conseguentemente a possibili cambiamenti dei *biomarkers* ossidativi presenti nel siero.

Per verificare questa ipotesi, l'attività sierica di PON1 e la TAC sono state misurate in un gruppo di gatti naturalmente affetti da FIP e successivamente comparata con due gruppi di gatti: uno composto da soggetti considerati clinicamente sani e con uno composto da soggetti affetti da altre patologie infiammatorie.

La PON1 è stata misurata utilizzando tre differenti substrati: *p-nitrophenyl* acetato (pNA), *phenyl* acetato (PA) e 5-thiobutil butyrolactone (TBBL), in modo da valutare le possibili differenze nei valori dell'enzima in relazione con il substrato.

La capacità totale antiossidante (*Total Antioxidant Capacity*, TAC) sierica valuta l'effetto cumulativo di tutti gli antiossidanti presenti nel sangue (Nagy et al., 2006) e fornisce un indice integrato dello stato ossidativo (Ghiselli et al., 2000).

Un'attività significativamente bassa di PON1 è stata osservata nei gatti con FIP e con altre patologie infiammatorie in relazione con il gruppo dei gatti sani, in tutti i substrati di analisi. Inoltre, TAC è risultata significativamente più bassa nei gatti con FIP rispetto agli altri due gruppi.

I metodi di analisi con substrato PA e TBBL hanno ottenuto risultati precisi e capaci di misurare PON1 con metodo lineare, risultati simili a quelli precedentemente riportati nel cane (Tvarijonaviciute et al., 2012b). Però in un caso di FIP, il metodo con substrato PA non è riuscito a registrare il valore di PON1 perché inferiore ai limiti di rilevamento. Quest'ultimo dato può rappresentare una limitazione nell'utilizzo di PA come substrato di analisi, in particolare in caso di FIP o altre condizioni infiammatorie dove sono previsti valori particolarmente bassi di PON1.

La presenza d'infiammazione e l'aumento delle citochine infiammatorie che si manifesta nei gatti affetti da FIP (Regan et al., 2009) potrebbe spiegare la diminuzione dell'attività di PON1, dal momento che essa è considerata parte

del sistema immunitario innato (Chun et al., 2004) ed è considerata una proteina negativa di fase acuta (Novak et al., 2010; Tvarijonaviciute et al., 2012b). Ciò è anche a sostegno del fatto che nel gruppo di gatti che manifestavano uno stato infiammatorio si presentavano valori diminuiti dell'attività di PON1.

Un'ultima considerazione è stata fatta nel gruppo dei gatti con FIP. I soggetti sono stati suddivisi in due sottogruppi: gatti con forma essudativa di FIP (formazione di immunocomplessi responsabili di vasculiti e conseguentemente di versamenti essudativi) e gatti con forma non essudativa (formazione di granulomi diffusi ai diversi organi) (Tecles et al., 2015).

Nella forma essudativa sono stati riscontrati valori inferiori di PON1, indicando un elevato stress ossidativo rispetto alla forma non essudativa. Inoltre, questo può essere relazionato con una peggiore prognosi valutata nei gatti affetti da FIP essudativa. Gli autori suggeriscono quindi che l'utilizzo di PON1 come *marker* ossidativo possa avere un ruolo prognostico nell'andamento della patologia.

In una precedente ricerca di Tvarijonaviciute e colleghi (2012a), lo studio della PON1 nel gatto andava ad inserirsi in una più ampia analisi degli analiti biochimici connessi con l'infiammazione, condotta su gatti obesi prima e dopo perdita di peso.

L'obesità felina è una comune patologia che si manifesta in più del 27% dei gatti domestici (Lund et al., 2006). Come nell'uomo, l'obesità è spesso associata ad altri disordini, tra cui lo sviluppo di resistenza all'insulina, il diabete mellito (German, 2006), e lo sviluppo di una condizione d'infiammazione sistemica cronica di basso grado (Trayhurn, 2005). A proposito, nell'obesità umana, i valori sierici dell'attività di PON1 vanno a diminuire (Kotani, 2009).

Un primo obiettivo dello studio è stato quello di valutare i diversi analiti biochimici, relativi alla condizione metabolica ed infiammatoria, in soggetti obesi prima e in seguito alla perdita di peso. Fra questi, PON1 non ha

dimostrato cambiamenti significativi sia nelle iniziali condizioni metaboliche sia successivamente alla perdita di peso.

Nella seconda parte dello studio, è stato investigato come lo stato dei diversi fattori pro infiammatori nelle condizioni originali possa predire il successo della conseguente dieta alimentare. In quest'ottica PON1 prima della perdita di peso era inferiore nei gatti fallimentari, nei quali la concentrazione di glucosio era maggiore. La ragione per tale associazione ancora non è stata chiarita. Tuttavia, gli autori suggeriscono che il profilo genetico del soggetto che non raggiunge l'obiettivo della perdita di peso, possa influire sullo sviluppo di patologie metaboliche (come l'insulino-resistenza) che rallentano e complicano la fase della perdita di peso.

2.2.4 Specie Suina

Nella specie suina, negli ultimi anni, sono stati condotti studi preliminari incentrati sullo sviluppo di metodiche analitiche valide per lo studio di PON1 e per l'analisi del suo possibile ruolo fisiologico nel suino.

Il suino domestico, *Sus scrofa*, è normalmente impiegato come utile modello negli studi di medicina umana, per l'analisi di un gran numero di patologie, quali per esempio il diabete, l'aterosclerosi, l'obesità e le patologie cardiovascolari (Nafikov and Beitz, 2007). Inoltre, il suino è, come l'uomo, un onnivoro (Mersmann, 1986) e può naturalmente sviluppare aterosclerosi quando alimentato con una dieta ricca di grassi e colesterolo (Bell e Gerrity, 1992; Mahley et al., 1975). Infine, il suino è anche uno dei modelli animali più utilizzati per lo studio del metabolismo lipidico umano a causa della somiglianza nel profilo delle lipoproteine (Terpstra et al., 1982), nello stesso metabolismo lipidico e nella risposta delle lipoproteine alla dieta alimentare (Moghadasian, 2002; Navarro et al., 2004). Secondo quanto appena spiegato, un importante aspetto della ricerca di PON1 in questa specie è rappresentato dal fatto che le misurazioni dell'attività sierica dell'enzima rappresenterebbero un utile *biomarker* in questi studi.

Nello studio di Xie e collaboratori (2010), è stata sequenziata l'intera lunghezza del cDNA della PON1 suina e ne è stata studiata la struttura genomica. Inoltre, i risultati della PCR (*Polymerase Chain Reaction*) *real time* hanno rilevato che la PON1 suina è ampiamente espressa nel rene, seguita da fegato, polmone e piccolo intestino. Invece, essa è espressa a bassissimo livello nel cuore e raramente è espressa in milza, linfonodi, muscolo striato, cervello e grasso.

Un recente studio di Escribano e colleghi (2015), pioniere dell'argomento, si è occupato della validazione di tre metodi spettrofotometrici per la quantificazione dell'attività sierica di PON1 e della determinazione del comportamento dell'enzima durante lo stato infiammatorio.

Al momento, non erano ancora stati effettuati studi sulla validazione di metodiche analitiche per la valutazione di PON1 nel siero di suino e non era ancora noto se l'enzima si comportasse come una APP negativa in questa specie.

I tre metodi spettrofotometrici validati in questo studio si sono differenziati per la tipologia di substrato utilizzato: TBBL, PA e pNA. Tutte le metodiche si sono dimostrate precise ed accurate e capaci di registrare l'intervallo di attività di PON1 nel siero suino. Inoltre, i tre metodi sono risultati pratici, rapidi e che consentissero la valutazione di più campioni contemporaneamente.

Le conclusioni ottenute sono risultate correlate con quanto riportato da Tvarijonaviciute et al. (2012b).

Nella seconda parte del presente studio, PON1 è stata valutata in condizioni infiammatorie sperimentalmente indotte tramite l'inoculazione di *turpentine*, in accordo con studi precedenti (Tecles et al., 2007; Gutiérrez et al., 2009).

I risultati ottenuti hanno mostrato una diminuzione significativa dell'attività di PON1 a 72 h dopo l'inoculazione, in tutti i differenti metodi di analisi (Figura 9).

È noto che PON1 diminuisca durante una condizione di stress ossidativo indotto dall'infiammazione, ma è necessario che trascorra del tempo tra la

ricezione dello stimolo infiammatorio e un'effettiva diminuzione dell'attività sierica di PON1. Con questa spiegazione gli autori motivano l'intervallo di tempo trascorso prima di una significativa diminuzione dei valori dell'enzima. Inoltre, l'uso della PON1 come APP negativa potrebbe essere molto più sensibile per l'individuazione dell'infiammazione rispetto all'albumina, l'APP negativa più comunemente usata. Difatti, durante uno stato infiammatorio, l'albumina in proporzione diminuisce di meno (1,11 volte) rispetto ai valori ottenuti per PON1 (rispettivamente 1,64 volte per TBBL, 1,66 volte per PA e 1,70 volte per pNA).

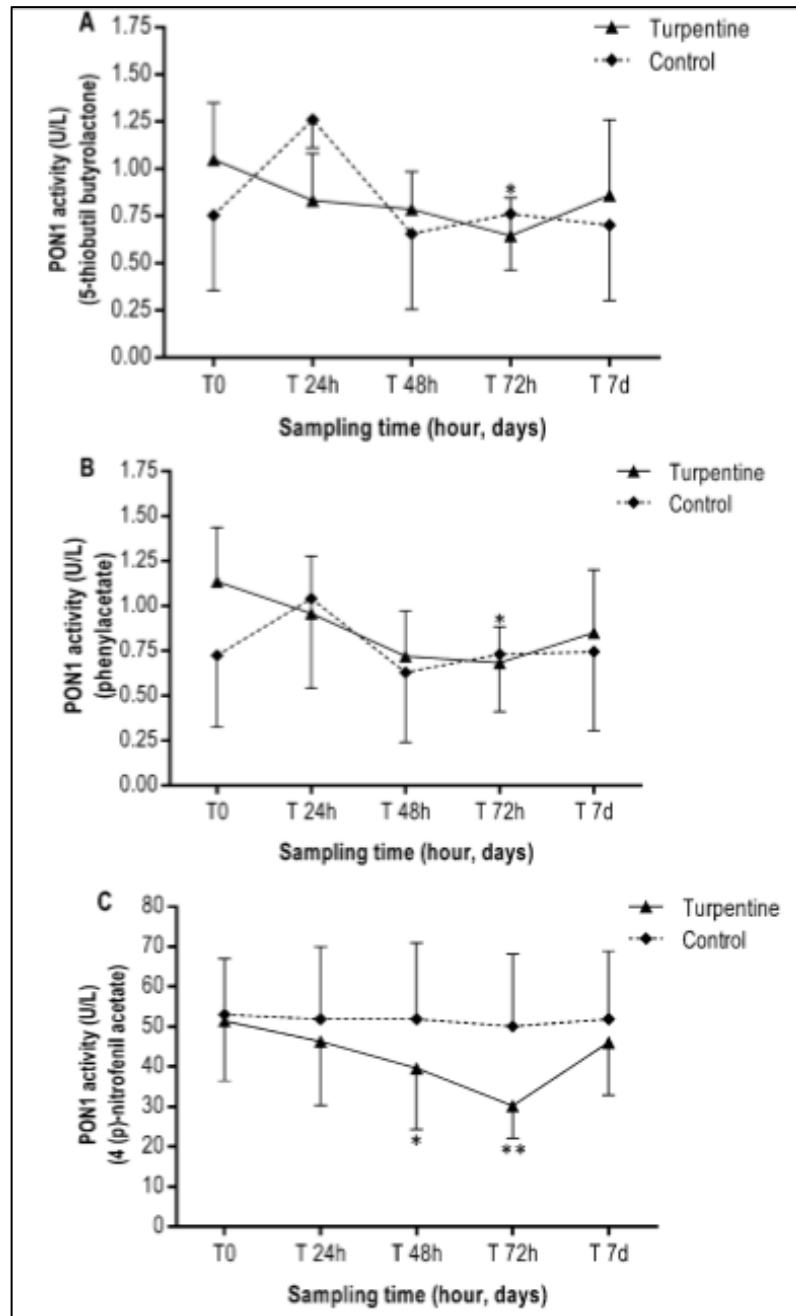


Figura 9. L'attività sierica di PON1 misurata nel gruppo di controllo ($n=5$) e nei suini inoculati con *turpentine* ($n=5$), usando come substrato (A) 5-thiobutil butyrolactone, (B) fenil acetato (C) 4-(p)-nitrofenil acetato. Misurazioni prima dell'inoculazione (T_0), a 24 h (T_{24h}), 48 h (T_{48h}), 72 h (T_{72h}) e a 7 giorni (T_{7d}). I valori mostrati sono medie \pm DS. * $P<0,05$, ** $P<0,01$, *** $P<0,001$ in relazione a T_0 per ciascun gruppo (da Escribano et al., 2015).

CAPITOLO 3 – PARTE SPERIMENTALE

3.1 Scopo del lavoro

L'obiettivo del presente lavoro è eseguire la validazione analitica del metodo per la rilevazione della PON1 sierica nella specie equina, basato sull'utilizzo del paraoxone come substrato scelto. Inoltre, lo studio si è proposto di definire gli intervalli di riferimento (*Reference Intervals*, RIs) in cavalli e puledri sani, come passaggio fondamentale per un futuro utilizzo di PON1 nella pratica clinica.

Lo studio è stato approvato dall'Organismo sul Benessere Animale (OBA) dell'Ateneo di Pisa, protocollo n.ro 23506 del 23/06/2015.

Per ogni soggetto è stato ottenuto un consenso informato dal proprietario relativo all'esecuzione delle procedure cliniche.

3.2 Materiali e metodi

3.2.1 Selezione dei soggetti

Il presente studio si è svolto nel biennio 2015-16 ed ha incluso un totale di 120 cavalli adulti e 55 puledri.

Tutti i soggetti inclusi nel presente studio sono stati considerati clinicamente sani sulla base di:

- anamnesi;
- EOG ed EOP di apparato gastro-enterico, respiratorio e cardio-circolatorio;
- CBC completo e profilo ematochimico di base (profilo renale, profilo epatico, enzimi muscolari, albumina e proteine totali).

3.2.2 Prelievo e pre-processazione dei campioni di sangue

In tutti i soggetti è stato ottenuto un campione di sangue dalla vena giugulare sinistra, immediatamente raccolto in una provetta senza anticoagulanti al cui interno si trovano micro particelle di silice che favoriscono l'attivazione della coagulazione.

Il campione è stato trasportato refrigerato presso il Dipartimento di Scienze Veterinarie di Pisa dove è stato centrifugato entro 2 h dalla raccolta ad una velocità di 4000 giri/minuto per 5 minuti.

Il siero è stato prelevato tramite una pipetta Pasteur (monouso in plastica) e trasferito in una provetta Eppendorf (monouso in plastica).

Infine il campione è stato catalogato (adulto o puledro, sesso, età, data di raccolta) e congelato a -20°C, prima di essere analizzato.

3.2.3 Misurazioni dell'attività sierica di PON1

La processazione analitica dei campioni è stata eseguita presso il Dipartimento di Medicina Veterinaria dell'Università di Milano.

L'attività di PON1 nel siero è stata valutata con un metodo automatizzato adattato da Ferrè et al., (2002) e messo a punto su uno spettrofotometro automatico Cobas Mira (Roche Diagnostic, Svizzera), avvalendosi del metodo enzimatico proposto da Feingold e colleghi (1998), già precedentemente validato nel cane (Rossi et al., 2013) e nel bovino (Giordano et al., 2013).

La reazione buffer è stata preparata utilizzando un buffer di glicina (0,05 mM, pH 10,5) contenente come substrato 1 mM di etile di paraoxone (purezza >90%, Sigma-Aldrich, USA) e 1mM di CaCl₂. La reazione enzimatica è stata avviata con 6 µL del campione in analisi, 89 µL di acqua distillata e 100 µL di reazione buffer, a 37°C. L'entità di idrolisi del paraoxone a *p*-nitrofenolo è stata misurata monitorando l'aumento di assorbanza a 504 nm, usando un coefficiente di estinzione molare di 18,050 L/mol/cm⁻¹ come suggerito da Feingold e colleghi (1998).

L'unità di misura dell'attività di PON1 è stata espressa in U/mL ed è definita come la formazione di 1 nmol di *p*-nitrofenolo al minuto, sotto le condizioni sperimentali.

3.2.4 Validazione della misurazione dell'attività enzimatica di PON1

Secondo le pubblicazioni raccomandate sulle procedure di validazione (Westgard, 2003; Jensen e Kjølgaard-Hansen, 2010), la ripetibilità *intra-* e *inter-assay* sono state valutate all'interno di tre raggruppamenti (*pool*) di più campioni di siero equino, con bassa, media ed alta attività di PON1. L'attività di PON1 in questi sieri è stata valutata in via preliminare, prima di conoscere le caratteristiche analitiche del test utilizzato.

Per la ripetibilità (*intra-assay precision*) sono state effettuate 20 determinazioni su ciascuno dei 3 *pool*, con attività bassa, media e alta, sulla base delle quali sono stati calcolati, la media, la deviazione standard (DS) e il coefficiente di variazione (*coefficient of variation, CV*) ($CV \% = (DS \times 100) / \text{media}$).

La variabilità inter-serie (*inter-assay variability*) è stata valutata su aliquote congelate dello stesso *pool* attraverso l'analisi di campioni per tre volte consecutive, in 10 sessioni di lavoro consecutive. Dai valori ottenuti sono stati calcolati media, deviazione standard e CV.

L'accuratezza è stata determinata mediante la valutazione della linearità di diluizione (*Linearity Under Dilution*, LUD) e dello SRT (*Spiking and Recovery Test*).

Il LUD è stato eseguito valutando l'attività di PON1 per tre volte su un *pool* di siero equino diluito con acqua distillata in modo da ottenere concentrazioni del 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 0%.

Il test SRT è stato attuato selezionando 2 campioni, uno a bassa (A) e uno ad alta attività di PON1 (B), sui quali sono state eseguite 3 determinazioni; quindi a 100 μ L di campione A sono state addizionate quantità crescenti (da 10 a 100 μ L) di campione B, per un totale di 10 determinazioni ognuna misurata per tre volte.

La correlazione fra la percentuale dei valori osservati in relazione con i valori attesi di LUD e SRT è stata valutata mediante il *square linear regression*.

3.2.5 Individuazione degli intervalli di riferimento

Gli intervalli di riferimento sono stati determinati utilizzando le macroistruzioni del *Reference Value Advisor* (*freeware v2.1; download at <http://www.biostat.envt.fr/spip/spip.php?article63>*) per Excel (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA), recentemente validato per l'uso nei laboratori di medicina veterinaria (Geffrè et al., 2011).

Seguendo le indicazioni del CLSI (CLSI, 2008), l'istogramma dell'intervallo di riferimento dell'attività di PON1 è stato esaminato per un'iniziale valutazione dell'identificazione e della distribuzione dei valori anomali.

Per identificare i valori anomali (*outliers*) sono stati utilizzati i test di Dixon e Tukey secondo la regola:

- outliers alto = limite superiore del *range* interquartile (IQR) + (IQR x 1,5);
- outliers basso = limite inferiore del range interquartile (IQR) - (IQR x 1,5).

In accordo con le linee guida di CLSI (CLSI, 2008), l'attenzione è rivolta a conservare piuttosto che eliminare i valori anomali.

Gli intervalli di riferimento sono stati calcolati utilizzando l'efficace metodo sul convertitore di dati Box-Cox (Box e Cox, 1964) e il 90% degli intervalli di confidenza (*confidence intervals*, CIs) intorno ai limiti di riferimento sono stati determinati utilizzando un metodo *bootstrap* non parametrico.

3.2.6 Analisi statistiche sulla divisione degli intervalli di riferimento

I risultati ottenuti relativi all'età (puledri e adulti), sesso e razza sono stati espressi come media e deviazione standard.

Il test di Mann-Whitney per dati non appaiati è stato utilizzato per verificare differenze statisticamente significative tra puledri e adulti, maschi e femmine (puledri) e trottatori vs *Warmblood* (sia adulti che puledri).

Il test di Kruskal-Wallis e Bonferroni post-hoc sono stati applicati per evidenziare differenze tra castroni vs femmine vs stalloni e per confrontare le differenti razze tra loro. Le differenze sono state considerate statisticamente significative per $P < 0,05$.

Le possibili differenze legate all'età sono state investigate, sia nei puledri sia nei cavalli adulti, utilizzando un'analisi di regressione eseguita nel software *Reference Value Advisor*, citato sopra.

Il test Harris e Boyd (Harris e Boyd, 1990) è stato utilizzato per verificare la necessità o meno di stabilire intervalli di riferimento separati in base a età, sesso e razza.

CAPITOLO 4 – RISULTATI

Dei 120 cavalli adulti, il 40/120 (33,33%) erano femmine, il 40/120 (33,33%) maschi, il 40/120 (33,33%) castroni; dei 55 puledri, il 27/55 (49,1%) erano femmine e il 28/55 (50,90%) maschi.

In relazione alla razza, 57/120 (47,5%) cavalli adulti erano *Warmbloods*, 46/120 (38,33%) Trottatori, 8/120 (6,67%) *Ponies*, 6/120 (5%) PSI, 3/120 (2,5%) cavalli da lavoro. Mentre i puledri erano 22/55 (40%) *Warmbloods*, 31/55 (56,36%) Trottatori, 2/55 (3,63%) PSI.

L'età media dei soggetti adulti era di $11,98 \pm 5,83$ anni (*range*: 3-27 anni, mediana: 11 anni). In base al sesso, l'età media delle femmine era $11,05 \pm 3,56$ anni (*range*: 4-21 anni, mediana: 11 anni), dei maschi era $10,52 \pm 7,26$ anni (*range*: 3-27 anni, mediana: 8 anni) e dei castroni era $14,38 \pm 5,42$ anni (*range*: 4-25 anni, mediana: 14,5 anni).

L'età media dei puledri era di $51,36 \pm 20,17$ giorni (*range*: 19-90 gironi, mediana: 47 giorni). In base al sesso, l'età media delle femmine era $54,30 \pm 23,50$ giorni (*range*: 19-90 giorni, mediana: 50 giorni), dei maschi era $48,54 \pm 16,27$ giorni (*range*: 29-90 giorni, mediana: 46 giorni).

I risultati relativi alla variabilità *intra-assay* sono riportati in Tabella 1. Tali risultati evidenziano che il CV è sempre basso, con media delle tre determinazioni su *pool* a diversa attività di PON1 uguale a 1,7%.

| | Pool basso | Pool medio | Pool alto |
|--------------------|-------------------|-------------------|------------------|
| X±DS (U/mL) | 24,04 ± 0,62 | 34,02 ± 0,55 | 61,01 ± 0,57 |
| CV (%) | 2,57 | 1,60 | 0,93 |

Tabella 1. Variabilità *intra-assay*: media±deviazione standard (X±DS) e coefficiente di variazione (CV) di PON1 in pool di siero ad attività bassa, media e alta.

I risultati della ripetibilità *inter-assay* sono riportati in Tabella 2. La ripetibilità *inter-assay* dimostra performance sovrapponibili a quelle *intra-assay*, con CV medio valutato sui tre pool a diversa attività basso, pari a 3,17%.

| | Pool basso | Pool medio | Pool alto |
|--------------------|-------------------|-------------------|------------------|
| X±DS (U/mL) | 23,23 ± 0,68 | 33,71 ± 1,34 | 62,44 ± 1,64 |
| CV (%) | 2,91 | 3,98 | 2,62 |

Tabella 2. Variabilità *inter-assay*: media±deviazione standard (X±DS) e coefficiente di variazione (CV) di PON1 in pool di siero ad attività bassa, media e alta.

La LUD (r^2 0,98, $P < 0,001$) e lo SRT (r^2 1,00, $P < 0,001$) hanno evidenziato un'ottima correlazione tra valori attesi ed osservati.

Gli intervalli di riferimento per cavalli adulti e puledri sono 38-81,2 U/mL e 36-82 U/mL, rispettivamente. Gli intervalli di riferimento di adulti e puledri sono simili. La similarità dei valori è stata confermata con il test Harris e Boyd (Harris e Boyd, 1990) che non ha evidenziato la necessità di stabilire intervalli di riferimento separati per gli adulti e per i puledri ($z=0$; *alternative critical* $z=2,56$). Inoltre, le analisi statistiche non hanno rilevato differenze significative tra puledri (media ± DS: 56,6 ± 10,0 U/mL; mediana: 55,2 U/mL; I-III quartile: 49,7-65,1 U/mL) e adulti (media ± DS: 56,6 ± 11,7 U/mL; mediana: 56,6 U/mL; I-III quartile: 48,7-64,5 U/mL).

All'interno dei due gruppi di studio di adulti e puledri, i soggetti sono stati suddivisi in sottogruppi di età. Le analisi statistiche effettuate non hanno evidenziato differenze significative né all'interno del gruppo dei cavalli adulti ($P=0,949$), né all'interno del gruppo dei puledri ($P=0,180$).

Per quanto riguarda il sesso, nei puledri i valori dell'attività di PON1 sono risultati 56,7 ± 8,8 U/mL nei maschi e 56,6 ± 11,3 U/mL nelle femmine.

Nei puledri non sono state riscontrate differenze statisticamente significative legate al sesso ($P=0,963$). Il test di Boyd ed Harris evidenzia che gli intervalli di riferimento per maschi e femmine sono sovrapponibili ($z=0,21$; *alternative critical* $z=1,43$).

Nei cavalli adulti, invece, sono state evidenziate differenze statisticamente significative ($P=0,010$) in relazione al sesso. In particolare, l'attività della PON1 nelle femmine è significativamente più elevata vs i maschi ($P=0,014$) e vs i castroni ($P=0,047$), mentre non esistono differenze tra maschi vs castroni. Nelle femmine il valore medio di PON1 è $60,3 \pm 9,6$ U/mL, con un RI di 35-81 U/mL, nei maschi è $54,3 \pm 11,2$ U/mL con un RI di 38,2-89,3 U/mL e nei castroni è $55,3 \pm 13,3$ U/mL con un RI di 32,8-92 U/mL. Il test di Harris e Boyd indica che un intervallo di riferimento genere-specifico dovrebbe essere impiegato per le femmine ($z=2,52$; *alternative critical* $z=1,73 - z=1,92$; *alternative critical* $z=1,73$), mentre un comune intervallo di riferimento potrebbe essere usato per i maschi ed i castroni ($z=0,36$; *alternative critical* $z=1,73$).

Negli adulti, in base alla razza gli *Warmbloods* hanno mostrato valori medi di attività della PON1 di $54,4 \pm 12,9$ U/mL (RIs 33,7-91,1 U/mL), nei trottatori è $59,3 \pm 9,8$ U/mL (RIs 39,6-80 U/mL), nei *Ponies* $59,5 \pm 6$ U/mL, nei PSI $60,0 \pm 13,8$ U/mL, nei cavalli da lavoro è $54,5 \pm 12,4$ U/mL. Non sono state evidenziate differenze statisticamente significative tra i gruppi ($P=0,083$).

Confrontando soltanto le due razze maggiormente rappresentate (trottatori vs *Warmblood*), è stata, però, riscontrata una differenza statisticamente significativa ($P=0,011$) e il test di Harris e Boyd suggerisce che dovrebbero essere utilizzati gli intervalli di riferimento specifici per trottatori o *Warmbloods* ($z=2,18$; *alternative critical* $z=1,96$).

Per quanto riguarda i puledri, gli *Warmbloods* hanno mostrato valori medi di $56,4 \pm 8,6$ U/mL (RIs: 39,5-76,3 U/mL) e i trottatori di $56,4 \pm 11,2$ U/mL (RIs: 35,4-85,5 U/mL). Non sono state evidenziate differenze tra i due gruppi. I puledri PSI non sono stati inclusi nelle analisi statistiche poiché solo due puledri appartenevano a questa razza. Il test di Harris e Boyd suggerisce che gli RIs specifici per le due razze di puledri maggiormente rappresentate non dovrebbero essere impiegati ($z= 0,03$; *alternative critical* $z= 1,40$).

CAPITOLO 5 – DISCUSSIONE

Numerosi studi sono stati effettuati sull'attività di PON1 in varie specie animali (Turk et al., 2004; Bionaz et al., 2007; LaBrecque et al., 2009; Tvarijonaviciute et al., 2012a; Tvarijonaviciute et al., 2012b; Rossi et al., 2013; Rossi et al., 2014a; Ibba et al., 2015), ma ad oggi non vi sono informazioni disponibili sulla possibile utilità di questo analita nel cavallo.

Per questo motivo, è stato necessario effettuare un preliminare studio di validazione per determinare le performance analitiche del metodo d'analisi e stabilire degli intervalli di riferimento da utilizzare nella pratica clinica.

I nostri risultati hanno dimostrato che il metodo da noi utilizzato per la misurazione di PON1 è preciso ed accurato anche sul siero equino. In particolare, le valutazioni *intra-* ed *inter-assay* mostrano una soglia di errore inferiore al 5%, valore considerato accettabile per la maggior parte degli analiti biochimici (Ricos et al., 1999). Inoltre, il valore da noi ottenuto sull'imprecisione *inter-assay* è risultato simile a quanto già evidenziato per il cane (Rossi et al., 2013).

Nonostante ad oggi non esista un *gold standard* per la valutazione dell'attività di PON1, i nostri risultati mostrano un eccellente livello di accuratezza del metodo analitico basato sull'uso del paraoxone.

Se confrontiamo i valori medi e gli intervalli di riferimento registrati nel cavallo (rispettivamente, adulto media: 56,6 U/mL RI: 38-81,2 U/mL; puledro media: 56,5 U/mL RI: 36-82 U/mL), l'attività di PON1 mostra valori più bassi rispetto a quanto evidenziato nel cane (Rossi et al., 2013), gatto (Tvarijonaviciute et al., 2012a) e bovino (Turk et al., 2004; Bionaz et al., 2007), ma lievemente superiori a quanto riportato nel suino (LaBrecque et al., 2009).

I diversi studi presi in esame si avvalgono, come nel nostro caso, del metodo analitico basato sull'uso del paraoxone. Le differenze, però, possono essere

spiegate dal differente metabolismo epatico e lipidico nelle diverse specie animali prese in considerazione e dalle isoforme specie-specifiche.

Dal presente studio non emergono differenze significative tra i valori registrati nei cavalli adulti e nei puledri. Questo significativo risultato può essere dipendente dall'età dei puledri inclusi nello studio. Nello studio di A. Giordano e collaboratori (2013), condotto sul bovino, la PON1 è stata valutata su vitelli dalla nascita (da 10 minuti di vita) fino a 21 giorni di età. In questi soggetti l'attività della PON1 è molto bassa alla nascita ed aumenta significativamente dal 3° al 21° giorno di età.

Valori molto bassi dell'attività di PON1 nei neonati bovini sono legati all'imaturità del fegato, al differente metabolismo lipidico nei vitelli rispetto ai bovini adulti e/o all'alta suscettibilità dei neonati allo stress ossidativo che può determinare l'inattivazione di PON1 (Inanami et al., 1999). Giordano e colleghi riportano un'attività di PON1 nei vitelli che aumenta dalla nascita fino a 21 giorni e poi rimane costante fino a 120 giorni con valori paragonabili a quelli dei bovini adulti.

Nel nostro studio i puledri inclusi avevano un'età compresa tra 19 e 90 giorni, *range* di età in cui i valori di PON1 sono risultati sovrapponibili a quelli dell'adulto, come già evidenziato per il bovino (Giordano et al., 2013).

La suddivisione del gruppo di studio in base all'età non ha evidenziato nessuna differenza tra i gruppi, in linea con quanto già riportato in medicina umana (Mueller et al., 1983).

Dal presente studio è emerso che l'attività di PON1 è più elevata nelle femmine adulte rispetto a castroni e stalloni. Questo risultato è in accordo con quanto riportato nel topo (Ali et al., 2003) e in uno studio effettuato nell'uomo (Wehner et al., 1987), ma non è in accordo con quanto riportato da altri autori sempre nell'uomo (Mueller et al., 1983) e nel cane (Rossi et al., 2013).

Nel puledro, a differenza che per l'adulto, non abbiamo trovato differenze significative legate al sesso. Questo può essere giustificato dal fatto che i puledri inclusi, proprio perché molto giovani, sono animali non sessualmente sviluppati. Questo risultato è in accordo con studi effettuati sul topo che hanno

dimostrato che la concentrazione di testosterone nel sangue e l'attività degli ormoni femminili (animali ovariectomizzati vs non) non sembrano influenzare l'espressione genica della PON1 (Playfer et al., 1976).

Nel nostro studio abbiamo riscontrato una differenza di attività dell'analita tra i cavalli adulti trottatori vs gli *Warmbloods*, ma la differenza non è stata riscontrata nei puledri confrontando le stesse razze. La maggiore attività di PON1 rilevata nei trottatori adulti potrebbe essere legata al tipo di allenamento e all'intensità dell'esercizio fisico dei soggetti inclusi. E' noto, infatti, che il cavallo è suscettibile allo stress ossidativo indotto dall'esercizio fisico (Kinnunen et al., 2005).

Non sono state riscontrate significative differenze nell'attività di PON1 quando anche altre razze di cavalli adulti sono state incluse nell'analisi statistica. L'assenza di significative differenze nelle altre razze potrebbe essere relazionata al basso numero di cavalli analizzati per ciascun gruppo, che può aver indotto un artefatto statistico di tipo II (Armitage et al., 1971).

In quest'ottica, potrebbero rivelarsi utili ulteriori indagini, che comprendano un maggior numero di cavalli per ognuna di queste razze, in modo da identificare eventuali differenze associate con le varie attitudini.

Nonostante le significative differenze associate con genere e attitudine, gli intervalli di riferimento registrati nei differenti gruppi di animali sono largamente sovrapponibili gli uni agli altri. Ciononostante, in accordo con il test di Harris e Boyd, dovrebbero essere stabiliti specifici RIs per il gruppo delle femmine adulte, dei trottatori e dei *Warmbloods* adulti. Tuttavia, quest'ultimo aspetto necessita di essere verificato attraverso ulteriori studi su larga scala.

Indipendentemente dalla necessità di stabilire intervalli di riferimento associati al sesso o alla razza, è di notevole importanza che i limiti inferiori degli intervalli di riferimento da noi ottenuti siano risultati simili per tutte le categorie di ripartizione esaminate in questo studio.

Considerando che in molte specie i pazienti con stress ossidativo associato a stato infiammatorio hanno un'attività di PON1 molto bassa in relazione con il

limite inferiore di riferimento (Giordano et al., 2013; Ibba et al., 2015), risulta consigliabile utilizzare un singolo intervallo di riferimento per cavalli di differenti genere (maschi e castroni) ed età (puledri e cavalli adulti).

CAPITOLO 6 - CONCLUSIONI

Questo studio ha dimostrato che il metodo basato sull'utilizzo del paraoxone come substrato nella misurazione dell'attività di PON1 è preciso ed accurato nel cavallo come in altre specie e che l'attività di PON1 è inferiore nel cavallo rispetto a molte altre specie domestiche.

Nonostante la presenza di alcune significative differenze associate al genere o alla razza, i limiti di riferimento inferiori associati all'età, razza o genere sono simili gli uni agli altri. Ne consegue che nella pratica di routine sarebbe consigliabile utilizzare un unico intervallo di riferimento sia per i giovani puledri sia per i cavalli adulti, indipendentemente dal loro genere e dalla loro attitudine.

Ulteriori studi sono auspicabili per verificare l'utilità della PON1 come *marker* diagnostico e prognostico in condizioni patologiche, come già evidenziato in altre specie (Rossi et al., 2014a).

BIBLIOGRAFIA

Agachan, B., Yilmaz, H., Karaali, Z., Isbir, T. (2004) Paraoxonase 55 and 192 polymorphism and its relationship to serum paraoxonase activity and serum lipids in Turkish patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. *Cell Biochemistry and Function*. 22, 163–168.

Ahmed, Z., Ravandi, A., Maguire, G.F., Emili, A., Draganov, D., La Du, B.N., Connelly, P.W. (2001). Apolipoprotein AI promotes the formation of phosphatidylcholine core aldehydes that are hydrolyzed by paraoxonase (PON-1) during high density lipoprotein oxidation with a peroxy nitrite donor. *Journal of Biological Chemistry*, 276(27), 24473-24481.

Al-Timimi, D.J., Dormandy, T.L. (1977). The inhibition of lipid autoxidation by human caeruloplasmin. *Biochemical Journal*, 168(2), 283-288.

Aldridge, W.N. (1953). Serum esterases. 2. An enzyme hydrolysing diethyl p-nitrophenyl phosphate (E 600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera. *Biochemical Journal*, 53(1), 117.

Aldridge, W.N. (1989). In *Enzymes Hydrolysing Organophosphorus Compounds*. Edited by Reiner, E., Aldridge, W.N., Hoskin, F.C.G. Chichester: E. Horwood; 1.

Ali, A.B., Zhang, Q., Lim, Y.K., Fang D., Retnam, L., Lim, S.K. (2003). Expression of major HDL-associated antioxidant PON-1 is gender dependent and regulated during inflammation. *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 34, No. 7, pp. 824–829.

Amusatogui, I., Sainz, A., Rodriguez, F., Tesouro, M.A. (2003). Distribution and relationships between clinical and biopathological

parameters in canine leishmaniasis. *European journal of epidemiology*, 18(2), 147-156.

Antončić-Svetina, M., Turk, R., Svetina, A., Gereš, D., Rekić, B., Juretić, D. (2011). Lipid status, paraoxonase-1 activity and metabolic parameters in serum of heifers and lactating cows related to oxidative stress. *Research in veterinary science*, 90(2), 298-300.

Armitage, P., Berry, G., Matthews, J.N.S. (1971). *Statistical methods in medical research*. Fourth edition, Blackwell Science.

Aubo, C., Senti, M., Marrugat, J., Tomas, M., Vila, J., Sala, J., Masiá, R. (2000). Risk of myocardial infarction associated with Gln/Arg 192 polymorphism in the human paraoxonase gene and diabetes mellitus. *European heart journal*, 21(1), 33-38.

Aviram, M. (1993) Modified forms of low-density lipoprotein and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 98:1–9.

Aviram, M. (1996). Interaction of oxidized low-density lipoprotein with macrophages in atherosclerosis, and the antiatherogenicity of antioxidants. *European Journal of Clinical Chemistry and Clinica*, 34:599–608.

Aviram, M., Rosenblat, M., Bisgaier, C.L., Newton, R.S., Primo-Parmo, S.L., La Du, B.N. (1998). Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. *Journal of Clinical Investigation*, 101(8), 1581.

Aviram, M., Rosenblat, M., Billecke, S., Eroglu, J., Sorenson, R., Bisgaier, C.L., La Du, B.N. (1999). Human serum paraoxonase (PON 1) is inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(7), 892-904.

Aviram, M., Hardak, E., Vaya, J., Mahmood, S., Milo, S., Hoffman, A., Billicke S., Draganov D., Rosenblat, M. (2000). Human serum

paraoxonases (PON1) Q and R selectively decrease lipid peroxides in human coronary and carotid atherosclerotic lesions. *Circulation*, 101(21), 2510-2517.

Aviram, M., Rosenblat, M. (2004). Paraoxonases 1, 2, and 3, oxidative stress, and macrophage foam cell formation during atherosclerosis development. *Free Radical Biology and Medicine*, 37(9), 1304-1316.

Banka, C.L. (1996). High density lipoprotein and lipoprotein oxidation. *Current opinion in lipidology*, 7(3), 139-142.

Barbieri, M., Bonafè, M., Marfella, R., Ragno, E., Giugliano, D., Franceschi, C., Paolisso, G. (2002). LL-paraoxonase genotype is associated with a more severe degree of homeostasis model assessment IR in healthy subjects. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 87(1), 222-225.

Bauchart, D. (1993). Lipid absorption and transport in ruminants. *Journal of Dairy Science*, 76(12), 3864-3881.

Bell, F.P., Gerrity, R.G. (1992). Evidence for an altered lipid metabolic state in circulating blood monocytes under conditions of hyperlipemia in swine and its implications in arterial lipid metabolism. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 12(2), 155-162.

Benditt, E.P., Eriksen, N., Hanson, R.H. (1979). Amyloid protein SAA is an apoprotein of mouse plasma high-density lipoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(8), 4092-4096.

Berkowitz, G.S., Wetmur, J.G., Birman-Deych, E., Obel, J., Lapinski, R.H., Godbold, J.H., et al., Wolff, M.S. (2004). In utero pesticide exposure, maternal paraoxonase activity, and head circumference. *Environmental health perspectives*, 112(3), 388.

- Berrougui, H., Loued, S., Khalil, A. (2012). Purified human paraoxonase-1 interacts with plasma membrane lipid rafts and mediates cholesterol efflux from macrophages. *Free Radical Biology and Medicine*, 52(8), 1372-1381.
- Besler, C., Heinrich, K., Rohrer, L., Doerries, C., Riwanto, M., Shih, D. M., Mueller, M. (2011). Mechanisms underlying adverse effects of HDL on eNOS-activating pathways in patients with coronary artery disease. *The Journal of clinical investigation*, 121(7), 2693-2708.
- Bhattacharyya, T., Nicholls, S.J., Topol, E.J., Zhang, R., Yang, X., Schmitt, D., Brennan, M.L. (2008). Relationship of paraoxonase 1 (PON1) gene polymorphisms and functional activity with systemic oxidative stress and cardiovascular risk. *Jama*, 299(11), 1265-1276.
- Billecke, S., Draganov, D., Counsell, R., Stetson, P., Watson, C., Hsu, C., La Du, B.N. (2000). Human serum paraoxonase (PON1) isozymes Q and R hydrolyze lactones and cyclic carbonate esters. *Drug Metabolism and Disposition*, 28(11), 1335-1342.
- Bin Ali, A., Zhang, Q., Lim, Y.K., Fang, D., Retnam, L., Lim, S.K. (2003). Expression of major HDL-associated antioxidant PON-1 is gender dependent and regulated during inflammation. *Free Radical Biology and Medicine*, 34(7), 824-829.
- Bionaz M, Trevisi E, Calamri L, Librandi F, Ferrari A, Bertoni G. (2007). Plasma paraoxonase, health, inflammatory conditions, and liver function in transition dairy cows. *Journal of Dairy Science*. Apr;90(4):1740-50.
- Bobe, G., Young, J.W., Beitz, D.C. (2004). Invited review: pathology, etiology, prevention, and treatment of fatty liver in dairy cows. *Journal of dairy science*, 87(10), 3105-3124.
- Boemi, M., Leviev, I., Sirolla, C., Pieri, C., Marra, M., James, R.W. (2001) Serum paraoxonase is reduced in type 1 diabetic patients compared to non-

diabetic, first degree relatives; influence on the ability of HDL to protect LDL from oxidation. *Atherosclerosis* 155, 229–235.

Bogdan, C., Röllinghoff, M. (1998). The immune response to Leishmania: mechanisms of parasite control and evasion. *International journal for parasitology*, 28(1), 121-134.

Boozer, A.L., Macintire, D.K. (2003). Canine babesiosis. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 33(4), 885-904.

Box G.E.P. e D.R. Cox. 1964. An analysis of transformations. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B* 26, pp.211-252.

Broomfield, C.A. Ford, K.W. (1991). Hydrolysis of nerve gases by plasma enzymes. In *Proceedings of the 3rd international meeting on cholinesterases, La Grande-Motte, France* (Vol. 167).

Browne, R.W., Koury, S.T., Marion, S., Wilding, G., Muti, P., Trevisan, M. (2007). Accuracy and biological variation of human serum paraoxonase 1 activity and polymorphism (Q192R) by kinetic enzyme assay. *Clinical Chemistry*, 53(2), 310-317.

Bruss, M.L. (2008). Lipids and ketones. *Clinical biochemistry of domestic animals*, 6, 81-115.

Cabana, V.G., Gewurz, H., Siegel, J.N. (1982). Interaction of very low-density lipoproteins (VLDL) with rabbit C-reactive protein. *The Journal of Immunology*, 128(5), 2342-2348.

Camps, J., Marsillach, J., Joven, J. (2009). The paraoxonases: role in human diseases and methodological difficulties in measurement. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 46(2), 83-106.

Carson, C.A., Philips, R.S. (1981). Immunologic response of the vertebrate host to Babesia. In: Ristic, M., Krejer, J.P. (Eds.), *Babesiosis*, Academic Press, New York. Pp. 411-443.

- Cebra, C.K., Garry, F.B., Getzy, D.M., Fettman, M.J. (1997). Hepatic lipidosis in anorectic, lactating Holstein cattle: a retrospective study of serum biochemical abnormalities. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 11(4), 231-237.
- Ceròn, J.J., Eckersall, P.D., Martínez-Subiela, S. (2005). Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Veterinary Clinical Pathology*, 34(2), 85-99.
- Ceròn, J.J., Tecles, F., Tvarijonaviciute, A. (2014). Serum paraoxonase 1 (PON1) measurement: an update. *BMC Veterinary Research*, 10(1), 74.
- Chikazawa, S., Hoshi, F., Kanai, K., Orino, K., Watanabe, K., Higuchi, S.I. (2013). Development of a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay to detect and measure serum levels of canine ferritin. *Journal of Veterinary Medical Science*, 75(4), 515-517.
- Chisolm, G.M., Penn, M.S. (1996). Oxidized lipoproteins and atherosclerosis. *Atherosclerosis and coronary artery disease. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven*, 129-149.
- Chiu, K.C., Chuang, L.M., Chu, A., Lu, J., Hu, J., Fernando, S. (2004) Association of paraoxonase 1 polymorphism with β -cell function: a case of molecular heterosis. *Pancreas* 28, e96–e103.
- Chun, C.K., Ozer, E.A., Welsh, M.J., Zabner, J., Greenberg, E.P. (2004). Inactivation of a *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal by human airway epithelia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(10), 3587-3590.
- CLSI C28-A3. *Definin, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical and Laboratory; Approved Guideline*. 3rd ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008: 1-61.

- Cole, T.B., Jampsa, R.L., Walter, B.J., Arndt, T.L., Richter, R.J., Shih, D.M., Furlong, C.E. (2003). Expression of human paraoxonase (PON1) during development. *Pharmacogenetics and Genomics*, 13(6), 357-364.
- Collins, R.A., Reid, I.M. (1980). A correlated biochemical and stereological study of periparturient fatty liver in the dairy cow. *Research in veterinary science*, 28(3), 373-376.
- Costa, L.G., Vitalone, A., Cole, T.B., Furlong, C.E. (2005a). Modulation of paraoxonase (PON1) activity. *Biochemical Pharmacology*, 69(4), 541-550.
- Costa, L.G., Cole, T.B., Vitalone, A., Furlong, C.E. (2005b). Measurement of paraoxonase (PON1) status as a potential biomarker of susceptibility to organophosphate toxicity. *Clinica Chimica Acta*, 352(1), 37-47.
- Costa, L.G., Giordano, G., Cole, T.B., Marsillach, J., Furlong, C.E. (2013). Paraoxonase 1 (PON1) as a genetic determinant of susceptibility to organophosphate toxicity. *Toxicology*, 307, 115-122.
- Davies, H.G., Richter, R.J., Keifer, M., Broomfield, C.A., Sowalla, J., Furlong, C.E. (1996). The effect of the human serum paraoxonase polymorphism is reversed with diazoxon, soman and sarin. *Nature genetics*, 14(3), 334-336.
- Dantoine, T.F., Debord, J., Charmes, J.P., Merle, L., Marquet, P., Lachatre, G., Leroux-Robert, C. (1998). Decrease of serum paraoxonase activity in chronic renal failure. *Journal of the American Society of Nephrology*, 9(11), 2082-2088.
- Dantoine, T.F., Drouet, M., Debord, J., Merle, L., Cogne, M., Charmes, J.P. (2002). Paraoxonase 1 192/55 gene polymorphisms in Alzheimer's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 977(1), 239-244.

- Das, U.N. (2007). Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as possible markers of low-grade systemic inflammation. *Medical Science Monitor*, 13(12), RA214-RA221.
- Davies, H.G., Richter, R.J., Keifer, M., Broomfield, C.A., Sowalla, J., Furlong, C.E. (1996). The effect of the human serum paraoxonase polymorphism is reversed with diazoxon, soman and sarin. *Nature Genetics*, 14(3), 334-336.
- Deakin, S., Leviev, I., Nicaud, V., Brulhart Meynet, M.C., Tired, L., James, R.W. (2002) Paraoxonase-1 L55M polymorphism is associated with an abnormal oral glucose tolerance test and differentiates high risk coronary disease families. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 87,1268–1273.
- Deakin, S.P., Bioletto, S., Bochaton-Piallat, M.L., James, R.W. (2011). HDL-associated paraoxonase-1 can redistribute to cell membranes and influence sensitivity to oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 50(1), 102-109.
- de Roos, N.M., Schouten, E.G., Scheek, L.M., van Tol, A., Katan, M.B. (2002). Replacement of dietary saturated fat with trans fat reduces serum paraoxonase activity in healthy men and women. *Metabolism*, 51(12), 1534-1537.
- Dirican, M., Akça, R., Sarandol, E., Dilek, K. (2004). Serum paraoxonase activity in uremic predialysis and hemodialysis patients. *J Nephrol*, 17(6), 813-8.
- Draganov, D.I., Stetson, P.L., Watson, C.E., Billecke, S.S., La Du, B.N. (2000). Rabbit serum paraoxonase 3 (PON3) is a high density lipoprotein-associated lactonase and protects low density lipoprotein against oxidation. *Journal of Biological Chemistry*, 275(43), 33435-33442.

- Draganov, D.I., La Du, B.N. (2004). Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 369(1), 78-88.
- Draganov, D.I., Teiber, J.F., Speelman, A., Osawa, Y., Sunahara, R., La Du, B.N. (2005). Human paraoxonases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities. *Journal of Lipid Research*, 46(6), 1239-1247.
- Durrington, P.N., Mackness, B., Mackness, M.I. (2001). Paraoxonase and atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 21(4), 473-480.
- Ecobichon, D.J., Stephens, D.S. (1973). Perinatal development of human blood esterases. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 14(1), 41-47.
- Engel, S.M., Wetmur, J., Chen, J., Zhu, C., Barr, D.B., Canfield, R.L., Wolff, M.S. (2011). Prenatal exposure to organophosphates, paraoxonase 1, and cognitive development in childhood. *Environmental health perspectives*, 119(8), 1182.
- Erdös, E.G., Boggs, L.E. (1961). Hydrolysis of paraoxon in mammalian blood. *Nature*, 190(4777), 716-717.
- Escribano, D., Tvarijonaviciute, A., Tecles, F., Cerón, J.J. (2015). Serum paraoxonase type-1 activity in pigs: Assay validation and evolution after an induced experimental inflammation. *Veterinary immunology and immunopathology*, 163(3), 210-215.
- Eskenazi, B., Huen, K., Marks, A., Harley, K.G., Bradman, A., Barr, D.B., Holland, N. (2010). PON1 and neurodevelopment in children from the CHAMACOS study exposed to organophosphate pesticides in utero. *Environmental health perspectives*, 118(12), 1775.

Farid, A.S., Honkawa, K., Fath, E.M., Nonaka, N., Horii, Y. (2013). Serum paraoxonase-1 as biomarker for improved diagnosis of fatty liver in dairy cows. *BMC Veterinary Research*, 9(1), 73.

Feingold, K.R., Memon, R.A., Moser, A.H., Grunfeld, C. (1998). Paraoxonase activity in the serum and hepatic mRNA levels decrease during the acute phase response. *Atherosclerosis*, 139(2), 307-315.

Ferrè, N., Camps, J., Cabrè, M., Paul, A., Joven, J. (2001) Hepatic paraoxonase activity alterations and free radical production in rats with experimental cirrhosis. *Metabolism: Clinical and Experimental*. 50, 997–1000.

Ferrè, N., Camps, J., Prats, E., Vilella, E., Paul, A., Figuera, L., Joven, J. (2002). Serum paraoxonase activity: a new additional test for the improved evaluation of chronic liver damage. *Clinical chemistry*, 48(2), 261-268.

Ferré, N., Camps, J., Fernandez-Ballart, J., Arija, V., Murphy, M.M., Ceruelo, S., Joven, J. (2003). Regulation of serum paraoxonase activity by genetic, nutritional, and lifestyle factors in the general population. *Clinical Chemistry*, 49(9), 1491-1497.

Forte, T.M., Subbanagounder, G., Berliner, J.A., Blanche, P.J., Clermont, A.O., Jia, Z., Bielicki, J.K. (2002). Altered activities of anti-atherogenic enzymes LCAT, paraoxonase, and platelet-activating factor acetylhydrolase in atherosclerosis-susceptible mice. *Journal of Lipid Research*, 43(3), 477-485.

Franco-Pons, N., Marsillach, J., Joven, J., Camps, J., Closa, D. (2008). Serum paraoxonase undergoes inhibition and proteolysis during experimental acute pancreatitis. *Journal of Gastrointestinal Surgery*, 12(5), 891-899.

Frey, I., Berg, A., Baumstark, M.W., Collatz, K.G., Keul, J. (1990). Effects of age and physical performance capacity on distribution and composition

of high-density lipoprotein subfractions in men. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*, 60(6), 441-444.

Fuhrman, B., Buch, S., Vaya, J., Belinky, P.A., Coleman, R., Hayek, T., Aviram, M. (1997). Licorice extract and its major polyphenol glabridin protect low-density lipoprotein against lipid peroxidation: in vitro and ex vivo studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *The American journal of clinical nutrition*, 66(2), 267-275.

Gardner, R.S., Ogden, N.H., Cripps, P.J., Billington, D. (2003). Separation of bovine plasma lipoproteins by a rapid ultracentrifugation method. *Journal of Comparative Pathology*, 128(1), 15-23.

Geffré, A., Concordet, D., Braun, J.P., Trumel, C. (2011). Reference Value Advisor: a new freeware set of macroinstructions to calculate reference intervals with Microsoft Excel. *Veterinary Clinical Pathology*, 40(1), 107-112.

Gerloff, B.J., Herdt, T., Emery, R.S. (1986). Relationship of hepatic lipidosis to health and performance in dairy cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 188(8), 845-850.

German, A.J. (2006). The growing problem of obesity in dogs and cats. *The Journal of Nutrition*, 136(7), 1940S-1946S.

Ghiselli, A., Serafini, M., Natella, F., Scaccini, C. (2000). Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radical Biology and Medicine*, 29(11), 1106-1114.

Giordano, A., Veronesi, M.C., Rossi, G., Pezzia, F., Probo, M., Giori, L., Paltrinieri, S. (2013). Serum paraoxonase-1 activity in neonatal calves: Age related variations and comparison between healthy and sick animals. *The Veterinary Journal*, 197(2), 499-501.

Gordon, S.M., Hofmann, S., Askew, D.S., Davidson, W.S. (2011). High density lipoprotein: it's not just about lipid transport anymore. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 22(1), 9-15.

Goswami, B., Tayal, D., Gupta, N., Mallika, V. (2009). Paraoxonase: a multifaceted biomolecule. *Clinica Chimica Acta*, 410(1), 1-12.

Gouédard, C., Barouki, R., Morel, Y. (2004). Dietary polyphenols increase paraoxonase 1 gene expression by an aryl hydrocarbon receptor-dependent mechanism. *Molecular and Cellular Biology*, 24(12), 5209-5222.

Grummer, R.R. (1993). Etiology of lipid-related metabolic disorders in periparturient dairy cows. *Journal of dairy science*, 76(12), 3882-3896.

Gugliucci, A., Kotani, K., Kimura, S. (2012). Paraoxonase 1 in chronic kidney failure. *Journal of lipids*, 2012.

Guns, P.J., Assche, T., Verreth, W., Fransen, P., Mackness, B., Mackness, M., Bult, H. (2008). Paraoxonase 1 gene transfer lowers vascular oxidative stress and improves vasomotor function in apolipoprotein E-deficient mice with pre-existing atherosclerosis. *British journal of pharmacology*, 153(3), 508-516.

Gutiérrez, A.M., Martínez-Subiela, S., Eckersall, P.D., Cerón, J.J. (2009). C-reactive protein quantification in porcine saliva: a minimally invasive test for pig health monitoring. *The Veterinary Journal*, 181(3), 261-265.

Harel, M., Aharoni, A., Gaidukov, L., Brumshtein, B., Khersonsky, O., Meged, R., Dvir H., Ravelli R.B.G., McCarthy A., Toker L., Sussman J.L, Tawfik D.S., Silman, I. (2004). Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. *Nature structural & molecular biology*, 11(5), 412-419.

Harel, M., Brumshtein, B., Meged, R., Dvir, H., Ravelli, R., McCarthy, A., Toker, L., Silman, I., Sussman, J. (2007). 3-D structure of serum

paraoxonase 1 sheds light on its activity, stability, solubility and crystallizability. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 58(3), 347-353.

Harley, K.G., Huen, K., Schall, R.A., Holland, N.T., Bradman, A., Barr, D.B., Eskenazi, B. (2011). Association of organophosphate pesticide exposure and paraoxonase with birth outcome in Mexican-American women. *PLoS One*, 6(8), e23923.

Harris, E.K., Boyd, J.C. (1990). On dividing reference data into subgroups to produce separate reference ranged. *Clinical Chemistry*;36(2):265-270.

Hayek, T., Fuhrman, B., Vaya, J., Rosenblat, M., Belinky, P., Coleman, R., Elis, A., Aviram, M. (1997). Reduced progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice following consumption of red wine, or its polyphenols quercetin or catechin, is associated with reduced susceptibility of LDL to oxidation and aggregation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 17(11), 2744-2752.

Heidarpour, M., Soltani, S., Mohri, M., Khoshnegah, J. (2012). Canine visceral leishmaniasis: relationships between oxidative stress, liver and kidney variables, trace elements, and clinical status. *Parasitology research*, 111(4), 1491-1496.

Hess, R.S., Saunders, H.M., Van Winkle, T.J., Shofer, F.S., Washabau, R.J. (1998). Clinical, clinicopathologic, radiographic, and ultrasonographic abnormalities in dogs with fatal acute pancreatitis: 70 cases (1986-1995). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 213(5), 665-670.

Hessler, J.R., Robertson, A.L., Chisolm, G.M. (1979). LDL-induced cytotoxicity and its inhibition by HDL in human vascular smooth muscle and endothelial cells in culture. *Atherosclerosis*, 32(3), 213-229.

Horke, S., Witte, I., Wilgenbus, P., Krüger, M., Strand, D., Förstermann, U. (2007). Paraoxonase-2 reduces oxidative stress in vascular cells and

decreases endoplasmic reticulum stress-induced caspase activation. *Circulation*, 115(15), 2055-2064.

Ibba, F., Rossi, G., Meazzi, S., Giordano, A., Paltrinieri, S. (2015) Serum concentration of high density lipoproteins (HDLs) in leishmaniotic dogs. *Research in Veterinary Science*. 98, 89–91

Iftimie, S., García-Heredia, A., Pujol, I., Ballester, F., Fort-Gallifa, I., Simó, J.M., Camps, J. (2016). A preliminary study of paraoxonase-1 in infected patients with an indwelling central venous catheter. *Clinical biochemistry*, 49(6), 449-457.

Inanami, O., Shiga, A., Okada, K., Sato, R., Miyake, Y., Kuwabara, M. (1999). Lipid peroxides and antioxidants in serum of neonatal calves. *American journal of veterinary research*, 60(4), 452-457.

Jacobson, L.S. (2006). The South African form of severe and complicated canine babesiosis: clinical advances 1994–2004. *Veterinary parasitology*, 138(1), 126-139.

Jahangiri, A. (2010). HDL and the acute phase response. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity*, 17(2), 156.

James, R.W., Deakin, S.P. (2004). The importance of high-density lipoproteins for paraoxonase-1 secretion, stability, and activity. *Free Radical Biology and Medicine*, 37(12), 1986-1994.

Jarvik, G.P., Rozek, L.S., Brophy, V.H., Hatsukami, T.S., Richter, R.J., Schellenberg, G.D., Furlong, C.E. (2000). Paraoxonase (PON1) phenotype is a better predictor of vascular disease than is PON1192 or PON155 genotype. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 20(11), 2441-2447.

Jarvik, G.P., Tsai, N.T., McKinstry, L.A., Wani, R., Brophy, V.H., Richter, R.J., Furlong, C.E. (2002). Vitamin C and E intake is associated with

increased paraoxonase activity. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 22(8), 1329-1333.

Jarvik, G.P., Jampsa, R., Richter, R.J., Carlson, C.S., Rieder, M.J., Nickerson, D.A., Furlong, C.E. (2003). Novel paraoxonase (PON1) nonsense and missense mutations predicted by functional genomic assay of PON1 status. *Pharmacogenetics and Genomics*, 13(5), 291-295.

Jensen, A.L., Kjelgaard-Hansen, M. (2010). Diagnostic test validation. In: Weiss, D.J., Wardrop K.J., eds. *Schalm's Veterinary Hematology*. 6th ed. Iowa: Wiley-Blackwell. 1027-1033.

Jialal, I., and S.M. Grundy. (1992). Effect of dietary supplementation with alpha-tocopherol on the oxidative modification of low density lipoprotein. *Journal of Lipid Research*, 33:899–906.

Jorritsma, R., Jorritsma, H., Schukken, Y.H., Wentink, G.H. (2000). Relationships between fatty liver and fertility and some periparturient diseases in commercial Dutch dairy herds. *Theriogenology*, 54(7), 1065-1074.

Kalaitzakis, E., Panousis, N., Roubies, N., Giadinis, N., Kaldrymidou, E., Georgiadis, M., Karatzias, H. (2010). Clinicopathological evaluation of downer dairy cows with fatty liver. *Canadian Veterinary Journal*, 51(6), 615.

Kamisako, T., Kobayashi, Y., Takeuchi, K., Ishihara, T., Higuchi, K., Tanaka, Y., et al., Adachi, Y. (2000). Recent advances in bilirubin metabolism research: the molecular mechanism of hepatocyte bilirubin transport and its clinical relevance. *Journal of gastroenterology*, 35(9), 659-664.

Kaneko, J.J., Harvey, J.W., Bruss, M.L. (Eds.). (2008). *Clinical biochemistry of domestic animals*. 6th edition. Amsterdam; Boston: Academic press/Elsevier.

- Kao, Y.L., Donaghue, K., Chan, A., Knight, J., Silink, M. (1998) A variant of paraoxonase (PON1) gene is associated with diabetic retinopathy in IDDM. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*. 83, 2589–2592.
- Kaplan, M., Hayek, T., Raz, A., Coleman, R., Dornfeld, L., Vaya, J., Aviram, M. (2001). Pomegranate juice supplementation to atherosclerotic mice reduces macrophage lipid peroxidation, cellular cholesterol accumulation and development of atherosclerosis. *The Journal of Nutrition*, 131(8), 2082-2089.
- Karant, S., Pope, C. (2000). Carboxylesterase and A-esterase activities during maturation and aging: relationship to the toxicity of chlorpyrifos and parathion in rats. *Toxicological Sciences*, 58(2), 282-289.
- Katoh, N. (2002). Relevance of apolipoproteins in the development of fatty liver and fatty liver-related peripartum diseases in dairy cows. *Journal of Veterinary Medical Science*, 64(4), 293-307.
- Kawamura, M., Maede, Y., Namioka, S. (1987). Mitogenic responsibilities of lymphocytes in canine babesiosis and the effects of splenectomy on it. *Japanese Journal of Veterinary Research*, 35(1), 1-10.
- Keegan, R.F., Webb, C.B. (2010). Oxidative stress and neutrophil function in cats with chronic renal failure. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 24(3), 514-519.
- Keskin, M., Dolar, E., Dirican, M., Kiyici, M., Yilmaz, Y., Gurel, S., et al., Gulten, M. (2009). Baseline and salt-stimulated paraoxonase and arylesterase activities in patients with chronic liver disease: relation to disease severity. *Internal Medicine Journal*, 39(4), 243-248.
- Khersonsky, O., Tawfik, D.S. (2005). Structure– reactivity studies of serum paraoxonase PON1 suggest that its native activity is lactonase. *Biochemistry*, 44(16), 6371-6382.

Khersonsky, O., Tawfik, D.S. (2006). The histidine 115-histidine 134 dyad mediates the lactonase activity of mammalian serum paraoxonases. *Journal of Biological Chemistry*, 281(11), 7649-7656.

Kinnunen, S., Hyypä, S., Lehmuskero, A., Oksala, N., Mäenpää, P., Hänninen, O., Atalay, M. (2005). Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and exercise-induced oxidative stress in trotters. *European journal of applied physiology*, 95(5-6), 550-556.

Kordonouri, O., James, R.W., Bennetts, B., Chan, A., Kao, Y.L., Danne, T., Donaghue, K. (2001). Modulation by blood glucose levels of activity and concentration of paraoxonase in young patients with type 1 diabetes mellitus. *Metabolism*, 50(6), 657-660.

Kotani, K., Sakane, N., Sano, Y., Tsuzaki, K., Matsuoka, Y., Egawa, K., et al., Kimura, S. (2009). Changes on the physiological lactonase activity of serum paraoxonase 1 by a diet intervention for weight loss in healthy overweight and obese women. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*, 45(3), 329-334.

Kumon, Y., Suehiro, T., Ikeda, Y., Hashimoto, K. (2003). Human paraoxonase-1 gene expression by HepG2 cells is downregulated by interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α , but is upregulated by interleukin-6. *Life sciences*, 73(22), 2807-2815.

La Du, B.N. (1992). Human serum paraoxonase/arylesterase. In: Kalow W (ed) Genetic factors influencing the metabolism of foreign compounds (International encyclopedia of pharmacology and therapeutics). *Pergamon Press*, New York, pp 51–91.

La Du, B.N., Adkins, S., Kuo, C.L., Lipsig, D. (1993). Studies on human serum paraoxonase/arylesterase. *Chemico-biological interactions*, 87(1-3), 25-34.

LaBrecque, B., Beaudry, D., Mayhue, M., Hallé, C., Bordignon, V., Murphy, B.D., Palin, M.F. (2009). Molecular characterization and expression analysis of the porcine paraoxonase 3 (PON3) gene. *Gene*. 443(1-2):110-20. doi: 10.1016.

Lamb, D.J., Leake, D.S. (1994). Acidic pH enables caeruloplasmin to catalyse the modification of low-density lipoprotein. *FEBS letters*, 338(2), 122-126.

Letellier, C., Durou, M.R., Jouanolle, A.M., Le Gall, J.Y., Poirier, J.Y. Ruelland, A. (2002) Serum paraoxonase activity and paraoxonase gene polymorphism in type 2 diabetic patients with or without vascular complications. *Diabetes Metabolism*. 28, 297–304.

Leviev, I., Negro, F., James, R.W. (1997). Two alleles of the human paraoxonase gene produce different amounts of mRNA. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 17(11), 2935-2939.

Leviev, I., James, R.W. (2000). Promoter polymorphisms of human paraoxonase PON1 gene and serum paraoxonase activities and concentrations. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 20(2), 516-521.

Leviev, I., Kalix, B., Brulhart Meynet, M.C., James, R.W. (2001) The paraoxonase PON1 promoter polymorphism C(-107)T is associated with increased serum glucose concentrations in non-diabetic patients. *Diabetologia* 44, 1177–1183.

Li, W.F., Matthews, C., Disteché, C.M., Costa, L.G., Furlong, C.E. (1997). Paraoxonase (PON1) gene in mice: sequencing, chromosomal localization and developmental expression. *Pharmacogenetics and Genomics*, 7(2), 137-144.

Li, W.F., Costa, L.G., Richter, R.J., Hagen, T., Shih, D.M., Tward, A., Aaron, L., Aldon, J., Furlong, C.E. (2000). Catalytic efficiency determines

the in-vivo efficacy of PON1 for detoxifying organophosphorus compounds. *Pharmacogenetics and Genomics*, 10(9), 767-779.

Liao, F., Zhu, X.Y., Wang, Y.M., Zhao, Y.S., Zhu, L.P., Zuo, Y.P. (2007). Correlation of serum arylesterase activity on phenylacetate estimated by the integrated method to common classical biochemical indexes of liver damage. *Journal of Zhejiang University Science B*, 8(4), 237-241.

Link, J.J., Rohatgi, A., de Lemos, J.A. (2007). HDL cholesterol: physiology, pathophysiology, and management. *Current problems in cardiology*, 32(5), 268-314.

Lund, E.M., Armstrong, P.J., Kirk, C.A., Klausner, J. S. (2006). Prevalence and risk factors for obesity in adult dogs from private US veterinary practices. *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, 4(2), 177.

Lusis, A.J. (2000) Atherosclerosis, *Nature*, 407, 233–241.

Mackness, M.I., Arrol, S., Durrington, P.N. (1991). Paraonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS letters*, 286(1-2), 152-154.

Mackness, M.I., Arrol, S., Abbott, C., Durrington, P.N. (1993). Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraonase. *Atherosclerosis*, 104(1-2), 129-135.

Mackness, M. I., Durrington, P. N. (1995). HDL, its enzymes and its potential to influence lipid peroxidation. *Atherosclerosis*, 115(2), 243-253.

Mackness, M.I., Mackness, B., Durrington, P.N., Connelly, P.W., Hegele, R.A. (1996). Paraonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins. *Current opinion in lipidology*, 7(2), 69-76.

Mackness, B., Durrington, P.N., Mackness, M.I. (1998). Human serum paraoxonase. *General Pharmacology: The Vascular System*, 31(3), 329-336.

Mackness, M.I., Durrington, P.N., Mackness, B. (2000). How high-density lipoprotein protects against the effects of lipid peroxidation. *Current opinion in lipidology*, 11(4), 383-388.

Mackness, B., Davies, G.K., Turkie, W., Lee, E., Roberts, D.H., Hill, E., Mackness, M.I. (2001). Paraoxonase status in coronary heart disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 21(9), 1451-1457.

Mackness, B., Durrington, P.N., Mackness, M.I. (2002a). The paraoxonase gene family and coronary heart disease. *Current opinion in lipidology*, 13(4), 357-362.

Mackness, B., Durrington, P.N., Boulton, A.J., Hine, D. Mackness, M.I. (2002b) Serum paraoxonase activity in patients with type 1 diabetes compared to healthy controls. *European Journal of Clinical Investigation* 32, 259–256.

Mackness, B., Durrington, P., McElduff, P., Yarnell, J., Azam, N., Watt, M., Mackness, M. (2003). Low paraoxonase activity predicts coronary events in the Caerphilly Prospective Study. *Circulation*, 107(22), 2775-2779.

Mackness, B., Hine, D., Liu, Y., Mastorikou, M., Mackness, M. (2004). Paraoxonase-1 inhibits oxidised LDL-induced MCP-1 production by endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 318(3), 680-683.

Mackness, B., Quarck, R., Verreth, W., Mackness, M., Holvoet, P. (2006). Human paraoxonase-1 overexpression inhibits atherosclerosis in a mouse model of metabolic syndrome. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 26(7), 1545-1550.

- Mackness, M., Mackness, B. (2011). Effect of dilution on high-density lipoprotein associated paraoxonase-1 activity. *Clinical biochemistry*, 44(14), 1270-1271.
- Mackness, B., Mackness, M. (2012). The antioxidant properties of high-density lipoproteins in atherosclerosis. *Panminerva medica*, 54(2), 83.
- Mackness, M., Mackness, B. (2015). Human paraoxonase-1 (PON1): Gene structure and expression, promiscuous activities and multiple physiological roles. *Gene*, 567(1), 12-21.
- Mahley, R.W., Weisgraber, K.H., Innerarity, T., Brewer Jr, H.B., Assmann, G. (1975). Swine lipoproteins and atherosclerosis. Changes in the plasma lipoproteins and apoproteins induced by cholesterol feeding. *Biochemistry*, 14, 2817-2823.
- Main, A.R. (1960). The differentiation of the A-type esterases in sheep serum. *Biochemical Journal*, 75(1), 188.
- Mancianti, F., Meciani, N. (1988). Specific serodiagnosis of canine leishmaniasis by indirect immunofluorescence, indirect hemagglutination, and counterimmunoelectrophoresis. *American journal of veterinary research*, 49(8), 1409-1411.
- Mansfield, C.S., James, F.E., Robertson, I.D. (2008). Development of a clinical severity index for dogs with acute pancreatitis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 233(6), 936-944.
- Mansfield, C. (2012). Acute pancreatitis in dogs: advances in understanding, diagnostics, and treatment. *Topics in companion animal medicine*, 27(3), 123-132.
- Manthripragada, A.D., Costello, S., Cockburn, M.G., Bronstein, J.M., Ritz, B. (2010). Paraoxonase 1 (PON1), agricultural organophosphate exposure, and Parkinson disease. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, 21(1), 87.

Marcos, E., Mazur, A., Cardot, P., Rayssiguier, Y. (1990). The effect of pregnancy and lactation on serum lipid and apolipoprotein B and A-I levels in dairy cows. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 64(1-5), 133-138.

Marsillach, J., Aragonès, G., Beltrán, R., Caballeria, J., Pedro-Botet, J., Morcillo-Suárez, C., Camps, J. (2009). The measurement of the lactonase activity of paraoxonase-1 in the clinical evaluation of patients with chronic liver impairment. *Clinical Biochemistry*, 42(1), 91-98.

Martinez-Subiela, S., Tecles, F., Eckersall, P.D., Ceron, J.J. (2002). Serum concentrations of acute phase proteins in dogs with leishmaniasis. *Veterinary Record*, 150(8), 241-244.

Martinez-Subiela, S., Strauss-Ayali, D., Cerón, J.J., Baneth, G. (2011). Acute phase protein response in experimental canine leishmaniosis. *Veterinary parasitology*, 180(3), 197-202.

Martinez-Subiela, S., Cerón, J.J., Strauss-Ayali, D., Garcia-Martinez, J.D., Tecles, F., Tvarijonaviciute, A., Baneth, G. (2014). Serum ferritin and paraoxonase-1 in canine leishmaniosis. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 37(1), 23-29.

Mazur, A., Gueux, E., Chilliard, Y., Rayssiguter, Y. (1988). Changes in plasma lipoproteins and liver fat content in dairy cows during early lactation. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 59(1-5), 233-237.

Mazur, A. (1946). An enzyme in animal tissues capable of hydrolyzing the phosphorus-fluorine bond of alkyl fluorophosphates. *Journal of Biological Chemistry*, 164(1), 271-289.

McDaniel, C.Y., Dail, M.B., Wills, R.W., Chambers, H.W., Chambers, J.E. (2014). Paraoxonase 1 polymorphisms within a Mississippi USA

population as possible biomarkers of enzyme activities associated with disease susceptibility. *Biochemical Genetics*, 52(11-12), 509-523.

Mersmann, H.J. (1986). The pig: a concise source of information.

Milochevitch, C., Khalil, A. (2001). Study of the paraoxonase and platelet-activating factor acetylhydrolase activities with aging. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)*, 65(5-6), 241-246.

Mitchinson, M. J., Ball, R.Y., Carpenter, K.L.H., Enright, J.H. (1990). Macrophages and ceroid in human atherosclerosis. *European Heart Journal*, 11(suppl E), 116-121.

Mogarekar, M.R., Chawhan, S.S. (2013). The determination of Q192R polymorphism of paraoxonase 1 by using non-toxic substrate p-nitrophenylacetate. *Indian Journal of Human Genetics*, 19(1), 71.

Moghadasian, M.H. (2002). Experimental atherosclerosis: a historical overview. *Life sciences*, 70(8), 855-865.

Moser, V.C., Chanda, S.M., Mortensen, S.R., Padilla, S. (1998). Age-and gender-related differences in sensitivity to chlorpyrifos in the rat reflect developmental profiles of esterase activities. *Toxicological Sciences*, 46(2), 211-222.

Mrljak, V., Kučer, N., Kuleš, J., Tvarijonavičiute, A., Brkljačić, M., Crnogaj, M., et al., Rafaj, R.B. (2014). Serum concentrations of eicosanoids and lipids in dogs naturally infected with *Babesia canis*. *Veterinary parasitology*, 201(1), 24-30.

Mudroň, P., Rehage, J., Qualmann, K., Sallmann, H.P., Scholz, H. (1999). A study of lipid peroxidation and vitamin E in dairy cows with hepatic insufficiency. *Transboundary and Emerging Diseases*, 46(4), 219-224.

Mueller, R.F., Hornung, S., Furlong, C.E., Anderson, J., Giblett, E.R., Motulsky, A.G. (1983). Plasma paraoxonase polymorphism: a new enzyme

assay, population, family, biochemical, and linkage studies. *American Journal of Human Genetics*, 35(3), 393.

Murase, T., Maede, Y. (1990). Increased erythrophagocytic activity of macrophages in dogs with *Babesia gibsoni* infection. *Nihon juigaku zasshi. The Japanese Journal of Veterinary Science*, 52, 321-327.

Murase, T., Yamato, O., Tajima, M., Maede, Y. (1996). Oxidative damage and enhanced erythrophagocytosis in canine erythrocytes infected with *Babesia gibsoni*. *Journal of Veterinary Medical Science*, 58(3), 259-261.

Nafikov, R.A., Beitz, D.C. (2007). Carbohydrate and lipid metabolism in farm animals. *The Journal of nutrition*, 137(3), 702-705.

Nagy, G., Ward, J., Mosser, D.D., Koncz, A., Gergely, P., Stancato, C., et al., Talarico, T. (2006). Regulation of CD4 expression via recycling by HRES-1/RAB4 controls susceptibility to HIV infection. *Journal of Biological Chemistry*, 281(45), 34574-34591.

Navab, M., Imes, S.S., Hama, S.Y., Hough, G.P., Ross, L.A., Bork, R.W., Valente, A.J., Berliner, J.A., Drinkwater, D.C., Laks, H. (1991). Monocyte transmigration induced by modification of low density lipoprotein in cocultures of human aortic wall cells is due to induction of monocyte chemotactic protein 1 synthesis and is abolished by high density lipoprotein. *Journal of Clinical Investigation*, 88(6), 2039.

Navab, M., Berliner, J.A., Watson, A.D., Hama, S.Y., Territo, M.C., Lusis, A.J., Shih, D.M., Van Lenten, B.J., Frank, J.S., Demer, L.L., Fogelman, A.M., Edwards, P.A. (1996). The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 16(7), 831-842.

Navab, M., Hama-Levy, S., Van Lenten, B.J., Fonarow, G.C., Cardinez, C.J., Castellani, L.W., La Du, B.N. (1997). Mildly oxidized LDL induces

an increased apolipoprotein J/paraoxonase ratio. *Journal of Clinical Investigation*, 99(8), 2005.

Navab, M., Anantharamaiah, G.M., Reddy, S.T., Van Lenten, B.J., Ansell, B.J., Fogelman, A.M. (2006). Mechanisms of disease: proatherogenic HDL—an evolving field. *Nature Reviews Endocrinology*, 2(9), 504-511.

Navarro, M.A., Acín, S., Carnicer, R., Guzmán-García, M.A., Arbonés-Mainar, J.M., Surra, J.C., Osada, J. (2004). Response of ApoA-IV in pigs to long-term increased dietary oil intake and to the degree of unsaturation of the fatty acids. *British journal of nutrition*, 92(05), 763-769.

Nevin, D.N., Zambon, A., Furlong, C. E., Richter, R.J., Humbert, R., Hokanson, J.E., Brunzell, J.D. (1996). Paraoxonase genotypes, lipoprotein lipase activity, and HDL. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 16(10), 1243-1249.

Ng, C.J., Wadleigh, D.J., Gangopadhyay, A., Hama, S., Grijalva, V.R., Navab, M., Fogelman, A.M., Reddy, S.T. (2001). Paraoxonase-2 is a ubiquitously expressed protein with antioxidant properties and is capable of preventing cell-mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *Journal of Biological Chemistry*, 276(48), 44444-44449.

Nielsen, S.S., Mueller, B.A., De Roos, A.J., Viernes, H.M.A., Farin, F.M., Checkoway, H. (2005). Risk of brain tumors in children and susceptibility to organophosphorus insecticides: the potential role of paraoxonase (PON1). *Environmental health perspectives*, 909-913.

Nishio, E., Watanabe, Y. (1997). Cigarette smoke extract inhibits plasma paraoxonase activity by modification of the enzyme's free thiols. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 236(2), 289-293.

Novak, F., Vavrova, L., Kodykova, J., Hynkova, M., Zak, A., Novakova, O. (2010). Decreased paraoxonase activity in critically ill patients with sepsis. *Clinical and experimental medicine*, 10(1), 21-25.

Ofek, K., Krabbe, K.S., Evron, T., Debecco, M., Nielsen, A.R., Brunnsgaard, H., Pedersen, B.K. (2007). Cholinergic status modulations in human volunteers under acute inflammation. *Journal of molecular medicine*, 85(11), 1239-1251.

Ohtsuka, H., Koiwa, M., Hatsugaya, A., Hoshi, F., Yokota, H., Okada, H., Kawamura, S.I. (2001). Relationship between serum TNF activity and insulin resistance in dairy cows affected with naturally occurring fatty liver. *Journal of Veterinary Medical Science*, 63(9), 1021-1025.

Otsuka, Y., Yamasaki, M., Yamato, O., Maede, Y. (2002). The effect of macrophages on the erythrocyte oxidative damage and the pathogenesis of anemia in *Babesia gibsoni* – infected dogs with low parasitemia. *The Journal of Veterinary Medicine Science*. 64, 221 – 226.

Paltrinieri, S., Solano-Gallego, L., Fondati, A., Lubas, G., Gradoni, L., Castagnaro, M., Zatelli, A. (2010). Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 236(11), 1184-1191.

Panaro, M.A., Fasanella, A., Lisi, S., Mitolo, V., Andriola, A., Brandonisio, O. (1998). Evaluation of nitric oxide production by *Leishmania infantum*-infected dog macrophages. *Immunopharmacology and immunotoxicology*, 20(1), 147-158.

Paragh, G., Balla, P., Katona, E., Seres, I., Egerhazi, A., Degrell, I. (2002) Serum paraoxonase activity changes in patients with Alzheimer's disease and vascular dementia. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neurosciences*. 252, 63–67.

Parra, S., Marsillach, J., Aragonès, G., Rull, A., Beltrán-Debón, R., Alonso-Villaverde, C., et al., Camps, J. (2010). Methodological constraints in interpreting serum paraoxonase-1 activity measurements: an example

from a study in HIV-infected patients. *Lipids in Health and Disease*, 9(1), 32.

Pereda, J., Sabater, L., Aparisi, L., Escobar, J., Sandoval, J., Viña, J., et al., Sastre, J. (2006). Interaction between cytokines and oxidative stress in acute pancreatitis. *Current medicinal chemistry*, 13(23), 2775-2787.

Primo-Parmo, S.L., Sorenson, R.C., Teiber, J., La Du, B.N. (1996). The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics*, 33(3), 498-507.

Pfohl, M., Koch, M., Enderle, M.D., Kühn, R., Füllhase, J., Karsch, K.R., Häring, H.U. (1999). Paraoxonase 192 Gln/Arg gene polymorphism, coronary artery disease, and myocardial infarction in type 2 diabetes. *Diabetes*, 48(3), 623-627.

Phuntuwate, W., Suthisisang, C., Koanantakul, B., Mackness, M.I., Mackness, B. (2005). Paraoxonase 1 status in the Thai population. *Journal of Human Genetics*, 50(6), 293-300.

Playfer, J.R., Eze, L.C., Bullen, M.F., Evans, D.A.P. (1976). Genetic polymorphism and interethnic variability of plasma paraoxonase activity. *Journal of Medical Genetics*. 13: 337-342.

Raiszadeh, F., Solati, M., Etemadi, A., Azizi, F. (2004). Serum paraoxonase activity before and after treatment of thyrotoxicosis. *Clinical endocrinology*, 60(1), 75-80.

Rao, M.N., Marmillot, P., Gong, M., Palmer, D.A., Seeff, L.B., Strader, D.B., Lakshman, M.R. (2003). Light, but not heavy alcohol drinking, stimulates paraoxonase by upregulating liver mRNA in rats and humans. *Metabolism*, 52(10), 1287-1294.

Rantala, M., Silaste, M.L., Tuominen, A., Kaikkonen, J., Salonen, J.T., Alftan, G., Kesäniemi, Y.A. (2002). Dietary modifications and gene

polymorphisms alter serum paraoxonase activity in healthy women. *The Journal of Nutrition*, 132(10), 3012-3017.

Reddy, S.T., Wadleigh, D.J., Grijalva, V., Ng, C., Hama, S., Gangopadhyay, A., Shih, D.M., Lusic, A.J., Navab, M., Fogelman, A.M. (2001). Human paraoxonase-3 is an HDL-associated enzyme with biological activity similar to paraoxonase-1 protein but is not regulated by oxidized lipids. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 21(4), 542-547.

Reference Value Advisor Macroinstructions. Available at: <http://www.biostat.envt.fr/spip/spip.php?article63>.

Regan, A.D., Cohen, R.D., Whittaker, G.R. (2009). Activation of p38 MAPK by feline infectious peritonitis virus regulates pro-inflammatory cytokine production in primary blood-derived feline mononuclear cells. *Virology*, 384(1), 135-143.

Reid, I.M. (1980). Incidence and severity of fatty liver in dairy cows. *The Veterinary Record*, 107(12), 281-284.

Reif, D.W. (1992). Ferritin as a source of iron for oxidative damage. *Free Radical Biology and Medicine*, 12(5), 417-427.

Ricós, C., Alvarez, V., Cava, F., Garcia-Lario, J.V., Hernandez, A., Jimenez, C.V., Simon, M. (1999). Current databases on biological variation: pros, cons and progress. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*, 59(7), 491-500.

Rienhoff Jr, H.Y., Huang, J.H., Li, X.X., Liao, W.S. (1990). Molecular and cellular biology of serum amyloid A. *Molecular biology & medicine*, 7(3), 287-298.

Rodríguez-Sanabria, F., Rull, A., Beltrán-Debón, R., Aragonès, G., Camps, J., Mackness, M., Joven, J. (2010). Tissue distribution and expression of

paraoxonases and chemokines in mouse: the ubiquitous and joint localisation suggest a systemic and coordinated role. *Journal of molecular histology*, 41(6), 379-386.

Ross, R. (1993) The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990's, *Nature*, 36, 801–809.

Rossi, G., Giordano, A., Pezzia, F., Kjelgaard-Hansen, M., Paltrinieri, S. (2013). Serum paraoxonase 1 activity in dogs: preanalytical and analytical factors and correlation with C-reactive protein and alpha-2-globulin. *Veterinary Clinical Pathology*, 42(3), 329-341.

Rossi, G., Ibba, F., Meazzi, S., Giordano, A., Paltrinieri, S. (2014a). Paraoxonase activity as a tool for clinical monitoring of dogs treated for canine leishmaniasis. *The Veterinary Journal*, 199(1), 143-149.

Rossi, G., Kuleš, J., Rafaj, R. B., Mrljak, V., Lauzi, S., Giordano, A., Paltrinieri, S. (2014b). Relationship between paraoxonase 1 activity and high density lipoprotein concentration during naturally occurring babesiosis in dogs. *Research in veterinary science*, 97(2), 318-324.

Rozenberg, O., Shih, D.M., Aviram, M. (2005). Paraoxonase 1 (PON1) attenuates macrophage oxidative status: studies in PON1 transfected cells and in PON1 transgenic mice. *Atherosclerosis*, 181(1), 9-18.

Sabesin, S.M., Hawkins, H.L., Kuiken, L., Ragland, J.B. (1977). Abnormal plasma lipoproteins and lecithin-cholesterol acyltransferase deficiency in alcoholic liver disease. *Gastroenterology*, 72(3), 510-518.

Schweikert, E.M., Amort, J., Wilgenbus, P., Förstermann, U., Teiber, J.F., Horke, S. (2012). Paraoxonases-2 and-3 are important defense enzymes against *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors due to their anti-oxidative and anti-inflammatory properties. *Journal of lipids*, 2012.

Sentí, M., Tomás, M., Vila, J., Marrugat, J., Elosua, R., Sala, J., Masiá, R. (2001). Relationship of age-related myocardial infarction risk and Gln/Arg 192 variants of the human paraoxonase1 gene: the REGICOR study. *Atherosclerosis*, 156(2), 443-449.

Sentí, M., Tomás, M., Anglada, R., Elosua, R., Marrugat, J., Covas, M. I., Fitó, M. (2003). Interrelationship of smoking, paraoxonase activity, and leisure time physical activity: a population-based study. *European Journal of Internal Medicine*, 14(3), 178-184.

Seres, I., Paragh, G., Deschene, E., Fulop, T., Khalil, A. (2004). Study of factors influencing the decreased HDL associated PON1 activity with aging. *Experimental Gerontology*, 39(1), 59-66.

Shih, D.M., Gu, L., Hama, S., Xia, Y.R., Navab, M., Fogelman, A.M., Lusis, A.J. (1996). Genetic-dietary regulation of serum paraoxonase expression and its role in atherogenesis in a mouse model. *Journal of Clinical Investigation*, 97(7), 1630.

Shih, D.M., Gu, L., Xia, Y.R., Navab, M., Li, W.F., Hama, S., Lusis, A.J. (1998). Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature*, 394(6690), 284-287.

Smolen, A., Eckerson, H.W., Gan, K.N., Hailat, N., La Du, B.N. (1991). Characteristics of the genetically determined allozymic forms of human serum paraoxonase/arylesterase. *Drug Metabolism and Disposition*, 19(1), 107-112.

Solano-Gallego, L., Trotta, M., Carli, E., Carcy, B., Caldin, M., Furlanello, T. (2008). *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* clinicopathological findings and DNA detection by means of PCR-RFLP in blood from Italian dogs suspected of tick-borne disease. *Veterinary parasitology*, 157(3), 211-221.

- Soyoral, Y.U., Aslan, M., Emre, H., Begenik, H., Erdur, F.M., Turkel, A., et al., Erkoç, R. (2011). Serum paraoxonase activity and oxidative stress in patients with adult nephrotic syndrome. *Atherosclerosis*, 218(1), 243-246.
- Stafforini, D.M., McIntyre, T.M., Prescott, S.M. (1990). Platelet-activating factor acetylhydrolase from human plasma. *Methods in enzymology*, 187, 344-357.
- Steinberg, D., Parthasarathy S., Carew T.E., Khoo J.C., Witztum J.L. (1989). Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *New England Journal Medicine*. 320:915–924.
- Suresh, D.R., Annam, V., Pratibha, K., Prasad, B.M. (2009). Total antioxidant capacity—a novel early bio-chemical marker of oxidative stress in HIV infected individuals. *Journal of biomedical science*, 16(1), 61.
- Sutherland, W.H., Walker, R.J., de Jong, S.A., van Rij, A.M., Phillips, V., Walker, H.L. (1999). Reduced postprandial serum paraoxonase activity after a meal rich in used cooking fat. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 19(5), 1340-1347.
- Tang, W.W., Hartiala, J., Fan, Y., Wu, Y., Stewart, A.F., Erdmann, J., Hazen, S.L. (2012). Clinical and genetic association of serum paraoxonase and arylesterase activities with cardiovascular risk. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 32(11), 2803-2812.
- Tavori, H., Aviram, M., Khatib, S., Musa, R., Mannheim, D., Karmeli, R., Vaya, J. (2011). Paraoxonase 1 protects macrophages from atherogenicity of a specific triglyceride isolated from human carotid lesion. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(1), 234-242.
- Tecles, F., Fuentes, P., Subiela, S.M., Parra, M.D., Munoz, A., Ceron, J.J. (2007). Analytical validation of commercially available methods for acute phase proteins quantification in pigs. *Research in veterinary science*, 83(1), 133-139.

Tecles, F., Caldín, M., Tvarijonaviciute, A., Escribano, D., Martínez-Subiela, S., Cerón, J.J. (2015). Serum biomarkers of oxidative stress in cats with feline infectious peritonitis. *Research in veterinary science*, 100, 12-17.

Terpstra, A.H., Sanchez-Muniz, F.J., West, C.E., Woodward, C.J. (1982). The density profile and cholesterol concentration of serum lipoproteins in domestic and laboratory animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 71(4), 669-673.

Tomás, M., Sentí, M., Elosua, R., Vila, J., Sala, J., Masià, R., Marrugat, J. (2001). Interaction between the Gln–Arg 192 variants of the paraoxonase gene and oleic acid intake as a determinant of high-density lipoprotein cholesterol and paraoxonase activity. *European Journal of Pharmacology*, 432(2), 121-128.

Torti, F.M., Torti, S.V. (2002). Regulation of ferritin genes and protein. *Blood*, 99(10), 3505-3516.

Trayhurn, P. (2005). Adipose tissue in obesity—an inflammatory issue. *Endocrinology*, 146(3), 1003-1005.

Turk, R., Juretic, D., Geres, D., Turk, N., Rekić, B., Simeon-Rudolf, V., Svetina, A. (2004). Serum paraoxonase activity and lipid parameters in the early postpartum period of dairy cows. *Research in veterinary science*, 76(1), 57-61.

Tvarijonaviciute, A., Ceron, J.J., Holden, S.L., Morris, P.J., Biourge, V., German, A.J. (2012a). Effects of weight loss in obese cats on biochemical analytes related to inflammation and glucose homeostasis. *Domestic animal endocrinology*, 42(3), 129-141.

Tvarijonaviciute, A., Tecles, F., Caldín, M., Tasca, S., Cerón, J. (2012b). Validation of spectrophotometric assays for serum paraoxonase type-1

measurement in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 73(1), 34-41.

Tvarijonavičiute, A., Kocaturk, M., Cansev, M., Tecles, F., Ceron, J.J., Yilmaz, Z. (2012c). Serum butyrylcholinesterase and paraoxonase 1 in a canine model of endotoxemia: effects of choline administration. *Research in veterinary science*, 93(2), 668-674.

Tvarijonavičiute, A., García-Martínez, J.D., Caldin, M., Martínez-Subiela, S., Tecles, F., Pastor, J., Ceron, J.J. (2015). Serum paraoxonase 1 (PON1) activity in acute pancreatitis of dogs. *Journal of small animal practice*, 56(1), 67-71.

Tward, A., Xia, Y.R., Wang, X.P., Shi, Y.S., Park, C., Castellani, L.W., Shih, D.M. (2002). Decreased atherosclerotic lesion formation in human serum paraoxonase transgenic mice. *Circulation*, 106(4), 484-490.

Van Himbergen, T.M., van der Schouw, Y.T., Voorbij, H.A., van Tits, L.J., Stalenhoef, A.F., Peeters, P.H., Roest, M. (2008). Paraoxonase (PON1) and the risk for coronary heart disease and myocardial infarction in a general population of Dutch women. *Atherosclerosis*, 199(2), 408-414.

Van Lenten, B.J., Hama, S.Y., De Beer, F.C., Stafforini, D.M., McIntyre, T.M., Prescott, S.M., La Du, B.N., Fogelman, A.M., Navab, M. (1995). Anti-inflammatory HDL becomes pro-inflammatory during the acute phase response. Loss of protective effect of HDL against LDL oxidation in aortic wall cell cocultures. *Journal of Clinical Investigation*, 96(6), 2758.

Van Linthout, S., Spillmann, F., Schultheiss, H.P., Tschope, C. (2010). High-density lipoprotein at the interface of type 2 diabetes mellitus and cardiovascular disorders. *Current pharmaceutical design*, 16(13), 1504-1516.

- Vanarsa, K., Ye, Y., Han, J., Xie, C., Mohan, C., Wu, T. (2012). Inflammation associated anemia and ferritin as disease markers in SLE. *Arthritis research & therapy*, 14(4), R182.
- Wallace, A.J., Sutherland, W.H., Mann, J.I., Williams, S.M. (2001). The effect of meals rich in thermally stressed olive and safflower oils on post prandial serum paraoxonase activity in patients with diabetes. *Eur. J. Clin. Nutr.* 55, 951–958.
- Wang, M., Lang, X., Cui, S., Zou, L., Cao, J., Wang, S., Wu, X. (2012). Quantitative assessment of the influence of paraoxonase 1 activity and coronary heart disease risk. *DNA and cell biology*, 31(6), 975-982.
- Watson, A.D., Berliner, J.A., Hama, S.Y., La Du, B.N., Faull, K.F., Fogelman, A.M., Navab, M. (1995). Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *Journal of Clinical Investigation*, 96(6), 2882.
- Webb, C., Lehman, T., McCord, K., Avery, P., Dow, S. (2008). Oxidative stress during acute FIV infection in cats. *Veterinary immunology and immunopathology*, 122(1), 16-24.
- Webb, C.B., Falkowski, L. (2009). Oxidative stress and innate immunity in feline patients with diabetes mellitus: the role of nutrition. *Journal of feline medicine and surgery*, 11(4), 271-276.
- Wehner, J.M., Murphy-Erdosh, C., Smolen, A., Smolen, T.N. (1987). Genetic variation in paraoxonase activity and sensitivity to diisopropylphosphofluoridate in inbred mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 28(2), 317-320.
- Weitman, S.D., Vodcnik, M.J., Lech, J.J. (1983). Influence of pregnancy on parathion toxicity and disposition. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 71(2), 215-224.

Westgard, J.O. (2003). Internal quality control: planning and implementation strategies. *Annals of Clinical Biochemistry*. Nov;40:593-611.

Xenoulis, P.G., Suchodolski, J.S., Steiner, J.M. (2008). Chronic pancreatitis in dogs and cats. *Compendium*.

Xie, S., Li, J., Chen, Y., Wang, C., Zhang, H., Mo, D. (2010). Sequence identification, chromosomal mapping and tissue specific expression of the porcine paraoxonase 1 (PON1) gene. *Molecular biology reports*, 37(3), 1347-1353.

Yilmaz, N. (2012). Relationship between paraoxonase and homocysteine: crossroads of oxidative diseases. *Arch Med Sci*, 8(1), 138-153.

Zech, R., Zürcher, K. (1974). Organophosphate splitting serum enzymes in different mammals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 48(3), 427-433.