

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
FACOLTÀ DI MEDICINA VETERINARIA



Dipartimento di Scienze Sperimentali Veterinarie

TESI DI LAUREA

**AOPP (Advanced Oxidation Protein Products) PER IL
MONITORAGGIO DELLO STRESS OSSIDATIVO NELLA
BOVINA DA LATTE DURANTE IL PROCESSO
INFIAMMATOARIO**

Relatore: Ch.mo prof. Gianfranco Gabai

Correlatore: Dott.ssa Daniela Pasotto

Laureanda: Nadia Borsato

Anno Accademico 2010-2011

INDICE

1	PREFAZIONE E SCOPO DELLA TESI	1
2	INTRODUZIONE	5
2.1	INFIAMMAZIONE	5
2.1.1	Il sistema immunitario nella risposta infiammatoria	5
2.1.2	Il processo infiammatorio	6
2.1.2.1	Il processo infiammatorio acuto: modificazioni vascolari	6
2.1.2.2	Il processo infiammatorio acuto: intervento cellulare	10
2.1.2.3	Il processo infiammatorio cronico	19
2.1.3	Infiammazioni più frequenti nella bovina da latte	20
2.1.3.1	Le mastiti	21
2.1.3.2	Le infiammazioni uterine post parto	22
2.1.3.3	Le patologie podali	23
2.2	STRESS OSSIDATIVO	25
2.2.1	L'equilibrio tra ossidanti e antiossidanti	25
2.2.2	Lo stress ossidativo e i danni indotti da questo	27
2.2.2.1	DNA	27
2.2.2.2	Lipidi	28
2.2.2.3	Proteine	28
2.2.3	Prodotti dell'ossidazione proteica e produzione di autoanticorpi	29
2.2.4	Stress ossidativo indotto dall'infiammazione	30
2.3	MARCATORI OGGETTO DEL PRESENTE STUDIO	34
2.3.1	Aptoglobina (Hp)	34
2.3.2	AOPP	36
2.3.3	Glutathione (GSH)	37

2.3.4 DHEA	39
2.3.5 Interleuchina 6 (IL-6)	42
2.3.6 Tumor necrosis factor alpha (TNF- α)	43
2.3.7 Interferone alfa (IFN- α)	45
3 MATERIALI E METODI	47
3.1 RACCOLTA DEI CAMPIONI	47
3.2 DOSAGGIO DELL'APTOGLOBINA	48
3.3 TITOLAZIONE DEL LISOZIMA	48
3.4 SAGGIO BRADFORD	51
3.5 DOSAGGIO DELLE AOPP	51
3.6 DOSAGGIO DEI T-BARS	52
3.7 DETERMINAZIONE DEL GSH TOTALE	53
3.8 ANALISI RADIOIMMUNOLOGICA (RIA)	54
3.8.1 RIA su micropiastra	54
3.8.2 Allestimento della curva di taratura e dei controlli	55
3.9 DOSAGGIO DELL'INTERLEUCHINA 6	57
3.10 DOSAGGIO DEL TNF- α	58
3.11 DOSAGGIO DELL'IFN- α	58
3.12 COLORAZIONE CON DIFF QUICK PER LA VALUTAZIONE DELLO STRISCIO EMATICO	58
3.13 SAGGIO IMMUNO ENZIMATICO DEL TITOLO ANTICORPALE (EIA)	60
3.13.1 Preparazione della AOPP-BSA	60
3.13.2 Determinazione degli autoanticorpi	61
3.14 ELABORAZIONE DEI RISULTATI	62
3.14.1 Classificazione degli animali	62
3.14.2 Analisi statistica	63

4 RISULTATI E DISCUSSIONE	65
4.1 CORRELAZIONE TRA I VARI PARAMETRI	65
4.2 POPOLAZIONE CLINICAMENTE SANA	66
4.2.1 Variazioni fisiologiche	66
4.2.2 Confronto tra manze e animali adulti	73
4.3 LIVELLO DI ASSOCIAZIONE TRA I DUE SISTEMI DI CLASSIFICAZIONE	73
4.4 CONFRONTO TRA POPOLAZIONE CLINICAMENTE SANA E CLINICAMENTE MALATA	74
4.5 CONFRONTO TRA POPOLAZIONE IN FASE ACUTA E POPOLAZIONE DI CONTROLLO VALUTATE SULLA BASE DEI VALORI DI APTOGLOBINA	86
5 CONCLUSIONI	89
6 BIBLIOGRAFIA	91
7 RINGRAZIAMENTI	127

1 PREFERAZIONE E SCOPO DELLA TESI

Negli ultimi anni la ricerca ha dimostrato sempre maggior interesse verso lo stress ossidativo e i prodotti dell'ossidazione ad esso correlati. Questi ultimi sono stati considerati di notevole importanza in medicina umana nell'ambito di patologie quali Alzheimer (Smith *et al.*, 1992), cancro (Loft *et al.*, 2008), aterosclerosi (Gounopoulos *et al.*, 2007), nefropatie (Witko-Sarsat *et al.*, 1998), Parkinson (Jenner, 2003), diabete (Kaluosava *et al.*, 2002), artrite (Seven *et al.*, 2008), nonché in meccanismi fisiopatologici come l'invecchiamento (Ames *et al.*, 1993).

Tuttavia, alcune ricerche hanno anche evidenziato un ruolo fondamentale delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) nel regolare alcune attività fisiologiche e fisiopatologiche dell'apparato riproduttivo femminile come lo sviluppo follicolare, l'ovulazione, la funzionalità del corpo luteo, la fecondazione e lo sviluppo embrionale (Fujii *et al.*, 2005).

Alla luce di questo e della possibile correlazione tra prodotti dell'ossidazione e mortalità embrionale nella donna (Guerin *et al.*, 2001), lo stress ossidativo ha suscitato notevole interesse nell'ambito della medicina e dell'allevamento delle bovine da latte, dove i problemi di fertilità negli ultimi decenni sono notevolmente aumentati (Lucy, 2007) in buona parte per mancato mantenimento della gravidanza, causando grosse perdite economiche (Royal *et al.*, 2000a; De Vries, 2006). Nelle bovine da latte, infatti, è stata evidenziata una importante incidenza di riassorbimento embrionale nelle prime fasi della gravidanza, e solo il 40% degli animali risulta gravido a 28 giorni dall'inseminazione (Santos *et al.*, 2004). In maniera simile, nelle donne, il 30-50% dei concepimenti termina con un aborto spontaneo, che avviene nella maggior parte dei casi nella fase di impianto e risulta associato alla presenza di stress ossidativo (Gupta *et al.*, 2007).

In uno studio di Iborra e colleghi (2005) viene riportato che patologie dell'apparato riproduttore come l'endometriosi, la sindrome dell'ovaio policistico, gli aborti ripetuti e l'ostruzione delle tube, sono correlate alla presenza di citochine infiammatorie, oltre che di elevati livelli di specie reattive dell'ossigeno. Va inoltre ricordato che lo stabilirsi della gravidanza induce un meccanismo immunosoppressivo generato da una serie di citochine che operano in maniera coordinata e complessa sia a livello locale che sistemico; questo garantisce l'innescamento dei cambiamenti molecolari e cellulari che garantiscono l'impianto e lo sviluppo embrionale (Orsi, 2008). L'alterazione di questo meccanismo di

“comunicazione” tra madre e feto, data dalle citochine stesse, può essere associato a fenomeni che vanno dall’aborto spontaneo all’insorgenza di danni cerebrali del feto (Orsi and Tribe, 2008). A causa di tutto questo risulta di fondamentale importanza comprendere quale sia la relazione tra processo infiammatorio, stress ossidativo e gravidanza.

In un recente studio (Celi *et al.*, 2010) campioni di sangue sono stati prelevati ad intervalli regolari in bovine da latte dopo l’inseminazione artificiale (IA), valutandone in particolar modo alcuni indicatori plasmatici di stress ossidativo. Parallelamente venivano svolte diagnosi di gravidanza ecografica a partire dal venticinquesimo giorno dall’IA, in modo tale da poter differenziare animali positivi (in cui l’IA dava origine ad una gravidanza), negativi (in cui l’IA non dava origine ad una gravidanza) e con riassorbimento embrionale (ovvero animali in cui la diagnosi risultava positiva ad una prima indagine ma non esitava in gravidanza). Tra gli indici valutati è stato evidenziato che solo uno di questi, ovvero le *advanced oxidation protein products* (AOPP), risultava variare in maniera statisticamente significativa nel gruppo di animali che subiva riassorbimento embrionale rispetto agli altri due (Fig. 1.1).

Le AOPP sembrano derivare da reazioni tra proteine plasmatiche e ossidanti clorurati (Witko-Sarsat *et al.*, 1999; Fialovà *et al.*, 2006; Noyan *et al.*, 2006) ma, essendo lo studio di queste molto recente, il loro ruolo è ancora scarsamente compreso. Essendo però la capacità di produrre ossidanti clorurati tipica dell’enzima mieloperossidasi (MPO) contenuto nelle cellule in grado di svolgere fagocitosi (in particolar modo i neutrofili), è ragionevole supporre che le AOPP siano il risultato di un fenomeno infiammatorio acuto. Tuttavia, una volta prodotte, le AOPP possono manifestare attività pro-infiammatoria (Kalousovà *et al.*, 2005; Shi *et al.*, 2008), probabilmente stimolando la produzione di auto-anticorpi come accade per altri prodotti dell’ossidazione (Shanti *et al.*, 1999; Palinski and Witzum, 2000; Kurien *et al.*, 2006), anche se questo meccanismo non è ancora stato dimostrato per le AOPP.

Il fatto che le AOPP siano innalzate negli animali che vanno incontro a riassorbimento embrionale potrebbe quindi essere giustificato da un processo infiammatorio che determina sia l’aumento del parametro, sia i fenomeni che conducono all’incapacità di portare a termine la gravidanza. Lo scopo di questa tesi è di evidenziare una possibile relazione tra processi infiammatori (acuti e cronici) più frequenti nelle bovine da latte (mastiti, infiammazioni uterine postparto e patologie podali) e variazioni delle AOPP.

Non va comunque escluso che le AOPP possano giocare un ruolo biologico proprio nel determinare la morte embrionale, soprattutto tramite la formazione di autoanticorpi.

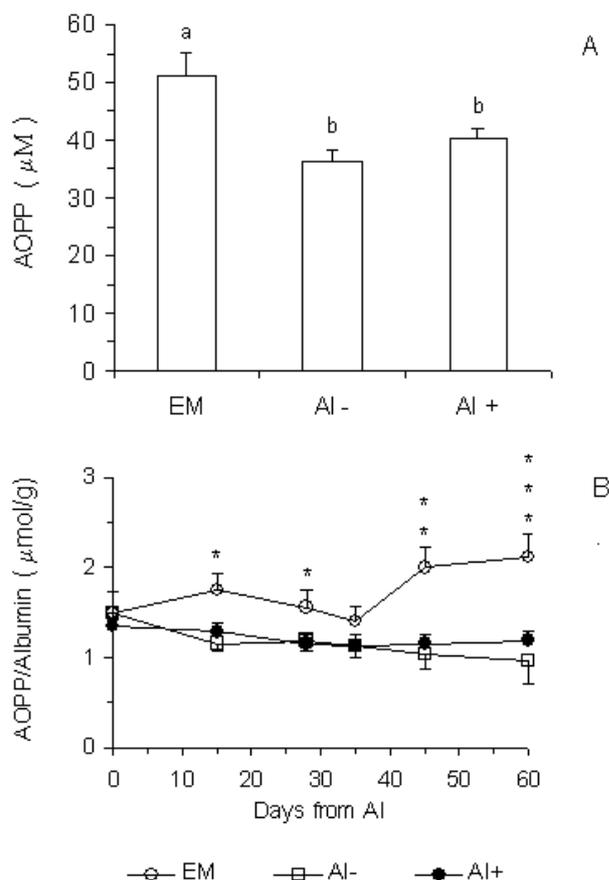


Figura 1.1 A: Variazioni dei livelli di AOPP in relazione all'esito della fecondazione artificiale. Lettere diverse indicano medie significativamente differenti. ($P < 0.01$) **B:** Variazioni dei rapporti AOPP/albumina in relazione all'esito dell'inseminazione artificiale e al numero di giorni trascorsi da questa. Il valore AOPP/albumina è risultato significativamente più elevato negli animali in cui si riscontrava morte embrionale. Gli asterischi indicano medie significativamente differenti: *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$. EM: morte embrionale; AI-: animali con diagnosi di gravidanza negativa dopo inseminazione artificiale; AI+: animali con diagnosi di gravidanza positiva dopo inseminazione artificiale. (Celi *et al.*, 2010)

Inoltre, alcuni autori hanno evidenziato una correlazione tra stress ossidativo, capacità antiossidante totale plasmatica e stato metabolico e produttivo dell'animale (Bernabucci *et al.*, 2005; Gaál *et al.*, 2006; Castillo *et al.*, 2005), rafforzando l'ipotesi che l'aumento della richiesta energetica dovuta alla lattazione possa alterare l'equilibrio tra metaboliti reattivi dell'ossigeno (ROMs) e capacità antiossidante nel sangue, probabilmente anche grazie ad una perdita di antiossidanti plasmatici liposolubili tramite la secrezione latte (Castillo *et al.*, 2005). Compito di questo lavoro è quindi anche quello di valutare se le

concentrazioni di AOPP plasmatiche siano soggette a variazione dipendenti della fase metabolica e produttiva.

2 INTRODUZIONE

2.1 INFIAMMAZIONE

2.1.1 IL SISTEMA IMMUNITARIO NELLA RISPOSTA INFIAMMATORIA

Il sistema immunitario è un insieme di organi e cellule in grado di distinguere ciò che è proprio dell'individuo (ovvero *self*) da ciò che è estraneo o proprio ma alterato (*non-self*), operando in maniera coordinata per mantenere l'integrità dell'organismo (Delmann and Eurell, 2000).

A seguito del passaggio delle eventuali barriere fisiche, il primo ostacolo che i patogeni incontrano è rappresentato dalla cosiddetta "immunità innata" (Tizard, 2000), responsabile di una risposta immediata nei confronti dei patogeni (Chou *et al.*, 2008). Questa ha evoluto meccanismi di riconoscimento tra *self* e *non-self* basata su pattern molecolari di riconoscimento (*pathogen-associated molecular pattern* o PAMPs). Questi pattern vengono quindi riconosciuti da recettori (*pattern recognition receptor* o PRRs) che inducono o inibiscono la risposta immunitaria a seconda del tipo di segnale (Medzhitov and Janeway, 2002).

Il legame tra PRRs e PAMPs dà origine alla fagocitosi nelle cellule coinvolte (prevalentemente macrofagi) che, a loro volta, secernono citochine e chemochine che stimolano le altre cellule della risposta immunitaria (neutrofili, monociti, natural killer, eosinofili) (Si-Tahar *et al.*, 2009). I PRRs includono tre gruppi di recettori: *nucleotide-oligomerization domain-like receptors* (NLR), *retinoic acid-inducible gene* (RIG)-*I-like helicase* e i più noti *Toll-like receptors* (TLRs) (Si-Tahar *et al.*, 2009). Questi ultimi, dopo l'identificazione del microrganismo, inviano segnali che portano all'attivazione di fattori di trascrizione: in particolare viene attivato il *nuclear factor κB* che stimola la produzione di citochine e di varie proteine responsabili dell'attività battericida dei fagociti (Kumar *et al.*, 2005). I macrofagi, le cellule dendritiche e altre cellule presentanti l'antigene, fagocitano e processano gli antigeni presentandoli ai linfociti T: questo rappresenta il punto di connessione tra immunità innata e acquisita (Chou *et al.*, 2008).

Il sistema immunitario acquisito è invece un organismo particolarmente complesso e sofisticato; esso interviene come ultima difesa e permette di fermare ed eliminare il patogeno, ma anche di riconoscerlo nel momento in cui dovesse ripresentarsi, in modo da dare origine ad una risposta ancora più rapida ed efficace. Questo sistema è costituito da linfociti e anticorpi (Tizard, 2000).

2.1.2 IL PROCESSO INFIAMMATOARIO

L'infiammazione è una risposta dell'organismo ai danni legati a insulti chimici, fisici o a microrganismi e loro tossine; essa mira ad inattivare o distruggere il patogeno coinvolto, rimuovere le sostanze irritanti e porre le basi per la riparazione tissutale (Guzik *et al.*, 2003).

Il processo infiammatorio può essere differenziato in acuto o cronico. La forma acuta ha un esordio rapido (secondi o minuti), una durata breve (fino a qualche giorno) ed è contraddistinto dall'essudazione (formazione dell'edema) e dalla migrazione leucocitaria. L'infiammazione cronica ha una maggiore durata ed è associata alla presenza di linfociti e macrofagi, proliferazione dei vasi sanguigni, fibrosi e necrosi tissutale (Kumar *et al.*, 2005).

2.1.2.1 Il processo infiammatorio acuto: modificazioni vascolari

Le prime alterazioni che compaiono, a seguito del danno subito dai tessuti, coinvolgono la componente vascolare: il fenomeno vasodilatativo che prende origine interessa dapprima le arteriole e successivamente si risolve nell'apertura di nuovi letti capillari nella regione, causando un aumento del flusso ematico. La vasodilatazione è rapidamente seguita da un aumento della permeabilità vascolare del microcircolo. Questi due meccanismi, aumentando il flusso ematico e la permeabilità vascolare, danno origine al processo di essudazione (Kumar *et al.*, 2005). Le molecole coinvolte in questo meccanismo comprendono istamina, serotonina, monossido d'azoto (NO), ROS, chinine e prodotti di derivazione dall'acido arachidonico.

L'istamina è prevalentemente presente nei mastociti che, quando esposti al fluido extracellulare a seguito del danno tissutale, degranulano. L'istamina rilasciata è responsabile della dilatazione di capillari e venule, mentre causa la vasocostrizione di vasi specifici (negli erbivori i vasi polmonari, nel cane le vene epatiche). Inoltre questa molecola è in grado di aumentare la permeabilità vascolare (Tizard, 2000) tramite un meccanismo legato alla separazione delle giunzioni intercellulari (Majno and Palade, 1961). Lo stesso effetto viene dato dalla serotonina: alcuni studi hanno dimostrato però un effetto più potente di quest'ultima amina vasoattiva rispetto all'istamina (Majno and Palade, 1961).

L'ossido nitrico svolge un ruolo fondamentale nella modulazione della risposta infiammatoria. Esistono tre tipi di enzimi coinvolti nella sua formazione (*Nitric oxide synthase* o NOS): uno di tipo neuronale (nNOS), una forma inducibile attiva in particolare nei macrofagi a seguito della stimolazione infiammatoria (iNOS) e una forma costitutiva presente a livello endoteliale (eNOS) (Guzik *et al.*, 2003). Nella risposta flogistica risultano di particolare interesse la eNOS, responsabile del mantenimento di un basso tono vascolare e della prevenzione dall'adesione di leucociti e piastrine alla parete vasale (Ignarro, 2002) e la iNOS, che è ampiamente coinvolta nella risposta infiammatoria (Michel and Feron, 1997). Durante il corso del processo infiammatorio l'attività della iNOS fa aumentare notevolmente i livelli di NO oltre quelli presenti fisiologicamente (Xie and Nathan, 1994); l'NO così prodotto è responsabile della distruzione dei microrganismi (Guzik *et al.*, 2003). Quindi, oltre ad essere un potente vasodilatatore, l'ossido nitrico è anche responsabile della riduzione della risposta infiammatoria e dell'attività nei confronti dei microrganismi. Nonostante sia stato recentemente dimostrato che l'NO può inibire l'espressione di numerose citochine in linfociti, eosinofili, monociti e altre cellule (Marcinkiewicz and Chain, 1993; Marcinkiewicz, 1997; Marcinkiewicz *et al.*, 1996; Giustizieri *et al.*, 2002), il ruolo di questa molecola nell'immunoregolazione è ancora poco chiaro e sembra che le sue azioni in questo ambito siano dipendenti dalla sua concentrazione, dall'ambiente cellulare e dalla avvenuta attivazione delle cellule coinvolte (Nathan, 2002).

I ROS sembrano avere un ruolo fondamentale nel meccanismo modulatorio di rilascio di altri mediatori dell'infiammazione (Guzik *et al.*, 2003) (per la produzione di ROS nell'infiammazione si rimanda al cap. 2.2.4). I ROS possono regolare l'espressione di molecole di adesione a livello di cellule endoteliali e infiammatorie, influenzando quindi sul

richiamo di cellule al sito di infiammazione (Niu *et al.*, 1994; Fraticelli *et al.*, 1996). Essi inoltre aumentano l'espressione di citochine e chemochine (Kimura *et al.*, 2003; Brzozowski *et al.*, 2003), stimolano l'attività della MAP-kinasi (che conduce all'attivazione di più fattori di trascrizione) e possono fungere da secondi messaggeri nella trasduzione del segnale infiammatorio (Guzik *et al.*, 2003). A loro volta alcune citochine possono aumentare l'attività della NADPH-ossidasi e quindi la produzione di ROS (Decleva *et al.*, 2002). Lo stato redox della cellula può influire sui meccanismi di trasduzione del segnale e quindi essere coinvolto nell'immunoregolazione. In particolare l'anione superossido può dare effetti diretti tramite la modificazione delle molecole coinvolte nel segnalamento e dei fattori di trascrizione, o indiretti tramite l'interazione con l'ossido nitrico. Questo dà origine ad una perdita di NO biodisponibile e formazione di perossinitrito (Guzik *et al.*, 2003). Inoltre i ROS, alterando le strutture cellulari, inducono un aumento della permeabilità vascolare tramite danno alle cellule endoteliali e inibiscono gli inattivatori delle proteasi (come l' α -antitripsina) con aumento della distruzione della matrice extracellulare e delle lesioni ad altri tipi di cellule (Kumar *et al.*, 2005).

Le chinine sono un gruppo di polipeptidi di cui la più importante è la bradichinina. Queste molecole vengono prodotte a partire da precursori (chininogeni) grazie all'attività di proteasi (callicreine) e sono responsabili dell'aumento della permeabilità vascolare, della stimolazione della contrazione del muscolo liscio, della dilatazione dei vasi sanguigni e della stimolazione dei recettori dolorifici (Tizard, 2000).

I metaboliti dell'acido arachidonico (o eicosanoidi) comprendono prostaglandine, trombossani e leucotrieni/lipossine. La loro biosintesi avviene prevalentemente a livello della membrana plasmatica: a seguito di uno stimolo idoneo (nervoso, endocrino o metabolico) vengono attivate delle fosfolipasi che liberano l'acido grasso precursore, ovvero l'acido arachidonico. Quest'ultimo, una volta rilasciato nel mezzo intracellulare, viene metabolizzato da particolari enzimi attivati: il sistema delle ciclossigenasi (COX) che dà origine alle prostaglandine e ai trombossani, e il sistema delle lipossigenasi (LOX) con produzione di leucotrieni (Aguggini *et al.*, 1998). Sono state identificate due isoforme di COX: la COX1 è considerata normalmente espressa nei tessuti sani e produce le prostaglandine necessarie al mantenimento dell'omeostasi dell'organismo, mentre l'attività della COX2 (che risulta inducibile) aumenta negli stati infiammatori (Corletto, 2004). Tuttavia alcuni studi hanno dimostrato che l'iniziale aumento della produzione di

prostanoidi (prostaglandine e trombossani) a seguito della stimolazione nociva, deriva dall'attività della COX1; solo in un secondo momento è la COX2 a divenire una maggiore fonte di questi composti (Tilley *et al.*, 2001). Gli enzimi che danno origine alle prostacicline (PGI₂) si trovano nelle cellule endoteliali, quelli che originano i trombossani prevalentemente nelle piastrine, mentre le altre prostaglandine possono essere generate in vari tipi di cellule nucleate. L'effetto di questi composti nel processo infiammatorio può essere molto complesso: la PGF_{2α} e i trombossani causano contrazione della muscolatura liscia e quindi vasocostrizione; PGE₁, PGE₂ e prostaciclina causano rilassamento della muscolatura liscia e vasodilatazione; PGI₂, PGE₁ e PGF_{2α} inibiscono l'aggregazione piastrinica; PGE₂ e trombossani promuovono l'aggregazione piastrinica e il rilascio di mediatori come la serotonina, mentre la PGF_{2α} promuove il rilascio di mediatori dei mastociti (Tizard, 2000).

La produzione di leucotrieni avviene prevalentemente in neutrofili, eosinofili, monociti, macrofagi, mastociti, basofili e linfociti B (Reid *et al.*, 1990; Jakobsson *et al.*, 1991). Il leucotriene B₄ (LTB₄) è un potente agente chemiotattico dei neutrofili: esso è in grado di stimolare l'adesione di queste cellule all'epitelio e il rilascio degli enzimi lisosomiali dai neutrofili stessi, oltre che essere un potente mediatore del dolore (Henderson, 1994). I leucotrieni C₄, D₄ ed E₄ invece inducono vasocostrizione, aumento della permeabilità vascolare, aumento delle secrezioni mucose e agiscono come immunomodulatori (Henderson, 1991; Samuelsson *et al.*, 1987).

Le lipossine sono prodotti piastrinici derivanti da intermedi prodotti dai neutrofili: le principali funzioni di queste sembrano essere l'inibizione del reclutamento leucocitario e delle componenti cellulari dell'infiammazione, limitando la chemiotassi dei neutrofili e la loro adesione all'endotelio (Levy and Serhan, 2002). Il loro ruolo sembra quindi essere quello di regolatore negativo endogeno dell'azione dei leucotrieni, meccanismo che risulta fondamentale nella risoluzione dell'infiammazione (Kumar *et al.*, 2005).

Un consistente aumento della permeabilità vascolare può essere legato infine al danno diretto sull'endotelio da parte dell'agente patogeno (Lentsch and Ward, 2000).

2.1.2.2 Il processo infiammatorio acuto: intervento cellulare

I leucociti, per poter raggiungere la sede di infiammazione, devono passare la barriera endoteliale. Questi devono affrontare quindi la fase di marginazione, il rotolamento, l'adesione all'endotelio e infine la diapedesi.

Le molecole che permettono l'adesione leucocitaria vengono distinte in selectine e integrine. Le selectine comprendono tre molecole: E-selectina e P-selectina sono espresse a livello dell'endotelio attivato, mentre la L-selectina è espressa costitutivamente nei leucociti (Mc Ever, 1994; Tedder *et al.*, 1995). Le integrine invece sono eterodimeri che riconoscono la matrice extracellulare, glicoproteine della superficie cellulare e altre molecole (come fibrinogeno e fattore del complemento C3bi). Tutti i leucociti producono la β_2 integrina, mentre eosinofili, monociti e linfociti esprimono sulla loro superficie anche la β_1 , β_7 e α_4 integrina. La più importante famiglia di molecole responsabili dell'adesione endoteliale è data dalle immunoglobuline: in particolare ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule 1*) e VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule 1*) legano le integrine presenti sui leucociti (Springer, 1995; Kumar *et al.*, 2005).

Fisiologicamente la porzione centrale dei vasi sanguigni è occupata dai globuli rossi, che spostano i leucociti nella porzione aderente all'endotelio. Questo processo, amplificato nell'infiammazione a causa del rallentamento del flusso dovuto alla vasodilatazione, oltre che ai fenomeni di emoconcentrazione derivante dall'aumento della permeabilità, prende il nome di *marginazione* (Kumar *et al.*, 2005; Muller, 2002).

I leucociti prendono quindi contatto con l'endotelio tramite le selectine (Carlos and Harlan, 1994; Etzioni *et al.*, 1999; Vestweber and Blanks, 1999): il legame transitorio che si crea in questo modo, associato al rotolamento dei leucociti sull'endotelio, viene detto *rolling* (Kumar *et al.*, 2005). La P-selectina viene esocitata da parte delle cellule endoteliali a seguito della stimolazione con l'istamina, l'L-selectina si trova a livello dei microvilli dei leucociti, mentre le integrine sono collocate nel corpo del leucocita tra i microvilli (Von Adrian *et al.*, 1995). In questo modo le molecole che determinano l'adesione iniziale dei leucociti vengono a contatto per prime con l'endotelio; subito dopo i microvilli si retraggono permettendo il legame tra integrine e recettori endoteliali (Muller, 2002). Per prevenire l'insorgere di fenomeni infiammatori indesiderati, la E-selectina viene espressa solo dopo l'attivazione dell'endotelio da parte delle citochine infiammatorie e la P-selectina, stoccata all'interno della cellula, viene portata alla

superficie cellulare per degranulazione a seguito dell'interazione con l'istamina (Muller, 2002). In condizioni di infiammazione cronica la P-selectina può essere espressa stabilmente sulla superficie cellulare (Pan *et al.*, 1998; Yao *et al.*, 1996). L'L-selectina viene quindi espressa in modo costitutivo, la P selectina interviene nelle forme iniziali e croniche, mentre la E-selectina compare nella fase acuta: in questo modo ci sono molecole per supportare l'attività leucocitaria durante tutto il periodo evolutivo del processo infiammatorio (Muller, 2002).

A seguito del rolling, per evitare che i leucociti ritornino nel torrente circolatorio, risulta necessaria l'attivazione di legami ad alta affinità tra endotelio e leucociti stessi. Queste interazioni derivano da stimoli che originano dalla superficie endoteliale (sottoforma di molecole incorporate nella stessa) (Muller, 1999) o derivanti dal sito di infiammazione come le chemochine. Queste ultime, dopo aver legato i glicosaminoglicani della superficie endoteliale, vengono presentate ai leucociti (Tanaka *et al.*, 1993).

Le chemochine sono piccole molecole (8-14 kDa) che interagiscono con i leucociti (prevalentemente neutrofili, monociti, linfociti ed eosinofili) tramite legami con diversi tipi di recettori (Zlotnik and Yoshie, 2000). Esse vengono divise in 4 famiglie in relazione alla posizione dei legami disolfuro nella catena peptidica e tendono ad essere più efficaci nei confronti di alcune classi di leucociti piuttosto che altre (Muller, 2002). Al pari delle citochine, le chemochine sono proteine prodotte e secrete da leucociti e tessuti in maniera costitutiva o a seguito di induzione, manifestando efficacia a livello locale (con effetto autocrino o paracrino) (Baggiolini, 2001). Le due sottofamiglie principali sono le chemochine CXC (o α chemochine) e le CC (o β chemochine) (Baggiolini, 2001), mentre le altre due componenti sono rappresentate dalle chemochine C (γ chemochine) e le chemochine CX₃C (Kumar *et al.*, 2005). L'interleuchina 8 (IL-8) è un esempio di chemochina CXC prodotta da fibroblasti, macrofagi, linfociti, granulociti, cellule endoteliali, epatociti e cheratinociti: essa possiede attività chemiotattica nei confronti di neutrofili, basofili e alcuni linfociti T. In particolare essa attiva i neutrofili (con stimolazione al rilascio di granuli citoplasmatici), il *respiratory burst* e il rilascio di leucotrieni. In modo simile un'altra chemochina CXC (proteina infiammatoria dei macrofagi 2 o MIP-2) viene secreta dai macrofagi e presenta attività chemiotattica sui neutrofili (Tizard, 2000). Le chemochine CC comprendono la proteina chemiotattica per i monociti (MCP-1), la eotassina, la proteina infiammatoria dei macrofagi 1 α , e la RANTES (*Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted*). Queste

attraggono monociti, eosinofili, basofili e linfociti, ma non sono attive sui neutrofilii. L'eotassina recluta invece selettivamente gli eosinofili (Kumar *et al.*, 2005). Infine la linfoactina (una chemochina C) è chemiotattica per i linfociti, mentre la fractalina (una CX₃C chemochina) stimola l'adesione di linfociti T e mastociti all'endotelio (Tizard, 2000).

Il legame delle chemochine ai glicosaminoglicani delle cellule endoteliali attiva i leucociti, convertendo le integrine di questi in integrine ad alta affinità: queste ultime possono quindi legare i ligandi ICAM-1, ICAM-2 e VCAM-1 a livello endoteliale (Muller, 2002). L'espressione di ICAM e VCAM viene aumentata drasticamente dalle citochine rilasciate durante il processo infiammatorio (Pober and Cotran, 1990). A questo punto i leucociti "scivolano" sulla superficie endoteliale verso le giunzioni intercellulari endoteliali (Muller, 2002). I prodotti rilasciati dai leucociti innescano l'aumento delle concentrazioni di calcio citosolico delle cellule endoteliali (Gautam *et al.*, 2000) che, retraendosi, facilitano il passaggio dei leucociti stessi (Hixenbaugh *et al.*, 1997).

Interazioni omofile tra molecole che prendono il nome di *platelet/endothelial cell adhesion molecule-1* (PECAM-1/CD31) e CD99 (presenti sia sui leucociti che sull'endotelio a livello delle giunzioni cellulari), intervengono nel processo detto di *diapedesi*, che consiste nella migrazione dei leucociti attraverso l'endotelio (Muller, 2002). Una volta avvenuto ciò, i leucociti devono passare attraverso la lamina basale e quindi nella matrice extracellulare per raggiungere la sede interessata dal danno: il modo con cui questo avviene non è ancora completamente chiarito, ma sembra siano coinvolte le PECAM dei leucociti e alcune componenti non note della lamina basale (Liao *et al.*, 1995). Risulta invece che la migrazione nella matrice extracellulare sia dovuta ad un sinergismo nell'azione tra integrine β_1 e integrine β_2 (Werr *et al.*, 1998). Le integrine β_2 legano inoltre il fibrinogeno e alcuni prodotti derivanti dalla scissione proteolitica di questo, noti per essere importanti componenti della matrice extracellulare, in particolar modo nella sede d'infiammazione (Forsyth *et al.*, 2001).

Una volta raggiunta la matrice extracellulare, i leucociti migrano verso la sede da cui è originato lo stimolo infiammatorio secondo un processo definito *chemiotassi*. Nei mammiferi i segnali extracellulari responsabili della migrazione leucocitaria sono dati dalle chemochine stesse. Queste legano i recettori presenti a livello dei leucociti (GPCR) stimolando una complessa cascata di reazioni che comporta la polimerizzazione dell'actina: questo meccanismo dà origine alla formazione di pseudopodi che spingono la

cellula verso la regione a maggiore concentrazione di chemochine (Jin *et al.*, 2008). Oltre alle chemochine, anche fattori esogeni (come i prodotti di origine batterica) piuttosto che endogeni (come il sistema del complemento e i prodotti della via della lipossigenasi) sembrano agire come chemioattrattori legando i GPCR (Kumar *et al.*, 2005). I microbi, i prodotti delle cellule necrotiche, i complessi antigene-anticorpo e le citochine inducono nei leucociti diverse risposte tra cui la produzione dei metaboliti dell'acido arachidonico, la degranulazione e la secrezione di enzimi lisosomiali (con attivazione della cascata ossidativa nel processo della fagocitosi), la modulazione delle molecole di adesione leucocitaria e la secrezione di citochine. Tutto questo prende il nome globale di *attivazione leucocitaria* (Kumar *et al.*, 2005).

Le citochine sono glicoproteine che regolano la risposta immunitaria tramite un meccanismo di segnalamento tra le cellule e comprendono le interleuchine, gli interferoni, il *tumor necrosis factor* (TNF), i *growth factors* (o *colony stimulating factors*) e le chemochine (Tizard, 2000). Le citochine vengono prodotte da cellule circolanti nel torrente sanguigno (come linfociti e monociti), cellule endoteliali e fibroblasti (Nicod, 1993). Le proprietà di queste molecole e le loro interazioni con altre popolazioni cellulari sono particolarmente complesse: saranno quindi accennate in questo lavoro solo quelle delle due più importanti citochine che mediano il processo infiammatorio, ovvero il *tumor necrosis factor* (TNF) e l'interleuchina 1 (IL-1). Queste ultime condividono diverse proprietà biologiche e la loro interazione esita in un effetto più importante di quello che sarebbe ottenuto dalla loro singola attività (Beutler and Cerami 1986; Dinarello 1986). L'IL-1 è un polipeptide prodotto a seguito di infezione o danno cellulare e, nonostante venga prodotta prevalentemente dai macrofagi, essa può derivare anche da cellule epiteliali, linfociti ed endotelio (Dinarello, 1988). Anche il TNF viene principalmente secreto dai macrofagi, ma possono essere coinvolti nella sua produzione anche linfociti B, linfociti T e fibroblasti. Questa molecola è inoltre in grado di aumentare la sintesi di altre citochine da parte dei macrofagi stessi come l'IL-1, l'IL-6 e alcuni *colony stimulating factors* (Tizard, 2000). L'IL-1 è responsabile di fenomeni a carico del sistema nervoso centrale (febbre, aumento nella secrezione di ACTH e neuropeptidi, sonnolenza e calo dell'appetito), metabolici (aumento della sintesi delle proteine di fase acuta, alterazioni elettrolitiche, calo dell'attività del citocromo P450 e alterazioni dei livelli di insulina), ematici (neutrofilia, linfopenia, aumento dell'attività di eliminazione delle cellule tumorali, aumento dei fattori di crescita del midollo osseo) e dell' endotelio (aumento

dell'adesione leucocitaria, della sintesi di PGI₂, PGE₂ e fattore attivante le piastrine e ipotensione) (Dinarello, 1988).

Il fattore attivante le piastrine (PAF) (prodotto da piastrine, basofili, neutrofilo, monociti/macrofagi e cellule endoteliali) stimola l'aggregazione piastrinica, la vasodilatazione, l'aumento della permeabilità delle venule e facilita il legame delle integrine nel processo di adesione dei leucociti all'endotelio, la chemiotassi, la degranolazione e la cascata ossidativa. Esso risulta quindi in grado di evocare la maggior parte delle caratteristiche essenziali dell'infiammazione (Kumar *et al.*, 2005).

Il processo infiammatorio ha come esito la *fagocitosi*, ovvero il processo tramite il quale i neutrofilo e i macrofagi eliminano gli agenti lesivi. Esistono tre stadi in questo meccanismo: il riconoscimento e l'adesione della particella da fagocitare, la sua ingestione e quindi la degradazione del materiale ingerito (Underhill and Ozinsky, 2002). L'adesione dei leucociti sulla superficie batterica non può avvenire in quanto entrambi portano una carica negativa: questa viene neutralizzata tramite il "rivestimento" della superficie cellulare con proteine cariche positivamente, come alcuni componenti del sistema del complemento (per esempio: C3b), che permettono così l'interazione del microrganismo con i neutrofilo carichi negativamente (Tizard, 2000).

Il sistema del complemento è costituito da 20 proteine seriche che cooperano nella via classica e nella via alternativa (Egwan and Befus, 1983). La via classica è attivata da immunocomplessi contenenti IgM e IgG (Loos, 1982) o proteine di fase acuta come la proteina C reattiva (Kaplan and Volanakis, 1974), mentre la via alternativa non richiede la presenza di anticorpi ma è stimolata dalla presenza di batteri, virus, funghi, elminti, protozoi e cellule linfoblastoidi (Santoro, 1982; Hirsch, 1982; Kazatchkine and Nydegger, 1982; Sundsmo, 1982). Entrambe le vie, tramite una cascata di reazioni che coinvolge i vari componenti del complemento, terminano nell'attivazione della proteina C3 nelle forme C3a e C3b, che a loro volta attivano il complesso C5 (Egwan and Befus, 1983). Viene inoltre descritta una terza via *della lectina*, in cui la lectina plasmatica si lega ai carboidrati presenti sui microrganismi e attiva direttamente il C1 (Kumar *et al.*, 2005). Il complesso C5 si scinde quindi in C5a e C5b: questo lega i componenti C6, C7, C8 e C9 dando origine ad un complesso che prende il nome di MAC (*membrane attack complex*) che, inserendosi sulla membrana dei microrganismi, dà lisi osmotica di questi (Tizard, 2000) (Fig. 2.1).

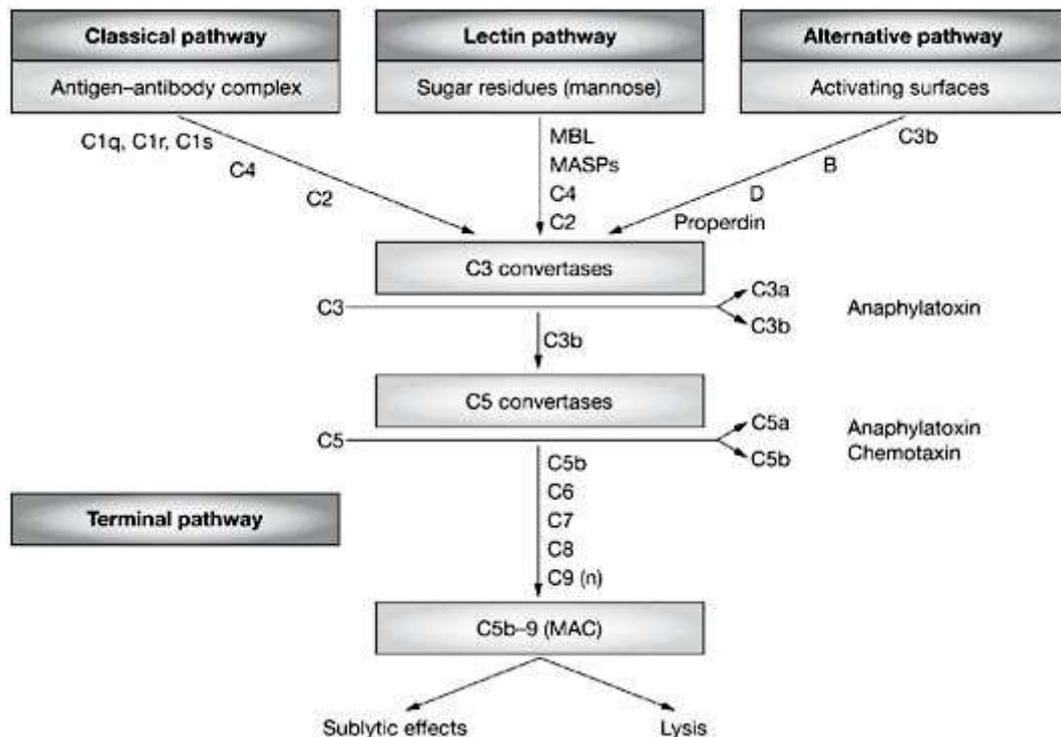


Figura 2.1 Attivazione del sistema del complemento tramite le vie classica, alternativa e della lectina. Si rimanda alla spiegazione nel testo. MAC: membrane attack complex; MASPs: mannose-binding-lectin-associated serine proteases; MBL: mannose-binding lectin. (Cook and Botto, 2006)

I frammenti che derivano dall'attivazione del complemento, oltre a formare la MAC, sono anche responsabili della mediazione dei fenomeni infiammatori quali:

- opsonizzazione: i fagociti possiedono recettori (CR1) nei confronti del C3 che si lega ai microrganismi. Questo permette la fagocitosi dei patogeni.
- chemiotassi: alcuni derivati della cascata del complemento risultano avere attività chemiotattica. C5b67 è chemiotattico per neutrofili ed eosinofili; C5 per neutrofili, eosinofili, macrofagi e basofili. Quest'ultimo peptide è responsabile della stimolazione del *respiratory burst* nei neutrofili e della up-regulation di alcuni recettori per i fattori del complemento in queste cellule.
- infiammazione: C3a e C5a, dette *anafilotossine*, fanno contrarre la muscolatura liscia bronchiale e intestinale, causano la degranolazione dei mastociti e stimolano il rilascio di istamina e serotonina da parte delle piastrine. La loro attività determina aumento della permeabilità vascolare e causa il rilascio degli enzimi lisosomiali da parte dei neutrofili e di trombossani da parte dei macrofagi.
- immuno-regolazione: C3 e i suoi recettori regolano il sistema immunitario. C3d si combina con alcuni antigeni e lega i recettori CR2 dei linfociti B, causando un

aumento della risposta immunitaria. Il calo delle concentrazioni di C3 dà infatti origine al calo della formazione di anticorpi. (Tizard, 2000)

Il riconoscimento e l'adesione dei leucociti sui microrganismi avviene quindi quando questi sono opsonizzati da C3b, ma anche IgG e alcune lectine plasmatiche che vengono riconosciute da specifici recettori (Kumar *et al.*, 2005). Inoltre, sulla superficie leucocitaria, esistono recettori quali i *recettori per il mannosio* e i *recettori scavenger*. I recettori per il mannosio sono presenti prevalentemente sulla superficie macrofagica e sono in grado di riconoscere mannosio, fucosio o residui di N-acetilglucosamina sulla superficie dei microrganismi (Largent *et al.*, 1984), risultando attivi nei confronti di *Candida albicans*, *Pneumocystis carinii*, *Leishmania donovani*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Streptococcus pneumonia* (Chakraborty *et al.*, 2001; Ezekowitz *et al.*, 1991; Marodi *et al.*, 1991; O'Riordan *et al.*, 1995; Schlesinger, 1993; Zamze *et al.*, 2002). I recettori scavenger, invece, sono stati studiati primariamente per la loro capacità di legare e internalizzare le lipoproteine modificate, meccanismo che suggerisce un loro importante ruolo nell'aterosclerosi. Tuttavia alcuni di questi recettori sono in grado di legare un'ampia varietà di patogeni e quindi sono coinvolti anche nelle difese nei confronti dei microrganismi (Gough and Gordon, 2000). Similmente anche le integrine macrofagiche come la Mac-1 possono legare i microbi per la fagocitosi (Kumar *et al.*, 2005).

Una volta avvenuti riconoscimento e adesione, la membrana plasmatica della cellula fagocitaria inizia ampi movimenti avvolgenti sollevandosi in pliche o in pseudopodi che circondano la particella da fagocitare; contemporaneamente l'area tra particella e citoplasma leucocitario si introflette avvolgendo la particella stessa e trasportandola gradualmente all'interno della cellula. Questi processi di internalizzazione coinvolgono vari elementi del citoscheletro e richiedono energia rilasciata dall'idrolisi dell'ATP (Rosati e Colombo, 1997).

L'ultimo passaggio che consente quindi di terminare il processo fagocitotico è l'uccisione e la degradazione del materiale fagocitato. I maggiori responsabili di questo fenomeno sono i ROS prodotti dalla NADPH ossidasi e dalla MPO (per le caratteristiche e i meccanismi d'azione di questi due enzimi si rimanda al capitolo 2.2.4 "stress ossidativo indotto dall'infiammazione"). Le molecole prodotte da questi due enzimi (come perossido di idrogeno e ipoclorito) sono responsabili dell'uccisione dei microbi: in particolar modo il sistema della mieloperossidasi è il meccanismo battericida più efficiente a disposizione

dei neutrofili, anche se le cellule con deficit di MPO sono in grado di uccidere i batteri (anche se più lentamente) grazie alla formazione di superossido, radicali idrossili e ossigeno singoletto (Kumar *et al.*, 2005). Esistono tuttavia anche dei sistemi ossigeno indipendenti di degradazione batterica, come la proteina permeabilizzante battericida (BPI), il lisozima, la lattoferrina, la proteina basica maggiore, le defensine e le serina proteasi.

La BPI, una proteina espressa primariamente nei neutrofili, dimostra grande attività antimicrobica nei confronti dei Gram negativi, oltre che una spiccata attività di neutralizzazione delle tossine (Schultz and Weiss, 2007); tramite attivazione di una fosfolipasi, essa degrada i fosfolipidi causando aumento della permeabilità della membrana esterna dei microrganismi (Kumar *et al.*, 2005).

Il lisozima è una proteina che catalizza l'idrolisi dei legami 1-4 glicosidici tra acido N-acetilmuramico e N-acetilglucosamina dei peptidoglicani di parete cellulare (Proctor and Cunningham, 1988). Quindi, l'attività antimicrobica del lisozima è attribuita primariamente alla lisi enzimatica dei peptidoglicani che compongono la parete cellulare dei microrganismi (Branen and Davidson, 2004).

La lattoferrina è una glicoproteina che deriva per la maggior parte dai neutrofili (Iyer and Lönnardal, 1993). Nonostante la sua presenza venga utilizzata per identificare i granuli specifici in cui è contenuta, è stato dimostrato che questa molecola può anche essere ritrovata in altri granuli, seppur a concentrazioni inferiori (Saito *et al.*, 1993). La lattoferrina ha un ruolo fondamentale sia nel metabolismo del ferro sia nella difesa dell'organismo: essa, oltre ad avere un effetto batteriostatico, può anche esercitare un effetto battericida e limitare la proliferazione di altri microrganismi come funghi e virus (Levay and Viljoen, 1995).

La proteina basica maggiore (MBP) è uno dei principali costituenti dei granuli degli eosinofili e il suo rilascio è coinvolto nell'uccisione dei parassiti mediata da queste cellule (Butterworth *et al.*, 1979; Wassom and Gleich, 1979). Elevati livelli di MBP sono stati riscontrati nel siero di pazienti con eosinofilia (Wassom *et al.*, 1981) e nei siti che presentavano infiammazione con consistente presenza di eosinofili (Filley *et al.*, 1982). Alcuni studi hanno evidenziato che la MBP umana è inoltre in grado di indurre rilascio non citolitico di istamina da parte dei basofili e, nel caso del ratto, anche dei mastociti (O'Donnell *et al.*, 1983).

Le defensine comprendono un gruppo di polipeptidi ricchi in cisteina che presentano attività antimicrobica: questi sono composti da 29-42 aminoacidi e contengono tre legami disolfidici (formati da tre paia di residui di cisteina) (Patterson-Delafiels *et al.*, 1980; Selsted *et al.*, 1983; Lehrer *et al.*, 1993; Garcia-Olmedo *et al.*, 1998). Alcuni studi hanno dimostrato che le defensine hanno potente attività antibatterica, antifungina e antivirale nei confronti di un'ampia varietà di microrganismi (Weinberg *et al.*, 1998; Selsted, 1984; Lehrer *et al.*, 1989). L'attività antibiotica di queste molecole potrebbe coinvolgere sia la membrana cellulare sia alcuni target intracellulari (Xiong *et al.*, 1999). Oltre alla loro attività microbica, le defensine risultano coinvolte nella chemiotassi per monociti, linfociti T e cellule dendritiche (Chertov *et al.*, 1996; Territo *et al.*, 1989; Yang *et al.*, 1999), inibiscono il legame dell'ACTH ai suoi recettori (da cui il nome "corticostatine" dato talvolta alle defensine) (Tominaga *et al.*, 1990), sopprimono l'attivazione della via classica del complemento (van den Berg *et al.*, 1998), inducono il rilascio di istamina da parte dei mastociti (Befus *et al.*, 1999) e promuovono il legame della lipoproteina(a) alla matrice vascolare (Bdeir *et al.*, 1999; Higazi *et al.*, 1997).

Le serina proteasi neutre (come la catepsina G, l'elastasi, l'azurocidina e la proteinasi3) sono invece contenute nei lisosomi dei neutrofili, strutture specializzate che prendono il nome di *granuli azzurrofilici*. Queste molecole sono coinvolte nell'uccisione e digestione dei microrganismi, oltre che nella distruzione delle proteine della matrice extracellulare (Havemann and Janoff, 1978; Elsbach and Weiss, 1988).

Il processo infiammatorio acuto, se in grado di neutralizzare gli stimoli lesivi (in caso di danno lieve e di breve durata, con mantenimento della possibilità rigenerativa delle cellule parenchimali), esita nel ritorno alla normalità nella sede in cui la flogosi era presente; se le lesioni sono di grave entità o il processo ha colpito tessuti che non possono rigenerare, la guarigione avviene per sostituzione con tessuto connettivo (Kumar *et al.*, 2005). L'ultima possibilità è che il processo esiti in un'infiammazione cronica.

2.1.2.3 Il processo infiammatorio cronico

L'infiammazione cronica può originare da un processo acuto o essere tale fin da subito (Dianzani, 1995) e viene definita come “un’infiammazione di durata prolungata in cui procedono contemporaneamente l’infiammazione attiva, la distruzione di tessuto e i tentativi di riparazione” (Kumar *et al.*, 2005).

Nel passaggio tra infiammazione acuta e cronica i granulociti neutrofili diminuiscono e vengono sostituiti da macrofagi, linfociti e plasmacellule. Il passaggio tra accumulo neutrofilico e monocitario potrebbe essere secondario ad un cambiamento nel tipo di chemochine prodotte da cellule stromali, macrofagi o neutrofili (Kaplanski *et al.*, 2003).

Le cellule dell’infiammazione cronica si raggruppano quindi “a manicotto” intorno ai vasi e danno origine a strutture che prendono il nome di *infiltrati o manicotti parvicellulari* (Dianzani, 1995). Questi ultimi contraddistinguono l’infiammazione cronica e sono accompagnati da danno tissutale (dato dall’agente lesivo o dalle cellule infiammatorie stesse), angiogenesi e fibrosi (Kumar *et al.*, 2005).

L’interleuchina 6 (IL-6) svolge un ruolo fondamentale nell’innesco del processo cronico a partire da quello acuto. In particolare, dopo aver legato il suo recettore (*soluble IL-6 receptor α* o sIL-6R α), essa aumenta la secrezione cellulare dell’IL-6 stessa e del *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1), ma non quella dell’IL-8, favorendo così la transizione da richiamo neutrofilico a monocitario (Hurst *et al.*, 2001; Marin *et al.*, 2001). Inoltre i neutrofili apoptotici vengono riconosciuti e fagocitati dai macrofagi grazie ad antigeni di membrana: questo comporta un aumento della secrezione di MCP-1 e una riduzione di quella di IL-8, ovvero eventi che stimolano il richiamo monocitario. Quindi ad una diminuzione dei neutrofili nel sito infiammatorio si accompagna un aumento dei monociti (Ryan and Majno, 1977; Melnicoff *et al.*, 1989; Doherty *et al.*, 1988).

Le molecole che possono risultare chemiotattiche per i monociti sono molto variabili e dipendenti dalla circostanza specifica. Queste comprendono l’MCP-1, C5a, fattore di crescita derivato dalle piastrine, *transforming growth factor α* , frammenti di degradazione del collagene e della fibronectina, oltre che chemochine rilasciate da macrofagi attivati o altre cellule (Kumar *et al.*, 2005).

L’attivazione macrofagica è invece dovuta all’attività dell’IFN- γ e del TNF esogeno o prodotto dai macrofagi stessi a seguito dell’attivazione dei Toll like receptors (TLR) (Mosser, 2003; Nathan, 1991). Una volta migrati nella sede infiammatoria, i macrofagi

attivati sono in grado di eliminare i patogeni grazie alla produzione di specie reattive dell'ossigeno e monossido d'azoto (NO) (Mosser, 2003). Queste sostanze sono contemporaneamente responsabili anche del danno ai tessuti dell'ospite e vengono rilasciate assieme a molecole che determinano l'innescò del processo riparativo, che accompagna il danno tissutale e il processo infiammatorio stesso (Kumar *et al.*, 2005).

Esiste inoltre un'attivazione macrofagica tramite la via alternativa: la stimolazione con IL-4 attiva queste cellule che però non sono in grado di produrre NO, alterando così la loro capacità di distruzione dei microrganismi. Queste cellule sembrano invece essere coinvolte nella riparazione tissutale, nell'angiogenesi e nella deposizione di matrice extracellulare (Mosser, 2003, Stein *et al.*, 1992).

Inoltre i macrofagi cooperano con le plasmacellule tramite il sistema di presentazione dell'antigene e con i linfociti T tramite espressione di molecole di membrana e citochine; a loro volta questi ultimi secernono IFN- γ , che rappresenta uno dei più importanti attivatori dei macrofagi (Kumar *et al.*, 2005).

L'infiammazione cronica può presentare un aspetto *diffuso* (detto anche *interstiziale* e contraddistinto da un numero di macrofagi non abbondante, infiltrazione di linfociti e plasmacellule e proliferazione dei fibroblasti), o uno *granulomatoso* (circoscritto e con reazione cellulare esuberante) (Dianzani, 1995).

Nel processo infiammatorio cronico si possono inoltre formare cellule giganti multinucleate (derivanti dalla fusione di più macrofagi) o cellule epitelioidi (macrofagi attivati simili a cellule epiteliali tipiche del processo granulomatoso) (Delmann and Eurell, 2000; Kumar *et al.*, 2005).

2.1.3 INFIAMMAZIONI PIÙ FREQUENTI NELLA BOVINA DA LATTE

In questo lavoro sono stati presi in considerazione alcuni stati infiammatori tra i più frequenti nella bovina da latte, ovvero mastiti, infiammazioni uterine postparto e patologie podali. Di seguito si descrivono brevemente i meccanismi eziopatogenetici e gli aspetti clinici di queste forme.

2.1.3.1 Le mastiti

Il termine “mastite” viene utilizzato per descrivere un processo infiammatorio della ghiandola mammaria; essa rappresenta la patologia infettiva con i risvolti economici più rilevanti nell’allevamento della bovina da latte (Zhao and Lacasse, 2008).

Dovuta ad agenti patogeni quali streptococchi, stafilococchi, coliformi, arcanobatteri, micoplasmi, leptospire o funghi, può essere trasmessa durante i processi di mungitura (*forme contagiose*, spesso subcliniche, date da stafilococchi e streptococchi, ad eccezione di *S. uberis*) o dovuta all’imbrattamento della mammella nel tempo che intercorre tra le mungiture (*forme ambientali*, spesso clinicamente manifeste) (Edmondson and Bramley, 2004).

La cheratina che si trova a livello del dotto papillare rappresenta una barriera fisica e chimica nei confronti degli agenti patogeni (Capuco *et al.*, 1992); una volta oltrepassato questo primo ostacolo, i microrganismi devono superare i meccanismi di difesa cellulare e umorale della ghiandola stessa per poter dare origine ad un processo infettivo (Sordillo and Streicher, 2002). Se l’infezione persiste il danno cellulare del tessuto mammario peggiora: questo comporta la perdita di integrità della barriera emato-mammaria con conseguente miscelazione del liquido extracellulare col latte (Zhao and Lacasse, 2008).

A seguito dell’invasione da parte dei microrganismi, il tessuto rilascia sostanze chemiotattiche che richiamano leucociti polimorfonucleati: questi hanno il compito di distruggere l’agente patogeno tramite meccanismi ossigeno-dipendenti e ossigeno-indipendenti. L’attivazione del *respiratory burst* e il rilascio di enzimi contenuti nei granuli possono contribuire a peggiorare il danno tissutale e ad alterare la normale funzionalità della ghiandola mammaria (Paape *et al.*, 2002).

Nelle mastiti clinicamente evidenti si notano gonfiore, dolore e aumento di consistenza della mammella, spesso associate a risentimento sistemico con piressia e anoressia fino al decubito nelle forme più gravi. Inoltre le secrezioni latte possono presentare coaguli o addirittura striature di sangue (Edmondson and Bramley, 2004).

Diversamente, nelle forme subcliniche, l’unico indice che può confermare la presenza di un’infiammazione a carico della ghiandola mammaria è il numero di cellule somatiche nel latte: queste comprendono neutrofili, macrofagi e linfociti, e nella maggior parte delle vacche sane questo valore risulta essere inferiore a 50.000 cellule per millilitro di latte (Edmondson and Bramley, 2004).

Nonostante la maggior parte della popolazione leucocitaria normalmente presente nel latte sia rappresentata da linfociti e macrofagi, spetta ai neutrofili il sistema più efficace di difesa della ghiandola mammaria: il numero di questi ultimi tende ad aumentare infatti rapidamente nelle prime fasi di infezione (Hibbit *et al.*, 2004).

2.1.3.2 Le infiammazioni uterine post parto

Tra i processi infiammatori che colpiscono l'utero post parto si ricordano la metrite puerperale (con rilevamento di risentimento sistemico, febbre, utero dilatato e presenza di scolo uterino fetido rosso-bruno entro 21 giorni dal parto), la piometra (se presenti pus all'interno dell'utero contemporaneamente alla presenza di un corpo luteo persistente e cervice chiusa) e le metriti ed endometriti cliniche o subcliniche (Sheldon *et al.*, 2006). Sheldon e colleghi (2006) descrivono la metrite clinica come una forma di dilatazione uterina, non necessariamente accompagnata da risentimento sistemico, con presenza di scolo uterino purulento riscontrabile in vagina entro 21 giorni dal parto: la persistenza di questa situazione oltre le tre settimane post parto o la presenza di materiale mucopurulento (circa 50% di pus e 50% di muco) a 26 giorni dal parto fa definire la patologia come endometrite clinica. La diagnosi di forme subcliniche è invece basata su rilievi citologici.

L'endometrite, ovvero l'infiammazione dell'endometrio che spesso esita in forme di subfertilità o infertilità, deriva da una contaminazione uterina da parte di batteri a seguito di fenomeni predisponenti quali ritenzione degli invogli fetali, distocia, taglio cesareo, parto gemellare, morte fetale, parto indotto o scarsa igiene dell'ambiente in cui avviene il parto (Sheldon *et al.*, 2004). La ritenzione degli invogli fetali tende a dare le forme più gravi di endometrite (Sheldon e Noakes, 1998), mentre la scarsa igiene della zona parto è responsabile di un importante aumento del rischio di insorgenza della patologia (Noakes *et al.*, 1991).

Poiché clinicamente le endometriti si manifestano con scolo vaginale mucopurulento associato a scarsa involuzione uterina (Sheldon *et al.*, 2004), la tecnica più utilizzata per la diagnosi è la valutazione dello scolo vaginale (colore, presenza di pus, quantità, odore e presenza di flocculazioni) e la palpazione dell'utero tramite ispezione rettale (allo scopo

di evidenziare il diametro di cervice e corna uterine e quindi il livello di involuzione uterina) (Sheldon and Noakes, 1998).

L'impatto delle patologie uterine post parto sulla fertilità degli animali è legata all'alterazione del profilo progestinico, che indica ovulazione ritardata, cisti ovariche e prolungamento della fase luteale (Opsomer *et al.*, 2000; Royal *et al.*, 2000b). Questo comporta perdita economica dovuta all'eliminazione degli animali a causa dell'infertilità, al calo della produzione latte e ai costi del trattamento (Sheldon *et al.*, 2009).

2.1.3.3 Le patologie podali

La più rilevante manifestazione clinica comune alle patologie podali è la zoppia, ovvero l'alterazione della locomozione che gli animali sfruttano per alleviare o eliminare il dolore derivante da lesioni o infiammazioni dell'arto colpito (Scott, 1989; Hardie, 2000). Oltre a diminuire il benessere animale, essa ha un impatto economico rilevante sottoforma di costi di trattamento e misure di controllo (Moore *et al.*, 2001), peggioramento delle performance riproduttive (Sprecher *et al.*, 1997), calo della produzione latte (Warnick *et al.*, 2001), aumento del numero di capi eliminati e calo del valore della carcassa dei capi macellati (van Arendonk *et al.*, 1984).

Nella maggior parte dei casi, le patologie responsabili di zoppia colpiscono il piede e possono essere classificate in quattro gruppi: ulcere soleari e lesioni della linea bianca, altre patologie minori dell'unghione, patologie cutanee e patologie della terza falange e dell'osso navicolare (Blowey, 2004).

Le ulcere soleari e i difetti della linea bianca (che comprendono la formazione di ascessi sterili, separazione della linea bianca e infezioni penetranti che sfociano a livello della corona) sono causati da un indebolimento del tessuto corneo, derivante da una patologia del corion (ovvero la componente responsabile della formazione della scatola cornea) che prende il nome di coriosi o podoflemmatite asettica o, meno correttamente, laminite (Blowey, 2004).

Tra i fenomeni responsabili dell'insorgenza della coriosi vengono riportati fattori alimentari (come il rilascio di istamina dalle fonti proteiche della dieta (Nillson, 1963) o assorbimento di endotossine responsabili di forme trombotiche (Andersson and Bergman, 1980)) e fattori manageriali (come il tipo di pavimentazione (Bergsten, 1994), la stazione

prolungata per scarso comfort d'allevamento (Leonard *et al.*, 1994) e il corretto svolgimento del pareggiamento dei piedi (Manson and Leaver, 1988)).

Secondo Ossent (1995) la coriosi evolve in tre stadi: in una prima fase l'alterazione del flusso sanguigno nel corion comporta una scarsa ossigenazione e quindi una scarsa sintesi di cheratina. Nella seconda fase viene modificata la sospensione della terza falange a causa della compromissione della componente lamellare dell'unghione, con conseguente rotazione della falange stessa. Infine la compressione dell'osso sul corion (in particolare al di sotto della tuberosità su cui si inserisce il tendine flessore) determina un'ulteriore necrosi ischemica e alterazione nella produzione di tessuto corneo, che esita quindi nell'ulcera soleare. La teoria più probabile dell'iniziale modificazione vascolare resta quella del "ristagno" di sangue all'interno del piede a causa della vasodilatazione e dell'apertura degli shunt artero-venosi presenti fisiologicamente a questo livello. Una volta che la terza falange è ruotata non è in grado di tornare alla posizione di partenza; oltre a questo il corion va incontro a processi di fibrosi che alterano perennemente la capacità di produrre tessuto corneo di buona qualità, creando così una maggiore predisposizione all'insorgenza di altre coriosi (Blowey, 2004).

Altre cause di zoppia che possono derivare da alterazioni dell'unghione comprendono la penetrazione da parte di corpi estranei, *slurry heel* (in cui il mancato corretto appoggio sui talloni comporta una rotazione della terza falange e quindi compressione del corion), fessure verticali (a causa di danni a carico della benda perioplica) o fessure orizzontali (dovute ad un periodo di mancata produzione dell'unghione in animali che soffrono di patologie debilitanti come mastiti, metriti o qualsiasi forma di tossiemia) (Blowey, 2004).

Un altro tipo di patologia podale è dato dalla necrobacillosi interdigitale, una dermatite necrotizzante acuta o subacuta in cui *Fusobacterium necrophorum* sembra giocare un ruolo centrale; essa origina dalla cute dello spazio interdigitale e crea quadri clinici contraddistinti da piressia, anoressia, calo della produzione latte e presenza di essudato nauseabondo. Questi sintomi spesso peggiorano a causa di infezioni secondarie (Greenough *et al.*, 1981; Alban *et al.*, 1995).

La dermatite digitale, probabilmente dovuta alla presenza contemporanea di più patogeni, si presenta invece sottoforma di alterazioni nella parte caudale del piede, in prossimità dello spazio interdigitale. Inizialmente le lesioni sono di tipo ulcerativo a margini definiti, umide, molto dolenti e talvolta sanguinanti (Shearer, 1996).

Altre forme di patologie cutanee che conducono a zoppia sono la dermatite interdigitale (che sembra essere una combinazione di dermatite digitale cronica e slurry heel); l'iperplasia interdigitale cutanea (che dà zoppia quando la lesione assume dimensioni rilevanti o quando subisce infezioni secondarie); *la mud fever* (con desquamazione cutanea a seguito di esposizione al freddo) (Blowey, 2004).

Le ulcere soleari, i difetti della linea bianca, la necrobacillosi interdigitale o la penetrazione di corpi estranei, soprattutto se trascurate, possono dare origine a patologie secondarie delle strutture più profonde come tendini, articolazioni e componenti ossee sottostanti come l'osso navicolare e la terza falange: quest'ultima nella bovina può essere colpita da una particolare forma osteomielitica detta "necrosi apicale della terza falange" (Blowey, 2004).

2.2 STRESS OSSIDATIVO

2.2.1 L'EQUILIBRIO TRA OSSIDANTI E ANTIOSSIDANTI

Per radicale libero si intende una molecola che presenta a livello dell'orbitale più esterno uno o più elettroni spaiati, divenendo così una specie estremamente reattiva che tende a "strappare" elettroni ad altre molecole per diventare in questo modo più stabile (Reilly *et al.*, 1991). I radicali liberi che si trovano fisiologicamente nell'organismo derivano prevalentemente dalle normali attività aerobie cellulari (in particolare l'attività mitocondriale) e, poiché presentano quindi come molecola centrale l'ossigeno, prendono il nome di specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Lykkesfeldt and Svendsen, 2007). Col termine di *metaboliti reattivi dell'ossigeno* (ROM) si includono invece sia i ROS sia i metaboliti di questi (derivati non radicalici dell'ossigeno come l'acido ipocloroso e il perossido di idrogeno) (Reilly *et al.*, 1991).

I ROS, se presenti fisiologicamente in basse quantità, partecipano a funzioni di fondamentale importanza all'interno dell'organismo come la fosforilazione proteica, la differenziazione cellulare, l'apoptosi, la maturazione oocitaria, la corretta funzionalità del corpo luteo e la difesa nei confronti dei microrganismi (Hoidal, 2001; Georgieva, 2005; Agarwal *et al.*, 2005). Tuttavia, per evitare l'insorgenza di danni derivanti da un eccesso

di ROMs all'interno delle cellule, gli organismi aerobi hanno sviluppato dei particolari sistemi antiossidanti. Questi sono in grado di stabilizzare e rendere innocui i radicali liberi, cedendo loro un elettrone. In questo modo gli stessi antiossidanti divengono radicali ma, essendo molto più stabili, non sono in grado di dare danno cellulare. Una volta ossidato, vari meccanismi riportano l'antiossidante al suo stato ridotto, rendendolo in grado di svolgere nuovamente la sua attività (Lykkesfeldt and Svendsen, 2007).

Gli antiossidanti sono una famiglia molto eterogenea di molecole: alcune di queste agiscono in modo non enzimatico come le vitamine A, C, E, gli urati, la transferrina e anche l'albumina (Reilly, 1991; Agarwal *et al.*, 2005, Noyan *et al.*, 2006). Tuttavia la detossificazione enzimatica esercitata da molecole come la superossido dismutasi (SOD), la glutazione perossidasi, il sistema tireodossina e le aldo-keto reduttasi, sembra essere più efficiente (Halliwell and Gutteridge, 1998).

La superossido-dismutasi (SOD), responsabile della conversione dell'anione superossido in perossido di idrogeno, è presente sottoforma di vari isoenzimi. SOD1 contiene rame e zinco come cofattori e si trova a livello del citosol, SOD2 è invece un'isoforma mitocondriale contenente manganese. SOD3 è molto simile a SOD1, poiché utilizza come cofattori rame e zinco, ma è presente a livello extracellulare (Fujii *et al.*, 2005).

La glutazione perossidasi (GPx), in particolare grazie alla selenocisteina, è in grado di detossificare dai perossidi utilizzando il glutazione (GSH) come donatore di elettroni. Anche in questo caso esistono diverse isoforme: GPx1 ampiamente distribuita nei tessuti, GPx2 espressa a livello intestinale, GPx3 in plasma e fluido epididimale e GPx4 nel testicolo (Fujii *et al.*, 2005).

La catalasi è invece l'enzima responsabile della conversione del perossido di idrogeno in ossigeno e acqua usando come sito attivo il gruppo eme contenente ferro (Berg *et al.*, 2003; Poulos and Kraut, 1980).

Il sistema della tireodossina riduce le molecole ossidate, tornando nella forma funzionante ridotta grazie all'attività dell'enzima tireodossina reduttasi e ad una molecola di NADPH (Fujii *et al.*, 2005).

Parallelamente a questi meccanismi antiossidanti esistono delle difese nei confronti delle molecole danneggiate dai ROMs. Queste comprendono i sistemi di riparazione del DNA che sono in grado di identificare, eliminare e sostituire basi azotate ossidate (Loft *et al.*, 2008), oltre che le proteasi ed altri enzimi in grado di eliminare proteine e lipidi danneggiati dal processo ossidativo (Ames *et al.*, 1993). Esistono quindi due livelli di

difesa: il primo, tramite l'attività degli antiossidanti, evita la persistenza dei ROMs all'interno della cellula; il secondo fa diminuire l'accumulo delle molecole danneggiate dai ROMs, evitando patologie provocate dalla loro presenza quali l'aterosclerosi e l'Alzheimer (Dean *et al.*, 1997).

2.2.2 LO STRESS OSSIDATIVO E I DANNI INDOTTI DA QUESTO

Alcuni processi patologici sono in grado di aumentare la produzione di ROMs, rendendo quindi insufficiente il sistema antiossidante alla loro rimozione e conducendo al fenomeno dello stress ossidativo. Quest'ultimo viene infatti definito come il fenomeno per cui i radicali liberi vengono prodotti più velocemente di quanto le sostanze antiossidanti siano in grado di neutralizzarli (Sies, 1991; Bernabucci *et al.*, 2002; Castillo *et al.*, 2005). L'accumulo dei ROS comporta la comparsa di danni a carico di varie strutture all'interno dell'organismo tra cui il DNA, i lipidi e le proteine (Sugino, 2006).

2.2.2.1 DNA

La maggiore fonte endogena di danno al DNA sembrano essere i ROS (Bohr, 2002; Lindahl, 1993). Le specie reattive dell'ossigeno sono in grado di causare diversi tipi di lesione a livello del DNA come l'ossidazione delle basi azotate, siti abasici, *single-strand break* e *double-strand break* (Krokan *et al.*, 1997). Inoltre sembra che il DNA mitocondriale possa subire danni ossidativi maggiori di quelli cui è sottoposto il DNA nucleare (Wallace *et al.*, 1987; Yakes and Van Houten, 1997).

Queste alterazioni possono quindi condurre a mutazioni o morte cellulare (Imlay and Linn, 1988; Takahashi *et al.*, 2000) e probabilmente sono coinvolte nei meccanismi carcinogenici (Loft *et al.*, 2008).

2.2.2.2 Lipidi

Gli acidi grassi poli-insaturi (PUFAs) sono le molecole più sensibili all'attività dei ROS: queste si trovano a livello delle varie membrane cellulari sottoforma di fosfolipidi. Oltre a garantire la fluidità della membrana, i PUFA sono precursori di molecole prodotte in risposta a stimoli intra ed extra cellulari; il meccanismo coinvolto prevede l'attività di enzimi come le lipossigenasi, che trasformano i PUFA in idroperossidi (Spitteller, 2006). I ROS, invece, sono in grado di reagire in modo non enzimatico con i PUFA rendendoli a loro volta radicali che, reagendo con l'ossigeno, danno origine a radicali perossidi. Questi a loro volta reagiscono con un gruppo CH₂ di un altro PUFA trasformandosi in idroperossidi (LOOHs), ma innescano la formazione di un nuovo radicale, portando quindi ad un processo a catena (Spitteller, 2006). I radicali così formati possono reagire con altri lipidi, proteine o acidi nucleici creando particolari danni alla membrana cellulare che possono condurre dall'aumento della permeabilità fino alla lisi cellulare (Reilly *et al.*, 1991). Tuttavia, questo sembra essere anche un meccanismo difensivo nelle cellule cancerose o precancerose, infettate da virus o comunque danneggiate in modo tale da minare la salute dell'individuo (Das, 1999; Salganik, 2001).

2.2.2.3 Proteine

Anche le proteine rappresentano un target dell'attività ossidante dei ROS. Le alterazioni cui possono andare incontro a seguito della reazione con i radicali dell'ossigeno comprendono l'ossidazione delle catene laterali amminoacidiche, il cross-linking tra proteine, la degradazione dei legami peptidici, la formazione di legami covalenti con prodotti dell'ossidazione lipidica o glucidica e la frammentazione delle proteine stesse (Davies, 1987; Berlett and Stadtman, 1997).

Studi condotti sull'albumina sierica bovina hanno permesso di evidenziare che la specie reattiva dell'ossigeno maggiormente coinvolta nell'ossidazione proteica risulta essere il radicale idrossile, mentre gli amminoacidi maggiormente coinvolti sono triptofano, tirosina, istidina e cisteina (Davies, 1987). L'alterazione della struttura primaria delle proteine si riflette quindi anche sulle altre strutture, causando alterazioni della conformazione proteica e alterando così il normale processo proteolitico innescato dalle

proteasi. In particolare una conformazione proteica lievemente aperta esita in una maggiore attività proteasica (Moller and Kristensen, 2004). Allo stesso modo le proteine lievemente ossidate sono maggiormente sottoposte ad attività proteolitica, al contrario di quelle significativamente alterate che talvolta sono meno suscettibili alle proteasi (Moller and Kristensen, 2004). Questa potrebbe quindi essere la causa dell'accumulo di alcune proteine nei tessuti.

2.2.3 PRODOTTI DELL' OSSIDAZIONE PROTEICA E PRODUZIONE DI AUTOANTICORPI

L'ipotesi che le proteine ossidate possano essere riconosciute dall'organismo come sostanze *non-self*, e quindi in grado di stimolare la produzione di anticorpi, è nata da uno studio condotto sull'ossidazione dell'LDL in relazione all'aterosclerosi (Palinski and Witztum, 2000).

Durante i processi di stress ossidativo, le molecole maggiormente coinvolte risultano essere i fosfolipidi e in particolar modo i PUFA: i prodotti dell'ossidazione di questi ultimi possono essere aldeidi estremamente reattive (come la malondialdeide (MDA) o il 4-idrossinonenale (4-HNE)), o fosfolipidi ossidati. Entrambi questi composti possono legarsi a proteine o lipidi creando quindi un insieme molto eterogeneo di prodotti (Palinski and Witztum, 2000). Considerato che i neoepitopi formati dalla modificazione dell'istidina e della lisina sono particolarmente immunogenici e che l'apoB contenuta nell'LDL è ricca di quest'ultimo amminoacido, è stato dimostrato che anticorpi contro MDA-lisina o 4-HNE-lisina venivano prodotti in topi dopo la somministrazione di omologhi dell'LDL modificato in vitro con MDA o 4-HNE (Palinski *et al.*, 1989).

Va comunque tenuto presente che la misurazione del livello di anticorpi sintetizzati nei confronti dei prodotti dell'ossidazione può essere fuorviante. Infatti, da un aumento delle attività che inducono la formazione di lipoproteine ossidate, ci si potrebbe aspettare un aumento degli anticorpi circolanti: in realtà questo non è sempre vero poiché gli antigeni così formati legano la quota di anticorpi liberi, che quindi risultano paradossalmente ridotti (Palinski *et al.*, 1996; Itabe *et al.*, 1996; Holvoet and Collen, 1997).

Anche gli *advanced glycation-end products* (AGEs), derivanti dall'esposizione di proteine e lipidi alla glicazione\ossidazione (Shi *et al.*, 2008), inducono la formazione di autoanticorpi (Palinski *et al.*, 1995; Reaven *et al.*, 1997).

Ciò significa che l'organismo è in grado di produrre anticorpi nei confronti di lipidi o proteine che hanno subito una modificazione come il danno ossidativo: questo concetto, nell'ambito di questo lavoro, potrebbe rappresentare un fondamentale punto di partenza per ulteriori studi.

Si può quindi concludere che i prodotti derivanti dai processi ossidativi possono:

- accumularsi nei tessuti, essendo meno sensibili a meccanismi di riconoscimento e proteolisi (Moller and Kristensen, 2004). Questo è ciò che accade nel caso dell'invecchiamento (Smith *et al.*, 1992; Ames *et al.*, 1993), aterosclerosi (Matsuura *et al.*, 2008) o morbo di Alzheimer (Smith *et al.*, 1992).
- agire da neoepitopi con conseguente formazione di autoanticorpi che potenziano l'attivazione dei mediatori dell'infiammazione come accade nell'aterosclerosi (Palinski and Witztum, 2000) o nell'endometriosi (Shanti *et al.*, 1999).

2.2.4 STRESS OSSIDATIVO INDOTTO DALL' INFIAMMAZIONE

La comparsa dello stress ossidativo può essere legata a vari fenomeni che comportano l'aumento dei ROS, come le alterazioni della pressione parziale dell'ossigeno a livello tissutale, l'attività di alcuni xenobiotici, la carenza di vitamine A, E e C, l'invecchiamento e le flogosi. In particolare, nei processi flogistici, le cellule in grado di fare fagocitosi (come i neutrofili e i macrofagi) riconoscono la sostanza estranea e la incorporano all'interno di vacuoli formando i *fagosomi*. A seguito della fusione di questi ultimi con i lisosomi prendono origine i *fagolisosomi* (Rosati e Colombo, 1997), mentre il processo di rilascio dei granuli nel fagosoma prende il nome di *degranolazione* (Fantone and Ward, 1982). I granuli lisosomiali contengono enzimi in grado di distruggere un'ampia gamma di sostanze biologiche comprese le membrane cellulari batteriche, il collagene, l'elastina e i mucopolisaccaridi (Fantone and Ward, 1982). I neutrofili e i macrofagi, allo scopo di eliminare la sostanza estranea, attivano quindi dei meccanismi ossigeno-dipendenti dando origine al fenomeno che prende il nome di *respiratory burst*, con un aumento delle

richieste di ossigeno da parte delle cellule coinvolte, glicogenolisi, aumento dell'ossidazione del glucosio attraverso la via dell'esoso monofosfato e produzione di ROS (Kumar *et al.*, 2005). Le specie reattive dell'ossigeno prodotte in misura maggiore sono l'anione superossido (O_2^-) e il perossido di idrogeno, derivanti dall'attività dell'enzima nicotinamide-adenina-dinucleotide-ossidasi (NADPH ossidasi) (Robinson *et al.*, 2004). La NADPH ossidasi è un complesso costituito da due componenti di membrana che formano la componente catalitica del flavocitocromo b_{588} (gp91^{PHOX} e p22^{PHOX}) (Segal and Jones, 1978; Dinauer *et al.*, 1987; Parkos *et al.*, 1988), tre componenti citosoliche (p67^{PHOX}, p47^{PHOX} e p40^{PHOX}) (Wientjes *et al.*, 1993, 1996; Zhan *et al.*, 1996; Lapouge *et al.*, 2000), e una GTP-asi a basso peso molecolare (rac1 o rac2) (Quinn *et al.*, 1993; Abo *et al.*, 1994; Bokoch *et al.*, 1994; Kreck *et al.*, 1996). Vista la capacità della NADPH ossidasi di dare origine a composti tossici, esiste una fine regolazione nell'attivazione dell'enzima. Gli stimoli che sono in grado di attivarla comprendono le particelle che vengono fagocitate, alcune molecole chemiotattiche, alcuni lipidi e gli anticorpi (Robinson, 2008). In questi casi la porzione citoplasmatica si unisce a quella del flavocitocromo b_{588} , mentre la rac2 si dissocia dal suo inibitore e lega il GTP (Bokoch and Diebold, 2002). L'enzima così attivato trasporta elettroni dal NADPH del versante citoplasmatico all'ossigeno contenuto nel liquido extracellulare o all'interno del fagosoma (quando la membrana è invaginata), formando così anione superossido (Klebanoff, 2005).

La reazione catalizzata dalla NADPH ossidasi può essere così riassunta:



A questo punto la reazione di dismutazione di due molecole di anione superossido (in cui una viene ossidata, mentre l'altra viene ridotta) e 2 protoni, dà origine a perossido di idrogeno (H_2O_2) e ossigeno molecolare (O_2). Questa reazione può essere spontanea (soprattutto a pH acido) o mediata dall'enzima superossido dismutasi (SOD), anche se non esistono studi che dimostrino il rilascio della SOD neutrofilica all'interno del fagosoma e si suppone invece che questa possa essere una componente dell'organismo fagocitato (Klebanoff, 2005). Allo stesso tempo, a partire da anione superossido e perossido di idrogeno, possono essere prodotti altri ROS, come il radicale idrossile ($OH\cdot$)

(Beckman *et al.*, 1990; Ramos *et al.*, 1992), ossigeno singoletto ($^1\text{O}_2$) (Corey *et al.*, 1987; Steinbeck *et al.*, 1992) e ozono (O_3) (Wentworth *et al.*, 2002).

Una buona parte del perossido di idrogeno prodotto dai neutrofili viene convertita ad acido ipocloroso, un potente microbicide, ad opera dell'enzima mieloperossidasi (MPO) (Klebanoff, 1970). La MPO, inizialmente chiamata da Agner (1941) verdoperossidasi a causa del suo colore verde, è una glicoproteina costituita da quattro catene polipeptidiche (due pesanti e due leggere) contenente due gruppi eme (Klebanoff, 2005). Essa rappresenta uno dei maggiori costituenti dei granuli azzurrofilari (Lemansky *et al.*, 2003).

L'acido ipocloroso così prodotto può reagire con i composti contenenti azoto a formare derivati come le monocloramine e le dicloramine, che possono essere poi degradate alle corrispondenti aldeidi (Hazen *et al.*, 1998a; Hazen *et al.*, 1998b). La taurina, che è presente ad alte concentrazioni nel citoplasma dei neutrofili (Soupart, 1962; Learn *et al.*, 1990), reagisce con HOCl formando N-cloro taurina, meno tossica dell'acido ipocloroso: questo meccanismo permette ai neutrofili di proteggersi dal rilascio di HOCl nel citoplasma (Schuller-Levis and Park, 2003; Klebanoff, 2005). Anche la tirosina può essere convertita ad opera dell'HOCl in 3-clorotirosina o 3,5-diclorotirosina (Hazen *et al.*, 1996; Domigan *et al.*, 1995). Anche se non è noto se la clorinazione della tirosina possa danneggiare microrganismi o tessuti, essa viene usata come marker dell'attività mieloperossidasi (Winterbourn, 2002). Inoltre MPO e H_2O_2 possono indurre alterazioni della tirosina senza mediazione dell'acido ipocloroso, formando dei radicali che, tramite fenomeni di cross-linking, danno origine a ditirosina (Heinecke *et al.*, 1993a; Savenkova *et al.*, 1994; Jacob *et al.*, 1996; Heinecke *et al.*, 1993b).

Un ultimo composto derivante dall'alterazione della tirosina è la 3-nitrotirosina, la cui presenza è stata dimostrata nelle aree sottoposte a flogosi (Ischiropoulos, 1998), tanto da poter essere usato come marker di infiammazione. I macrofagi attivati sono infatti in grado di stimolare l'azione dell'enzima ossido-nitrico sintetasi inducibile (iNOS) producendo così rilevanti quantità di ossido nitrico ($\text{NO}\cdot$), oltre che produrre superossido grazie all'attività della NADPH-ossidasi (Piroddi *et al.*, 2007). La combinazione di $\text{NO}\cdot$ e anione superossido dà origine a perossinitrito (ONO_2^-) (Saran *et al.*, 1990; Koppenol *et al.*, 1992; Huie and Padmaja, 1993) in grado di ossidare i gruppi sulfidrilici proteici o non (Radi *et al.*, 1991). La reazione tra perossinitrito e anidride carbonica dà quindi origine a molecole che inducono processi di idrossilazione e nitratura delle proteine (Alvarez and Radi, 2003). È stato inoltre dimostrato che la produzione di nitrotirosina può essere legata

ad un meccanismo dipendente dalla MPO, in grado di produrre una potente specie reattiva dell'azoto, ovvero il diossido di azoto (NO₂) (Baldus *et al.*, 2001).

Anche le lipossigenasi (LOX) e le ciclossigenasi (COX) svolgono un ruolo fondamentale nel determinare lo stress ossidativo durante i processi infiammatori. L'acido arachidonico, contenuto nelle membrane cellulari, viene rilasciato grazie all'attività di una fosfolipasi e viene quindi metabolizzato da LOX e COX dando origine a una serie di eicosanoidi tra cui prostaglandine, trombossani e leucotrieni (Samuelsson *et al.*, 1987; Funk, 2001). Durante le reazioni catalizzate dalla LOX possono essere generati alcuni prodotti dell'idroperossidazione dell'acido arachidonico che possono fungere da ROS (Schweiger *et al.*, 2007; Uchida, 2003; Brash, 1999). Inoltre, alcuni prodotti derivanti dall'attività della LOX (come l'acido 12-idrossieicosatetraenoico (12S-HETE), l'acido 15-idrossieicosatetraenoico (15S-HETE) e i leucotrieni) possono indurre l'attività della NADPH-ossidasi con conseguente generazione di ROS (Luchtefeld *et al.*, 2003; de Carvalho *et al.*, 2008). Similmente la COX, trasformando l'acido arachidonico in prostaglandina H₂ (PGH₂), innesca la reazione che dà origine ad una serie di metaboliti (tra cui la prostaglandina F_{2α}) in grado di stimolare l'attività della NADPH-ossidasi (Katsuyama *et al.*, 2002). Alcuni studi (Kim and Dinauer, 2006; Shiose and Sumimoto, 2000) hanno dimostrato che l'acido arachidonico stesso è in grado di indurre l'attivazione della NADPH ossidasi.

Un ultimo enzima coinvolto nel meccanismo di stress ossidativo innescato dal processo infiammatorio sembra essere la xantina ossidasi. Questa è una flavoproteina contenente molibdeno e ferro in grado di ossidare l'ipoxantina a xantina e quindi ad acido urico. L'ossidante che viene utilizzato in entrambe le reazioni è l'ossigeno molecolare, che viene ridotto a perossido di idrogeno (Berg *et al.*, 2003). Anche se il ruolo della xantina ossidasi nelle cellule infiammatorie risulta poco chiaro, uno studio di Hellsten *et al.* (1997) dimostrò l'esistenza di una correlazione tra processo infiammatorio e quantità di enzima presente in fibre muscolari dopo esercizio intenso. Questo aumento risultò essere legato prevalentemente al rilascio dell'enzima da parte delle cellule endoteliali e dei leucociti: i neutrofili attivati in particolar modo sembrano essere in grado di stimolare la conversione della xantina deidrogenasi in xantina ossidasi nelle cellule endoteliali stesse (Wakabayashi *et al.*, 1995).

2.3 MARCATORI OGGETTO DEL PRESENTE STUDIO

2.3.1 APTOGLOBINA (Hp)

L'aptoglobina (Hp) è una proteina di fase acuta positiva che ha come ruolo fondamentale quello della rimozione dell'emoglobina presente nel torrente circolatorio a seguito di fenomeni emolitici o del fisiologico turnover dei globuli rossi (Quaye, 2008). L'innalzamento della concentrazione di questa molecola avviene primariamente grazie al meccanismo di induzione dato dall'IL-6, prodotta grazie alla stimolazione da parte di altre citochine come TNF- α e IL-1 (Oliviero *et al.*, 1987).

La concentrazione dell'aptoglobina tende ad aumentare abbondantemente durante i processi infiammatori, in particolare tra le 24 e le 48 ore che seguono un intervento chirurgico o un'infezione batterica o virale (mastiti, polmoniti, enteriti, peritoniti, endocarditi, ascessi, traumi, endometriti). Il suo innalzamento è però riscontrato anche in situazioni non associate ad infiammazione quali il parto nelle bovine, lo stress da trasporto nei vitelli o la lipidosi epatica, probabilmente a causa dell'induzione degli epatociti alla secrezione dell'aptoglobina a seguito di stimolazione da parte dei glucocorticoidi o dell'estradiolo (Thomas, 2000). In un recente studio di Huzzey e colleghi (2009) si evidenzia infatti che bovine nella fase del parto, in assenza di segni clinici di metrite, presentano un picco nella concentrazione di aptoglobina il terzo giorno dopo il parto. Questo parametro tende poi a diminuire gradualmente fino a raggiungere valori basali stabili intorno al dodicesimo giorno post parto. Nello stesso studio si dimostra inoltre che nelle bovine con forme lievi e gravi di metrite, nello stesso intervallo di tempo, si rilevano valori più elevati di aptoglobina rispetto al gruppo senza segni clinici (Fig. 2.2).

Una delle più importanti proprietà dell'aptoglobina è quella di riduzione dello stress ossidativo. Tseng e colleghi (2004) hanno dimostrato che il suo potere antiossidante supera di gran lunga quello della vitamina C: questa caratteristica contribuisce in maniera rilevante al mantenimento dello stato redox cellulare tramite la mitigazione del *respiratory burst*, con conseguente riduzione del danno ai tessuti circostanti. Inoltre l'aptoglobina limita i danni indotti dalle specie reattive dell'ossigeno grazie al legame con l'emoglobina libera (che rappresenta una potenziale responsabile di danno ossidativo) e

alla riduzione nel rilascio del gruppo eme (Quaye, 2008). È stato infine dimostrato (Salvatore *et al.*, 2007) che questa proteina di fase acuta è coinvolta nel meccanismo di protezione dell'Apo A-1 dal danno mediato dai radicali liberi e nella prevenzione della formazione di addotti tra HDL e altre lipoproteine: la corretta attività dell'Apo A-1, che consiste nel trasportare il colesterolo al fegato per la sua successiva degradazione, garantisce quindi benefici nell'ambito dell'insorgenza delle patologie cardiovascolari.

Oltre alle proprietà antiossidanti, l'aptoglobina possiede importanti proprietà immunomodulatorie: essa promuove l'apoptosi dei neutrofili nella fase di richiamo di monociti e macrofagi alla sede infiammata (Kim *et al.*, 1995), è in grado di sedare il processo infiammatorio tramite l'inibizione dell'attività degli enzimi COX e LOX (meccanismo che limita ulteriormente il danno ai tessuti) (Saeed *et al.*, 2007) ed è coinvolta nelle fasi riparative (Gabay, 2006).

La concentrazione di aptoglobina nei bovini sani risulta spesso non misurabile (Makimura and Suzuki, 1982; Conner *et al.*, 1986; Eckersall and Conner, 1988), mentre durante la reazione di fase acuta essa può aumentare fino a 50-100 volte (Conner *et al.*, 1988; Conner *et al.*, 1989, Godson *et al.*, 1996; Gruys *et al.*, 1993), rendendola così la più importante proteina di fase acuta nella specie bovina (Alsemgeest *et al.*, 1994).

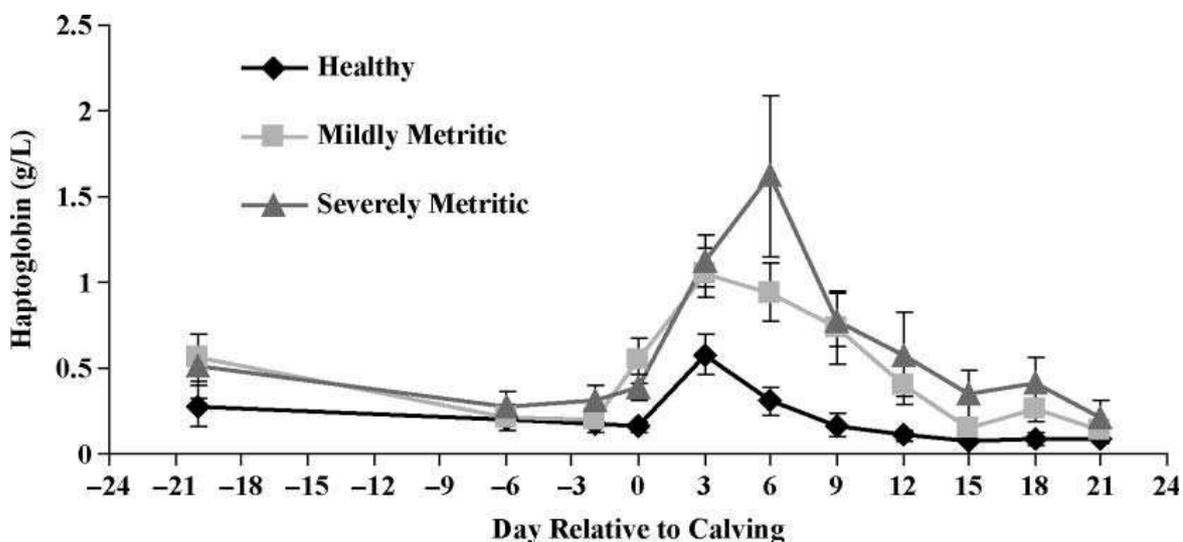


Figura 2.2 Concentrazioni medie di aptoglobina in animali sani (n=23), con lieve metrite (n=32) e grave metrite (n=12) durante il periparto. (Huzzey *et al.*, 2009)

2.3.2 AOPP

Le *advanced oxidation protein products* (AOPP) sono i prodotti della reazione delle proteine plasmatiche con gli ossidanti clorurati prodotti dalla MPO (Fialovà *et al.*, 2006; Noyan *et al.*, 2006). La mieloperossidasi è responsabile della produzione di AOPP in due modi: il primo derivante dall'attività dell' HOCl (Witko-Sarsat *et al.*, 1998), il secondo dalla capacità propria dell'enzima di dare origine a ditirosina (Heinecke *et al.*, 1993a, Heinecke *et al.*, 1993b).

Questi marker sono stati studiati per la prima volta in pazienti con uremia e insufficienza renale cronica sottoposti a dialisi (Witko-Sarsat *et al.*, 1996; Witko-Sarsat *et al.*, 1998): la membrana da dialisi, infatti, attiva i neutrofili e li spinge a produrre grosse quantità di ROS (anione superossido, perossido di idrogeno, radicale idrossile e acido ipocloroso) (Nguyen *et al.*, 1985; Himmelfarb *et al.*, 1991) che, vista l'incapacità del sistema antiossidante plasmatico di rimuoverli efficacemente, inducono lo stress ossidativo (Loughrey *et al.*, 1994; Cèballos-Picot *et al.*, 1996). Witko-Sarsat e colleghi (1996) riscontrarono nel sangue di questi pazienti alti livelli di proteine ossidate, distinguibili dalle forme non ossidate grazie alle loro diverse caratteristiche spettroscopiche (derivanti ad esempio dall'ossidazione dei gruppi aromatici). Le AOPP così rilevate furono distinte in quelle con massa molecolare pari a 600 kDa e quelle da 60 kDa. Le prime vengono definite "ad alto peso molecolare" (HMW) e corrispondono all'albumina, che sembra formare aggregati derivanti da ponti disolfuro e/o *cross-linking* a causa della formazione di ditirosina. Il secondo gruppo "a basso peso molecolare" è invece costituito da albumina monomeric (Witko-Sarsat *et al.*, 1996).

In seguito a queste rilevazioni, è stato ipotizzato un possibile ruolo delle AOPP nella patogenesi di altre malattie. Il loro accumulo è stato quindi identificato in diabete mellito (Kalousova *et al.*, 2002), nefropatia diabetica (Shi *et al.*, 2008), coronaropatie (Kaneda *et al.*, 2002) e obesità (Atabek *et al.*, 2006).

Indagini successive hanno dimostrato che le AOPP sono in grado di innescare il *respiratory burst* in monociti e neutrofili e stimolare l'attività monocitaria, oltre che essere positivamente correlate agli indicatori di infiammazione (Witko-Sarsat *et al.*, 1998). Nello stesso studio fu evidenziato che l'aumento delle AOPP è seguito da un calo del GSH, mentre i valori della malondialdeide (un prodotto della perossidazione lipidica) risultano invariati in casi e controlli: questo avvalorava l'ipotesi che le AOPP siano marker

di stress ossidativo più sensibili rispetto alla MDA classicamente usata (Witko-Sarsat *et al.*, 1996).

La capacità delle AOPP di promuovere il processo infiammatorio è stata dimostrata anche nella nefropatia diabetica (Shi *et al.*, 2008) e sembra sia legata alla similitudine tra AOPP e AGE (*advanced glycation end products*): la capacità di stimolare i macrofagi deriverebbe quindi dalla comune possibilità di legare i RAGE (recettori per gli AGE), scatenando un rilascio di citochine e una risposta proinfiammatoria paradossalmente più importanti di quelle indotte dagli AGE stessi (Kalousova *et al.*, 2005).

I monociti quindi sono al tempo stesso sia bersaglio delle AOPP, sia i promotori della loro formazione tramite la produzione di ROS.

2.3.3 GLUTATIONE (GSH)

Il sistema glutatione-glutatione disulfide (GSH-GSSG) è il più abbondante sistema redox nelle cellule eucariote (Meister and Anderson, 1983). Questo svolge un ruolo fondamentale nell'omeostasi cellulare (Valko *et al.*, 2007; Dröge, 2002) e nella difesa della cellula dallo stress ossidativo (Berg *et al.*, 2003), oltre ad essere coinvolto nei processi di segnalamento associati alla morte cellulare programmata (apoptosi) (Sies, 1999; Filomeni *et al.*, 2002; Circu and Aw, 2008). Inoltre è coinvolto anche nella sintesi dei leucotrieni (Rouzer *et al.*, 1982) e rappresenta una fonte di cisteina per i linfociti, la cui attività è dipendente dalla disponibilità di questo amminoacido (Dröge *et al.*, 1986).

Il GSH viene sintetizzato in due fasi a partire da L-glutamato, L-cisteina e glicina grazie agli enzimi γ -glutamyl-cisteina sintetasi e glutatione-sintetasi (Sies, 1999) (Fig. 2.3).

Il gruppo sulfidrilico libero (contenuto nell'amminoacido cisteina) conferisce capacità riducente alla molecola (Parris, 1997), che quindi si può presentare in una forma ridotta (GSH) o in una forma ossidata (nota come glutatione disulfide o GSSG). Terminata la sua sintesi, il GSH può essere trasportato attraverso la membrana plasmatica. Questo meccanismo è ampiamente utilizzato nel fegato che, oltre che eliminare il GSSG per via biliare, produce grosse quantità di GSH e lo immette nel torrente circolatorio in modo da rifornire gli altri tessuti (Bartoli and Sies, 1978; Kaplowitz *et al.*, 1996).

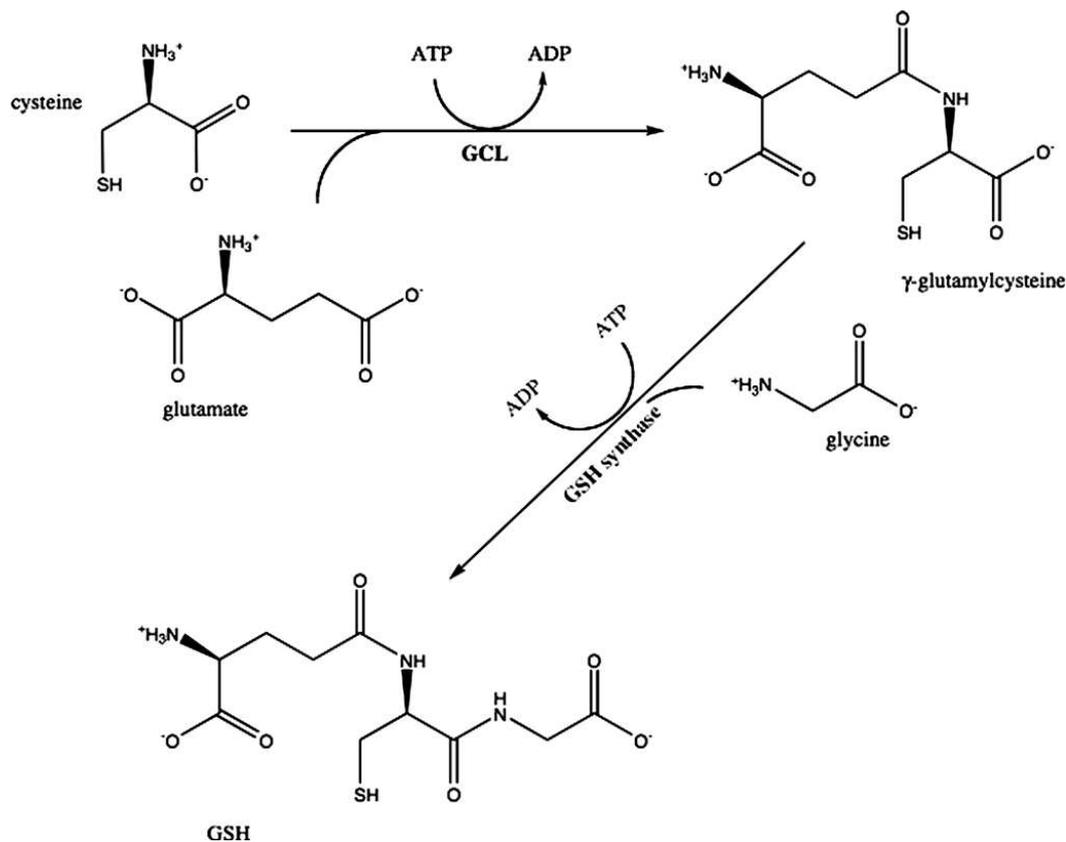


Figura 2.3 Sintesi del glutatione. Formazione sequenziale ATP-dipendente dei legami amidici tra cisteina e gruppo gamma-carbossilico del glutammato e quindi tra glicina e cisteina. GCL: gamma-glutamyl-cisteina sintetasi; GSH: glutatione. (Forman *et al.*, 2009)

Tra le varie funzioni del glutatione, una delle più importanti risulta essere il suo ruolo come cofattore nell'attività degli enzimi antiossidanti come la glutatione perossidasi (GPx). Due molecole di glutatione e una di perossido di idrogeno, grazie all'attività della GPx, danno origine a GSSG e acqua (Berg *et al.*, 2003). La forma ridotta del glutatione viene quindi rigenerata a partire da quella ossidata grazie all'enzima glutatione reduttasi, sfruttando il NADPH come coenzima (Berg *et al.*, 2003). Fisiologicamente l'attività della glutatione reduttasi e la disponibilità di NADPH sono sufficienti a mantenere il valore GSSG:GSH tra 1:100 e 1:1000 (Dalle Donne *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2004). Il ruolo del GSH nello stress ossidativo è amplificato anche dalla sua capacità di riportare alla forma ridotta altri antiossidanti ossidati come la vitamina E (Meister, 1994a; Meister, 1994b, Anderson, 1997, Meister, 1995). Tuttavia, se lo stress ossidativo aumenta o l'attività della glutatione reduttasi diminuisce (ad esempio a causa di un calo della sintesi del NADPH), il GSSG si accumula e il rapporto GSSG:GSH aumenta.

Il GSSG formato può:

- formare ponti disolfuro con proteine cellulari
- essere rilasciato dalla cellula per mantenere costante il rapporto intracellulare GSH:GSSG ed essere quindi metabolizzato a livello extracellulare
- essere ridotto nuovamente a GSH ad opera della glutatione reduttasi

Di conseguenza, la perdita complessiva di GSH viene compensata o dalla riduzione del GSSG o dalla sintesi ex-novo della molecola (Giovannini *et al.*, 2006).

Per glutatione totale (GSx) si intende la somma delle concentrazioni della forma ridotta e il doppio di quella ossidata (poiché la riduzione del GSSG dà origine a due molecole di GSH), ovvero la concentrazione di GSH nel campione a seguito della completa riduzione del GSSG (Schafer and Buettner, 2001).

Durante lo stress ossidativo possono avvenire variazioni dei livelli di glutatione totale come esito della variazione dell'entità della sintesi e della perdita dell'indicatore stesso (Malmezat *et al.*, 2000). I livelli del GSx nei vari tessuti e nel plasma possono cambiare in base all'alimentazione e allo stato clinico del soggetto: animali sottoposti a infezione sperimentale aumentano la sintesi di glutatione in tutti i tessuti (soprattutto il fegato), ma i livelli plasmatici di GSx tendono ad abbassarsi (Malmezat *et al.*, 2000). Rahman e MacNee (2000) riportano inoltre che lo stress ossidativo indotto dai mediatori di infiammazione causa una intensa deplezione del GSH, rendendo così le cellule maggiormente suscettibili all'amplificazione della risposta infiammatoria.

2.3.4 DHEA

Il deidroepiandrosterone (DHEA) è uno dei prodotti della steroidogenesi. Questo androgeno deriva dall'attività del citocromo P450_{scc} che converte il colesterolo in pregnenolone e, successivamente, del P450_{c17} che converte quest'ultimo a 17-idrossipregnenolone e quindi DHEA. Questo sterioide può essere presente anche nella sua forma di solfato (DHEAS): la reazione di solfatazione è mediata dall'enzima idrossisteroide sulfotransferasi (HST), mentre la reazione opposta è dovuta alla steroido-solfatasi (Maninger *et al.*, 2009).

Il DHEA viene trasformato a livello dei tessuti periferici in estrogeni e androgeni, essendone un fondamentale precursore (Labrie *et al.*, 2005). Oltre a questo, nonostante sia

lo steroide maggiormente presente nel torrente circolatorio umano, il suo ruolo nella fisiologia, il suo meccanismo d'azione e il suo possibile coinvolgimento nelle patologie sono ancora poco compresi (Maninger *et al.*, 2009).

Studi condotti sull'uomo hanno dimostrato che i livelli di DHEA plasmatici variano nel corso della vita. La concentrazione dell'ormone (sia DHEA che DHEAS), prodotto dalla zona reticolare del surrene, inizia ad aumentare intorno ai 6-8 anni (Havelock *et al.*, 2004; Parker and Odell, 1980); successivamente anche testicoli/ovaie iniziano a produrre DHEA (Nieschlag *et al.*, 1973). Il picco di secrezione avviene intorno ai 20 anni oltre i quali la concentrazione diminuisce gradualmente fino ad arrivare al minimo valore intorno ai 65-70 anni, età in cui aumenta l'incidenza di patologie legate all'invecchiamento (Azuma *et al.*, 1993; Guazzo *et al.*, 1996; Regelson and Kalimi, 1994).

I dati riguardanti la secrezione del DHEA nella bovina sono invece molto più scarsi: Wise *et al.* (1982) evidenziarono che non esiste una correlazione tra concentrazione di DHEA/altri androgeni e giorno del ciclo ovarico o flusso sanguigno ovarico. Studi più recenti hanno dimostrato la capacità della ghiandola mammaria di convertire il DHEA in androstene-3 β ,17 β -diolo (Belvedere *et al.*, 1996), alterando così i livelli circolanti dell'androgeno. È stato inoltre evidenziato che esiste un incremento della concentrazione di DHEA nella fase terminale della gravidanza, seguito da un brusco calo dopo il parto (Gabai *et al.*, 2004). Almeida *et al.* (2008) dimostrarono che le concentrazioni sieriche del DHEA tendono a diminuire in animali in cui si evidenziano lesioni infiammatorie podali. Questo può essere giustificato dal fatto che, nonostante sia il cortisolo che il DHEA abbiano proprietà antinfiammatorie, il primo è responsabile di un importante fenomeno immunosoppressivo (Cupps and Fauci, 1982), mentre il secondo ha proprietà "immuno-protettive" (Saccò *et al.*, 2002). Il DHEA, infatti, dà origine ad aumento delle resistenze nei confronti di infezioni virali e batteriche (Loria *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1999), inibisce la produzione di IL-6 ed è quindi coinvolto nei disordini immunitari legati all'invecchiamento (Du *et al.*, 2001; Daynes *et al.*, 1993), ristabilisce le normali funzioni immunitarie dopo insulti termici o traumatico-emorragici e riduce la mortalità nei fenomeni settici (Ben-Nathan *et al.*, 1999; Marx *et al.*, 2003). Le concentrazioni di DHEA sembrano diminuire nei processi infettivi gravi (Rook *et al.*, 1997), nei processi infiammatori cronici (Masi *et al.*, 1984; Deighton *et al.*, 1992; Lahita *et al.*, 1987; Straub *et al.*, 1998; Dillon, 2005) e nell'invecchiamento nell'uomo, con conseguente aumento

del rischio di insorgenza di disfunzioni immunitarie e patologie infiammatorie (Bauer, 2005; Buckingham, 1996). Il motivo del calo della concentrazione di DHEA negli animali con patologie podali dello studio di Almeida e colleghi (2008), va quindi ricercato probabilmente nella cronicità dei casi trattati, anche se il reale motivo della diminuzione dei livelli dell'ormone nei processi infiammatori cronici non è ancora compreso. Tuttavia, un calo di questo steroide potrebbe causare un aumento del danno tissutale, visto che il DHEA normalmente inibisce l'espressione di potenti citochine pro-infiammatorie (come il TNF- α e l'IL-6) (Danenberg *et al.*, 1992; Araghi-Niknam *et al.*, 1997; Di Santo *et al.*, 1996; Kimura *et al.*, 1998).

Infine recenti studi hanno dimostrato che l'ACTH non è un fondamentale secretagogo del DHEA e che la ghiandola surrenale contribuisce scarsamente alla quantità di DHEA nel torrente circolatorio; sembra invece che negli animali gravidi la maggiore fonte di DHEA sia la placenta, responsabile dell'aumento della concentrazione dello steroide nella fase terminale della gravidanza e della discesa rapida di questo valore dopo il parto (Marinelli *et al.*, 2007).

Si suppone esista inoltre un'importante correlazione tra DHEA e stato infiammatorio. Il DHEA è in grado di inibire la secrezione di citochine proinfiammatorie come quella del *tumor necrosis factor* (TNF) (Danenberg *et al.*, 1992; Di Santo *et al.*, 1996; Araghi *et al.*, 1997; Kimura *et al.*, 1998; Padgett and Loria 1998). Contemporaneamente questo steroide può favorire l'attività dei linfociti T-helper 1 (Th1) e inibire quella dei T-helper 2 (Th2) (Wilder, 1996). A causa di questo meccanismo il DHEA può svolgere un ruolo anti-infiammatorio nelle infiammazioni guidate dai Th2 e un effetto pro-infiammatorio in quelle guidate dai Th1. Queste proprietà immunomodulatorie hanno suggerito il possibile ruolo del DHEA nelle patologie infiammatorie e giustificano l'effetto positivo dell'ormone nel miglioramento di patologie quali colite ulcerativa (Andus *et al.*, 2000) e lupus eritematoso sistemico (van Vollenhoven *et al.*, 1995; van Vollenhoven *et al.*, 1999), sottoforma di una riduzione della progressione della patologia (Andus *et al.*, 2000; van Vollenhoven *et al.*, 1995), aumento della densità ossea (Labrie *et al.*, 1997; Villareal *et al.*, 2000) e miglioramento del benessere e della salute mentale (Arlt *et al.*, 1999).

Alcuni studi condotti sull'uomo hanno messo in relazione i livelli di cortisolo e DHEA in pazienti sani e con presenza di processi infiammatori acuti o cronici (Straub *et al.*, 2002): nelle infiammazioni acute i livelli di DHEA e cortisolo aumentano, al contrario nelle croniche i livelli di DHEA diminuiscono in maniera netta, mentre il cortisolo non mostra

differenze significative rispetto ai soggetti sani. Probabilmente nelle infiammazioni acute le proprietà antiflogistiche del cortisolo (Kern *et al.*, 1988; Karck *et al.*, 1988) e del DHEA (Danenberg *et al.*, 1992; Di Santo *et al.*, 1996; Araghi-Niknam *et al.*, 1997; Kimura *et al.*, 1998; Padgett and Loria, 1998) risultano fondamentali nello smorzare il processo infiammatorio alla periferia (Munck and Guyre, 1986), riducendo i potenziali effetti deleteri dell'infiammazione stessa. Il motivo delle alterazioni del DHEA nei pazienti con infiammazione cronica invece non ha ancora una spiegazione.

Il DHEA, nonostante stimoli la β -ossidazione dando così origine a ROS (Mohan and Cleary, 1991; Yamada *et al.*, 1992, Hayashi *et al.*, 1994), sembra avere capacità antiossidanti (Schauer *et al.*, 1990). Uno studio condotto su topi ha dimostrato che la somministrazione di DHEA può rendere i tessuti più resistenti alla perossidazione lipidica indotta dall'iperglicemia: tuttavia i livelli tissutali di DHEA raggiunti nell'indagine erano molto più elevati rispetto a quelli che si trovano fisiologicamente nell'uomo, indicando che l'effetto protettivo del DHEA potrebbe essere farmacologico più che normalmente presente nell'organismo in questa specie (Aragno *et al.*, 1997). Tuttavia, nello stesso studio si evidenziava che il DHEA non modifica i livelli citosolici di antiossidanti quali α -tocoferolo o glutatione, né l'attività della glutatione perossidasi, reduttasi o transferasi: questo porta a concludere che sia il DHEA stesso (o i suoi metaboliti) ad avere un effetto antiossidante diretto, nonostante sia ancora poco chiaro il meccanismo di protezione contro la perossidazione lipidica.

2.3.5 INTERLEUCHINA 6 (IL-6)

L'interleuchina 6 svolge un importante ruolo come regolatore della risposta di fase acuta, fattore di stimolazione linfocitaria e mediatore della transizione tra risposta immunitaria innata e acquisita (Kishimoto *et al.*, 1995; Jones and Rose-John, 2002; Kaplanski *et al.*, 2003). La risposta classica all'IL-6 è data da un complesso recettoriale costituito da due subunità legate alla membrana: una catena chiamata IL-6R α e un recettore (gp130) espresso in modo ubiquitario (Murakami *et al.*, 1993). La risposta all'IL-6, normalmente, prende origine dall'interazione di questa molecola col recettore gp130 (Heinrich *et al.*, 2003; Ernst and Jenkins, 2004). Questo avviene classicamente tramite il legame dell'interleuchina con il suo recettore legato alla membrana IL-6R α ; esiste tuttavia

un'analogia forma solubile di quest'ultimo (sIL-6R α) che permette all'IL-6 di usufruire di un meccanismo alternativo di attivazione del gp130 chiamato *trans-signaling*. Quest'ultimo risulta dalla formazione di un complesso sIL-6R/IL-6 che è in grado di legare direttamente il gp130 (Jones and Rose-John, 2002). Questo tipo di interazione permette di attivare cellule che non sarebbero in grado di rispondere direttamente all'IL-6, visto che il gp130 è espresso in maniera ubiquitaria (Jones and Rose-John, 2002).

Il meccanismo del *trans-signaling* è il responsabile della clearance neutrofilica nella sede infiammata e della sostituzione di questa componente cellulare con quella mononucleata (Mc Loughlin *et al.*, 2003; Hurst *et al.*, 2001); questa regolazione del tipo di infiltrato infiammatorio avviene tramite il controllo dell'apoptosi leucocitaria e l'espressione di chemochine infiammatorie e molecole di adesione. Tutto questo è fondamentale nel passaggio tra risposta immunitaria innata e acquisita nella sede infiammata e quindi nella risoluzione del processo flogistico stesso (Mc Loughlin *et al.*, 2003; Romano *et al.*, 1997; Hurst *et al.*, 2001; Modur *et al.*, 1997; Marin *et al.*, 2001; Atreya *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2004).

L'IL-6 è coinvolta nei meccanismi di differenziazione cellulare monocito-macrofagica (Jenkins *et al.*, 2004; Chomarat *et al.*, 2000; Bleier *et al.*, 2004), nella polarizzazione dei linfociti T (Ohshima *et al.*, 1998; Romani *et al.*, 1996; Diehl *et al.*, 2000), nella proliferazione cellulare mediata dall'IL-2 (La Flamme and Pearce, 1999; Baroja *et al.*, 1988), nell'adesione dell'L-selectina (Chen *et al.*, 2004), nell'attivazione dei linfociti B e della produzione anticorpale (La Flamme and Pearce, 1999) e infine nel preservare i linfociti T dal meccanismo apoptotico (Atreya *et al.*, 2000; Teague *et al.*, 2000; Narimatsu *et al.*, 2001; Takeda *et al.*, 1998; Curnow *et al.*, 2004). Quest'ultimo sembra essere un meccanismo di fondamentale importanza nella progressione dell'infiammazione cronica.

2.3.6 TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA (TNF- α)

Il TNF- α (*tumor necrosis factor- α*) è una citochina di fase acuta che interviene in una grande varietà di attività biologiche che includono l'apoptosi, la proliferazione cellulare, l'immunomodulazione, l'infiammazione, la replicazione virale, l'allergia, l'artrite, lo shock settico, la resistenza insulinica, le patologie autoimmuni e altre condizioni

patologiche (Aggarwal, 2000; Dziegielewska *et al.*, 2000). Con particolare riferimento al processo infiammatorio, il TNF- α , similmente all'IL-1, induce l'espressione di molecole di adesione a livello endoteliale; queste molecole interagiscono quindi coi leucociti nel torrente circolatorio e innescano il processo di migrazione (Burger and Dayer, 2002).

Prodotto primariamente da cellule del sistema immunitario, il TNF- α interagisce con due tipi di recettori, ovvero il TNF- α receptor 1 (TNFR1 o p55) e il TNF- α receptor 2 (TNFR2 o p75) (Abe *et al.*, 1994). Il TNF-R1 è espresso costitutivamente nella maggior parte dei tessuti, mentre l'espressione di TNF-R2 è finemente regolata e limitata alle cellule del sistema immunitario (Wajant *et al.*, 2003).

Il TNF- α viene prodotto primariamente da macrofagi, ma anche da cellule linfoide, mastociti, cellule endoteliali, fibroblasti e tessuto nervoso; insieme ad altre citochine assume un ruolo centrale nello shock settico e viene rilasciato in grande quantità in risposta ai lipopolisaccaridi o altri prodotti di origine batterica (Wajant *et al.*, 2003; Mannel and Echtenacher, 2000). Alcuni studi hanno dimostrato che l'insieme delle risposte infiammatorie dell'ospite, tipiche dell'endotossitemia mortale o batteriemia da gram-negativi, può essere riprodotto in animali sani somministrando TNF- α (Tracey *et al.*, 1988; Tracey *et al.*, 1987; Beutler *et al.*, 1986). Tuttavia Echtenacher e colleghi (1990) dimostrarono che il blocco nella secrezione di TNF- α endogeno rende letale un quadro di peritonite di per sé non mortale, mentre altri studi conclusero che il blocco della secrezione della molecola non ha nessun impatto sull'esito della peritonite (Eskandari *et al.*, 1992; Remick *et al.*, 1995; Bagby *et al.*, 1991). Quindi, in talune condizioni, il rilascio di TNF- α endogeno potrebbe risultare essenziale, mentre i tentativi di diminuire le concentrazioni della molecola darebbero esito sfavorevole.

Il TNF- α induce direttamente l'espressione e il rilascio di fattori umorali, inclusi IL-10 (Platzer *et al.*, 1995; Wanidworanun and Strober, 1993), corticosteroidi (van der Poll *et al.*, 1991) e prostanoidi (Dayer *et al.*, 1985), che agiscono con un meccanismo a feedback negativo che sopprime la produzione e la processazione del TNF- α . Questi eventi permettono di garantire un'iniziale risposta innata e pro-infiammatoria data dal TNF- α e al tempo stesso di limitare in seguito la durata e l'intensità del processo flogistico. Inoltre il TNF- α è coinvolto nel meccanismo apoptotico in varie popolazioni cellulari: questo sembra spiegare la distruzione programmata di parte della componente cellulare immunitaria durante il processo infiammatorio (Ayala *et al.*, 1996), come la rimozione di

linfociti T durante i processi settici (Wang *et al.*, 1994) o di neutrofili dai siti infiammati (Liles and Klebanoff, 1995).

Il TNF- α può però anche indurre l'attivazione di citochine pro-infiammatorie che antagonizzano il meccanismo apoptotico, come l'IL-1, l'IL-6 e il *granulocyte-macrophage colony stimulating factor*: recenti studi hanno infatti dimostrato che il TNF- α non solo stimola la morte programmata cellulare, ma allo stesso tempo induce meccanismi che proteggono la cellula stessa dall'evento apoptotico (Beg and Baltimore, 1996).

2.3.7 INTERFERONE ALFA (IFN- α)

Il gruppo degli interferoni (IFN) viene classicamente diviso in due famiglie: gli interferoni di tipo I (che comprendono IFN- α , IFN- β , IFN- ω , IFN- τ , IFN- δ , IFN- κ e IFN- ϵ) e l'interferone di tipo II (che comprende il solo IFN- γ) (Platanias, 2005).

L'IFN- α , la cui secrezione è innescata primariamente dalla stimolazione di recettori citoplasmatici da parte di prodotti di origine virale, è stato inizialmente studiato per le sue spiccate attività antivirali; tuttavia risulta ormai evidente che esso è in grado di intervenire sull'attività del sistema immunitario e in particolare di determinare il passaggio tra immunità innata e acquisita (Biron, 2001).

L'attività dell'IFN- α è dovuta al suo legame con particolari recettori (IFNAR) che a loro volta interagiscono con due molecole denominate *tyrosine kinase 2* (TYK2) e *Janus-activated kinase 1* (JAK1), responsabili dell'attivazione delle cosiddette *signal transducers and activators of transcription* (STAT): le successive interazioni di questo gruppo di molecole esitano nella formazione di un complesso ISGF3 (*IFN-stimulated genes factor 3*) responsabile dell'attivazione dei meccanismi di trascrizione (Taniguchi *et al.*, 2001; Platanias, 2005). In questo modo L'IFN- α potenzia l'attività dell'IL-6 e induce la sintesi di chemochine (in particolare CXCL10), recettori per le chemochine, *transforming growth factor- β* , antagonisti recettoriali dell'IL-1 e recettori per il TNF (Theofilopoulos *et al.*, 2005). Gli interferoni di tipo I inducono la citotossicità delle cellule natural killer, lo sviluppo e la maturazione macrofagica e la produzione di iNOS (Taniguchi *et al.*, 2001).

È stato inoltre suggerito il fondamentale ruolo che gli interferoni di classe I potrebbero avere nel determinare il passaggio tra immunità innata e acquisita: alcune citochine (come IL-2, IL-4, IL-7 e IL-15) sono interessate nella proliferazione dei linfociti T, in modo da ricostituire il pool destinato alla memoria immunitaria, oltre che nell'inibizione dell'apoptosi di queste stesse cellule (Vella *et al.*, 1998). Gli interferoni di tipo I sembrano coinvolti nella proliferazione dei linfociti T CD8⁺ memoria indirettamente, tramite la secrezione indotta di IL-15 (Tough *et al.*, 1999; Tough and Sprent, 1994). In alcuni studi è risultato però evidente che la maggior parte di queste cellule si trovano in uno stato di quiescenza e non di ciclicità (Tough *et al.*, 1999; Tough and Sprent, 1994). Un modo con cui può essere prevenuta l'apoptosi dei linfociti CD4⁺ e CD8⁺, senza innescare un fenomeno di proliferazione cellulare, è quello di metterli in coltura con fibroblasti, cellule stromali o i prodotti derivanti dalle loro secrezioni (Akbar and Salmon, 1997). In questo meccanismo sembrano appunto coinvolti primariamente l'IFN-β (Pilling *et al.*, 1999), ma anche l'IFN-α che previene l'apoptosi direttamente e senza riattivare la ciclicità cellulare (Marrack *et al.*, 1999; Pilling *et al.*, 1999). A causa di questa attività, si suppone che la produzione esuberante di queste citochine possa indurre un'eccessiva sopravvivenza dei linfociti T e quindi innescare il processo dell'infiammazione cronica (Akbar *et al.*, 2000).

3 MATERIALI E METODI

3.1 RACCOLTA DEI CAMPIONI

Il lavoro si è focalizzato sullo studio della variazione delle AOPP, come indicatori di stress ossidativo nei vari stadi produttivi delle bovine da latte, in modo da evidenziare se l'aumento della richiesta energetica possa alterare l'equilibrio tra metaboliti reattivi dell'ossigeno (ROMs) e capacità antiossidante nel sangue. A questo scopo si sono raccolti campioni di sangue da animali sani suddivisi a seconda dello stato fisiologico in 6 gruppi:

1. animali in fase di asciutta con parto previsto dopo un periodo tra 3 e 1 settimana successiva al prelievo (n= 8)
2. animali in fase di lattazione nella prima settimana post-parto (n= 5)
3. animali in fase di lattazione nelle 4-6 settimane post-parto (n= 7)
4. animali in fase di lattazione nelle 16-20 settimane post-parto (n= 8)
5. animali in fase di tarda lattazione a più di 24 settimane post-parto (n=6)
6. manze con età compresa tra 13 e 15 mesi (n= 6)

Allo stesso tempo, per valutare una possibile correlazione tra processi infiammatori acuti e cronici più frequenti nelle bovine da latte e livelli plasmatici di AOPP, il campionamento si è effettuato anche su animali affetti da patologie infiammatorie (in particolar modo patologie infiammatorie uterine post-parto, mastiti e patologie podali) in fase acuta (n=11) e cronica (n=12).

I prelievi sono stati effettuati nei periodi di novembre 2008, marzo-aprile-maggio 2009, giugno-luglio 2010 da allevamenti eterogenei di bovine da latte: 11 allevamenti si trovano nella provincia di Treviso, uno in provincia di Vicenza e uno in provincia di Padova. In particolar modo sono stati presi in considerazione condizioni generali, pulizia, numero di capi e dimensioni d'allevamento, tipo di posta e attenzione del proprietario nei confronti delle problematiche più comuni dell'allevamento della bovina da latte. I capi sani sono stati selezionati da allevamenti che dimostravano buone caratteristiche per i parametri sopracitati. I capi malati sono stati invece individuati sulla base della richiesta di intervento veterinario da parte dell'allevatore a seguito di anamnesi, visita clinica ed eventuali tecniche diagnostiche aggiuntive (conta delle cellule somatiche nel latte da tabulati APA, *California mastitis test*).

Ad ogni bovina è stato effettuato un prelievo di sangue dalla vena giugulare in vacutainer contenenti EDTA e in vacutainer per la raccolta del siero. Questi sono stati conservati fino alla centrifugazione in una borsa termica refrigerata in cui veniva impedito il contatto diretto del vacutainer con la fonte di freddo. Una piccola aliquota di sangue eparinizzato è stata utilizzata per l'allestimento di uno striscio di sangue per il calcolo della formula leucocitaria.

Il sangue raccolto è stato centrifugato a 4500 rpm per 15 minuti, ottenendo così il plasma o il siero che è stato successivamente suddiviso in due aliquote e conservato a -20°C fino al momento delle analisi.

3.2 DOSAGGIO DELL'APTOGLOBINA

I sieri sono stati inviati in ghiaccio secco e processati presso il laboratorio di "Substrati cellulari e immunologia cellulare" dell'IZS della Lombardia e dell'Emilia (sede di Brescia). È stato utilizzato un kit immuno-enzimatico (Tridelta Development Ltd. Ireland), seguendo le istruzioni del produttore.

3.3 TITOLAZIONE DEL LISOZIMA

Il lisozima (β -1,4 glicano idrolasi) è un potente enzima antibatterico a diffusione pressoché ubiquitaria. Esso è in grado di svolgere anche un'azione sinergica con la risposta immunitaria umorale e i fattori del complemento. La sua determinazione permette quindi di conoscere lo stato di funzionalità del sistema monocitario-macrofagico ed è indice della presenza di stati flogistici.

Il principio su cui si basa la titolazione è dato dal contatto del siero con un microrganismo particolarmente sensibile all'attività litica del lisozima e precedentemente incorporato in un gel di agar. La presenza del lisozima viene evidenziata, dopo un opportuno periodo di incubazione, dalla comparsa attorno al pozzetto di deposizione del campione di un alone di lisi di diametro proporzionale alla concentrazione del lisozima stesso.

La titolazione del lisozima è stata effettuata dal siero di sangue prelevato dagli animali considerati nello studio. Essa richiede i seguenti reagenti e terreni:

- Acqua distillata.
- Tampone sodio fosfato monobasico-bibasico 1/15 M p/v, pH 6.3, ottenuto miscelando 7,9 parti di soluzione monobasica con 2,1 parti di soluzione bibasica.
- Lisozima (Sigma L-6876) da conservare a -20°C. La soluzione di Lisozima Standard si ottiene diluendo 32 mg di lisozima in 1 ml di tampone sodio fosfato. Sono distribuiti 15 µl della soluzione in microprovette conservate a -80°C.
- Agarose type II Medium EEO (Sigma A-6877) da conservare a +4°C.

Il sistema di saggio utilizzato è: *Micrococcus Lysodeikticus* (Sigma M-3770) da conservare a -20°C. La sospensione batterica è stata ottenuta diluendo 0,5 g di *Micrococcus Lysodeikticus* in 20 ml di tampone sodio-fosfato. Tale sospensione viene conservata in congelatore a -20°C in microprovette al volume di 150 µl.

I campioni, precedentemente aliquotati in microprovette e conservati a -20°C, sono stati quindi scongelati prima dell'analisi.

Successivamente sono state preparate le piastre sciogliendo 1 g di Agarose in 100 ml di tampone sodio fosfato; dopo aver portato ad ebollizione in bagnomaria per 15' fino ad ottenere una soluzione omogenea (mantenuta alla temperatura di 60°C e in costante agitazione su un agitatore magnetico preriscaldato), sono stati aggiunti 200µl della sospensione d'uso del *Micrococcus Lysodeikticus*.

Su ogni piastra Petri sono stati distribuiti, con una pipetta in vetro graduata, 20 ml della sospensione ottenuta, che è stata quindi lasciata solidificare. Infine, mediante ago in acciaio collegato alla pompa a vuoto, sono stati praticati 25 fori equidistanti tra loro in ogni piastra; in questo modo sono stati creati dei pozzetti, contrassegnati con il numero identificativo del campione sul retro della piastra (2 pozzetti per campione).

La preparazione del lisozima standard è stata ottenuta distribuendo in provette di vetro le seguenti quantità di tampone fosfato: 5 ml nella provetta denominata A, 1 ml in ognuna delle altre 7 provette denominate con lettere dalla B alla H.

Quindi sono stati aggiunti:

- alla provetta A: 10 µl della soluzione standard di lisozima per ottenere la soluzione standard di 64 µg/ml.

- alla provetta B: 1 ml della soluzione contenuta nella provetta A per ottenere la soluzione standard di 32 $\mu\text{g/ml}$.
- alla provetta C: 1 ml della soluzione contenuta nella provetta B per ottenere la soluzione standard di 16 $\mu\text{g/ml}$.
- alla provetta D: 1 ml della soluzione contenuta nella provetta C per ottenere la soluzione standard di 8 $\mu\text{g/ml}$.
- alla provetta E: 1 ml della soluzione contenuta nella provetta D per ottenere la soluzione standard di 4 $\mu\text{g/ml}$.
- alla provetta F: 1 ml della soluzione contenuta nella provetta E per ottenere la soluzione standard di 2 $\mu\text{g/ml}$.
- alla provetta G: 1 ml della soluzione contenuta nella provetta F per ottenere la soluzione standard di 1 $\mu\text{g/ml}$.
- alla provetta H: 1 ml della soluzione contenuta nella provetta G per ottenere la soluzione standard di 0,5 $\mu\text{g/ml}$.

Sono stati distribuiti 10 μl /pozzetto di ogni diluizione della soluzione standard di lisozima nei pozzetti corrispondenti (3 per ogni grado di diluizione). Similmente sono stati depositi i campioni di siero al volume di 10 μl /pozzetto, in due pozzetti per campione.

Le piastre sono state incubate a 37°C in camera umida per 16 h. La lettura è stata eseguita misurando il diametro degli aloni (compreso il diametro del pozzetto) utilizzando un calibro. È stato quindi calcolato per ogni campione e per ogni diluizione standard di lisozima il valore medio dei diametri di inibizione.

La curva dello standard è stata disegnata mettendo in ascissa il valore del logaritmo in base 10 delle diverse concentrazioni della soluzione standard di lisozima, e in ordinata i diametri medi degli aloni di inibizione in mm. I risultati sono stati ottenuti direttamente da questa curva di calibrazione introducendo i valori medi degli aloni di inibizione dei campioni in esame.

3.4 SAGGIO BRADFORD

I campioni, precedentemente diluiti, sono stati sottoposti a saggio Bradford mediante protocollo indicato nel datasheet del reagente utilizzato (Bradford Reagent, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) per determinarne la concentrazione proteica.

Inizialmente è stata allestita la curva di taratura (0,25-2 mg/ml) del saggio diluendo in acqua volumi crescenti di siero albumina bovina (BSA). A 25 µl di standard sono stati addizionati 750 µl di *Bradford Reagent*. Dopo agitazione, gli standard sono stati incubati a 15-30°C per 45 minuti e quindi sottoposti a lettura dell'assorbanza a 595 nm mediante spettrofotometro (V-630, Jasco Europe, Italia).

Successivamente, sono stati processati i campioni per effettuare una lettura in doppio. A 25 µl di ciascun campione opportunamente diluito sono stati addizionati 750 µl di *Bradford Reagent* incubato a 15-30°C per 45 minuti. I campioni così processati sono stati sottoposti a lettura allo spettrofotometro a 595 nm.

Le letture ottenute sono state plottate nella curva di taratura, determinando la diluizione ottimale da effettuare e la concentrazione proteica di ciascun campione al fine di standardizzare il protocollo.

3.5 DOSAGGIO DELLE AOPP

Le AOPP sono state misurate tramite il metodo spettrofotometrico di Witko-Sarsat con alcune modifiche (Witko-Sarsat *et al.*, 1998; Witko-Sarsat *et al.*, 1996) su lettore di micropiastre (Packard Instrument, Meriden, CT, USA), utilizzando la curva di calibrazione con chloramina-T (N-cloro-p-toluensulfonamide sale di sodio, che in presenza di ioduro di potassio assorbe a 340 nm). La chloramina-T 10 mM, diluita in PBS (20 mM, pH 7.4), è stata utilizzata per allestire la curva di taratura con un intervallo di diluizione da 0 a 100 µmol/litro (Fluka, St. Louis, MO). Su una piastra da 96 pozzetti (Perkin-Elmer Life and Analytical Sciences, Shelton, CT, USA) sono stati caricati 200 µl di plasma diluito 5 volte in PBS e 20 µl di acido acetico; 10 µl di potassio ioduro 1,16 M (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO) si aggiungono ai 200 µl di chloramina-T standard. Dopo agitazione, l'assorbanza della reazione è stata letta allo spettrofotometro a 340 nm contro il bianco contenente solo PBS, potassio ioduro e acido acetico.

La chloramina-T standard assorbe a 340 nm in modo lineare, con un range da 0-100 $\mu\text{mol/litro}$ e una sensibilità di 3,125 μM . La concentrazione delle AOPP è espressa come micromoli per litro di chloramina-T equivalenti.

3.6 DOSAGGIO DEI T-BARS

Le aldeidi prodotte dalla lipoperossidazione lipidica sono molecole chimicamente reattive e in grado di reagire formando legami covalenti con le proteine e gli acidi nucleici, perciò contribuiscono ad aumentare il danno radicalico; la loro misurazione può essere considerata un buon indice di lipoperossidazione lipidica. Il metodo più frequentemente utilizzato è il saggio con l'acido tiobarbiturico (TBA) (Yoshida *et al.*, 2005). In condizioni acide e ad elevata temperatura la MDA reagisce con il TBA in rapporto di 1 a 2. La concentrazione dell'addotto che si forma è determinata con una lettura spettrofotometrica a 532 nm.

La reazione è stata innescata mescolando:

- 0,2 ml di Sodio Dodecil Solfato (SDS) 8,1%
- 1,5 ml di Acido Acetico 20% pH 3.5
- 1,5 ml di Acido Tiobarbiturico 1%
- 0,550 ml d'acqua
- 0,05 ml di Butil idrossitoluene 0,8% in etanolo
- 0,250 ml di plasma di bovino

I campioni così ottenuti sono stati brevemente agitati ed incubati a 100°C per un'ora. Al termine dell'incubazione, i campioni sono stati raffreddati in ghiaccio ed agitati con l'aggiunta di 1 ml d'acqua e 5 ml di alcool n-butilico e piridina, in rapporto 15/1. Infine, i campioni sono stati centrifugati a 1400 g a 0°C per 10 minuti, fino ad ottenere una soluzione limpida. Il surnatante è stato prelevato e sottoposto a lettura dell'assorbanza a 535 nm mediante spettrofotometro (V-630, Jasco Europe, Italia).

Il tetrametossipropano è stato utilizzato come standard (0-5 micromoli in 10 ml) per stimare la formazione di TBARS come nanomoli equivalenti di MDA per ml di plasma bovino.

3.7 DETERMINAZIONE DEL GSH TOTALE

La concentrazione del glutatione totale (GSH) a livello plasmatico è stata determinata seguendo il metodo descritto da Tietze (1969), con alcune modifiche per adattarlo alle micropiastre (Baker *et al.*, 1990).

Il GSH presente nel plasma e nello standard è stato ossidato a GS-SG dall'aggiunta di acido ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB). I campioni e lo standard sono stati incubati a 37°C per 10 minuti fintanto che la reazione ha raggiunto l'equilibrio. A questo punto si è fatta una prima lettura che è stata utilizzata come bianco. L'aggiunta dell'enzima glutatione reduttasi trasforma il GS-SG in 2 GSH, con la formazione di NADP⁺ che ha proprietà cromogeniche. La lettura della piastra è stata protratta per 10 minuti fintanto che il segnale diveniva costante. Il bianco è stato sottratto dall'ultima lettura e la densità ottica ottenuta è stata utilizzata per calcolare il GSH totale plasmatico, usando la curva standard. Le soluzioni (Sigma-Aldrich Co., St, Louis, MO) preparate per il saggio enzimatico sono:

- Tampone fosfato con EDTA (F-E): NaH₂PO₄ 0,1M + EDTA 0,6mM (pH 7.4)
- Standard GSH solution: 325,42 µM
- GSH reduttasi (1,7 U/ml TF-E pH 7.4)
- NADPH 10mM (8,3 mg/ml H₂O)
- TRIS buffer 0,1M
- DTNB 10mM (3,96 mg/ml in TRIS buffer; pH 7.4 – 8)
- Soluzione di Reazione: 12ml TF-E + 180ml DTNB + 300 ml NADPH

La curva standard è stata ottenuta diluendo GSH con TF-E a partire da 21,69 fino a 0,339 µmol/L.

Duecento µl di soluzione di reazione e 30 µl di soluzione standard o di campione (diluito 1:60) sono stati caricati su piastre a 96 pozzetti (PS microtiter plate con 96 pozzetti a fondo piatto; Perkin-Elmer Life and Analytical Sciences, Shelton, CT, USA) in duplicato. Dopo 10 minuti di incubazione il valore di assorbanza è stato misurato spettrofotometricamente a 410 nm. Venticinque µL di soluzione con l'enzima reduttasi sono stati aggiunti ad ogni pozzetto. La lettura è stata raccolta ogni minuto per dieci minuti consecutivi. La concentrazione di GSH è stata calcolata come descritto precedentemente.

Il valore ottenuto è stato poi moltiplicato per il fattore di diluizione (= 0,033 µM, considerato che sono stati usati 30 µl di plasma per pozzetto).

3.8 ANALISI RADIOIMMUNOLOGICA (RIA)

Il dosaggio del DHEA e del cortisolo plasmatico è stato effettuato mediante analisi radioimmunologica (*Radioimmunoassay* - RIA), un sistema analitico ad elevata specificità e sensibilità. La specificità è raggiunta mediante l'utilizzo di un reattivo, l'anticorpo specifico, capace di riconoscere e legare selettivamente la sostanza da dosare. La sensibilità è garantita dall'affinità dell'anticorpo per l'antigene.

Il principio generale, su cui si basa il dosaggio radioimmunologico, corrisponde alla competizione tra un antigene libero marcato con un tracciante radioattivo e l'analita che si vuole quantificare per un anticorpo specifico comune. La competizione fra antigene marcato e analita si determina perché l'anticorpo è presente in difetto: ciò significa che maggiore è la concentrazione dell'analita presente, minore sarà la quantità del tracciante radioattivo che si lega all'anticorpo.

3.8.1 RIA SU MICROPIASTRA

Il RIA su micropiastra è una variante solida del tradizionale RIA e prevede l'utilizzo di micropiastre in poliestere da 96 pozzetti (Packard, optiplat 96 well PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Shelton, CT, USA). Inizialmente un anticorpo anti- γ globuline di coniglio prodotto nella capra è stato utilizzato come anticorpo secondario, diluito 1:1000 con tampone sodio acetato 0,15mM pH 9.0. L'antisiero è stato distribuito nei 96 pozzetti della micropiastra (200 μ l/pozzetto). Dopo un'incubazione a 4°C overnight la piastra è stata svuotata e sono stati aggiunti, ad ogni pozzetto, 200 μ l di tampone RIA ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 61mM, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 40 mM, NaCl 154 mM, pH 7.2) contenente albumina bovina serica (BSA) allo 0,1%. In seguito ad un'ulteriore incubazione di 1 ora a 4°C, la piastra è stata nuovamente svuotata e conservata a -20°C (non più di 4 settimane) fino al momento dell'utilizzo.

Ogni piastra è stata quindi caricata con 200 μ l dell'anticorpo specifico opportunamente diluito.

Le caratteristiche di specificità dell'anticorpo sono riportate nella tabella 3.1.

anticorpo	Specificità	
Anti deidroepiandrosterone-17-CMO (centro medico diagnostico Emilia s.r.l., Bologna, Italy) diluizione 1:32.000	deidroepiandrosterone	100%
	5-androsten -3 β , 17 β -diol	9,2%
	epiandrosterone	2,8%
	5 α -androstan-3 α ,17 β -diol	0,6%
	testosterone	0,1%
	androstenedione	0,1%
	deidroepiandrosterone solfato	0,04%
	cortisolo	< 0,001%
Anti cortisol-3-CMO (centro medico diagnostico Emilia s.r.l., Bologna, Italy) diluizione 1:20.000	cortisolo	100%
	Prednisolone	44,3%
	11-deoxycortisol	13,9%
	Cortisone	4,9%
	Corticosterone	3,5%
	Prednisone	2,7%
	17-hydroxyprogesterone	1%
	11-deoxycorticosterone	0,3%
	Progesterone	<0,01%
	17-hydroxypregnenolone	<0,01%
	deidroepiandrosterone solfato	<0,01%
	Androsterone solfato	<0,01%
Pregnenolone	<0,01%	

Tabella 3.1 Specificità degli anticorpi anti DHEA e cortisolo.

In ogni pozzetto, tranne che in quelli destinati alla determinazione di alcuni parametri di controllo (quali Attività Totale (AT) e Non Specific Bound (NSB)), sono stati dispensati 200 μ l di antisiero e la piastra è stata lasciata incubare a 4°C overnight.

3.8.2 ALLESTIMENTO DELLA CURVA DI TARATURA E DEI CONTROLLI

La curva di taratura si ottiene dosando quantità note di ormone non marcato a concentrazioni crescenti. I punti della curva sono stati preparati partendo da una soluzione standard di steroide diluito in etanolo alla concentrazione di 100 ng/ml, ulteriormente diluita in modo seriale con tampone RIA come indicato in Tab. 3.2.

Ormone	Range di concentrazione
DHEA	200-1,5 pg/50 µl
CORTISOLO	200-3 pg/50 µl

Tabella 3.2 Range di concentrazione delle curve di taratura.

Per stimare l'affidabilità e l'accuratezza del dosaggio, in ciascuna piastra sono stati allestiti alcuni pozzetti di controllo. In questi pozzetti sono stati valutati parametri quali: l'Attività Totale (AT), il legame non specifico con l'anticorpo (NSB), il controllo del coating (CO) ed il dosaggio di una quantità nota di analita (Ctrl).

- AT: è stato caricato solamente il tracciante radioattivo e non sono stati effettuati risciacqui per stimarne la radioattività totale.

- NBS: non è stato caricato l'anticorpo specifico, ma solo il tampone RIA ed il tracciante radioattivo per stimare la componente di legame aspecifico.

- CO: sono stati caricati l'anticorpo primario, il secondario, il tampone RIA ed il tracciante radioattivo. Essendo l'unico antigene presente, l'antigene marcato occuperà tutti i siti di legame dell'anticorpo esprimendo la radioattività massima misurabile dal sistema.

- Ctrl: sono stati caricati l'anticorpo primario, il secondario, il tampone RIA ed il tracciante. E' presente un estratto di plasma bovino con concentrazione nota dell'analita per verificare l'affidabilità dell'elaborazione.

Dopo l'incubazione con l'anticorpo specifico, ciascun pozzetto della piastra (tranne AT e NSB) è stato lavato con 200 µl di tampone RIA. Successivamente la piastra è stata svuotata, asciugata e quindi caricata (come da tabella 3.3) in doppio con 20 µl di plasma diluito con tampone RIA, in modo da raggiungere un volume complessivo di 200 µl/pozzetto.

	AT	NSB	Co	Curva	Campioni DHEA	Campioni C
Buffer RIA	-	200 µl	200 µl	150 µl	180 µl	190 µl
Standard	-	-	-	50 µl	-	-
Campione	-	-	-	-	20 µl	10 µl
Tracciante*	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl

Tabella 3.3 Schema di carico piastra. L'asterisco indica la radioattività del tracciante.

In tutti i pozzetti sono stati infine aggiunti 10 µl di tracciante radioattivo ([1,2,6,7-³H]deidroepiandrosterone o [1,2,6,7-³H]cortisolo (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Shelton, CT, USA)), diluito precedentemente con etanolo assoluto (*stock solution*) e ulteriormente diluito con tampone RIA (*working solution*) per ottenere una soluzione da 5000 cpm/10 µl.

La piastra è stata fatta agitare su agitatore orizzontale a bassa velocità per 3 minuti, coperta con pellicola e lasciata incubare overnight a 4°C al fine di indurre la reazione immunologica.

A seguito dell'incubazione, la piastra è stata lavata, tranne i pozzetti di controllo (AT e NSB), per 4 volte con tampone RIA (200 µl/pozzetto) per separare l'antigene marcato libero dall'antigene marcato legato all'anticorpo.

Infine ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 200 µl di liquido scintillante (Microscint, PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Shelton, CT, USA) per il conteggio della frazione di radioattività legata. La piastra è stata sigillata con pellicola termosaldabile (TOPSEAL S, PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Shelton, CT, USA) e messa ad agitare per 3 minuti a bassa velocità.

La frazione di radioattività legata è stata determinata mediante lettura al β-counter (Top-Count, PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Shelton, CT, USA) che, con apposito programma (Riasmart, PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Shelton, CT, USA), elabora una curva di taratura e fornisce direttamente le concentrazioni ormonali dei campioni (pg/pozzetto).

3.9 DOSAGGIO DELL'INTERLEUCHINA 6

I sieri sono stati inviati in ghiaccio secco e processati presso il laboratorio di “Substrati cellulari e immunologia cellulare” dell'IZS della Lombardia e dell'Emilia (sede di Brescia). È stato utilizzato un saggio biologico di proliferazione di cellule 7TD1 (Grenett *et al.*, 1991).

3.10 DOSAGGIO DEL TNF- α

I sieri sono stati inviati in ghiaccio secco e processati presso il laboratorio di “Substrati cellulari e immunologia cellulare” dell’IZS della Lombardia e dell’Emilia (sede di Brescia). È stato utilizzato un saggio biologico di citotossicità su cellule WEHI164 (Asai *et al.*, 1993).

3.11 DOSAGGIO DELL’ IFN- α

I sieri sono stati inviati in ghiaccio secco e processati presso il laboratorio di “Substrati cellulari e immunologia cellulare” dell’IZS della Lombardia e dell’Emilia (sede di Brescia). È stato utilizzato un saggio biologico su cellule di rene bovino in linea continua (Meager, 1987).

3.12 COLORAZIONE CON DIFF QUICK PER LA VALUTAZIONE DELLO STRISICIO EMATICO

Il campione di sangue è stato strisciato su un vetrino, lasciato asciugare all'aria a temperatura ambiente e colorato mediante Diff-Quick, metodo di colorazione rapido e poco costoso per ematologia, citologia e batteriologia.

Le soluzioni utilizzate sono:

Soluzione fissativa

1. Fast green 2.5 μ M
2. Metanolo 1 L

Soluzione di colorazione acida (Soluzione I)

1. Eosina G 1,76 mM
2. Tampone fosfato 0,1 M pH 6.6 1 L

Preparare la soluzione e filtrare con carta da filtro.

Soluzione di colorazione basica (Soluzione II)

1. Azzurro II (Blu di metilene) 2,94 mM

2. Tampone fosfato 0,1 M pH 6.6 1 L

Preparare la soluzione e filtrare con carta da filtro.

La procedura prevede che i vetrini siano dapprima immersi per 10 volte in una soluzione di fissaggio (Fast green-metanolo (Fluka, Saint Louis, MO, USA)) e quindi asciugati all'aria. Essi vengono successivamente immersi per 10 volte in una soluzione di colorazione acida di Eosina G (Carlo Erba Spa, Milano, Italia) in tampone fosfato 0,1 M pH 6.6, sciacquati delicatamente con acqua distillata, immersi 10 volte in una seconda soluzione di colorazione basica Azzurro II (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) in tampone fosfato 0,1 M pH 6.6 e nuovamente sciacquati con acqua distillata. Dopo asciugatura all'aria, i preparati vengono chiarificati in xilolo e coperti con un vetrino coprioggetto montato con un montante non acquoso (balsamo) per conservarli più a lungo.

I vetrini così ottenuti sono stati osservati al microscopio ottico (OLYMPUS, Vanox photomicroscope, Japan) in luce diretta ad un ingrandimento 40x (Fig. 3.1).

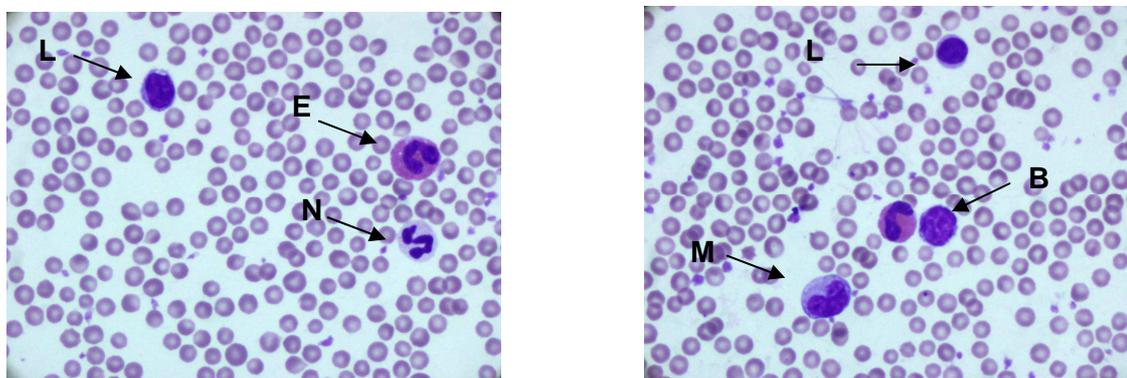


Figura 3.1 Striscio di sangue bovino con le varie popolazioni cellulari (colorazione eosina-azzurro II). Ingrandimento 40x. L: Linfocita; E: Granulocita eosinofilo; N: Granulocita neutrofilo; M: Monocita; B: Granulocita basofilo.

I neutrofili (N) presentano un nucleo allungato e polilobato con segmentazione variabile a seconda del grado di maturazione e una colorazione viola scuro. Il citoplasma risulta invece leggermente roseo. Nei ruminanti corrispondono alla seconda specie più numerosa della linea bianca presente.

Gli eosinofili (E) presentano un nucleo polilobato e sono in numero inferiore ai neutrofil; essi risultano facilmente identificabili per la presenza di numerosi e piccoli granuli acidofili rosa-arancio.

I basofili (B), rari nel sangue, presentano dei granuli rosso-porpora che riempiono tutto il citoplasma.

I linfociti (L) si distinguono per il loro nucleo rotondo di cromatina addensata con citoplasma moderatamente basofilo (leggermente azzurro). Sono la forma predominante espressa nei ruminanti.

I monociti (M) si presentano più grandi dei linfociti con nucleo di aspetto variabile (ovale, reniforme, spesso ameboide) con cromatina reticolare. Il citoplasma è abbondante, azzurro vacuolizzato e con leggere granulazioni rosate.

3.13 SAGGIO IMMUNO ENZIMATICO DEL TITOLO ANTICORPALE (EIA)

3.13.1 PREPARAZIONE DELLA AOPP-BSA

L'ossidazione della BSA è stata eseguita secondo il protocollo di Witko-Sarsat *et al.* (1996) e Yan *et al.* (1996), utilizzando soluzioni scalari di acido ipocloroso.

Centocinquanta mg di BSA (Sigma-Aldrich Co., St, Louis, MO) sono stati sciolti in 9 ml di PBS ed aliquotati in eppendorf ad una diluizione di 15 mg/0,9 ml.

Le soluzioni sono state quindi ottenute aggiungendo ad ogni aliquota di BSA 100 µl di soluzione acida, secondo lo schema riportato di seguito (Tab.3.4):

µl HOCl (518 mM)	ml di soluzione da aggiungere al campione	BSA ox	mM della soluzione finale
200 µl PBS	0,1	15 mg/0,9 ml	0
46µl (HOCl)+ 154 µl PBS	0,1	15 mg/0,9 ml	12
92µl (HOCl)+ 108 µl PBS	0,1	15 mg/0,9 ml	24
186µl (HOCl)+ 14 µl PBS	0,1	15 mg/0,9 ml	48

Tabella 3.4 Schema di preparazione della BSA ossidata

Ogni soluzione di BSA 15 mg/ml in PBS 10 mM è stata incubata per 30 minuti a temperatura ambiente con diluizioni scalari di HOCl (0, 12, 24 e 48 mM). Il campione è

stato poi sottoposto al calcolo della concentrazione proteica, al dosaggio delle AOPP ed ad una corsa elettroforetica per valutare l'integrità della proteina. Il campione è stato poi conservato a - 20°C.

3.13.2 DETERMINAZIONE DEGLI AUTOANTICORPI

La presenza di anticorpi contro AOPP-BSA nel siero di animali affetti da patologie infiammatorie è stata determinata tramite un test ELISA (Horiuchi *et al.*, 1991; Shanti *et al.*, 1999; Palacio *et al.*, 2006).

Le piastre in polistirene da 96 pozzetti (Perkin-Elmer Life and Analytical Sciences, Shelton, CT, USA) sono state incubate con 100µl/pozzetto di AOPP-BSA (30 µg/ml) in sodio acetato pH 9.2 a 4°C per 18 ore. Successivamente la piastra è stata lavata con PBS ed incubata con 200 µl di soluzione di blocco PBS all'1% di gelatina (Sigma-Aldrich Co., St, Louis, MO) per un'ora.

Dopo tre lavaggi con PBS la piastra è stata allestita con 10 µl di siero bovino diluito 1/10, portata ad un volume finale di 100 µl/pozzetto ed incubata a 4°C per 18 ore. Successivamente è stata lavata 3 volte con 200 µl/pozzetto di tampone fosfato ed incubata un'ora a 37°C con 100 µl/pozzetto di anticorpo secondario coniugato alla perossidasi (Goat-anti-IgG bovine –HRP, KPL, Gaithersburg, MD, USA) diluito 1:10.000.

Per eliminare l'eccesso di anticorpo la piastra è stata lavata 3 volte con 200 µl/pozzetto di PBS ed incubata con 100 µl di soluzione di reazione TMB (SureBlue Reverse TMB Microwell Peroxidase Substrate, KPL, Gaithersburg, MD, USA). La reazione colorimetrica è stata bloccata con 100 ml di HCl 1N. La piastra è quindi stata letta a 450 nm al lettore di micro piastre (Packard Instrument, Meriden, CT, USA) entro 1 ora.

3.14 ELABORAZIONE DEI RISULTATI

3.14.1 CLASSIFICAZIONE DEGLI ANIMALI

Gli animali sono stati raggruppati secondo due diversi criteri di classificazione: il primo di questi si è basato sulla valutazione clinica dei soggetti. Gli animali sono stati suddivisi in tre gruppi in questo modo:

1. Animali sani: se non si evidenziavano segni di patologia in atto né erano riportati in anamnesi dall'allevatore episodi o sintomi che potessero far supporre patologie recenti. Questi animali sono stati a loro volta suddivisi in sottopopolazioni secondo lo schema definito nel paragrafo 3.1.
2. Animali affetti da infiammazione cronica: se presenti al momento del prelievo manifestazioni di segni clinici di mastite, infiammazioni uterine post-parto o patologie podali presenti da più di tre giorni.
3. Animali affetti da infiammazione acuta: se presenti al momento del prelievo manifestazioni di segni clinici di mastite, infiammazioni uterine post-parto o patologie podali presenti da meno di tre giorni.

Il secondo criterio si è basato sulle concentrazioni ematiche dell'aptoglobina, valutata come indicatore di processo infiammatorio acuto. Come tale, in questo caso, non è stato possibile creare tre gruppi di animali bensì due:

1. Animali di controllo: se le concentrazioni di aptoglobina risultavano inferiori a 0,4 mg/ml.
2. Animali in fase acuta: se le concentrazioni di aptoglobina risultavano superiori a 0,4 mg/ml.

Il limite è stato stabilito sulla base di due studi condotti su bovini con forme di metrite e polmonite (Huzzey *et al.*, 2009; Skinner *et al.*, 1991).

3.14.2 ANALISI STATISTICA

Il grado di associazione tra i due criteri di classificazione è stato studiato mediante la procedura delle tabelle di contingenza (SPSS 15.0) ed è stato espresso dal coefficiente di contingenza. Questo valore oscilla tra 0 e 1, dove 0 indica la totale assenza di associazione tra le variabili considerate, mentre valori prossimi ad 1 indicano elevati livelli di associazione tra le variabili stesse.

Le differenze tra le concentrazioni dei parametri ematici osservate nelle fasi fisiologiche, e le differenze osservate tra le manze e le bovine adulte sono state valutate mediante il test di Kruskal-Wallis (SPSS 15.0). Il test di Kruskal-Wallis è stato utilizzato anche per valutare le differenze delle concentrazioni dei parametri ematici osservate tra gli animali clinicamente sani, gli animali con processo infiammatorio cronico e gli animali con processo infiammatorio acuto. Le differenze delle concentrazioni dei parametri ematici tra gli animali di controllo e i soggetti con valori di aptoglobina indicativi di infiammazione acuta sono state studiate mediante test di Mann-Whitney.

4 RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 CORRELAZIONE TRA I VARI PARAMETRI

Prima di analizzare nel dettaglio i risultati ottenuti, sono state studiate le correlazioni tra i parametri (Tab. 4.1). Questa indagine è stata condotta allo scopo di individuare quali fossero gli indicatori che meritavano maggiore attenzione e, in particolar modo, quali avessero una relazione significativa con le AOPP. La correlazione più interessante è quella tra AOPP e aptoglobina ($r=0,430$; $P<0,001$). Visto l'utilizzo di quest'ultimo parametro come indicatore di processo di fase acuta, questo dato ci suggerisce che le proteine ossidate sono dei validi indicatori del fenomeno infiammatorio acuto, poiché esiste una correlazione positiva tra i due parametri.

		PT/PI	GSH	AOPP	AOPP/PT	MDA	MDA/PT	DHEA	C	DHEA/C	Ab SI	LISO	IL6	APTO	LINF	NEUT	EOS	BAS	MON
GSH	R	-0,192																	
	P	0,131																	
AOPP	R	0,144	-0,307																
	P	0,261	0,014																
AOPP/PT	R	-0,361	-0,215	0,862															
	P	0,004	0,091	0,000															
MDA	R	-0,031	0,218	0,185	0,188														
	P	0,817	0,097	0,161	0,154														
MDA/PT	R	-0,225	0,246	0,113	0,223	0,966													
	P	0,086	0,060	0,393	0,090	0,000													
DHEA	R	0,169	-0,255	0,155	0,045	-0,008	-0,049												
	P	0,185	0,043	0,227	0,727	0,955	0,713												
C	R	0,130	0,268	-0,104	-0,170	0,136	0,104	-0,294											
	P	0,309	0,034	0,418	0,182	0,303	0,434	0,019											
DHEA/C	R	0,105	-0,279	0,082	0,026	-0,066	-0,091	0,831	-0,597										
	P	0,413	0,027	0,525	0,838	0,622	0,493	0,000	0,000										
Ab SI	R	-0,051	-0,175	-0,084	-0,061	-0,431	-0,416	0,220	-0,298	0,284									
	P	0,690	0,170	0,515	0,635	0,001	0,001	0,084	0,018	0,024									
LISO	R	0,121	-0,027	-0,030	-0,081	0,024	0,002	-0,068	-0,033	-0,049	-0,222								
	P	0,373	0,841	0,828	0,555	0,866	0,989	0,618	0,810	0,720	0,099								
IL6	R	0,071	0,018	0,147	0,078	-0,062	-0,095	0,071	0,059	0,000	-0,055	0,062							
	P	0,592	0,893	0,262	0,555	0,651	0,487	0,591	0,657	0,998	0,678	0,655							
APTO	R	0,114	-0,265	0,430	0,377	-0,012	-0,048	-0,018	-0,194	-0,010	-0,276	0,160	-0,109						
	P	0,381	0,039	0,001	0,003	0,928	0,722	0,889	0,133	0,937	0,032	0,249	0,407						
LINF	R	-0,123	0,250	-0,013	0,022	0,209	0,194	-0,069	0,079	-0,076	0,097	-0,120	0,186	-0,312					
	P	0,335	0,048	0,921	0,866	0,112	0,140	0,591	0,536	0,554	0,447	0,376	0,156	0,014					
NEUT	R	0,092	-0,191	0,025	-0,003	-0,114	-0,121	0,141	-0,140	0,164	-0,073	0,109	-0,126	0,209	-0,914				
	P	0,474	0,135	0,848	0,981	0,389	0,363	0,272	0,274	0,199	0,569	0,425	0,336	0,106	0,000				
EOS	R	0,094	-0,155	0,003	-0,040	-0,023	-0,002	-0,169	0,187	-0,193	-0,016	-0,034	0,080	-0,119	0,104	-0,268			
	P	0,463	0,225	0,984	0,757	0,866	0,986	0,185	0,142	0,129	0,899	0,805	0,542	0,361	0,419	0,034			
BAS	R	0,009	-0,052	-0,127	-0,134	-0,119	-0,100	-0,160	0,393	-0,263	-0,062	0,080	0,063	-0,113	-0,132	0,006	0,116		
	P	0,943	0,688	0,320	0,296	0,368	0,451	0,211	0,001	0,037	0,632	0,556	0,631	0,386	0,304	0,961	0,367		
MON	R	0,038	-0,076	-0,005	0,000	-0,225	-0,182	-0,065	-0,026	-0,073	-0,047	0,025	-0,209	0,376	-0,296	-0,052	-0,123	0,063	
	P	0,770	0,555	0,967	0,998	0,087	0,169	0,615	0,839	0,568	0,714	0,853	0,108	0,003	0,018	0,686	0,338	0,622	
N/L	R	0,161	-0,235	0,091	0,025	-0,116	-0,125	0,068	-0,012	0,050	-0,143	0,086	-0,094	0,280	-0,914	0,936	-0,191	0,067	0,064
	P	0,208	0,064	0,478	0,846	0,381	0,345	0,594	0,926	0,694	0,263	0,529	0,476	0,029	0,000	0,000	0,135	0,603	0,617

Tabella 4.1 Indice di correlazione dei vari parametri ematici confrontati tra loro. Nelle celle colorate si mettono in risalto i valori con $P<0,05$. In rosso evidenziata la correlazione tra AOPP e aptoglobina. R: indice di correlazione; P: significatività statistica; PT/PI: proteine totali; AOPP/PT: AOPP/proteine totali; MDA: malondialdeide; MDA/PT: malondialdeide/proteine totali; C: cortisolo; DHEA/C: DHEA/cortisolo; Ab SI: anticorpi sierici anti AOPP-BSA; LISO: lisozima; APTO: aptoglobina; LINF: linfociti; NEUT: granulociti neutrofilici; EOS: granulociti eosinofili; BAS: granulociti basofili; MON: monociti; N/L: granulociti neutrofilici/linfociti.

Inoltre si può evidenziare una correlazione negativa tra GSH e AOPP: questo risulta in linea con quanto rilevato in uno studio di Malmezat e colleghi (2000) in cui si mette in risalto un calo del GSH totale a seguito di infezione sperimentale. Tale fenomeno avviene probabilmente a causa del “consumo” del GSH all’aumentare dello stress ossidativo, allo scopo di ristabilire lo stato redox cellulare. In questo senso il processo infiammatorio sarebbe responsabile sia di un aumento delle AOPP, sia dell’aumento della produzione di specie reattive dell’ossigeno che determinerebbe il calo nella concentrazione del GSH stesso. Stesso ragionamento può valere per la correlazione esistente tra GSH e indicatori di processo infiammatorio quali l’aptoglobina o altri fattori la cui concentrazione è sensibile alle forme flogistiche, come DHEA, rapporto DHEA/cortisolo o cortisolo.

Di particolare interesse risulta la correlazione negativa tra anticorpi anti AOPP-BSA e malondialdeide: ciò potrebbe derivare dalla tecnica di dosaggio di quest’ultimo indicatore, che rileva sia la forma libera della MDA, sia la forma legata alle proteine. Questo prodotto della perossidazione lipidica potrebbe dare origine a legami con gli anticorpi che verrebbero così “mascherati” durante l’analisi per la stima del loro titolo. Rimane poco chiaro il motivo per cui gli anticorpi non siano invece correlati alle AOPP stesse.

Le altre correlazioni non sono state prese in considerazione in questo contesto, vista la scarsa attinenza con lo scopo di questo lavoro, mentre le concentrazioni ematiche di TNF- α e IFN- α non sono risultate rilevabili.

4.2 POPOLAZIONE CLINICAMENTE SANA

4.2.1 VARIAZIONI FISILOGICHE

Sulla base del sospetto che i valori dei parametri misurati potessero subire variazioni in relazione allo stadio produttivo, sono stati analizzati e confrontati i risultati nell’ambito dei vari gruppi di animali presenti all’interno della popolazione clinicamente sana (vedi capitolo 3.1).

In questa prima analisi sono stati confrontati tra loro i risultati delle sole sottopopolazioni adulte di animali (con esclusione quindi del gruppo delle manze). Questa scelta è stata condotta al fine di valutare le possibili variazioni dei parametri oggetto del presente

studio all'interno di una popolazione omogenea di animali (vista la potenziale differenza dal punto di vista fisiologico e metabolico di un animale in accrescimento rispetto ad uno in produzione), focalizzando l'attenzione sulle sole differenze riscontrabili in relazione alla distanza temporale dal parto.

I valori di aptoglobina mostrano un picco evidente nella prima settimana post parto, nonostante si possa evidenziare una grande variabilità all'interno del gruppo stesso; i valori invece risultano basali negli altri periodi ($P < 0,05$) (Fig. 4.1).

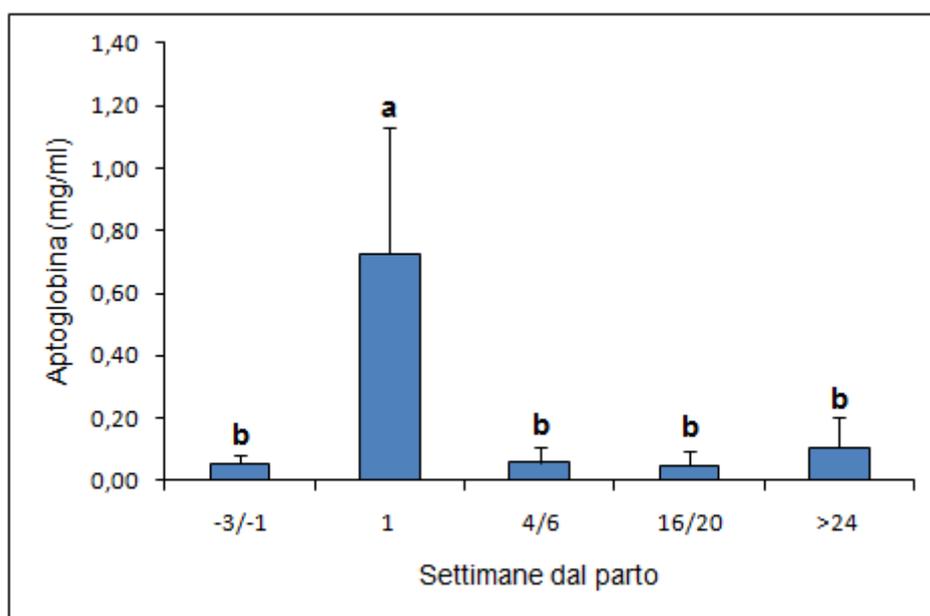


Figura 4.1 Variazione delle concentrazioni medie di aptoglobina nelle diverse fasi fisiologiche. Lettere diverse indicano medie significativamente differenti. ($P < 0,05$)

Essendo l'aptoglobina una proteina di fase acuta, i livelli elevati di questo parametro sarebbero indicativi di un processo infiammatorio acuto in corso. Il fenomeno che dà origine alla secrezione di aptoglobina da parte del fegato è dato primariamente dal rilascio di IL-6, dopo stimolazione da parte del TNF- α e dell'IL-1 (Oliviero *et al.*, 1987). Tuttavia la concentrazione media di IL-6 negli animali che si trovano nella prima settimana post parto (vedi oltre) è la più bassa tra quelle riscontrate nelle varie sottopopolazioni.

L'innalzamento del valore dell'aptoglobina potrebbe essere giustificato invece dallo stress dovuto al parto recente e dalla marcata alterazione dell'equilibrio endocrino che scatena e segue l'evento del parto, oltre che dalla persistenza dell'apertura della cervice in questa fase, che rende inevitabile una contaminazione dell'ambiente uterino e quindi

l'innescò della cascata infiammatoria. La diversa intensità di questi eventi nei vari animali e l'influenza dei molteplici fattori che rendono la risposta a questi stimoli molto soggettiva, giustificano l'ampia variabilità che si riscontra all'interno del gruppo. Alla luce di quanto considerato, e in particolar modo del basso livello dell'IL-6, l'innalzamento dell'aptoglobina in questi animali potrebbe essere quindi giustificato proprio dall'evento stressante del parto e in particolar modo dalla stimolazione da parte di ormoni quali l'estradiolo (Thomas, 2000). L'innalzamento della concentrazione dell'aptoglobina nella prima settimana post parto è inoltre perfettamente in accordo con quanto dimostrato nello studio di Huzzey e colleghi (2009), che evidenziava un picco di tale parametro in questa fase produttiva anche negli animali che non mostravano segni clinici di metrite (vedi paragrafo 2.3.1). Uchida e colleghi (1993) ipotizzavano inoltre la possibile correlazione tra l'innalzamento della concentrazione ematica dell'aptoglobina nella fase post parto e l'insorgenza di steatosi, presente con discreta probabilità nello stesso periodo.

L'analisi della variazione delle concentrazioni delle AOPP (espresse in μM) non ha evidenziato differenze statisticamente significative tra i gruppi considerati (Fig. 4.2).

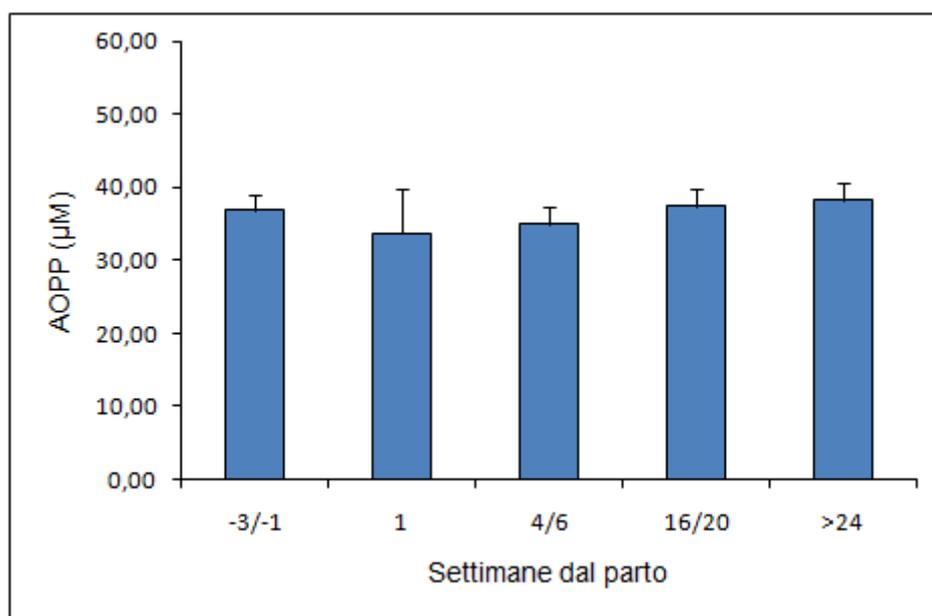


Figura 4.2 Variazione delle concentrazioni medie delle AOPP nelle diverse fasi fisiologiche.

Al contrario dei risultati ottenuti nella valutazione dell'aptoglobina, in questo caso non si evidenziano aumenti significativi in nessun gruppo. In particolar modo gli animali nella prima settimana post parto (nonostante mostrino variabilità più ampia rispetto agli altri gruppi, presumibilmente a causa della potenziale contaminazione uterina e del conseguente processo infiammatorio che può essere considerato parafisiologico) presentano valori medi di AOPP paragonabili a quelli delle altre sottopopolazioni. Questa omogeneità dei valori medi nei vari gruppi di animali sani risulterebbe quindi in linea con l'ipotesi che sia una significativa attivazione di granulociti neutrofili e monociti a dare origine alla formazione di questi indicatori.

L'analisi del DHEA ha evidenziato differenze significative tra i gruppi di animali ($P < 0,01$). In particolare gli animali che si trovano entro le 3 settimane che precedono il parto mostrano livelli di DHEA marcatamente più elevati rispetto agli altri gruppi, che risultano invece omogenei tra loro (Fig. 4.3).

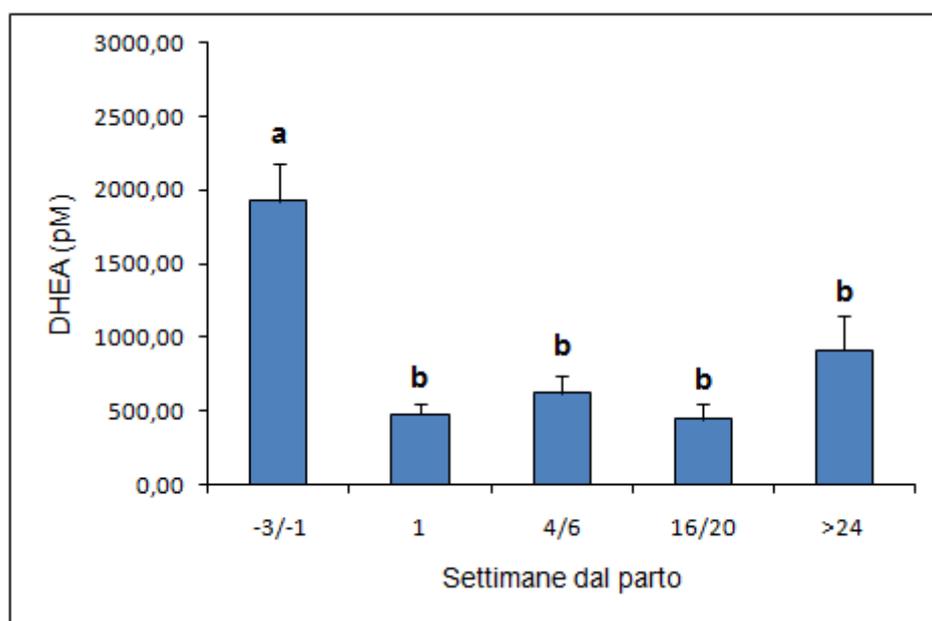


Figura 4.3 Variazione delle concentrazioni medie di DHEA nelle diverse fasi fisiologiche. Lettere diverse indicano medie significativamente differenti. ($P < 0,01$)

Questo risultato conferma quanto già riportato in altri studi (Gabai *et al.*, 2004; Marinelli *et al.*, 2007): nonostante il DHEA sia infatti un ormone prodotto da gonadi e surrene, nella fase di tarda gravidanza è la placenta a divenire la più rilevante fonte di questo

androgeno. Questo fenomeno spiega l'innalzamento della sua concentrazione nelle ultime settimane di gestazione e il suo brusco calo dopo il parto.

I valori di cortisolo risultano essere più elevati nel gruppo di animali che si trovano a 4/6 settimane dal parto e a 16/20 settimane dal parto ($P < 0,01$). Tendono invece ad essere più bassi in prossimità del parto (-3/-1 settimane al parto e 1 settimana dopo il parto) e ad assumere valori intermedi oltre le 24 settimane dopo il parto ($P < 0,01$), come evidenziato nel grafico (Fig. 4.4).

Il fisiologico picco della cortisolemia nel periparto si evidenzia tra le 12 ore precedenti e le 12 ore successive al parto, e mostra oscillazioni per le 36 ore che seguono il parto stesso (Smith *et al.*, 1973). In questo caso, non è stato possibile evidenziare tale picco nelle sottopopolazioni interessate, a causa del diverso intervallo temporale prelievo-parto tra gli animali di uno stesso gruppo.

Le concentrazioni medie, inoltre, risultano più basse nel periparto per poi aumentare nelle fasi oltre le 4/6 settimane post parto. Ciò è probabilmente legato all'attività produttiva dell'animale. Nelle fasi preparto lo stress legato alla manipolazione dell'animale è molto basso, per poi aumentare dopo il parto e raggiungere livelli massimi in prossimità del picco produttivo.

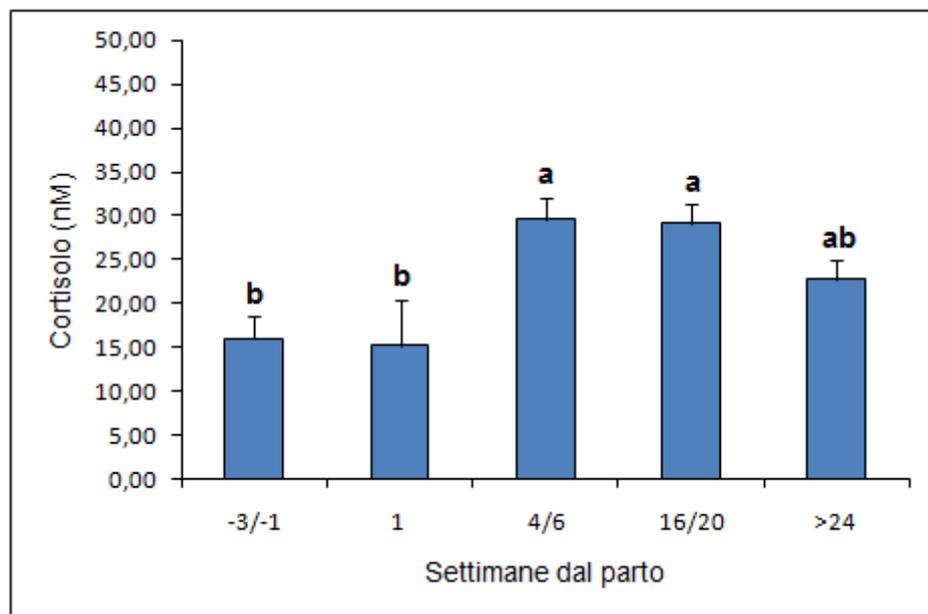


Figura 4.4 Variazione delle concentrazioni medie di cortisolo nelle diverse fasi fisiologiche. Lettere diverse indicano medie significativamente differenti. ($P < 0,01$)

Similmente all'andamento del DHEA stesso, il rapporto DHEA/cortisolo risulta significativamente più elevato nelle tre settimane che precedono il parto, diminuendo drasticamente e assumendo valori basali nell'intero periodo post parto ($P < 0,01$) (Fig. 4.5).

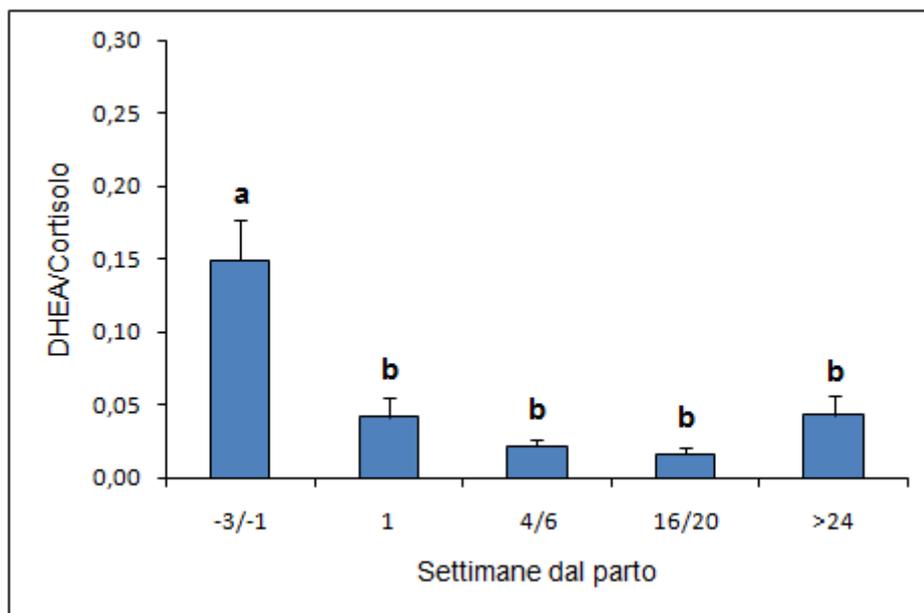


Figura 4.5 Variazione dei valori medi del rapporto DHEA/Cortisolo nelle diverse fasi fisiologiche. Lettere diverse indicano medie statisticamente differenti. ($P < 0,01$)

Il significato del rapporto DHEA/cortisolo è prevalentemente di tipo immunitario. Come descritto precedentemente (paragrafo 2.3.4) il DHEA ha proprietà “immuno-protettive” (Saccò *et al.*, 2002), mentre il cortisolo è un importante immunosoppressore (Cupps and Fauci, 1982). Il rapporto elevato quindi è indicativo di maggiore resistenza dell'animale nei confronti delle infezioni. Tuttavia, in questo caso, l'elevato rapporto DHEA/cortisolo nelle 3 settimane che precedono il parto è dovuto alla massiccia produzione dell'ormone da parte della placenta. Per questo motivo, nel momento in cui si renda necessario confrontare i valori di questo rapporto tra animali, risulta di fondamentale importanza tenere in considerazione se i soggetti si trovino in questa fase preparto; essa altera drasticamente i valori del parametro, mascherando l'effettiva produzione da parte di gonadi e surrene, e rendendo quindi inutile ogni paragone con animali che non siano nella fase terminale della gravidanza.

I valori di IL-6 hanno mostrato oscillazioni tra i gruppi, con un nadir nella prima settimana post parto e una intuibile tendenza ad aumentare nel periodo successivo, fino a raggiungere il picco massimo negli animali che si trovano ad oltre 24 settimane dal parto ($P < 0,05$) (Fig. 4.6).

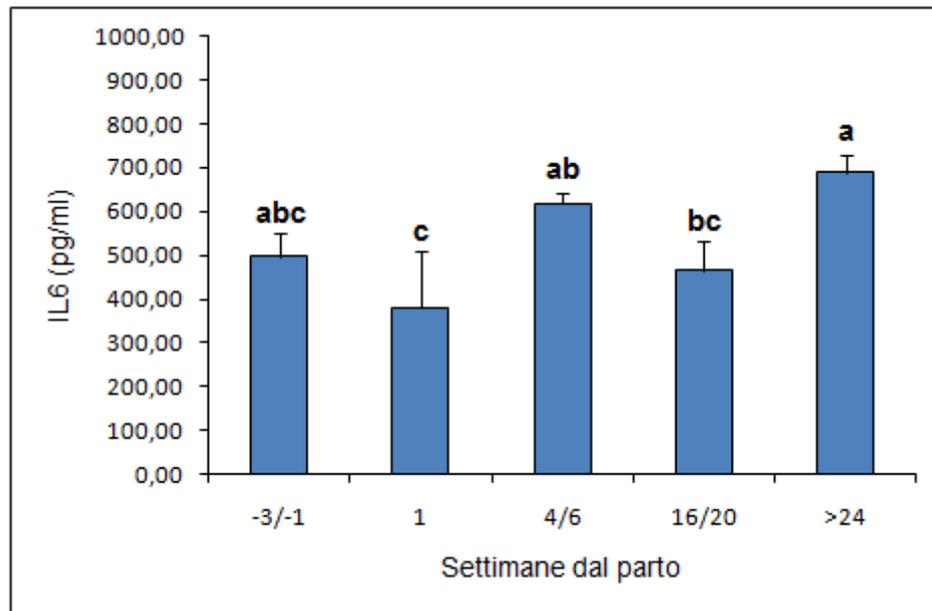


Figura 4.6 Variazione delle concentrazioni medie di IL-6 nelle diverse fasi fisiologiche. Lettere diverse indicano medie significativamente differenti. ($P < 0,05$)

I dati in letteratura (Ishikawa *et al.*, 2004) riportano un aumento delle concentrazioni del parametro nelle fasi che precedono il parto e una loro diminuzione nella fase post-parto. Va tuttavia considerato che tali valutazioni sono state condotte solo nei 60 giorni precedenti e successivi al parto stesso, e quindi risultano difficilmente confrontabili con i dati illustrati in questo lavoro. Un altro studio (Hagiwara *et al.*, 2001), che valutava animali suddivisi in 3 fasi di lattazione (precoce, intermedia e tarda), non ha invece rilevato differenze significative tra i gruppi.

I risultati, infine, evidenziano valori oscillanti delle concentrazioni medie di IL-6 nelle varie fasi fisiologiche: in questo caso l'impossibilità di definire un andamento lineare del valore è probabilmente legata alla scarsa numerosità dei campioni. L'interpretazione di questi risultati si rivela quindi difficoltosa a causa sia dell'inesistenza di dati completamente confrontabili in letteratura, sia dalla scarsa quantità di animali analizzati in questo studio, che rende il campione poco rappresentativo.

Gli altri parametri analizzati in questo lavoro non hanno mostrato differenze statisticamente significative tra i gruppi considerati.

4.2.2 CONFRONTO TRA MANZE E ANIMALI ADULTI

All'interno della popolazione clinicamente sana è stato posto il confronto tra manze e animali adulti. In questo caso sono state condotte comparazioni tra il gruppo delle manze e gli animali adulti a 4/6 settimane dopo il parto, e a 16/20 settimane dopo il parto. Lo scopo di questa valutazione è quello di considerare se animali giovani, che non hanno mai partorito, mostrino valori indicativi di stress ossidativo diversi rispetto ad animali adulti che hanno già affrontato almeno un parto. Allo scopo di concentrare l'attenzione su questo aspetto, non sono stati condotti i confronti tra le manze e gli altri tre gruppi di animali adulti (-3/-1 settimane al parto; 1 settimana dopo il parto; più di 24 settimane dopo il parto): questo a causa dell'impossibilità di paragonare sottopopolazioni così diverse dal punto di vista fisiologico e con presumibili differenze nei parametri ricercati, legate allo stesso stadio produttivo piuttosto che all'età dell'animale. Gli animali a -3/-1 settimane al parto sono stati scartati dal confronto per il quadro endocrino completamente diverso rispetto alle manze, quelli a 1 settimana dopo il parto per una probabile alterazione del profilo ossidativo visti i processi di lochiazione in atto durante questa fase, mentre quelli oltre le 24 settimane dopo il parto per l'eterogeneità di situazioni fisiologiche (gravidanza presente o meno, epoca di gestazione, ecc.).

In entrambe le valutazioni (manze vs animali a 4/6 settimane dal parto e manze vs animali a 16/20 settimane dal parto) nessun parametro tra quelli analizzati ha mostrato differenze significative tra i gruppi.

4.3 LIVELLO DI ASSOCIAZIONE TRA I DUE SISTEMI DI CLASSIFICAZIONE

Per poter meglio interpretare i risultati derivanti dal confronto tra popolazione sana e popolazioni malate, è stato valutato il livello di associazione tra i due parametri di

classificazione (clinico e basato sul livello di aptoglobina). Questo è risultato elevato (Coefficiente di contingenza=0,579; P<0,001) (Tab. 4.2).

Classificazione basata sulle concentrazioni di Aptoglobina	Classificazione Clinica			Totale
	Controllo	Infiammazione Cronica	Infiammazione Acuta	
Controllo	22	9	0	31
Infiammazione Acuta	4	3	11	18
Totale	26	12	11	49

Tabella 4.2 Associazione tra le diagnosi ottenute mediante anamnesi e valutazione clinica dei soggetti (criterio di classificazione clinica) o mediante valutazione delle concentrazioni ematiche di aptoglobina. Il livello di associazione tra i due criteri di classificazione è risultato elevato (Coefficiente di contingenza=0,579; P<0,001)

Si sottolinea che tra i 4 animali clinicamente sani che hanno presentato elevati valori di aptoglobina, 2 si trovano nella classe della prima settimana post parto, momento in cui questa proteina di fase acuta tende ad aumentare fisiologicamente e non è quindi necessariamente indice di un processo patologico in atto. Tra gli animali segnalati come appartenenti al gruppo clinico dell'infiammazione cronica, invece, i tre che hanno manifestato valori elevati di aptoglobina presentavano forme di riacutizzazione o peggioramento dei sintomi nei giorni del prelievo: nonostante sulla base dei criteri di classificazione (vedi paragrafo 3.14.1) essi appartenessero al gruppo clinico "con infiammazione cronica", l'aumento del parametro infiammatorio in questi casi è perfettamente giustificabile.

L'elevato valore del coefficiente di contingenza indica che la valutazione clinica e quella basata sui valori dell'aptoglobina sono pressoché sovrapponibili per quanto concerne l'infiammazione acuta.

4.4 CONFRONTO TRA POPOLAZIONE CLINICAMENTE SANA E CLINICAMENTE MALATA

Il confronto è stato condotto tra animali clinicamente sani, animali con infiammazione acuta e animali con infiammazione cronica secondo i criteri descritti nel paragrafo 3.14.1.

Tra gli animali clinicamente sani sono stati esclusi i soggetti che si trovavano nelle 3 settimane che precedono il parto (gruppo -3/-1). Il motivo di tale scelta è la differenza sostanziale di alcuni valori (in particolare del DHEA e del rapporto DHEA/Cortisolo) evidenziata nei risultati precedenti (paragrafo 4.2.1), secondo i quali l'effetto della fase fisiologica può mascherare quello legato ai fenomeni infiammatori, oltre che l'assenza tra gli animali malati di soggetti in questo stadio produttivo. Allo scopo di confrontare gruppi omogenei, anche le manze non sono state tenute in considerazione tra gli animali sani per i motivi di cui si è già accennato (paragrafo 4.2.1).

In questa analisi i risultati hanno evidenziato differenze tra i gruppi di più parametri, quali: aptoglobina, AOPP e rapporto AOPP/Proteine totali, GSH, DHEA e rapporto DHEA/Cortisolo, numero di linfociti e rapporto neutrofili/linfociti.

I valori medi dell'aptoglobina sono evidentemente superiori nel gruppo di animali con infiammazione acuta ($P < 0,001$), mentre i livelli del parametro negli altri due gruppi risultano basali (Fig. 4.7).

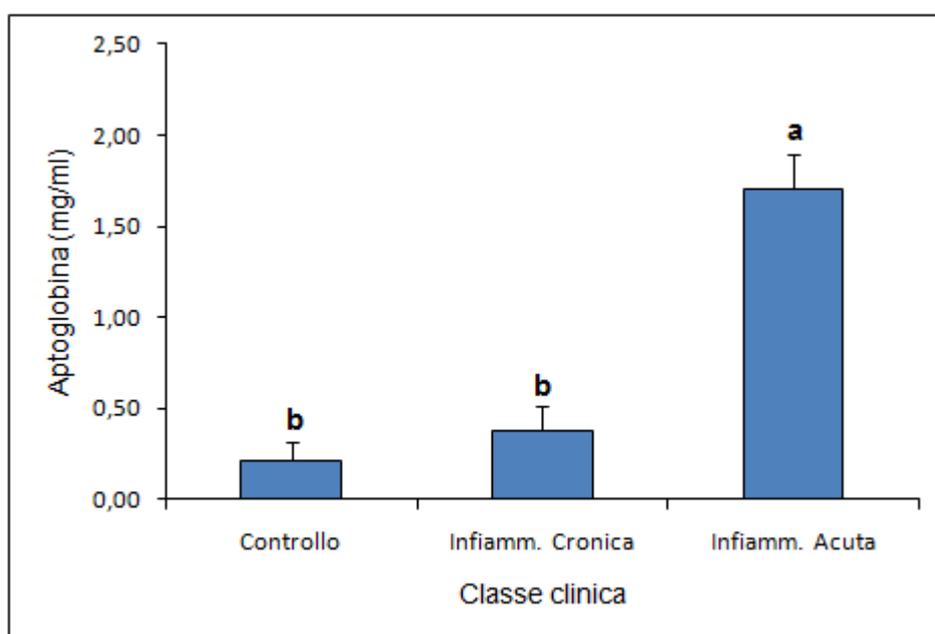


Figura 4.7 Variazione delle concentrazioni medie di aptoglobina tra i gruppi di animali classificati sulla base dei segni clinici. Lettere diverse indicano medie significativamente differenti. ($P < 0,001$)

Il valore marcatamente più elevato negli animali in fase acuta è perfettamente in linea con quanto riportato in altri studi (Skinner *et al.*, 1991), nei quali si evidenzia un valore medio inferiore a 0,2 mg/ml per animali sani e valori tra 1 e 2 mg/ml per gli animali con forme infiammatorie conclamate in atto.

Risulta da chiarire invece il motivo per cui le concentrazioni medie di IL-6 in queste sottopopolazioni non mostrino differenze statisticamente significative tra loro, visto che questa citochina rappresenta il più importante fattore nello stimolo alla secrezione dell'aptoglobina (Oliviero *et al.*, 1987). Probabilmente questo è imputabile al basso numero di animali oggetto di studio. L'ampiezza dell'errore standard rilevato avvalorerebbe questa ipotesi (Fig. 4.8).

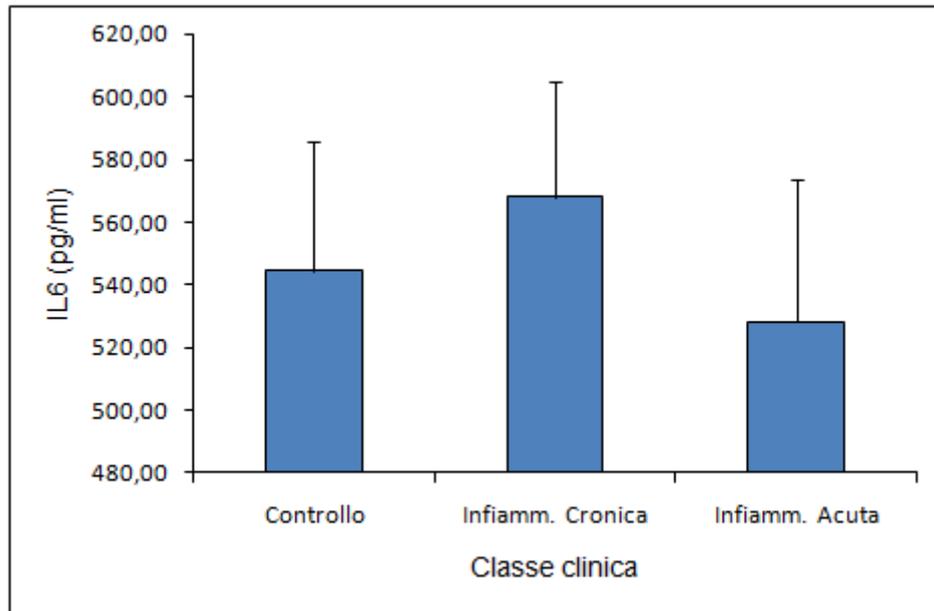


Figura 4.8 Variazione delle concentrazioni medie di IL-6 tra i gruppi di animali classificati sulla base dei segni clinici.

Il valore delle AOPP ($P < 0,01$) risulta più elevato negli animali in fase acuta rispetto agli altri due gruppi, come illustrato nella figura 4.9. Si riesce inoltre ad evidenziare un valore intermedio del parametro negli animali che presentano infiammazione cronica.

Questo tipo di risultato avvalora l'ipotesi che questi marker di stress ossidativo siano importanti indicatori di attivazione neutrofilica. Questa differenza nelle concentrazioni del parametro sono rese ancor più evidenti se vengono confrontate coi valori delle proteine totali, come rapporto AOPP/proteine totali (Fig. 4.10). In questo caso si evidenzia una significativa differenza tra animali con infiammazione acuta da una parte, e animali sani e con infiammazione cronica dall'altra ($P < 0,05$).

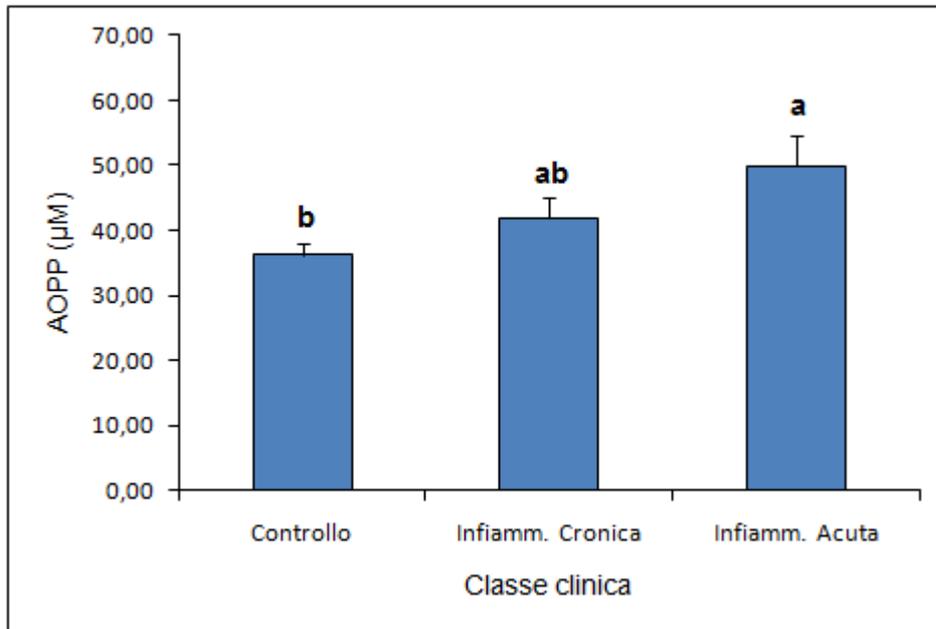


Figura 4.9 Variazione delle concentrazioni medie delle AOPP tra gruppi di animali classificati sulla base dei segni clinici. Lettere diverse indicano medie significativamente differenti. ($P < 0,01$)

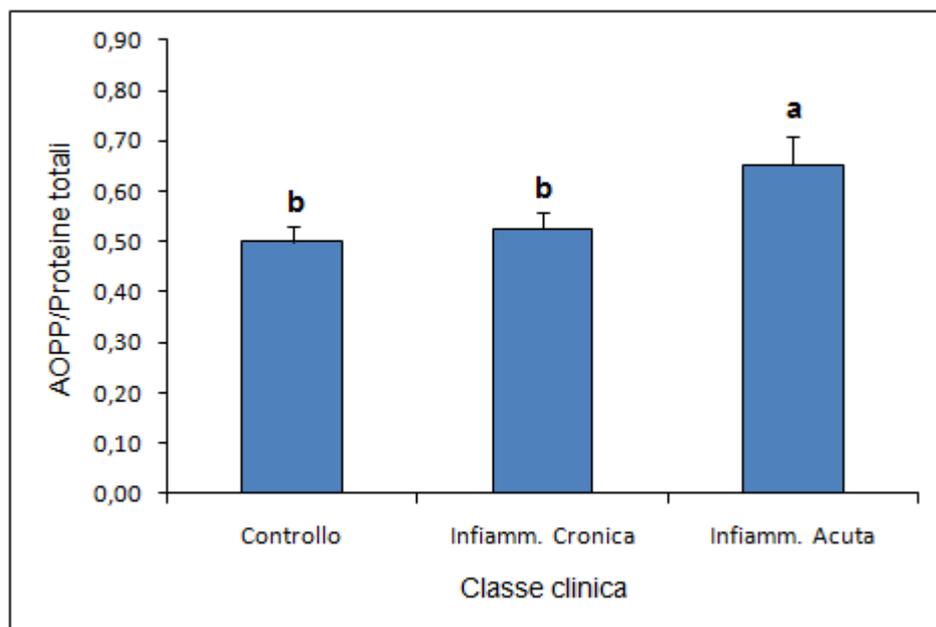


Figura 4.10 Variazione dei valori medi del rapporto AOPP/proteine totali tra gruppi di animali classificati sulla base dei segni clinici. Lettere diverse indicano medie significativamente differenti. ($P < 0,05$)

Questi risultati confermerebbero che quanto evidenziato da Witko Sarsat e colleghi (1996; 1998) nell'ambito dei pazienti sottoposti a dialisi, risulta valido anche nel caso della specie bovina in corso di processo infiammatorio acuto: l'attivazione neutrofilica porterebbe ad un aumento dell'attività della mieloperossidasi che, tramite la produzione

di acido ipocloroso (HOCl) e di ditirosina, determinerebbe ossidazione della componente proteica plasmatica. Il fatto che non ci siano differenze significative tra il gruppo di controllo e il gruppo di animali con infiammazione cronica sottolinea la specificità del parametro nei confronti della sola attivazione neutrofilica.

Nel paragrafo 4.1 è stata messa in luce la correlazione esistente tra AOPP e GSH, e AOPP e aptoglobina: oltre che essere importanti marker di stress ossidativo, quindi, le AOPP si sono dimostrate anche ottimi indicatori di processo infiammatorio acuto. Conseguentemente si può concludere che le AOPP possano essere utilizzate come marker di fase acuta al pari dell'aptoglobina ma, al contrario di quest'ultima, esse non sembrano influenzate da fenomeni quali il parto (Fig. 4.2), risultando quindi più affidabili dell'aptoglobina stessa. Viene inoltre confermato quanto ipotizzato dagli studi di Witko-Sarsat e colleghi (1996), ovvero che le AOPP siano indicatori di stress ossidativo più attendibili della malondialdeide classicamente usata, visto che quest'ultima non ha evidenziato variazioni nell'ambito delle popolazioni classificate in base ai sintomi clinici. A questo punto resta da chiarire se le AOPP possano indurre la formazione di autoanticorpi, considerata la possibilità di essere riconosciute come *non-self* dal sistema immunitario. Se ciò avvenisse, si giustificerebbe un potenziamento della risposta infiammatoria nonché un prolungamento della stessa, dettata da fenomeni che potrebbero quindi essere classificati come autoimmuni. In questo senso si ipotizzava che tra i risultati sarebbe emersa una correlazione tra AOPP e anticorpi anti AOPP-BSA. In realtà tale fenomeno non è stato evidenziato in questo studio, mentre resta dubbio il motivo della correlazione negativa rilevata (paragrafo 4.1, tabella 4.1) tra malondialdeide e anticorpi anti AOPP-BSA.

I valori di GSH mostrano differenze significative ($P < 0,01$) nel gruppo di controllo, dove il valore risulta più elevato rispetto agli animali in fase cronica e a quelli in fase acuta. In questi ultimi si evidenzia un valore intermedio (Fig. 4.11).

In alcuni studi si è dimostrato che il digiuno (Hum *et al.*, 1991) e la carenza di apporto proteico con la dieta (Hum *et al.*, 1992) sono correlati ad un calo delle concentrazioni ematiche di GSH. In questo studio, considerato il numero elevato di aziende diverse da cui sono stati selezionati gli animali, si suppone che l'effetto della dieta sul GSH ematico tenda ad essere mascherato poiché non è stato possibile tenere in considerazione il tipo di alimentazione somministrata. Questo è confermato anche dalla non significatività nella

diversità dei valori medi di GSH registrata nella popolazione sana nelle diverse fasi fisiologiche (Fig. 4.12).

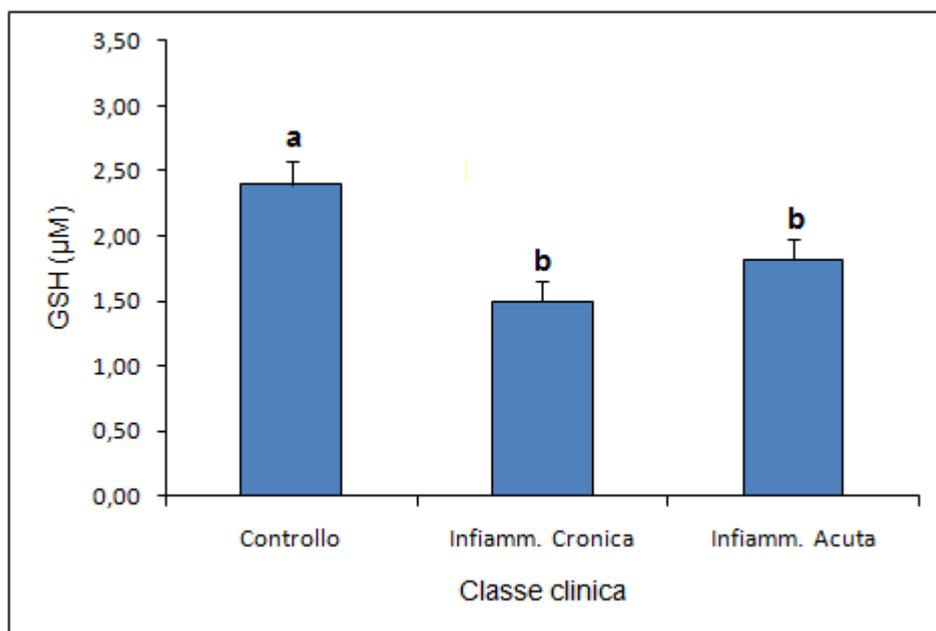


Figura 4.11 Variazione delle concentrazioni medie di GSH tra i gruppi di animali classificati sulla base dei segni clinici. Lettere diverse indicano medie significativamente differenti. ($P < 0,01$)

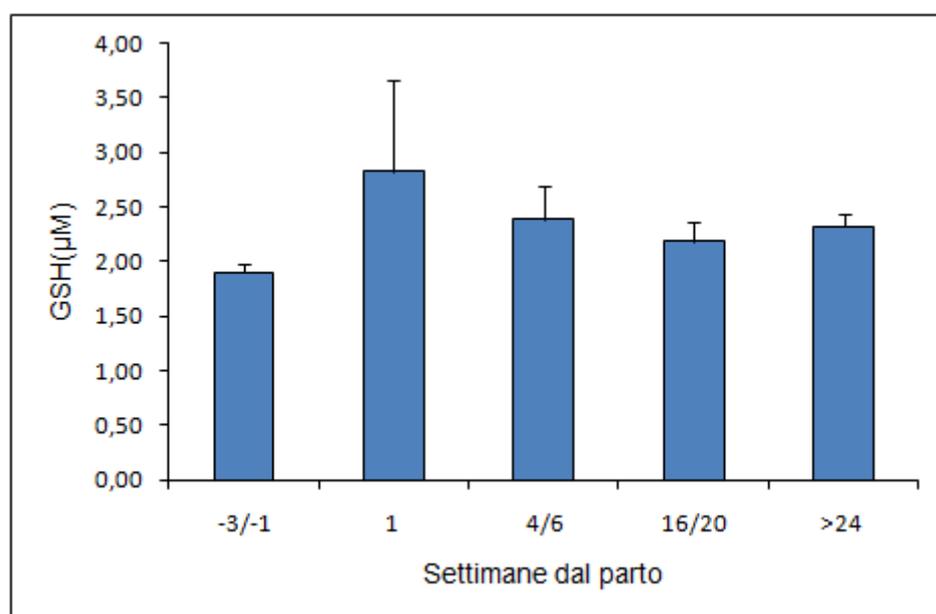


Figura 4.12 Variazione delle concentrazioni medie di GSH nelle diverse fasi fisiologiche.

Oltre a questo, un calo del GSH è stato dimostrato in diverse condizioni contraddistinte da una situazione di stress ossidativo persistente (White *et al.*, 1994). Questa ipotesi risulta più verosimile in questa indagine. In uno studio di Malmezat e colleghi (2000) è

stato evidenziato che animali anoressici sottoposti ad infezione sperimentale, comparati con soggetti sani a parità di alimentazione, mostrano livelli di GSH più elevati in tutti i tessuti tranne che nel sangue; allo stesso modo, dal confronto di questi risultati con quelli di uno studio di Breuillé e colleghi (1994), è emerso che le concentrazioni epatiche del GSH tendono ad essere più elevate nei soggetti a digiuno malati piuttosto che in soggetti normalmente alimentati sani, il che evidenzia una maggiore influenza sulle concentrazioni del parametro da parte del processo infiammatorio piuttosto che dell'alimentazione. Si suppone quindi che anche in questo contesto sia l'infiammazione a determinare modificazioni dei livelli di GSH, mascherando ulteriormente eventuali variazioni legate all'alimentazione. Probabilmente, durante il processo infiammatorio e a causa dello stress ossidativo indotto da questo, l'organismo tende a ristabilire l'equilibrio redox incrementando la sintesi del GSH per sopperire alla maggiore richiesta di antiossidanti. Tuttavia il più importante aumento del "consumo" di GSH rispetto alla sua produzione, giustificerebbe i valori ematici più bassi negli animali malati.

I livelli di DHEA assumono invece valore massimo negli animali in fase acuta, intermedio in quelli con infiammazione cronica e minore negli animali clinicamente sani (Fig. 4.13). Tuttavia esiste una differenza significativa solo tra gli animali con stato infiammatorio acuto e animali di controllo ($P < 0,01$).

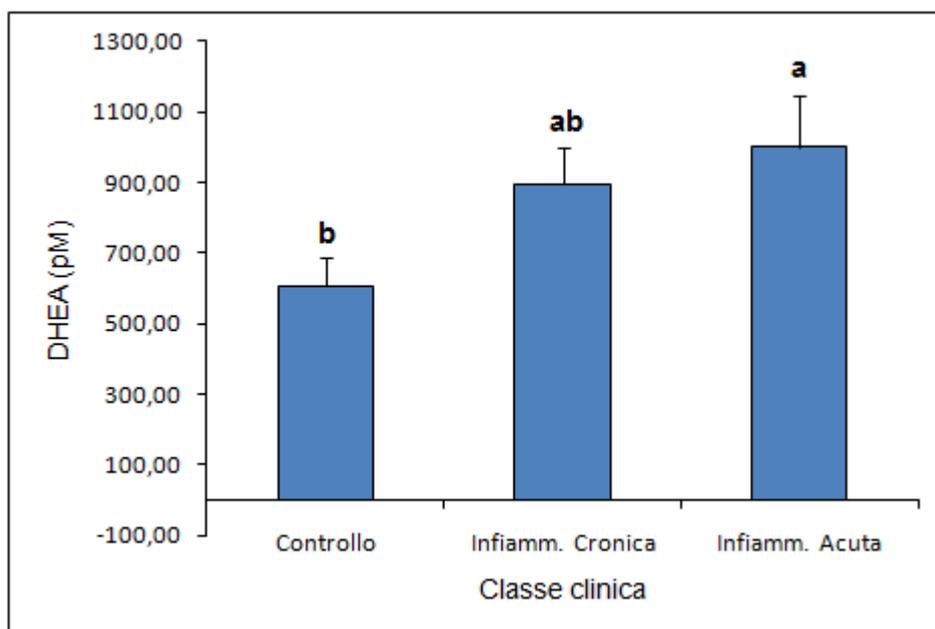


Figura 4.13 Variazione delle concentrazioni medie di DHEA tra gruppi di animali classificati sulla base dei segni clinici. Lettere diverse indicano medie significativamente differenti. ($P < 0,01$)

Poiché la cortisolemia non mostra differenze tra i gruppi, l'andamento del rapporto DHEA/cortisolo risulta molto simile a quello del DHEA stesso. In questo caso però si riescono ad evidenziare differenze significative ($P < 0,05$) tra gli animali con infiammazione (acuta e cronica) e animali di controllo (Fig. 4.14).

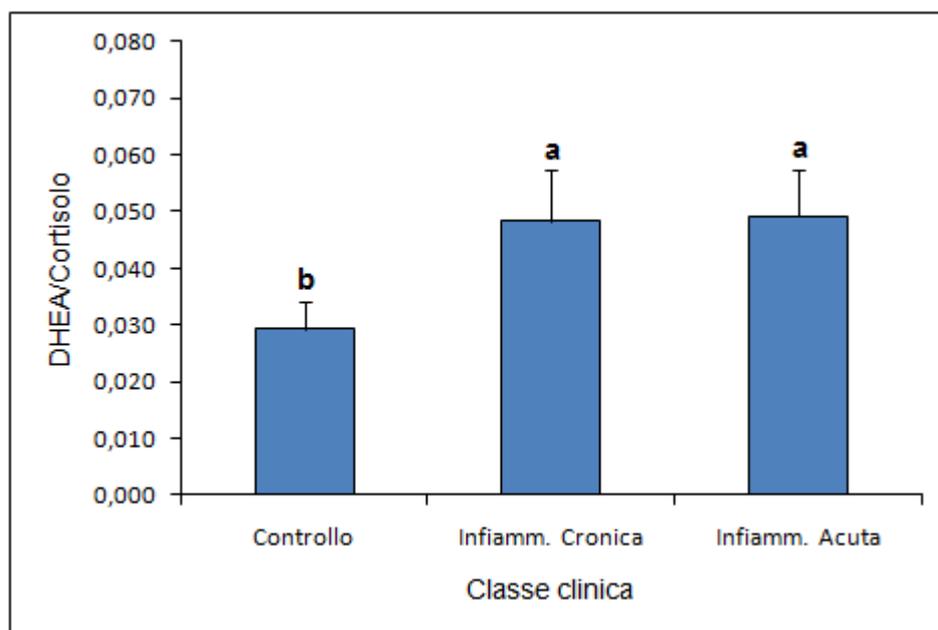


Figura 4.14 Variazione dei valori medi del rapporto DHEA/cortisolo tra gruppi di animali classificati sulla base dei segni clinici. Lettere diverse indicano medie significativamente differenti. ($P < 0,05$)

Questo risultato è in disaccordo con quanto definito in uno studio di Almeida e colleghi (2008), nel quale veniva dimostrato che le concentrazioni seriche del DHEA tendono a diminuire in animali in cui si evidenziano lesioni infiammatorie podali. Nella stessa indagine è stato inoltre calcolato il rapporto cortisolo/DHEA, che evidenziava differenze tendenzialmente significative ($P = 0,06$) tra i due gruppi di animali confrontati (più elevato nei malati). In letteratura, purtroppo, non sono riportate altre indicazioni riguardo alle variazioni di questi parametri nella specie bovina in corso di processo infiammatorio. L'opposto risultato qui presentato, rispetto a quanto ottenuto nello studio citato, potrebbe essere legato alla sostanziale diversità nelle tecniche di campionamento: i soggetti utilizzati nel lavoro indicato sono molto omogenei in termini di età, stadio produttivo e peso vivo. Inoltre gli animali sono stati allevati nell'intero periodo dello studio nello stesso ambiente e sottoposti ad uguale alimentazione, mentre il prelievo è stato effettuato per tutti i soggetti nella mattinata dello stesso giorno. Tutto questo potrebbe rendere non paragonabili i presenti risultati, derivanti da individui provenienti da allevamenti

estremamente eterogenei tra loro, con quelli di Almeida e colleghi (2008). Inoltre i casi dello studio di Almeida e colleghi erano di natura presumibilmente cronica, ma non definita con precisione nella valutazione degli animali. In conclusione, non essendo ancora chiaro quali possano essere le variabili che influenzano la concentrazione di DHEA plasmatico nella specie bovina, a causa della carenza di dati in letteratura, diventa pressoché impossibile definire il motivo di una tale diversità nei risultati dei due studi.

Indagini condotte su altre specie hanno evidenziato che i livelli di DHEA restano inalterati nei ratti a seguito di somministrazione di endotossine (Ghezzi *et al.*, 2000), mentre nel suino con shock circolatorio l'inoculazione di queste ultime causa la diminuzione della concentrazione dello steroide (Schurr *et al.*, 1997). Nei feti di femmine gravide di scimmia rhesus (*Macaca mulatta*), a seguito di infezione streptococcica uterina provocata, è stato invece riscontrato un aumento del DHEA nel sangue fetale (Gravett *et al.*, 1996). Similmente i livelli di questo androgeno tendono ad aumentare nelle fasi iniziali che seguono l'infezione da HIV nell'uomo (Christeff *et al.*, 1997) e nelle ore successive alla somministrazione di endotossine di *Salmonella abortus equi* in pazienti umani, per poi decrescere in quest'ultimo caso nell'arco delle 6-12 ore successive all'inoculazione (Schuld *et al.*, 2000). Questi risultati portano alla conclusione che il rilascio di DHEA tende a diversificarsi nelle varie fasi della risposta immunitaria dei soggetti.

Il motivo dell'andamento dei valori del DHEA e DHEA/cortisolo potrebbe essere giustificato dall'effetto del DHEA sul sistema immunitario, che conduce all'inibizione della secrezione di citochine pro-infiammatorie come il TNF- α e l'IL-6 (Danenberg *et al.*, 1992; Araghi-Niknam *et al.*, 1997; Di Santo *et al.*, 1996; Kimura *et al.*, 1998). L'incremento del valore durante il processo infiammatorio potrebbe rappresentare un meccanismo protettivo dell'individuo nei confronti dell'infiammazione stessa. Si mette in evidenza (Fig. 4.8), infatti, che il valore di IL-6 risultato più basso tra i gruppi considerati appartiene alla sottopopolazione degli animali con infiammazione acuta (sebbene questo valore non sia significativamente diverso dagli altri dal punto di vista statistico), ovvero quella che presenta allo stesso tempo i livelli più elevati di DHEA. Tuttavia i due parametri (DHEA e IL-6) non sono risultati correlati in questo studio (paragrafo 4.1).

Considerato che numerose indagini condotte sull'uomo hanno evidenziato diminuzioni delle concentrazioni del DHEA durante i processi infiammatori cronici (Masi *et al.*, 1984; Deighton *et al.*, 1992; Lahita *et al.*, 1987; Straub *et al.*, 1998; Dillon, 2005) e alla luce di

quanto evidenziato nel presente studio e in quello di Almeida *et al.* (2008), si può supporre che l'andamento del DHEA, durante le varie fasi del processo infiammatorio, consista in un iniziale aumento della sua concentrazione nelle prime fasi dell'evento flogistico e un successivo decremento nelle fasi croniche. Si suppone invece che la cortisolemia sia stabile in un primo momento, per poi aumentare con la cronicizzazione del processo, come illustrato in figura 4.15. Quest'ultimo effetto non è stato però riscontrato nel presente lavoro. La diversità tra i risultati ottenuti in questo studio e quelli di Almeida *et al.* (2008) potrebbe derivare quindi fondamentalmente dalle diverse fasi infiammatorie durante le quali è stato eseguito il prelievo.

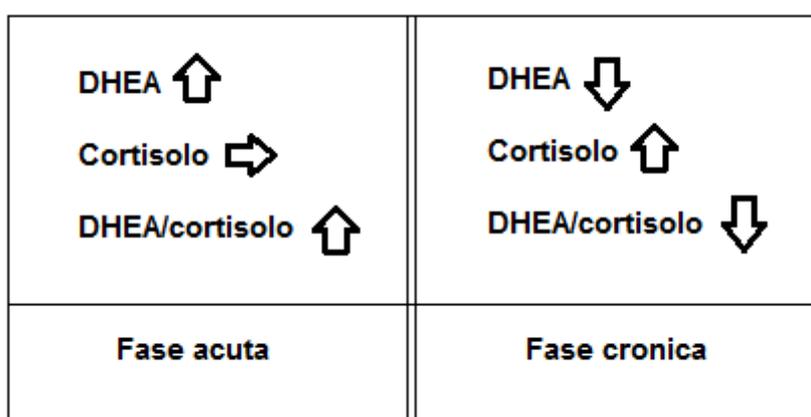


Figura 4.15 Ipotesi sulle variazioni dei livelli di DHEA e cortisolo durante le diverse fasi infiammatorie.

Per quanto riguarda la formula leucocitaria sono stati evidenziati valori più elevati nel numero di linfociti negli animali di controllo, seguiti dagli animali con infiammazione cronica e infine da quelli con infiammazione acuta (Fig. 4.16). Differenze significative sono riportate tra animali di controllo e animali malati (sia in forma acuta che cronica) ($P < 0,01$).

Il rapporto neutrofili/linfociti raggiunge il picco massimo nelle forme infiammatorie acute, intermedio in quelle croniche e minimo negli animali di controllo, comportandosi così in maniera inversa rispetto al numero di linfociti (Fig. 4.17). Anche in questo caso vengono riportate differenze significative tra gruppo di controllo da una parte e animali con forme infiammatorie acute e croniche dall'altra ($P < 0,05$).

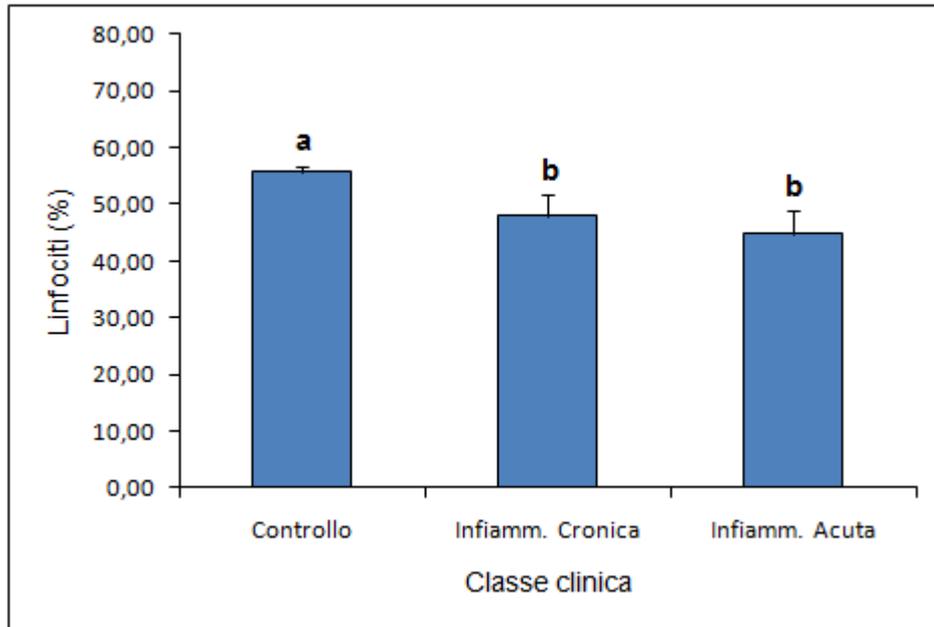


Figura 4.16 Variazione della percentuale di linfociti nella formula leucocitaria tra i gruppi di animali classificati sulla base dei segni clinici. Lettere diverse indicano medie significativamente differenti. ($P < 0,01$)

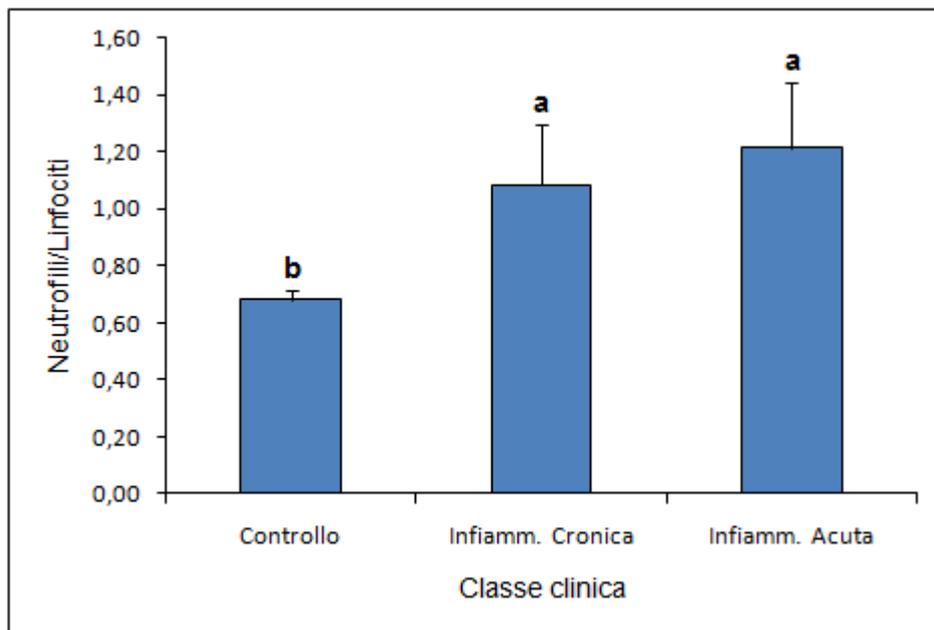


Figura 4.17 Variazione dei valori medi del rapporto neutrofili/linfociti nella formula leucocitaria tra gruppi di animali classificati sulla base dei segni clinici. Lettere diverse indicano medie significativamente differenti. ($P < 0,05$)

La percentuale fisiologica di linfociti nella specie bovina è definita nell'intervallo 45-75% (Aguggini *et al.*, 1998). La popolazione con processo infiammatorio acuto è l'unica che si discosta (seppur minimamente) da questo intervallo, con un valore medio del 44,73%. Gli altri due gruppi risultano all'interno del range (infiammazione cronica: 47,97%; controllo:

55,76%). Tuttavia nei soggetti malati è stata evidenziata una media significativamente più bassa rispetto ai sani. Fisiologicamente, nella specie bovina, il numero dei linfociti è più elevato di quello dei neutrofili. Valori superiori a 1 nel rapporto neutrofili/linfociti, riscontrati negli animali con processo infiammatorio (in particolar modo quello acuto), mettono quindi in evidenza la situazione flogistica esistente. Infatti, la forma acuta dell'infiammazione è determinata dall'attivazione neutrofilica, quella cronica da quella linfocitaria, macrofagica e linfoplasmacellulare. Nonostante questo, nella popolazione con infiammazione cronica non è stato evidenziato un aumento della componente linfocitaria, bensì valori ancora elevati di neutrofili, evidenziati dal rapporto neutrofili/linfociti.

Nell'ottica di questo lavoro risulta inevitabile paragonare questi risultati con quelli delle AOPP. In effetti il confronto della figura 4.17 con la 4.9 rende evidente un andamento sovrapponibile; questa sarebbe un'ulteriore prova a sostegno del fatto che le AOPP, anche nella specie bovina, sono degli indicatori di attivazione neutrofilica. Si può inoltre evidenziare come il rapporto AOPP/proteine totali (Fig. 4.10) sia in grado di discriminare gli animali con infiammazione acuta da quelli con infiammazione cronica, evento che il solo rapporto neutrofili/linfociti non è stato in grado di mettere in luce. Posto che gli animali con infiammazione acuta ed infiammazione cronica sono stati classificati sulla base della durata dei sintomi, questo indica che il rapporto neutrofili/linfociti tende a ristabilirsi più lentamente di un normale valore AOPP/proteine ossidate.

Gli altri parametri analizzati in questo studio non hanno mostrato differenze statisticamente significative tra i gruppi considerati.

4.5 CONFRONTO TRA POPOLAZIONE IN FASE ACUTA E POPOLAZIONE DI CONTROLLO VALUTATE SULLA BASE DEI VALORI DI APTOGLOBINA

La variazione dei parametri nei gruppi di bovine classificate sulla base della concentrazione di aptoglobina sono mostrati nella tabella 4.3.

Indicatore ematico		Gruppo		P
		Controllo	Infiamm. Acuta	
Aptoglobina	(mg/ml)	0,08 ± 0,02	1,49 ± 0,15	0,000
Lisozima	(µg/ml)	1,56 ± 0,34	1,81 ± 0,49	0,601
AOPP	(µM)	37,16 ± 1,57	46,83 ± 3,18	0,017
AOPP/Prot totali	(nmol/mg)	0,50 ± 0,02	0,61 ± 0,04	0,049
MDA	(µM)	0,32 ± 0,07	0,40 ± 0,07	0,131
MDA/Prot. Totali	(pmol/mg)	4,53 ± 1,12	5,14 ± 0,79	0,131
GSH	(µM)	2,14 ± 0,17	1,87 ± 0,14	0,281
DHEA	(pM)	725,29 ± 74,34	832,59 ± 106,83	0,263
Cortisolo	(nM)	25,49 ± 1,49	22,14 ± 2,65	0,206
DHEA/Cortisolo		0,034 ± 0,005	0,045 ± 0,007	0,044
Interleuchina 6	(pg/ml)	563,43 ± 31,38	522,44 ± 39,90	0,464
Linfociti	(%)	53,01 ± 1,55	48,46 ± 3,19	0,241
Gran. Neutrofili	(%)	39,49 ± 1,62	43,12 ± 3,02	0,481
Gran. Eosinofili	(%)	2,68 ± 0,38	1,78 ± 0,35	0,174
Gran. Basofili	(%)	0,86 ± 0,13	0,60 ± 0,20	0,187
Monociti	(%)	3,96 ± 0,53	6,04 ± 1,24	0,198
Neutrofili/Linfociti		0,81 ± 0,08	1,05 ± 0,16	0,361
Anti AOPP-BSA	(d.o.)	0,30 ± 0,02	0,24 ± 0,02	0,052

Tabella 4.3 Variazione dei parametri ematici tra gruppi di animali classificati in relazione ai valori ematici di aptoglobina (cutoff 0,4 mg/ml). Vengono evidenziati i parametri che differiscono tra i gruppi in modo significativo e che sono stati citati nel testo.

Il confronto è stato condotto tra il gruppo di animali con valori di aptoglobina inferiori a 0,4 mg/ml (di controllo) e quello con valori superiori a 0,4 mg/ml (con infiammazione acuta) (Huzzey *et al.*, 2009; Skinner *et al.*, 1991).

Tra gli animali di controllo sono stati esclusi gli animali che si trovavano nelle 3 settimane che precedono il parto (gruppo -3/-1). Il motivo di tale scelta è la differenza sostanziale di alcuni valori (in particolare del DHEA e DHEA/Cortisolo) evidenziata nei risultati precedenti (paragrafo 4.2.1) e l'assenza tra gli animali malati di soggetti in questa fase produttiva. Allo scopo di confrontare gruppi omogenei, anche le manze non sono state tenute in considerazione tra gli animali di controllo per i motivi di cui si è già accennato (paragrafo 4.2.1).

I risultati evidenziano che esiste una differenza significativa tra i due gruppi ($P < 0,001$) nei valori dell'aptoglobina. La concentrazione media nel gruppo di controllo è risultata essere particolarmente bassa (0,08 mg/ml) nonostante il cutoff sia stato definito ad un valore ben al di sopra di questo (0,4 mg/ml): questo suggerisce che la maggior parte della popolazione sana ha livelli ematici di aptoglobina prossimi a 0. Questo si sovrappone a quanto rilevato in diversi studi (Makimura and Suzuki, 1982; Conner *et al.*, 1986; Eckersall and Conner, 1988). Il valore medio riscontrato negli animali con infiammazione acuta risulta oltre 18 volte più elevato di quello di controllo; tuttavia questa sottopopolazione ha manifestato una distribuzione più omogenea. Anche in questa situazione non si riscontrano invece variazioni significative del valore di IL-6.

Le AOPP presentano variazioni significative tra i due gruppi, evidenziando valori più bassi negli animali di controllo (media 37,16 μM) rispetto a quelli con infiammazione acuta (media 46,83 μM) ($P < 0,05$). Stesso risultato si manifesta nella valutazione delle AOPP in rapporto alle proteine totali, dove i due valori sono rispettivamente 0,50 nmol/mg e 0,61 nmol/mg ($P < 0,05$). Anche in questo caso si può concludere quanto già visto nel paragrafo precedente riguardo questi parametri.

Anche il rapporto DHEA/Cortisolo risulta diverso nei due gruppi in modo statisticamente significativo ($P < 0,05$): negli animali di controllo il valore medio è più basso rispetto agli animali con infiammazione acuta. Al contrario della classificazione clinica, in questo caso non sono invece evidenziabili differenze nelle concentrazioni di DHEA tra i due gruppi. Va tenuto in considerazione che, in questa classificazione, 9 dei 12 animali che

presentavano una situazione clinica di infiammazione cronica sono risultati nel gruppo di controllo; questo è facilmente spiegabile dal fatto che, essendo l'aptoglobina una proteina di fase acuta positiva, essa tende ad aumentare durante il processo infiammatorio acuto e tornare a valori basali nella fase cronica. Il motivo dei livelli elevati di aptoglobina negli altri 3 animali è invece giustificabile dalla riacutizzazione o peggioramento del processo in atto, come illustrato nel paragrafo 4.3. L'aumento dei livelli del rapporto DHEA/cortisolo potrebbe quindi, anche in questo caso, suggerire un tentativo da parte dell'organismo di regolare il processo infiammatorio stesso nelle prime fasi della reazione. Anche in questa analisi il valore di IL-6, seppur non significativamente, risulta effettivamente più basso nel gruppo di animali che presenta valori di DHEA/cortisolo più elevati.

Risulta interessante, inoltre, la variazione di concentrazioni degli anticorpi anti AOPP-BSA. Le differenze tra i due gruppi non possono essere considerate significative, ma il valore di $P=0,052$ è prossimo a quello della significatività statistica. Si sottolinea ancora una volta il ruolo che questo indicatore potrebbe avere nella perpetuazione del processo infiammatorio. La concentrazione media più bassa negli animali con infiammazione acuta potrebbe indicare che gli anticorpi tendono a legarsi a proteine ossidate (probabilmente proteine legate alle malondialdeide, vista la correlazione evidenziata all'inizio di questo capitolo), determinando una diminuzione della forma libera titolabile nel torrente circolatorio. Queste ipotesi sono comunque molto precoci vista la scarsa quantità di dati a disposizione e la necessità di mettere a punto un sistema di quantificazione della malondialdeide più specifico.

5 CONCLUSIONI

I risultati della presente tesi supportano l'ipotesi che le AOPP siano prodotti dell'attivazione dei neutrofili e, come tali, indicatori di processo infiammatorio acuto. Il loro confronto con l'aptoglobina fa supporre che esse non risentano delle influenze alle quali questa proteina di fase acuta risulta sensibile (ad esempio: stress, parto) e che quindi possano rappresentare un indicatore più specifico di stress ossidativo dovuto ad infiammazione acuta. Inoltre, al contrario di altri parametri di stress ossidativo, esse non subiscono fluttuazioni significative nei vari stadi produttivi nella bovina da latte: ciò permetterebbe un confronto tra le concentrazioni ematiche nei vari soggetti indipendentemente dalla conoscenza della fase fisiologica in cui si trovano gli stessi.

Infine, i risultati emersi da questo lavoro confermerebbero l'ipotesi secondo la quale il motivo dell'aumento delle AOPP negli animali che manifestano riassorbimento embrionale, osservato da Celi e colleghi (2010), sia probabilmente da imputare a processi infiammatori acuti presenti in forma subclinica.

Le AOPP potrebbero quindi rappresentare un parametro da sfruttare per l'identificazione e la valutazione dei processi flogistici acuti presenti nelle prime fasi della gravidanza, che potrebbero portare a riassorbimento embrionale. In tale contesto diverrebbe indispensabile la determinazione di un livello soglia di AOPP, oltre al quale ipotizzare un processo infiammatorio in atto.

Di particolare rilievo risulta anche l'ipotesi che le AOPP possano perpetuare o aggravare il processo infiammatorio tramite la produzione di autoanticorpi, soprattutto visti i risvolti che ciò potrebbe avere nella prevenzione dell'insorgenza o della perpetuazione di patologie legate allo stress ossidativo. La correlazione emersa tra anticorpi anti AOPP-BSA e malondialdeide sembra supportare tale ipotesi, la cui conferma richiederà dovuti approfondimenti, in particolar modo in relazione al ruolo che questi anticorpi potrebbero avere nel determinismo delle problematiche in ambito riproduttivo.

Resta invece da valutare il ruolo del DHEA in ambito sia fisiologico che patologico. Il suo aumento nelle prime fasi del processo infiammatorio, riscontrato in questo studio, fa ipotizzare che esso possa assumere un ruolo protettivo nei confronti dell'organismo,

intervenendo nei primi stadi del processo flogistico allo scopo di regolare e coordinare la risposta immunitaria. Tuttavia, la scarsità e la diversità dei dati presenti in letteratura testimoniano la complessità dell'attività e del metabolismo di quest'ormone.

6 BIBLIOGRAFIA

Abe Y, Watanabe Y, Kimura S, 1994. The role of tumor necrosis factor receptors in cell signaling and significance of soluble form levels in the serum. *Surgery today*. **24**: 197-202.

Abo A, Webb MR, Grogan A, Segal AW, 1994. Activation of NADPH oxidase involves the dissociation of p21rac from its inhibitory GDP/GTP exchange protein (rhoGDI) followed by its translocation to the plasma membrane. *The biochemical journal*. **298**: 585-591.

Agarwal A, Gupta S, Sharma RK, 2005. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reproductive biology and endocrinology*. **3**:28.

Aggarwal BB, 2000. Tumor necrosis factors receptor associated signaling molecules and their role in activation of apoptosis, JNK and NF- κ B. *Annals of the rheumatic diseases*. **59** (suppl 1): i6-16.

Agner K, 1941. Verdoperoxidase. A ferment isolated from leukocytes. *Acta physiologica scandinavica*. **2** (suppl. 8): 1-62.

Aguggini G, Beghelli V, Clement MG, d'Angelo A, Debenedetti A, Facello C, Giulio LF, Guglielmino R, Lucaroni A, Maffeo G, Marongiu A, Naitana S, Nuvoli P, Piazza R, 1998. *Fisiologia degli animali domestici con elementi di etologia*. UTET, Torino.

Akbar AN, Lord JM, Salmon M, 2000. IFN- α and IFN- β : a link between immune memory and chronic inflammation. *Immunology today*. **21**: 337-342.

Akbar AN, Salmon M, 1997. Cellular environments and apoptosis: tissue microenvironments control activated T cell death. *Immunology today*. **18**. 72-76.

Alban L, Lawson LG, Agger JF, 1995. Foul in the foot (interdigital necrobacillosis) in Danish dairy cows-frequency and possible risk factors. *Preventive veterinary medicine*. **24**: 73-82.

Almeida PE, Weber PS, Burton JL, Zanella AJ, 2008. Depressed DHEA, and increased sickness response behaviours in lame dairy cows with inflammatory foot lesions. *Domestic animal endocrinology*. **34**: 89-99.

Alsemgeest SPM, Kalsbeek HC, Wensing T, Koeman JP, van Ederen AM, Gruys E, 1994. Concentrations of serum amyloid-A (SAA) and haptoglobin (Hp) as parameters of inflammatory diseases in cattle. *The veterinary quarterly* **16**: 21-23.

Alvarez B, Radi R, 2003. Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins. *Amino acids*. **25**: 295-311.

Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM, 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative disease of aging. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*. **90**: 7915-7922.

Anderson ME, 1997. Glutathione and glutathione delivery compounds. *Advances in pharmacology*. **38**: 65-78.

Andersson L, Bergman A, 1980. Pathology of bovine laminitis especially as regards vascular lesions. *Acta veterinaria scandinavica*. **21**: 559-566.

Andus T, Klebl F, Rogler G, Schölmerich J, Straub RH, 2000. Successful treatment of refractory ulcerative colitis with dehydroepiandrosterone (DHEA)-an open controlled pilot trial. *Gastroenterology*. **188**: A116.

Araghi-Niknam M, Zhang Z, Jiang S, Call O, Eskelson CD, Watson RR, 1997. Cytokine dysregulation and increased oxidation is prevented by dehydroepiandrosterone in mice infected with murine leukemia retrovirus. *Proceedings of the society for experimental biology and medicine*. **216**: 386-391.

Aragno M, Brignardello E, Tamagno E, gatto V, Danni O, Boccuzzi G, 1997. Dehydroepiandrosterone administration prevents the oxidative damage induced by acute hyperglycemia in rats. *Journal of endocrinology*. **155**: 233-240.

Arlt W, Callies F, van Vlijmen JC, Koehler I, Reincke M, Bidlingmaier M, Huebler D, Oettel M, Ernst M, Schulte HM, Allolio B, 1999. Dehydroepiandrosterone replacement in women with adrenal insufficiency. *New England journal of medicine*. **341**: 1013-1020.

Asai T, Okada M, Ono M, Irisawa T, Mori Y, Yokomizo Y, Sato S, 1993. Increased levels of tumor necrosis factor and interleukin 1 in bronchoalveolar lavage fluids from pigs infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Veterinary immunology and immunopathology*. **38**: 253-260.

Atabek ME, Keskin M, Yazici C, Kendirci M, Hatipoglu N, Koklu E, Kurtoglu S, 2006. Protein oxidation in obesity and insulin resistance. *European journal of pediatrics*. **165**: 753-756.

Atreya R, Mudter J, Finotto S, Müllberg J, Jostock T, Wirtz S, Schütz M, Bartsch B, Holtmann M, Becker C, Strand D, Czaja J, Schalaak JF, Lehr HA, Autschbach F, Schürmann G, Nishimoto N, Yoshizaki K, Ito H, Kishimoto T, Galle PR, Rose-John S, Neurath MF, 2000. Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nature medicine*. **6**: 583-588.

Ayala A, Herdon CD, Lehman DL, Ayala CA, Chaudry IH, 1996. Differential induction of apoptosis in lymphoid tissues during sepsis: variation in onset, frequency, and the nature of the mediators. *Blood*. **87**: 4261-4275.

Azuma T, Matsubara T, Shima Y, Haeno S, Fujimoto T, Tone K, Shibata N, Sakoda S, 1993. Neurosteroids in cerebrospinal fluid in neurologic disorders. *Journal of the neurological sciences*. **120**: 87-92.

Bagby GJ, Plessala KJ, Wilson LA, Thompson JJ, Nelson S, 1991. Divergent efficacy of antibody to tumor necrosis factor-alpha in intravascular and peritonitis models of sepsis. *The journal of infectious diseases*. **163**: 83-88.

Baggiolini M, 2001. Chemokines in pathology and medicine. *Journal of internal medicine*. **250**: 91-104.

Baker MA, Cerniglia GJ, Zaman A, 1990. Microtiter plate assay for the measurement of glutathione and glutathione disulfide in large numbers of biological samples. *Analytical biochemistry*. **190**: 360-365.

Baldus S, Eiserich JP, Mani A, Castro L, Figueroa M, Chumley P, Ma W, Tousson A, White CR, Bullard DC, Brennan ML, Lusic AJ, Moore KP, Freeman BA, 2001. Endothelial transcytosis of myeloperoxidase confers specificity to vascular ECM proteins as targets of tyrosine nitration. *The journal of clinical investigation*. **108**: 1759-1770.

Baroja ML, Ceuppens JL, van Damme J, Billiau A, 1988. Cooperation between an anti-T cell (anti-CD28) monoclonal antibody and monocyte-produced IL-6 in the induction of T cell responsiveness to IL-2. *Journal of immunology*. **141**: 1502-1507.

Bartoli M, Sies H, 1978. Reduced and oxidized glutathione efflux from liver. *FEBS letters*. **86**: 89-91.

Bauer ME, 2005. Stress, glucocorticoids and ageing of the immune system. *Stress*. **8**: 69-83.

Bdeir K, Cane W, Canziani G, Chaiken I, Weisel J, Koschinsky ML, Lawn RM, bannerman PG, Sachais BS, Kuo A, Hancock MA, Tomaszewski J, Raghunath PN, Ganz T, Higazi AA, Cines DB, 1999. Defensin promotes the binding of lipoprotein(a) to vascular matrix. *Blood*. **94**: 2007-2019.

Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA, 1990. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*. **87**: 1620-1624.

Befus AD, Mowat C, Gilchrist M, Hu J, Solomon S, Bateman A, 1999. Neutrophil defensins induce histamine secretion from mast cells: mechanisms of action. *Journal of immunology*. **163**: 947-953.

- Beg AA, Baltimore D**, 1996. An essential role for NF- κ B in preventing TNF α -induced cell death. *Science*. **274**: 782-784.
- Belvedere P, Gabai G, Dalla Valle L, Accorsi P, Trivoletti M, Colombo L, Bono G**, 1996. Occurrence of steroidogenic enzymes in the bovine mammary gland at different functional stages. *Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. **59**: 339-347.
- Ben-Nathan D, Padgett DA, Loria RM**, 1999. Androstenediol and dehydroepiandrosterone protect mice against lethal bacterial infections and lipopolysaccharide toxicity. *Journal of medical microbiology*. **48**: 425-431.
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L**, 2003. *Biochimica*, 5 edizione. Zanichelli, Bologna.
- Bergsten C**, 1994. Haemorrhages of the sole horn of dairy cows as a retrospective indicator of laminitis: an epidemiological study. *Acta veterinaria scandinavica*. **35**: 55-66.
- Berlett BS, Stadtman ER**, 1997. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *The journal of biological chemistry*. **272**: 20313-20316.
- Bernabucci U, Ronchi B, Lacetera N, Nardone A**, 2002. Markers of oxidative status in plasma and erythrocytes of transition dairy cows during hot season. *Journal of dairy science*. **85**: 2173-179.
- Bernabucci U, Ronchi B, Lacetera N, Nardone A**, 2005. Influence of body condition score on relationship between metabolic status and oxidative stress in periparturient dairy cows. *Journal of dairy Science*. **88**: 2017-2026.
- Beutler B, Cerami A**, 1986. Cachectin and tumor necrosis factor as two sides of the same biological coin. *Nature*. **32**: 584-588.
- Beutler B, Krochin N, Milsark IW, Luedke C, Cerami A**, 1986. Control of cachectin (tumor necrosis factor) synthesis: mechanisms of endotoxin resistance. *Science*. **232**: 977-980.
- Biron CA**, 2001. Interferons α and β as immune regulators-a new look. *Immunity*. **14**: 661-664.
- Bleier JI, Pillarisetty VG, Shah AB, DeMatteo RP**, 2004. Increased and long-term generation of dendritic cells with reduced function from IL-6-deficient bone marrow. *Journal of immunology*. **172**: 7408-7416.
- Blowey RW**, 2004. Lameness in the foot. In *Bovine medicine disease and husbandry of cattle*. Edited by: Andrews AH, Blowey RW, Boyd H, Eddy RG. Blackwell science, Oxford. 409-434.

- Bohr VA**, 2002. Repair of oxidative DNA damage in nuclear and mitochondrial DNA, and some changes with aging in mammalian cells. *Free radical biology and medicine*. **32**: 804-812.
- Bokoch GM, Bohl BP, Chuang TH**, 1994. Guanine nucleotide exchange regulates membrane translocation of Rac/Rho GTP-binding proteins. *The journal of biological chemistry*. **269**: 31674-31679.
- Bokoch GM, Diebold BA**, 2002. Current molecular models for NAPH oxidase regulation by Rac GTPase. *Blood*. **100**: 2692-2696.
- Branen JK, Davidson PM**, 2004. Enhancement of nisin, lysozyme and monolaurin antimicrobial activities by ethylenediaminetetraacetic acid and lactoferrin. *International journal of food microbiology*. **90**: 63-74.
- Brash AR**, 1999. Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *The journal of biological chemistry*. **274**: 23679-23682.
- Breuilé D, Malmezat T, Rosé F, Pouyet C, Obled C**, 1994. Assessment of tissue glutathione status during experimental sepsis. *Clinical nutrition*. **13**: 5.
- Brzozowski T, Konturek PC, Konturek SJ, Kwiecien S, Sliwowski Z, Pajdo R, Duda A, Ptak A, Hahn EG**, 2003. Implications of reactive oxygen species and cytokines in gastroprotection against stress-induced gastric damage by nitric oxide releasing aspirin. *International journal of colorectal disease*. **18**: 320-329.
- Buckingham JC**, 1996. Fifteenth Gaddum Memorial Lecture December 1994. Stress and the neuroendocrine-immune axis: the pivotal role of glucocorticoids and lipocortin 1. *British journal of pharmacology*. **118**: 1-19.
- Burger D, Dayer JM**, 2002. Cytokines, acute-phase proteins, and hormones: IL-1 and TNF- α production in contact-mediated activation of monocytes by T lymphocytes. *Annals of the New York academy of sciences*. **966**: 464-473.
- Butterworth AE, Wassom DL, Gleich GJ, Loegering DA, David JR**, 1979. Damage to schistosomula of *Schistosoma mansoni* induced directly by eosinophil major basic protein. *Journal of immunology*. **122**: 221-229.
- Capuco AV, Bright SA, Pankey JW, Wood DL, Miller RH, Bitman J**, 1992. Increased susceptibility to intramammary infection following removal of teat canal keratin. *Journal of dairy science*. **75**: 2126-2130.
- Carlos TM, Harlan JM**, 1994. Leukocyte-endothelial cell adhesion molecules. *Blood*. **84**: 1068-2101.

Castillo C, Hernandez J, Bravo A, Lopez-Alonso M, Pereira V, Benedito JL, 2005. Oxidative status during late pregnancy and early lactation in dairy cows. *The veterinary Journal*. **169**: 286-292.

Céballos-Picot I, Witko-Sarsat V, Merad-Boudia M, Nguyen AT, Thévenin M, Jaudon MC, Zingraff J, Verger C, Jungers P, Descamps-Latscha B, 1996. Glutathione antioxidant system as a marker of uremia progression and oxidative stress in chronic renal failure. *Free radicals biology & medicine*. **21**: 845-853.

Celi P, Merlo M, Da Dalt L, Stefani A, Barbato O, Gabai G, 2010. Relationship between late embryonic mortality and the increase of plasma advanced oxidised protein products (AOPP) in dairy cows. *Reproduction, fertility and development*. Accettato per la pubblicazione.

Chakraborty P, Ghosh D, Basu MK, 2001. Modulation of macrophage mannose receptor affects the uptake of virulent and avirulent *Leishmania donovani* promastigotes. *The journal of parasitology*. **87**: 1023-1027.

Chen Q, Wang WC, Bruce R, Li H, Schleider DM, Mulbury MJ, Bain MD, Wallace PK, Baumann H, Evans SS, 2004. Central role of IL-6 receptor signal-transducing chain gp130 in activation of L-selectin adhesion by fever-range thermal stress. *Immunity*. **20**: 59-70.

Chertov O, Michiel DF, Xu L, Wang JM, Tani K, Murphy WJ, Longo DL, Taub DD, Oppenheim JJ, 1996. Identification of defensin-1, defensin-2, and CAP37/azurocidin as T-cell chemoattractant proteins released from interleukin-8-stimulated neutrophils. *The journal of biological chemistry*. **271**: 2935-2940.

Chomarar P, Banchereau J, Davoust J, Palucka AK, 2000. IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nature immunology*. **1**: 510-514.

Chou MY, Hartvigsen K, Hansen LF, Fogelstrand L, Shaw PX, Boullier A, Binder CJ, Witztum JL, 2008. Oxidation-specific epitopes are important targets of innate immunity. *Journal of internal medicine*. **263**: 479-488.

Christeff N, Gherbi N, Mammes O, Dalle MT, Gharakhanian S, Lortholary O, Melchior JC, Nunez, 1997. Serum cortisol and DHEA concentrations during HIV infection. *Psychoneuroendocrinology*. **22**: S11-S18.

Circu ML, Aw TY, 2008. Glutathione and apoptosis. *Free radical research*. **42**: 689-706.

Conner JG, Eckersall PD, Doherty M, Douglas TA, 1986. Acute phase response and mastitis in the cow. *Research in veterinary science*. **41**. 126-128.

- Conner JG, Eckersall PD, Wiseman A, Aitchison TC, Douglas TA**, 1988. Bovine acute phase response following turpentine injection. *Research in veterinary science*. **44**: 82-88.
- Conner JG, Eckersall PD, Wiseman A, Bain RK, Douglas TA**, 1989. Acute phase response in calves following infection with *P. haemolytica*, *Ostertagia ostertagi* and endotoxin administration. *Research in veterinary science*. **47**: 203-207.
- Cook HT, Botto M**, 2006. Mechanisms of disease: the complement system and the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Nature clinical practice. Rheumatology*. **2**: 330-337.
- Corey EJ, Mehrotra MM, Khan AU**, 1987. Antiarthritic gold compounds effectively quench electronically excited singlet oxygen. *Science*. **236**: 68-69.
- Corletto F**, 2004. *Anestesia del cane e del gatto*. Poletto editore, Milano.
- Cupps TR, Fauci AS**, 1982. Corticosteroid-mediated immunoregulation in man. *Immunological reviews*. **65**: 133-155.
- Curnow SJ, Scheel-Toellner D, Jenkinson W, Raza K, Durrani OM, Faint JM, Rauz S, Wloka K, Pilling D, Rose-John S, Buckley CD, Murray PI, Salmon M**, 2004. Inhibition of T cell apoptosis in the aqueous humor of patients with uveitis by IL-6/soluble IL-6 receptor trans-signaling. *Journal of immunology*. **173**: 5290-5297.
- Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo G, Giustarini D, Milzani A**, 2009. Protein S-glutathionylation: a regulatory device from bacteria to humans. *Trends in biochemical sciences*. **34**: 85-96.
- Danenberg HD, Alpert G, Lustig S, Ben-Nathan D**, 1992. Dehydroepiandrosterone protects mice from endotoxin toxicity and reduces tumor necrosis factor production. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. **36**: 2275-2279.
- Das UN**, 1999. Essential fatty acids, lipid peroxidation and apoptosis. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids*. **61**: 157-163.
- Davies KJ**, 1987. Protein damage and degradation by oxygen radicals. General aspects. *The journal of biological chemistry*. **262**: 9895-9901.
- Dayer JM, Beutler B, Cerami A**, 1985. Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E₂ production by human synovial cells and dermal fibroblast. *The journal of experimental medicine*. **162**: 2163-2168.
- Daynes RA, Araneo BA, Ershler WB, Maloney C, Li GZ, Ryu SY**, 1993. Altered regulation of IL-6 production with normal aging. Possible linkage to the age-associated decline in dehydroepiandrosterone and its sulfated derivative. *Journal of immunology*. **150**: 5219-5230.

- de Carvalho DD, Sadok A, Bourgarel-Rey V, Gattacceca F, Penel C, Lehmann M, Kovacic H**, 2008. Nox1 downstream of 12-lipoxygenase controls cell proliferation but not cell spreading of colon cancer cells. *International journal of cancer*. **122**: 1757-1764.
- De Vries A**, 2006. Economic value of pregnancy in dairy cattle. *Journal of dairy science*. **89**: 3876-3885.
- Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ**, 1997. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *The biochemical journal*. **324**: 1-18.
- Decleva E, Dri P, Menegazzi R, Busetto S, Cramer R**, 2002. Evidence that TNF-induced respiratory burst of adherent PMN is mediated by integrin alpha(L)beta(2). *Journal of leukocyte biology*. **72**: 718-726.
- Deighton CM, Watson MJ, Walker DJ**, 1992. Sex hormones in postmenopausal HLA-identical rheumatoid arthritis discordant sibling pairs. *The journal of rheumatology*. **19**: 1663-1667.
- Delmann HD, Eurell JA**, 2000. *Istologia e anatomia microscopica veterinaria*. Casa editrice ambrosiana, Milano.
- Di Santo E, Foddi MC, Ricciardi-Castagnoli P, Mennini T, Ghezzi P**, 1996. DHEAS inhibits TNF production in monocytes, astrocytes and microglial cells. *Neuroimmunomodulation*. **3**: 285-288.
- Dianzani MU**, 1995. *Istituzioni di patologia generale*. UTET, Torino.
- Diehl S, Anguita J, Hoffmeyer A, Zapton T, Ihle JN, Fikrig E, Rincon M**, 2000. Inhibition of Th1 differentiation by IL-6 is mediated by SOCS1. *Immunity*. **13**: 805-815.
- Dillon JS**, 2005. Dehydroepiandrosterone, dehydroepiandrosterone sulfate and related steroids: their role in inflammatory, allergic and immunological disorders. Current drug targets. *Inflammation and allergy*. **4**: 377-385.
- Dinarello CA**, 1986. Interleukin-1: amino acid sequences, multiple biological activities and comparison with tumor necrosis factor (cachectin). *The year in immunology*. **2**: 68-89.
- Dinarello CA**, 1988. Biology of interleukin 1. *The FASEB journal*. **2**: 108-115.
- Dinauer MC, Orkin SH, Brown R, Jesaitis AJ, Parkos CA**, 1987. The glycoprotein encoded by the X-linked chronic granulomatous disease locus is a component of the neutrophil cytochrome b complex. *Nature*. **327**: 717-720.
- Doherty DE, Downey GP, Worthen GS, Haslett C, Henson PM**, 1988. Monocyte retention and migration in pulmonary inflammation. Requirement for neutrophils. *Laboratory investigation*. **59**: 200-213.

- Domigan NM, Charlton TS, Duncan MW, Winterbourn CC, Kettle AJ**, 1995. Chlorination of tyrosyl residues in peptides by myeloperoxidase and human neutrophils. *The journal of biological chemistry*. **270**: 16542-16548.
- Dröge W**, 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*. **82**: 47-95.
- Dröge W, Pottmeyer-Gerber C, Schmidt H, Nick S**, 1986. Glutathione augments the activation of cytotoxic T lymphocytes in vivo. *Immunobiology*. **172**: 151-156.
- Du C, Khalil MW, Sriram S**, 2001. Administration of dehydroepiandrosterone suppresses experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice. *Journal of immunology*. **167**: 7094-7101.
- Dziegielewska KM, Møller JE, Potter AM, Ek J, Lane MA, Saunders NR**, 2000. Acute-phase cytokines IL-1 β and TNF- α in brain development. *Cell tissue research*. **299**: 335-345.
- Echtenacher B, Falk W, Mannel DN, Krammer PH**, 1990. Requirement of endogenous tumor necrosis factor/cachectin for recovery from experimental peritonitis. *Journal of immunology*. **145**: 3762-3766.
- Eckersall PD, Conner JG**, 1988. Bovine and canine acute phase proteins. *Veterinary research communications*. **12**: 169-178.
- Edmonson PW, Bradley AJ**, 2004. Mastitis. In *Bovine medicine disease and husbandry of cattle*. Edited by: Andrews AH, Blowey RW, Boyd H, Eddy RG. Blackwell science, Oxford. 326-336.
- Egwang TG, Befus AD**, 1983. The role of complement in the induction and regulation of immune responses. *Immunology*. **51**: 207-224.
- Elsbach P, Weiss J**, 1988. Phagocytic cells: oxygen-independent antimicrobial systems. In *Inflammation: basic principles and clinical correlates*. Edited by: JI Gallin, IM Goldstein, R Snyderman. Raven press Ltd., New York. 445-470.
- Ernst M, Jenkins BJ**, 2004. Acquiring signaling specificity from the cytokine receptor gp130. *Trends in genetics*. **20**: 23-32.
- Eskandari MK, Bolgos G, Miller C, Nguyen DT, DeForge LE, Remick DG**, 1992. Anti-tumor necrosis factor antibody therapy fails to prevent lethality after cecal ligation and puncture or endotoxemia. *Journal of immunology*. **148**: 2724-2730.
- Etzioni A, Doerschuk CM, Harlan JM**, 1999. Of man and mouse: leukocyte and endothelial adhesion molecule deficiencies. *Blood*. **94**: 3281-3288.

Ezekowitz RA, Williams DJ, Koziel H, Armstrong MY, Warner A, Richards FF, Rose RM, 1991. Uptake of *Pneumocystis carinii* mediated by the macrophage mannose receptor. *Nature*. **351**: 155-158.

Fantone JC, Ward PA, 1982. Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. *The american journal of pathology*. **107**: 395-418.

Fialová L, Malbohan I, Kalousovà M, Soukupová J, Krofta L, Stípek S, Zima T, 2006. Oxidative stress and inflammation in pregnancy. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*. **66**: 121-127.

Filley WV, Kephart GM, Holley KE, Gleich GJ, 1982. Identification by immunofluorescence of eosinophil granule major basic protein in lung tissues of patients with bronchial asthma. *Lancet*. **2**: 11-16.

Filomeni G, Rotilo G, Ciriolo MR, 2002. Cell signaling and the glutathione redox system. *Biochemical pharmacology*. **64**: 1057-1064.

Forman HJ, Zhang H, Rinna A, 2009. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Molecular aspects of medicine*. **30**: 1-12.

Forsyth CB, Solovjov DA, Ugarova TP, Plow EF, 2001. Integrin $\alpha_{M\beta 2}$ -mediated cell migration to fibrinogen and its recognition peptides. *The journal of experimental medicine*. **193**: 1123-1133.

Fratlicelli A, Serrano CV, Bochner BS, Capogrossi MC, Zweier JL, 1996. Hydrogen peroxide and superoxide modulate leukocyte adhesion molecule expression and leukocyte endothelial adhesion. *Biochimica et biophysica acta*. **1310**: 251-259.

Fujii J, Iuchi Y, Okada F, 2005. Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system. *Reproductive biology and endocrinology*. **3**: 43.

Funk CD, 2001. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoids biology. *Science*. **294**: 1871-1875.

Gaàl T, Ribiczeyné P, Stadler K, Jakus J, Reiczigel J, Kövér P, Mézes M, Sümeghy L, 2006. Free radicals, lipid peroxidation and the antioxidant system in the blood of cows and newborn calves around calving. *Comparative Biochemistry and Physiology, PartB*. **143**: 391-396.

Gabai G, Marinelli L, Simontacchi C, Bono G, 2004. The increase in plasma C195 steroids in subcutaneous abdominal and jugular veins of dairy cattle during pregnancy is unrelated to estrogenic activity. *Steroids*. **69**: 121-127.

- Gabay C**, 2006. Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis research and therapy*. **8** (suppl. 2): S3.
- Garcia-Olmedo F, Molina A, Alamillo JM, Rodriguez-Palenzuela P**, 1998. Plant defense peptides. *Biopolymers*. **47**: 479-491.
- Gautam N, Herwald H, Hedqvist P, Lindbom L**, 2000. Signaling via β_2 integrins triggers neutrophil-dependent alteration in endothelial barrier function. *The journal of experimental medicine*. **191**: 1829-1839.
- Georgieva NV**, 2005. Oxidative stress as a factor of disrupted ecological oxidative balance in biological system-a review. *Bulgarian journal of veterinary medicine*. **8**: 1-11.
- Ghezzi P, Di Santo E, Sacco S, Foddi C, Barbaccia ML, Mennini T**, 2000. Neurosteroid levels are increased in vivo after LPS treatment and negatively regulate LPS-induced tumor necrosis factor production. *European cytokine network*. **11**: 464-469.
- Giovannini C, Filesi C, D'Archivio M, Scazzocchio B, Santangelo C, Masella R**, 2006. Polifenoli e difese antiossidanti endogene: effetti sul glutatione e sugli enzimi ad esso correlati. *Annali dell'istituto superiore della sanità*. **42**: 336-347.
- Giustizieri ML, Albanesi C, Scarponi C, De Pità O, Girolomoni G**, 2002. Nitric oxide donors suppress chemokine production by keratinocytes in vitro and in vivo. *The American journal of pathology*. **161**: 1409-1418.
- Godson DL, Campos M, Attah-Poku SK, Redmond MJ, Cordeiro DM, Sethi MS, Harland RJ, Babiuk LA**, 1996. Serum haptoglobin as an indicator of acute phase response in bovine respiratory disease. *Veterinary immunology and immunopathology*. **51**: 277-292.
- Gough PJ, Gordon S**, 2000. The role of scavenger receptors in the innate immune system. *Microbes and infection*. **2**: 305-311.
- Gounopoulos P, Merki E, Hansen LF, Choi SH, Tsimikas S**, 2007. Antibodies to oxidized low density lipoprotein: epidemiological studies and potential clinical applications in cardiovascular disease. *Minerva cardioangiologica*. **55**: 821-837.
- Gravett MG, Haluska GJ, Cook MJ, Novy MJ**, 1996. Fetal and maternal endocrine responses to experimental intrauterine infection in rhesus monkeys. *American journal of obstetrics and gynecology*. **174**: 1725-1731.
- Greenough PR, MacCallum FJ, Weaver AD**, 1981. *Lameness in cattle*. Wright, Bristol.
- Grenett HE, Danley DE, Strick CA, James LC, Otterness IG, Fuentes N, Nesbitt JE, Fuller GM**, 1991. Isolation and characterization of biologically active murine interleukin-6 produced in *Escherichia coli*. *Gene*. **101**: 267-271.

Gruys E, van Ederen AM, Alsemgeest SPM, Kalsbeek HC, Wensing T, 1993. Acute phase protein values in blood of cattle as indicator of animals with pathological processes. *Archiv für Lebensmittelhygiene*. **44**: 107-111.

Guazzo EP, Kirkpatrick PJ, Goodyer IM, Shiers HM, Herbert J, 1996. Cortisol, dehydroepiandrosterone (DHEA), and DHEA sulfate in the cerebrospinal fluid of man: relation to blood levels and the effects of age. *The journal of clinical endocrinology and metabolism*. **81**: 3951-3960.

Guerin P, El Mouatassim S, Menezo Y, 2001. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Human reproduction update*. **7**: 175-189.

Gupta S, Agarwal A, Banerjee J, Alvarez J, 2007. The role of oxidative stress in spontaneous abortion and recurrent pregnancy loss: a systematic review. *Obstetrical and gynecological survey*. **62**: 335-347.

Guzik TJ, Korbout R, Adamek-Guzik T, 2003. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *Journal of physiology and pharmacology*. **54(4)**: 469-487.

Hagiwara K, Yamanaka H, Hisaeda K, Taharaguchi S, Kirisawa R, Iwai H, 2001. Concentrations of IL-6 in serum and whey from healthy and mastitic cows. *Veterinary research communications*. **25**: 99-108.

Halliwell B, Gutteridge JMC, 1998. *Free radicals in biology and medicine*, 3rd edition. Oxford science, Oxford.

Hardie EM, 2000. Recognition of pain behavior in animals. In *Animal pain: a practice-oriented approach to an effective pain control in animals*. Edited by: Hellbrekers LJ, Van der Wees. Utrecht, The Netherlands.

Havelock JC, Auchus RJ, Rainey WE, 2004. The rise in adrenal androgen biosynthesis: adrenarche. *Seminars in reproductive medicine*. **22**: 337-347.

Havemann K, Janoff A, 1978. *Neutral proteases of human polymorphonuclear leukocytes-biochemistry, physiology and clinical significance*. Urban and Schwarzenberg, Inc., Baltimore.

Hayashi F, Tamura H, Yamada J, Kasai H, Suga T, 1994. Characteristics of the hepatocarcinogenesis caused by dehydroepiandrosterone, a peroxisome proliferator, in male F-344 rats. *Carcinogenesis*. **15**: 2215-2219.

Hazen SL, d'Avignon A, Anderson MM, Hsu FF, Heinecke JW, 1998a. Human neutrophils employ the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride system to oxidize α -amino acids to a family of reactive aldehydes. Mechanistic studies identifying labile

intermediates along the reaction pathway. *The journal of biological chemistry*. **273**: 4997-5005.

Hazen SL, Hsu FF, d'Avignon A, Heinecke JW, 1998b. Human neutrophils employ myeloperoxidase to convert α -amino acids to a battery of reactive aldehydes: a pathway for aldehyde generation at sites of inflammation. *Biochemistry*. **37**: 6864-6873.

Hazen SL, Hsu FF, Mueller DM, Crowley JR, Heinecke JW, 1996. Human neutrophils employ chlorine gas as an oxidant during phagocytosis. *Journal of clinical investigation*. **98**: 1283-1289.

Heinecke JW, Li W, Daehnke HL III, Goldstein JA, 1993a. Dityrosine, a specific marker of oxidation, is synthesized by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide system of human neutrophils and macrophages. *The journal of biological chemistry*. **268**: 4069-4077.

Heinecke JW, Li W, Francis GA, Goldstein JA, 1993b. Tyrosyl radical generated by myeloperoxidase catalyzes the oxidative cross-linking of proteins. *The journal of clinical investigation*. **91**: 2866-2872.

Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F, 2003. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signaling and its regulation. *Biochemical journal*. **374**: 1-20.

Hellsten Y, Frandsen U, Ørthenblad N, Sjødin B, Richter E, 1997. Xanthine oxidase in human skeletal muscle following eccentric exercise: a role in inflammation. *Journal of physiology*. **498.1**: 239-248.

Henderson WR Jr, 1991. Eicosanoids and platelet-activating factor in allergic respiratory diseases. *The american review of respiratory disease*. **143**: S86-90.

Henderson WR Jr, 1994. The role of leukotrienes in inflammation. *Annals of internal medicine*. **121**: 684-697.

Hibbit KG, Craven N, Batten EH, 2004. Anatomy, physiology and immunology of the udder. In *Bovine medicine disease and husbandry of cattle*. Edited by: Andrews AH, Blowey RW, Boyd H, Eddy RG. Blackwell science, Oxford. 311-325.

Higazi AA, Lavi E, Bdeir K, Ulrich AM, Jamieson DG, rader DJ, Usher DC, Kane W, ganz T, Cines DB, 1997. Defensin stimulates the binding of lipoprotein (a) to human vascular endothelial and smooth muscle cells. *Blood*. **89**: 4290-4298.

Himmelfarb J, Lazarus JM, Hakim R, 1991. Reactive oxygen species production by monocytes and polymorphonuclear leukocytes during dialysis. *American journal of kidney diseases*. **17**: 271-276.

Hirsch RL, 1982. The complement system: its importance in the host response to viral infection. *Microbiological review*. **46**: 71-85.

Hixenbaugh EA, Goeckler ZM, Papaiya NN, Wysolmerski RB, Silverstein SC, Huang AJ, 1997. Chemoattractant-stimulated neutrophils induce regulatory myosin light chain phosphorylation and isometric tension development in endothelial cells. *The american journal of Physiology*. **273**: H981-H988.

Hoidal JR, 2001. Reactive oxygen species and cell signaling. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. **25**: 661-663.

Holvoet P, Collen D, 1997. Beta-VLDL hypercholesterolemia relative to LDL hypercholesterolemia is associated with higher levels of oxidized lipoproteins and a more rapid progression of coronary atherosclerosis in rabbits. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. **17**: 2376-2382.

Horiuchi S, Araki N, Morino Y, 1991. Immunochemical approach to characterize advanced glycation and products of the Maillard reaction. Evidence for the presence of a common structure. *The journal of biological chemistry*. **266**: 7329-7332.

Huie RE, Padmaja S, 1993. The reaction of NO with superoxide. *Free radical research communications*. **18**: 195-199.

Hum S, Koski KG, Hoffer LJ, 1992. Varied protein intake alters glutathione metabolism in rats. *Journal of nutrition*. **122**:2010-2018.

Hum S, Robitaille L, Hoffer LJ, 1991. Plasma glutathione turnover in the rat: effect of fasting and buthionine sulfoximine. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. **69**: 581-587.

Hurst SM, Wilkinson TS, McLoughlin RM, Jones S, Horiuchi S, Yamamoto N, Rose-John S, Fuller GM, Topley N, Jones SA, 2001. IL-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation. *Immunity*. **14**: 705-714.

Huzzey JM, Duffield TF, LeBlanc SJ, Veira DM, Weary DM, von Keyserlingk MA, 2009. Short communication: haptoglobin as an early indicator of metritis. *Journal of dairy science*. **92**: 621-625.

Iborra A, Palacio JR, Martinez P, 2005. Oxidative stress and autoimmune response in the infertile woman. *Chemical immunology and allergy*. **88**: 150-162.

Ignarro LJ, 2002. Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. *Journal of physiology and pharmacology*. **53**: 503-514.

Imlay JA, Linn S, 1988. DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science*. **240**: 1302-1309.

Ischiropoulos H, 1998. Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. *Archives of biochemistry and biophysics*. **356**: 1-11.

Ishikawa Y, Nakada K, Hagiwara K, Kirisawa R, Iwai H, Moriyoshi M, Sawamukai Y, 2004. Changes in interleukin-6 concentration in peripheral blood of pre and postpartum dairy cattle and its relationship to postpartum reproductive diseases. *The journal of veterinary medical science*. **66**: 1403-1408.

Itabe H, Yamamoto H, Imanaka T, Shimamura K, Uchiyama H, Kimura J, Sanaka T, Hata Y, Takano T, 1996. Sensitive detection of oxidatively modified low density lipoprotein using a monoclonal antibody. *Journal of lipid research*. **37**: 45-53.

Iyer S, Lönnerdal B, 1993. Lactoferrin, lactoferrin receptors and iron metabolism. *European journal of clinical nutrition*. **47**: 232-241.

Jacob JS, Cistola DP, Hsu FF, Muzaffar S, Mueller DM, Hazen SL, Heinecke JW, 1996. Human phagocytes employ the myeloperoxidase-hydrogen peroxide system to synthesize dityrosine trityrosine, pulcherosine, and isodityrosine by a tyrosyl radical-dependent pathway. *The journal of biological chemistry*. **271**: 19950-19956.

Jakobsson PJ, Odlander B, Steinhilber D, Rosé A, Claesson HE, 1991. Human B Lymphocytes possess 5-lipoxygenase activity and convert arachidonic acid to leukotriene B₄. *Biochemical and biophysical research communications*. **178**: 302-308.

Jenkins BJ, Grail D, Inglese M, quilici C, Bozinovski S, Wong P, Ernst M, 2004. Imbalanced gp130-dependent signaling in macrophages alters macrophage colony-stimulating factor responsiveness via regulation of c-fms expression. *Molecular and cellular biology*. **24**: 1453-1463.

Jenner P, 2003. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Annals of neurology*. **53** (suppl.3):S26-S38.

Jin T, Xu X, Hereld D, 2008. Chemotaxis, chemokine receptors and human disease. *Cytokine*. **44**: 1-8.

Jones SA, Rose-John S, 2002. The role of soluble receptors in cytokine biology: the agonistic properties of the sIL-6R/IL-6 complex. *Biochimica et biophysica acta*. **1592**: 251-263.

Kalousova M, Skrha J, Zima T, 2002. Advanced glycation end products and advanced oxidation protein products in patients with diabetes mellitus. *Physiological research*. **51**: 597-604.

Kalousova M, Zima T, Tesar V, Dusilova-Sulkova S, Skrha J, 2005. Advanced glycoxidation end products in chronic diseases-clinical chemistry and genetic background. *Mutation research*. **579**: 37-46.

- Kaneda H, Taguchi J, Ogasawara K, Aizawa T, Ohno M**, 2002. Increased level of advanced oxidation protein products in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis*. **162**: 221-225.
- Kaplan MH, Volanakis JE**, 1974. Interaction of C-reactive protein complexes with the complement system. I. Consumption of human complement associated with the reaction of C-reactive protein with pneumococcal C-polysaccharide and with choline phosphatides, lecithin and sphingomyelin. *Journal of immunology*. **112**: 2135-2147.
- Kaplanski G, Marin V, Montero-Julian F, Mantovani A, Farnarier C**, 2003. IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. *Trends in immunology*. **24**: 25-29.
- Kaplowitz N, Fernández-Checa JC, Kannan R, Garcia-Ruiz C, Ookhtens M, Yi JR**, 1996. GSH transporters: molecular characterization and role in GSH homeostasis. *Biological chemistry Hoppe-Seyler*. **377**: 267-273.
- Karck U, Peters T, Decker K**, 1988. The release of tumor necrosis factor from endotoxin-stimulated rat Kupffer cells is regulated by prostaglandin E2 and dexamethasone. *Journal of hepatology*. **7**: 352-361.
- Katsuyama M, Fan C, Yabe-Nishimura C**, 2002. NADPH oxidase is involved in prostaglandin F2alpha-induced hypertrophy of vascular smooth muscle cells: induction of NOX1 by PGF2alpha. *The journal of biological chemistry*. **277**: 13438-13442.
- Kazatchkine MD, Nydegger VE**, 1982. The human alternative complement pathway: biology and immunopathology of activation and regulation. *Progress in allergy*. **30**: 193-234.
- Kern JA, Lamb Rj, Reed JC, Daniele RP, Nowell PC**, 1988. Dexamethasone inhibition of interleukin 1 beta production by human monocytes. Posttranscriptional mechanisms. *Journal of clinical investigation*. **81**: 237-244.
- Kim C, Dinauer MC**, 2006. Impaired NADPH oxidase activity in Rac2-deficient murine neutrophils does not result from defective translocation of p47phox and p67phox and can be rescued by exogenous arachidonic acid. *Journal of leukocyte biology*. **79**: 223-234.
- Kim IK, Lee JH, Kim HS, Kwon OJ, Shim BS**, 1995. A novel function of haptoglobin: haptoglobin-haemoglobin complex induces apoptosis of hepatocarcinomatous hep 3B cells. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*. **55**: 529-535.
- Kimura M, Tanaka S, Yamada Y, Kiuchi Y, Yamakawa T, Sekihara H**, 1998. Dehydroepiandrosterone decreases serum tumor necrosis factor-alpha and restores insulin sensitivity: independent effect from secondary weight reduction in genetically obese Zucker fatty rats. *Endocrinology*. **139**: 3249-3253.

- Kimura T, Iwase M, Kondo G, Watanabe H, Ohashi M, Ito D, Nagumo M**, 2003. Suppressive effect of selective cyclooxygenase-2 inhibitor on cytokine release in human neutrophils. *International immunopharmacology*. **3**: 1519-1528.
- Kishimoto T, Akira S, Narazaki M, Taga T**, 1995. Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood*. **86**: 1243-1254.
- Klebanoff SJ**, 1970. Myeloperoxidase: contribution to the microbicidal activity of intact leukocytes. *Science*. **169**: 1095-1097.
- Klebanoff SJ**, 2005. Myeloperoxidase: friend and foe. *Journal of leukocyte biology*. **77**: 598-625.
- Koppenol WH, Moreno JJ, Pryor WA, Ischiropoulos H, Beckman JS**, 1992. Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chemical research in toxicology*. **5**: 834-842.
- Kreck ML, Freeman JL, Abo A, Lambeth JD**, 1996. Membrane association of Rac is required for high activity of the respiratory burst oxidase. *Biochemistry*. **35**: 15683-15692.
- Krokan HE, Standal R, Slupphaug G**, 1997. DNA glycosylases in the base excision repair of DNA. *Biochemistry journal*. **325**: 1-16.
- Kumar V, Abbas AK, Fausto N**, 2005. *Le basi patologiche delle malattie*. Elsevier Italia, Milano.
- Kurien BT, Hensley K, Bachmann M, Scofield RH**, 2006. Oxidatively modified autoantigens in autoimmune diseases. *Free radical biology & medicine*. **41**: 549-556.
- La Flamme AC, Pearce EJ**, 1999. The absence of IL-6 does not affect Th2 cell development in vivo, but does lead to impaired proliferation, IL-2 receptor expression, and B cell responses. *Journal of immunology*. **162**: 5829-5837.
- Labrie F, Diamond P, Cusan L, Gomez JL, Belanger A, Candas B**, 1997. Effect of 12-month dehydroepiandrosterone replacement therapy on bone, vagina, and endometrium in postmenopausal women. *Journal of clinical endocrinology and metabolism*. **82**: 3498-3505.
- Labrie F, Luu-The V, Belanger A, Lin S-X, Simard J, Pelletier G, Labrie C**, 2005. Is dehydroepiandrosterone a hormone? *Journal of endocrinology*. **187**: 169-196.
- Lahita RG, Bradlow HL, Ginzler E, Pang S, New M**, 1987. Low plasma androgens in women with systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism*. **30**: 241-248.
- Lapouge K, Smith SJ, Walker PA, Gamblin SJ, Smerdon SJ, Rittinger K**, 2000. Structure of the TPR domain of p67phox in complex with Rac-GTP. *Molecular cell*. **6**: 899-907.

- Largent BL, Walton KM, Hoppe CA, Lee YC, Schnaar RL**, 1984. Carbohydrate-specific adhesion of alveolar macrophages to mannose-derivatized surfaces. *The journal of biological chemistry*. **259**: 1764-1769.
- Learn DB, Fried VA, Thomas EL**, 1990. Taurine and hypotaurine content of human leukocytes. *Journal of leukocyte biology*. **48**: 174-182.
- Lehrer RI, Barton A, Daher KA, Harwig SS, Ganz T, selsted ME**, 1989. Interaction of human defensins with *Escherichia coli*. Mechanism of bactericidal activity. *The journal of clinical investigation*. **84**: 553-561.
- Lehrer RI, Lichtenstein AK, Ganz T**, 1993. Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Annual review of immunology*. **11**: 105-128.
- Lemansky P, Gerecitano-Schimidek M, Das RC, Schmidt B, Hasilik A**, 2003. Targeting myeloperoxidase to azurophilic granules in HL-60 cells. *Journal of leukocyte biology*. **74**: 542-550.
- Lentsch AB, Ward PA**, 2000. Regulation of inflammatory vascular damage. *The journal of pathology*. **190**: 343-348.
- Leonard FC, O'connel J, O'farrel K**, 1994. Effects of different housing conditions on behavior and foot lesions in Friesian heifers. *Veterinary records*. **134**: 490-494.
- Levay PF, Viljoen M**, 1995. Lactoferrin: a general review. *Haematologica*. **80**: 252-267.
- Levy BD, Serhan CN**, 2002. Polyisoprenyl phosphates: natural anti-inflammatory lipid signals. *Cellular and molecular life sciences*. **59**: 729-741.
- Liao F, Huynh HK, Eiroa A, Greene T, Polizzi E, Muller WA**, 1995. Migration of monocytes across endothelium and passage through extracellular matrix involve separate molecular domains of PECAM-1. *The journal of experimental medicine*. **182**: 1337-1343.
- Liles WC, Klebanoff SJ**, 1995. Regulation of apoptosis in neutrophils: Fas track to death? *Journal of immunology*. **155**: 3289-3291.
- Lindahl T**, 1993. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*. **362**: 709-715.
- Loft S, Danielsen PH, Mikkelsen L, Risom L, Forchhammer L, Møller P**, 2008. Biomarkers of oxidative damage to DNA and repair. *Biochemical society transactions*. **36**: 1071-1076.
- Loos M**, 1982. The classical complement pathway: mechanism of activation of the first component by antigen-antibody complexes. *Progress in allergy*. **30**: 135-192.

- Loria RM, Padgett DA, Huynh PN**, 1996. Regulation of the immune response by dehydroepiandrosterone and its metabolites. *The journal of endocrinology*. **150** (suppl.): S209-S220.
- Loughrey CM, Young IS, Lightbody JH, McMaster D, McNamee PT, Trimble ER**, 1994. Oxidative stress in haemodialysis. *QJM*. **87**: 679-683.
- Luchtefeld M, Drexler H, Schieffer B**, 2003. 5.Lipoxygenase is involved in the angiotensin II-induced NAD (P)H-oxidase activation. *Biochemical and biophysical research communication*. **308**: 668-672.
- Lucy MC**, 2007. Fertility in high producing dairy cows: reasons for decline and corrective strategies for sustainable improvement. *Society of reproduction and fertility supplement*. **64**: 237-254.
- Lykkesfeldt J, Svendsen O**, 2007. Oxidants and antioxidants in diseases: oxidative stress in farm animals. *The veterinary journal*. **173**: 502-511.
- Majno G, Palade GE**, 1961. Studies on inflammation. 1. The effect of histamine and serotonin on vascular permeability: an electron microscopic study. *The journal of biophysical and biochemical cytology*. **11**: 571-605.
- Makimura S, Suzuki N**, 1982. Quantitative determination of bovine serum haptoglobin and its elevation in some inflammatory diseases. *Nippon juigaku zasshi. The japanese journal of veterinary science*. **44**: 15-21.
- Malmezat T, Breuillé D, Capitan P, Mirand PP, Obled C**, 2000. Glutathione turnover is increased during the acute phase of sepsis in rats. *The journal of nutrition*. **130**: 1239-1246.
- Maninger N, Wolkowitz OM, Reus VI, Epel ES, Mellon SH**, 2009. Neurobiological and neuropsychiatric effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulfate (DHEAS). *Frontiers in neuroendocrinology*. **30**: 65-91.
- Mannel DN, Echtenacher B**, 2000. TNF in the inflammatory response. *Chemical immunology*. **74**: 141-161.
- Manson FJ, Leaver JD**, 1988. The influence of dietary protein intake and of hoof trimming on lameness in dairy cattle. *Animal production*. **47**: 191-199.
- Marcinkiewicz J**, 1997. Regulation of cytokine production by eicosanoids and nitric oxide. *Archivum immunologiae et therapeutiae experimentalis*. **45**: 163-167.
- Marcinkiewicz J, Chain BM**, 1993. Differential regulation of cytokine production by nitric oxide. *Immunology*. **80**: 146-150.
- Marcinkiewicz J, Grabowska A, Chain BM**, 1996. Is there a role for nitric oxide in regulation of T cell secretion of IL-2? *Journal of immunology*. **156**: 4617-4621.

- Marin V, Montero-Julian FA, Gres S, Boulay V, Bongrand P, Farnarier C, Kaplanski G**, 2001. The IL-6/soluble IL-6R α autocrine loop of endothelial activation as an intermediate between acute and chronic inflammation: an experimental model involving thrombin. *Journal of immunology*. **167**: 3435-3442.
- Marinelli L, Trevisi E, Da Dalt L, Merlo M, Bertoni G, Gabai G**, 2007. Dehydroepiandrosterone secretion in dairy cattle is episodic and unaffected by ACTH stimulation. *Journal of endocrinology*. **194**: 627-635.
- Marodi L, Korchak HM, Johnston RB Jr**, 1991. Mechanisms of host defense against *Candida* species. I. Phagocytosis by monocytes and monocyte-derived macrophages. *Journal of immunology*. **146**: 2783-2789.
- Marrack P, Kappler J, Mitchell T**, 1999. Type I interferons keep activated T cells alive. *The journal of experimental medicine*. **189**: 521-530.
- Marx C, Petros S, Bornstein SR**, 2003. Adrenocortical hormones in survivors and nonsurvivors of severe sepsis: diverse time course of dehydroepiandrosterone, dehydroepiandrosterone-sulfate, and cortisol. *Critical care medicine*. **31**: 1382-1388.
- Masi AT, Josipovic DB, Jefferson WE**, 1984. Low adrenal androgenic-anabolic steroids in women with rheumatoid arthritis (RA): gas-liquid chromatographic studies of RA patients and matched normal control women indicating decreased 11-deoxy-17-ketosteroid excretion. *Seminars in arthritis and rheumatism*. **14**: 1-23.
- Matsuura E, Hughes GR, Khanashta MA**, 2008. Oxidation of LDL and its clinical implication. *Autoimmunity reviews*. **7**: 558-566.
- McEver RP**, 1994. Selectins. *Current opinion in immunology*. **6**: 75-84.
- McLoughlin RM, Witowski J, Robson RL, Wilkinson TS, Hurst SM, Williams AS, Williams JD, Rose-John S, Jones SA, Topley N**, 2003. Interplay between IFN-gamma and IL-6 signaling governs neutrophil trafficking and apoptosis during acute inflammation. *The journal of clinical investigation*. **112**: 598-607.
- Meager A**, 1987. Quantification of interferons by anti-viral assays and their standardization. In: *Lymphokines and interferons, a practical approach*. Edited by: Clemens MJ, Morris AG, Gearing AJH. IRL Press, Oxford. 129-147.
- Medzhitov R, Janeway CA Jr**, 2002. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science*. **296**: 298-300.
- Meister A**, 1994a. Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals. *The journal of biological chemistry*. **269**: 9397-9400.
- Meister A**, 1994b. Glutathione, ascorbate, and cellular protection. *Cancer research*. **54** (7 suppl.): 1969S-1975S.

- Meister A**, 1995. Mitochondrial changes associated with glutathione deficiency. *Biochimica et biophysica acta*. **1271**: 35-42.
- Meister A, Anderson ME**, 1983. Glutathione. *Annual review of biochemistry*. **52**: 711-760.
- Melnicoff MJ, Horan PK, Morahan PS**, 1989. Kinetics of changes in peritoneal-cell populations following acute inflammation. *Cellular immunology*. **118**:178-191.
- Michel T, Feron O.**, 1997. Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *The journal of clinical investigation*. **100**: 2146-2152.
- Modur V, Li Y, Zimmerman GA, Prescott Sm, McIntyre TM**, 1997. Retrograde inflammatory signaling from neutrophils to endothelial cells by soluble interleukin-6 receptor alpha. *The journal of clinical investigation*. **100**: 2752-2756.
- Mohan PF, Cleary MP**, 1991. Short-term effects of dehydroepiandrosterone treatment in rats on mitochondrial respiration. *Journal of nutrition*. **121**. 240-250.
- Moller IM, Kristensen BK**, 2004. Protein oxidation in plant mitochondria as a stress indicator. *Photochemical and photobiological science*. **3**: 730-735.
- Moore DA, Berry SL, Truscott ML, Koziy V**, 2001. Efficacy of a nonantimicrobial cream administered topically for treatment of digital dermatitis in dairy cattle. *Journal of american veterinary medical association*. **219**: 1435-1438.
- Mosser DM**, 2003. The many faces of macrophage activation. *Journal of leukocyte biology*. **73**: 209-212.
- Muller WA**, 1999. Leukocyte-endothelial cell adhesion molecules in transendothelial migration, 3rd edition. In *Inflammation: basic principles and clinical correlates*. Edited by: Gallin JI and Snyderman R. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 585-592.
- Muller WA**, 2002. Leukocyte-endothelial cell interactions in the inflammatory response. *Laboratory investigations*. **82**: 521-533.
- Munck A, Guyre PM**, 1986. Glucocorticoid physiology, pharmacology and stress. *Advances in experimental medicine and biology*. **196**: 81-96.
- Murakami M, Hibi M, Nakagawa N, Nakagawa T, Yasukawa K, Yamanishi K, Taga T, Kishimoto T**, 1993. IL-6-induced homodimerization of gp130 and associated activation of a tyrosine kinase. *Science*. **260**: 1808-1810.
- Narimatsu M, Maeda H, Itoh S, Atsumi T, Ohtani T, Nishida K, Itoh M, Kamimura D, Park SJ, Mizuno K, Miyazaki J, Hibi M, Ishihara K, Nakajima K, Hirano T**, 2001. Tissue-specific autoregulation of the stat3 gene and its role in interleukin-6-induced survival signals in T cells. *Molecular and cellular biology*. **21**: 6615-6625.

Nathan C, 1991. Mechanisms and modulation of macrophage activation. *Behring institute mitteilungen*. Feb: 200-207.

Nathan C, 2002. Points of control in inflammation. *Nature*. **420**: 846-852.

Nguyen AT, Lethias C, Zingraff J, Herbelin A, Naret C, Descamps-Latscha B, 1985. Hemodialysis membrane-induced activation of phagocyte oxidative metabolism detected *in vivo* and *in vitro* within microamounts of whole blood. *Kidney international*. **28**: 158-167.

Nicod LP, 1993. Cytokines 1. Overview. *Thorax*. **48**: 660-667.

Nieschlag E, Loriaux DL, Ruder HJ, Zucker IR, Kirschner MA, Lipsett MB, 1973. The secretion of dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulphate in man. *Journal of endocrinology*. **57**: 123-134.

Nilsson SA, 1963. Clinical, morphological and experimental studies of laminitis in cattle. *Acta veterinaria scandinavica*. **4**, sup 1: 9-304.

Niu XF, Smith CW, Kubes P, 1994. Intracellular oxidative stress induced by nitric oxide synthesis inhibition increases endothelial cell adhesion molecules to neutrophils. *Circulation research*. **74**: 1133-1140.

Noakes DE, Wallace L, Smith GR, 1991. Bacterial flora of the uterus of cows after calving on two hygienically contrasting farms. *The veterinary record*. **128**: 440-442.

Noyan T, Güler A, Sekeroglu MR, Kamaci M, 2006. Serum advanced oxidation protein products, myeloperoxidase and ascorbic acid in pre-eclampsia and eclampsia. *Australian and New Zealand journal of obstetrics and gynaecology*. **46**: 486-491.

O'Donnel MC, Ackerman SJ, Gleich GJ, Thomas LL, 1983. Activation of basophil and mast cell histamine release by eosinophil granule major basic protein. *The journal of experimental medicine*. **157**: 1981-1991.

O'Riordan DM, Standing JE, Limper AH, 1995. *Pneumocystis carinii* glycoprotein A binds macrophage mannose receptors. *Infection and immunity*. **63**: 779-784.

Ohshima S, Saeki Y, Mima T, Sasai M, Nishioka K, Nomura S, Kopf M, Katada Y, Tanaka T, Suemura M, Kishimoto T, 1998. Interleukin 6 plays a key role in the development of antigen-induced arthritis. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*. **95**: 8222-8226.

Oliviero S, Morrone G, Cortese R, 1987. The human haptoglobin gene: transcriptional regulation during development and acute phase induction. *The EMBO journal*. **6**: 1905-1912.

- Opsomer G, Gröhn YT, Hertl J, Coryn M, Deluyker H, de Kruif A**, 2000. Risk factors for post partum ovarian dysfunction in high producing dairy cows in Belgium. A field study. *Theriogenology*. **53**: 841-857.
- Orsi NM**, 2008. Cytokine networks in the establishment and maintenance of pregnancy. *Human fertility*. **11**:222-230.
- Orsi NM, Tribe RM**, 2008. Cytokine networks and the regulation of uterine function in pregnancy and parturition. *Journal of neuroendocrinology*. **20**: 462-469.
- Ossent P**, 1995. The pathology of digital disease. *Cattle practice*. **3**: 263.
- Paape M, Mehrzad J, Zhao X, Detilleux J, Burvenich C**, 2002. Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*. **7**: 109-121.
- Padgett DA, Loria RM**, 1998. Endocrine regulation of murine macrophage function: effects of dehydroepiandrosterone, androstenediol, and androstenetriol. *Journal of neuroimmunology*. **84**: 61-68.
- Palacio JR, Iborra A, Ulcova-Gallova Z, Badia R, Martinez P**, 2006. The presence of antibodies to oxidative modified proteins in serum from polycystic ovary syndrome patients. *Clinical and experimental immunology*. **144**: 217-222.
- Palinski W, Hörkkö S, Miller E, Steinbrecher UP, Powell HC, Curtiss LK, Witztum JL**, 1996. Cloning of monoclonal autoantibodies to epitopes of oxidized lipoproteins from apolipoprotein E-deficient mice. Demonstration of epitopes of oxidized low density lipoprotein in human plasma. *The journal of clinical investigation*. **98**:800-814.
- Palinski W, Koschinsky T, Butler SW, Miller E, Vlassara H, Cerami A, Witztum JL**, 1995. Immunological evidence for the presence of advanced glycosylation end products in atherosclerotic lesions of euglycemic rabbits. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. **15**: 571-582.
- Palinski W, Rosenfeld ME, Ylä-Herttuala S, Gurtner GC, Socher SS, Butler SW, Parthasarathy S, Carew TE, Steinberg D, Witztum JL**, 1989. Low density lipoprotein undergoes oxidative modification in vivo. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*. **86**: 1372-1376.
- Palinski W, Witztum JL**, 2000. Immune responses to oxidative neoepitopes on LDL and phospholipids modulate the development of atherosclerosis. *Journal of internal medicine*. **247**: 371-380.
- Pan J, Xia L, Yao L, McEver RP**, 1998. Tumor necrosis factor-alpha- or lipopolysaccharide-induced expression of the murine P-selectin gene in endothelial cells involves novel kappaB sites and variant activating transcription factor/cAMP response element. *The journal of biological chemistry*. **273**: 10067-10077.

Parker LN, Odell WD, 1980. Control of adrenal androgen secretion. *Endocrine review*. **1**: 392-410.

Parkos CA, Dinauer MC, Walker LE, Allen RA, Jesaitis AJ, Orkin SH, 1988. Primary structure and unique expression of the 22-kilodalton light chain of human neutrophil cytochrome b. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*. **85**: 3319-3323.

Parris MK, 1997. Glutathione: systemic protectant against oxidative and free radical damage. *Alternative medicine review*. **2**: 155-176.

Patterson-Delafiels J, Martinez RJ, Lehrer RI, 1980. Microbicidal cationic proteins in rabbit alveolar macrophages: a potential host defense mechanism. *Infection and immunity*. **30**: 180-192.

Pilling D, Akbar AN, Girdlestone J, Orteu CH, Borthwick NJ, Amft N, Scheel-Toellner D, Buckley CD, Salmon M, 1999. Interferon-beta mediates stromal cell rescue of T cells from apoptosis. *European journal of immunology*. **29**: 1041-1050.

Piroddi M, Depunzio I, Calabrese V, Mancuso C, Aisa CM, Binaglia L, Minelli A, Butterfield A, Galli F, 2007. Oxidatively-modified and glycated proteins as candidate pro-inflammatory toxins in uremia and dialisi patients. *Amino acids*. **32**: 573-592.

Platanias LC, 2005. Mechanisms of type-I- and Type-II-interferon-mediated signaling. *Nature reviews. Immunology*. **5**: 375-386.

Platzer C, Meisel C, Vogt K, Platzer M, Volk HD, 1995. Up-regulation of monocytic IL-10 by tumor necrosis factor- α and cAMP elevating drugs. *International immunology*. **7**: 517-523.

Pober JS, Cotran RS, 1990. The role of endothelial cells in inflammation. *Transplantation*. **50**: 537-544.

Poulos TL, Kraut J, 1980. The stereochemistry of peroxidase catalysis. *The journal of biological chemistry*. **255**: 8199-8205.

Proctor VA, Cunningham RE, 1988. The chemistry of lysozyme and its use as a food preservative and a pharmaceutical. *Critical reviews in food science and nutrition*. **26**: 359-395.

Quaye IK, 2008. Haptoglobin, inflammation and disease. *Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene*. **102**: 735-742.

Quinn MT, Evans T, Loetterle LR, Jesaitis AJ, Bokoch GM, 1993. Translocation of Rac correlates with NADPH oxidase activation. Evidence for equimolar translocation of oxidase components. *Journal of biological chemistry*. **268**: 20983-20987.

Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA, 1991. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *The journal of biological chemistry*. **266**: 4244-4250.

Rahman I, MacNee, 2000. Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. *European respiratory journal*. **16**: 534-554.

Ramos CL, Pou S, Britigan BE, Cohen MS, Rosen GM, 1992. Spin trapping evidence for myeloperoxidase-dependent hydroxyl radical formation by human neutrophils and monocytes. *The journal of biological chemistry*. **267**: 8307-8312.

Reaven P, Merat S, Casanada F, Sutphin M, Palinski W, 1997. Effect of streptozotocin induced hyperglycemia on lipid profiles, formation of advanced glycosylation end products in lesions and extent of atherosclerosis in LDL receptor deficient mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. **17**: 2250-2256.

Regelson W, Kalimi M, 1994. Dehydroepiandrosterone (DHEA)-- the multifunctional steroid. II. Effects on the CNS, cell proliferation, metabolic and vascular, clinical and other effects. *Annals of the New York Academy of sciences*. **719**: 564-575.

Reid GK, Kargman S, Vickers PJ, Mancini JA, Lveillé C, Ethier D, Miller DK, Gillard JW, Dixon RA, Evans JF, 1990. Correlation between expression of 5-lipoxygenase-activating protein, 5-lipoxygenase, and cellular leukotriene synthesis. *The journal of biological chemistry*. **265**: 19818-23.

Reilly PM, Schiller HJ, Bulkley GB, 1991. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *The american journal of surgery*. **161**: 488-503.

Remick D, Manohar P, Bolgos G, Rodriguez J, Moldawer L, Wollenberg G, 1995. Blockade of tumor necrosis factor reduces lipopolysaccharide lethality, but not the lethality of cecal ligation and puncture. *Shock*. **4**: 89-95.

Robinson JM, 2008. Reactive oxygen species in phagocytic leukocytes. *Histochemistry and cell biology*. **130**: 281-297.

Robinson JM, Ohira T, Badwey JA, 2004. Regulation of the NADPH-oxidase complex of phagocytic leukocytes. Recent insights from structural biology, molecular genetics, and microscopy. *Histochemistry and cell biology*. **122**: 293-304.

Romani L, Mencacci A, Cenci E, Spaccapelo R, Toniatti C, Puccetti P, Bistoni F, Poli V, 1996. Impaired neutrophil response and CD4+ T helper cell 1 development in interleukin 6-deficient mice infected with *Candida albicans*. *Journal of experimental medicine*. **183**: 1345-1355.

Romano M, Sironi M, Toniatti C, Polentarutti N, Fruscella P, Ghezzi P, Faggioni R, Luini W, van Hinsbergh V, Sozzani S, Bussolino F, Poli V, Ciliberto G, Mantovani

A, 1997. Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity*. **6**: 315-325.

Rook GA, Hernandez-Pando R, 1997. Pathogenetic role, in human and murine tuberculosis, of changes in the peripheral metabolism of glucocorticoids and antiglucocorticoids. *Psychoneuroendocrinology*. **22** (suppl. 1): S109-S113.

Rosati P, Colombo R, 1997. *La cellula*. Edi.Ermes, Milano.

Rouzer CA, scott WA, Hamill AL, Liu FT, Katz DH, Cohn ZA, 1982. Secretion of leukotriene C and other arachidonic acid metabolites by macrophages challenged with immunoglobulin E immune complexes. *Journal of experimental medicine*. **156**: 1077-1086.

Royal M, Mann GE, Flint APF, 2000a. Strategies for reversing the trend towards subfertility in dairy cattle. *The Veterinary Journal*. **160**: 53-60.

Royal MD, Darwash AO, Flint APF, Webb R, Wooliams JA, Lamming GE, 2000b. Declining fertility in dairy cattle: changes in traditional and endocrine parameters of fertility. *Animal science*. **70**: 487-501.

Ryan GB, Majno G, 1977. Acute inflammation. *The american journal of pathology*. **86**: 183-276.

Saccò M, Valenti G, Corvi Mora P, Wu FC, Ray DW, 2002. DHEA, a selective glucocorticoid receptor antagonist: its role in immune system regulation and metabolism. *Journal of endocrinological investigation*. **25** (10 suppl): 81-82.

Saeed SA, Ahmad N, Ahmed S, 2007. Dual inhibition of cyclooxygenase and lipoxygenase by human haptoglobin: its polymorphism and relation to hemoglobin binding. *Biochemical and biophysical research communications*. **353**: 915-920.

Saito N, Takemori N, Hirai K, Onodera R, Watanabe S, Naiki M, 1993. Ultrastructural localization of lactoferrin in the granules other than typical secondary granules of human neutrophils. *Human cell*. **6**: 42-48.

Salganik RI, 2001. The benefits and hazards of antioxidants: controlling apoptosis and other protective mechanisms in cancer patients and the human population. *Journal of the American college of nutrition*. **20**(5 suppl): 464S-472S; discussion 473S-475S.

Salvatore A, Cigliano L, Bucci EM, Corpillo D, Velasco S, Carlucci A, Pedone C, Abrescia P, 2007. Haptoglobin binding to apolipoprotein A-I prevents damage from hydroxyl radicals on its stimulatory activity of the enzyme lecithin-cholesterol acyltransferase. *Biochemistry*. **46**: 11158-11168.

Samuelsson B, Dahlén SE, Lindgren JA, Rouzer CA, Serhan CN, 1987. Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. *Science*. **237**: 1171-1176.

Santoro F, 1982. Interaction of complement with parasite surfaces. In *Clinics in immunology and allergy, vol. 2 "immunoparasitology"*. Edited by: A.R.G. Capron. W.B. Saunders Co., London.

Santos JE, Thatcher WW, Chebel RC, Cerri RL, Galvao KN, 2004. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. *Animal reproduction science*. **82-83**: 513-535.

Saran M, Michel C, Bors W, 1990. Reaction of NO with O₂⁻. Implications for the action of endothelium-derived relaxing factor (EDRF). *Free radical research communication*. **10**: 221-226.

Savenkova ML, Mueller DM, Heinecke JW, 1994. Tyrosyl radicals generated by myeloperoxidase is a physiological catalyst for the initiation of lipid peroxidation in low density lipoprotein. *The journal of biological chemistry*. **269**: 20394-20400.

Schafer FQ, Buettner GR, 2001. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free radical biology and medicine*. **30**: 1191-1212.

Schauer JE, Schelin A, hanson P, streatman FW, 1990. Dehydroepiandrosterone and a beta-agonist, energy transducers, alter antioxidant enzyme systems: influence of chronic training and acute exercise in rats. *Archives of biochemistry and biophysics*. **283**: 503-511.

Schlesinger LS, 1993. Macrophage phagocytosis of virulent but not attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors. *Journal of immunology*. **150**: 2920-2930.

Schuld A, Mullington J, Friess E, Hermann DM, Galanos C, Holsboer F, Pollmächer T, 2000. Changes in dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA-sulfate plasma levels during experimental endotoxemia in healthy volunteers. *The journal of clinical endocrinology and metabolism*. **85**: 4624-4629.

Schuller-Levis GB, Park E, 2003. Taurine: new implications for an old amino acid. *FEMS microbiology letters*. **226**: 195-202.

Schultz H, Weiss JP, 2007. The bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) in infection and inflammatory disease. *Clinica chimica acta*. **348**: 12-23.

Schurr MJ, Fabian TC, Croce MA, Varnavas LE, Proctor KG, 1997. Dehydroepiandrosterone, an endogenous immune modulator, after traumatic shock. *Shock*. **7**: 55-59.

Schweiger D, Furstenberger G, Krieg P, 2007. Inducible expression of 15-lipoxygenase-2 and 8-lipoxygenase inhibits cell growth via common signaling pathways. *Journal of lipid research*. **48**: 553-564.

Scott GB, 1989. Changes in limb loading with lameness for a number of Friesian cattle. *The british veterinary journal*. **145**: 28-38.

Segal AW, Jones OT, 1978. Novel cytochrome b system in phagocytic vacuoles from human granulocytes. *Nature*. **276**: 515-517.

Selsted ME, Brown DM, Delange RJ, Lehrer RI, 1983. Primary structures of MCP-1 and MCP-2, natural peptide antibiotics of rabbit lung macrophages. *The journal of biological chemistry*. **258**: 14485-14489.

Selsted ME, Szklarek D, Lehrer RI, 1984. Purification and antibacterial activity of antimicrobial peptides of rabbit granulocytes. *Infection and immunity*. **45**: 150-154.

Seven A, Guzel S, Aslan M, Hamuryudan V, 2008. Lipid, protein, DNA oxidation and antioxidant status in rheumatoid arthritis. *Clinical Biochemistry*. **41**: 538-543.

Shanti A, Santanam N, Morales AJ, Parthasarathy S, Murphy AA, 1999. Autoantibodies to markers of oxidative stress are elevated in women with endometriosis. *Fertility and sterility*. **71**: 1115-1118.

Shearer JK, 1996. *Feet and leg problems in dairy cattle*. Presented at the 7th Florida Ruminant Nutrition Symposium, Gainesville, January 11-12, 1996.

Sheldon IM, Barrett DC, Boyd H, 2004. The post partum period. In *Bovine medicine disease and husbandry of cattle*. Edited by: Andrews AH, Blowey RW, Boyd H, Eddy RG. Blackwell science, Oxford. 508-529.

Sheldon IM, Cronin J, Goetze L, Donofrio G, Schuberth HJ, 2009. Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle. *Biology of reproduction*. **81**: 1025-1032.

Sheldon IM, Lewis GS, LeBlanc SJ, Gilbert RO, 2006. Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology*. **65**: 1516-1530.

Sheldon IM, Noakes DE, 1998. Comparison of three treatments for bovine endometritis. *The veterinary record*. **142**: 575-579.

Shi XY, Hou FF, Niu HX, Wang GB, Xie D, Guo ZJ, Zhou ZM, Yang F, Tian JW, Zhang X, 2008. Advanced oxidation protein products promote inflammation in diabetic kidney through activation of renal nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase. *Endocrinology*. **149**: 1829-1839.

Shiose A, Sumimoto H, 2000. Arachidonic acid and phosphorylation synergistically induce a conformational change of p47phox to activate the phagocyte NADPH oxidase. *The journal of biological chemistry*. **275**: 13793-13801.

Sies H, 1991. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *American journal of medicine*. **91**: 31S-38S.

Sies H, 1999. Glutathione and its role in cellular functions. *Free radical biology and medicine*. **27**: 916-921.

Si-Tahar M, Touqui L, Chignard M, 2009. Innate immunity and inflammation-two facets of the same anti-infectious reaction. *Clinical and experimental immunology*. **156**: 194-198.

Skinner JG, Brown RA, Roberts L, 1991. Bovine haptoglobin response in clinically defined field conditions. *The veterinary record*. **128**: 147-149.

Smith CD, Carney JM, Tatsumo T, Stadtman ER, Floyd RA, Markesbery WR, 1992. Protein oxidation in aging brain. *Annals of the New York academy of sciences*. **663**: 110-119.

Smith VG, Edgerton LA, Hafs HD, Convey EM, 1973. Bovine serum estrogens, progestins and glucocorticoids during late pregnancy, parturition and early lactation. *Journal of animal science*. **36**: 391-396.

Sordillo LM, Streicher KL, 2002. Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*. **7**: 135-146.

Soupart P, 1962. Free amino acids in blood and urine in the human. In *Amino acid pools*. Edited by: J.T. Holden. Elsevier, Amsterdam. 220-262.

Spitteller G, 2006. Peroxyl radicals: inductors of neurodegenerative and other inflammatory diseases. Their origin and how they transform cholesterol, phospholipids, plasmalogens, polyunsaturated fatty acids, sugars, and proteins into deleterious products. *Free radical biology and medicine*. **41**: 362-387.

SPSS 15.0 (2006). Base user's guide. SPSS Inc., Chicago, IL, USA.

Sprecher DJ, Hostetler DE, Kaneene JB, 1997. A lameness scoring system that uses posture and gait to predict dairy cattle reproductive performance. *Theriogenology*. **47**: 1179-1187.

Springer TA, 1995. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annual review of physiology*. **57**: 827-872.

Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S, 1992. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *The journal of experimental medicine*. **176**: 287-292.

Steinbeck ML, Khan AU, Karnovsky MJ, 1992. Intracellular singlet oxygen generation by phagocytosing neutrophils in response to particles coated with a chemical trap. *The journal of biological chemistry*. **267**: 13425-13433.

Straub RH, Lehle K, Hefarth H, weber M, Falk W, Preuner J, Schölmerich J, 2002. Dehydroepiandrosterone in relation to other adrenal hormones during an acute

inflammatory stressful disease state compared with chronic inflammatory disease: role of interleukin-6 and tumor necrosis factor. *European journal of endocrinology*. **146**: 365-374.

Straub RH, Vogl D, Gross V, Lang B, Schölmerich J, Andus T, 1998. Association of humoral markers of inflammation and dehydroepiandrosterone sulfate or cortisol serum levels in patients with chronic inflammatory bowel disease. *The american journal of gastroenterology*. **93**: 2197-2202.

Sugino N, 2006. Roles of reactive oxygen species in the corpus luteum. *Animal science journal*. **77**: 556-565.

Sundsmo JS, 1982. The leukocyte complement system. *Federation proceedings*. **41**: 3094-3098.

Takahashi M, Keicho K, Takahashi H, Ogawa H, Schultz RM, Okano A, 2000. Effect of oxidative stress on development and DNA damage in vitro cultured bovine embryos by comet assay. *Theriogenology*. **54**: 137-145.

Takeda K, Kaisho T, Yoshida N, Takeda J, Kishimoto T, Akira S, 1998. Stat3 activation is responsible for IL-6-dependent T cell proliferation through preventing apoptosis: generation and characterization of T cell-specific Stat3-deficient mice. *Journal of immunology*. **161**: 4652-4660.

Tanaka Y, Adams DH, Hubscher S, Hirano H, Siebenlist U, Shaw S, 1993. T-cell adhesion induced by proteoglycan-immunoblized cytokine MIP-1 beta. *Nature*. **361**: 79-82.

Taniguchi T, Ogasawara K, Takaoka A, Tanaka N, 2001. IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annual review of immunology*. **19**: 623-655.

Teague TK, Schaefer BC, Hildemen D, Bender J, Mitchell T, Kappler JW, Marrack P, 2000. Activation-induced inhibition of interleukin 6-mediated T cell survival and signal transducer and activator of transcription 1 signaling. *Journal of experimental medicine*. **191**: 915-926.

Tedder TF, Steeber DA, Chen A, Engel P, 1995. The selectins: vascular adhesion molecules. *The FASEB journal*. **9**: 866-873.

Territo MC, Ganz T, Selsted ME, Lehrer R, 1989. Monocyte-chemotactic activity of defensins from human neutrophils. *The journal of clinical investigation*. **84**:2017-2020.

Theofilopoulos AN, Baccala R, Beutler B, Kono DH, 2005. Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity. *Annual review of immunology*. **23**: 307-336.

Thomas JS, 2000. Overview of plasma proteins. In *Schalm's veterinary haematology*. Edited by: Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC. Lippincott, Philadelphia. 891-898.

- Tietze F**, 1969. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Analytical biochemistry*. **27**: 502-522.
- Tilley SL, Coffman TM, Koller BH**, 2001. Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. *The journal of clinical investigation*. **108**: 15-23.
- Tizard IR**, 2000. *Veterinary immunology an introduction*. Saunders company, Philadelphia.
- Tominaga T, Fukata J, Naito Y, Nakai Y, Funakoshi S, Fujii N, Imura H**, 1990. Effects of corticostatin-I on rat adrenal cells in vitro. *The journal of endocrinology*. **125**: 287-292.
- Tough DF, Sprent J**, 1994. Turnover of naïve and memory phenotype T cells. *Journal of experimental medicine*. **179**: 1127-1135.
- Tough DF, Sun S, Zhang X, Sprent J**, 1999. Stimulation of naïve and memory T cells by cytokines. *Immunological reviews*. **170**: 39-47.
- Tracey KJ, Lowry SF, Fahey TG 3rd, Albert JD, Fong Y, Hesse D, Beutler B, Manogue KR, Calvano S, Wei H, et al.**, 1987. Cachectin/tumor necrosis factor induces lethal shock and stress hormone responses in the dog. *Surgery, gynecology and obstetrics*. **164**: 415-422.
- Tracey KJ, Wei H, Manogue KR, Fong Y, Hesse DG, Nguyen HT, Kuo GC, Beutler B, Cotran RS, Cerami A, Lowry SF**, 1988. Cachectin/tumor necrosis factor induces cachexia, anemia, and inflammation. *Journal of experimental medicine*. **167**: 1211-1227.
- Tseng CF, Lin CC, Huang HY, Liu HC, Mao SJ**, 2004. Antioxidant role of human haptoglobin. *Proteomics*. **4**: 2221-2228.
- Uchida E, Katoh N, Takahashi K**, 1993. Appearance of haptoglobin in serum from cows at parturition. *Journal of veterinary medical science*. **55**: 893-894.
- Uchida K**, 2003. 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. *Progress in lipid research*. **42**: 318-343.
- Underhill DM, Ozinsky A**, 2002. Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annual review of immunology*. **20**: 825-852.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J**, 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and humane disease. *International journal of biochemistry and cell biology*. **39**: 44-84.

- van Arendonk JAM, Stokvisch PE, Korver S, Oldenbroek JK**, 1984. Factors determining the carcass value of culled dairy cows. *Livestock production science*. **11**: 391-400.
- van den Berg RH, Faber-Krol MC, van Wetering S, Hiemstra PS, Daha MR**, 1998. Inhibition of activation of the classical pathway of complement by human neutrophil defensins. *Blood*. **92**: 3898-3903.
- van der Poll T, Romijn JA, Endert E, Borm JJ, Buller HR, Sauerwein HP**, 1991. Tumor necrosis factor mimics the metabolic response to acute infection in healthy humans. *American journal of physiology*. **261**: E457-E465.
- van Vollenhoven RF, Engleman EG, McGuire JL**, 1995. Dehydroepiandrosterone in systemic lupus erythematosus. Results of a double-blind, placebo-controlled, randomized clinical trial. *Arthritis and rheumatism*. **38**: 1826-1831.
- van Vollenhoven RF, Park JL, Genovese MC, West JP, McGuire JL**, 1999. A double-blind, placebo-controlled, clinical trial of dehydroepiandrosterone in severe systemic lupus erythematosus. *Lupus*. **8**: 181-187.
- Vella T, Dow S, Potter TA, Kappler J, Marrack P**, 1998 Cytokine-induced survival of activated T cells *in vitro* and *in vivo*. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*. **95**: 3810-3815.
- Vestweber D, Blanks JE**, 1999. Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiological reviews*. **79**: 181-213.
- Villareal DT, Holloszky JO, Kohrt WM**, 2000. Effects of DHEA replacement on bone mineral density and body composition in elderly women and men. *Clinical endocrinology*. **53**: 561-568.
- Von Adrian UH, Hasslen SR, Nelson RD, Erlandsen SL, Butcher E**, 1995. A central role for microvillous receptor presentation in leukocyte adhesion under flow. *Cell*. **82**: 989-999.
- Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P**, 2003. Tumor necrosis factor signaling. *Cell death and differentiation*. **10**: 45-65.
- Wakabayashi Y, Fujita H, Morita I, Kawaguchi H, Murota S**, 1995. Conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase in bovine carotid artery endothelial cells induced by activated neutrophils: involvement of adhesion molecules. *Biochimica et biophysica acta*. **1265**: 103-109.
- Wallace DC, Ye JH, Neckelmann SN, Singh G, Webster KA, Greenberg BD**, 1987. Sequence analysis of cDNAs for the human and bovine ATP synthase beta subunit: mitochondrial DNA genes sustain seventeen times more mutations. *Current genetics*. **12**: 81-90.

- Wang SD, Huang KJ, Lin YS, Lei HY**, 1994. Sepsis-induced apoptosis of the thymocytes in mice. *Journal of immunology*. **152**: 5014-5021.
- Wanidworanun C, Strober W**, 1993. Predominant role of tumor necrosis factor alpha in human monocyte IL-10 synthesis. *Journal of immunology*. **151**: 6853-6861.
- Warnick LD, Janssen D, Guard CL, Grohn YT**, 2001. The effect of lameness on milk production in dairy cows. *Journal of dairy science*. **84**: 1988-1997.
- Wassom DL, Gleich GJ**, 1979. Damage to *Trichinella spiralis* newborn larvae by eosinophil basic protein. *The american journal of tropical medicine and hygiene*. **28**: 860-863.
- Wassom DL, Loegering DA, Solley GO, Moore SB, schooley RT, Fauci AS, Gleich GJ**, 1981. Elevated serum levels of the eosinophil granule major basic protein in patients with eosinophilia. *The journal of clinical investigation*. **67**: 651-661.
- Weinberg A, Krisanaprakornkit S, Dale BA**, 1998. Epithelial antimicrobial peptides: review and significance for oral applications. *Critical reviews in oral biology and medicine*. **9**:399-414.
- Wentworth P Jr, McDunn JE, Wentworth AD, Takeuchi C, Nieva J, Jones T, Bautista C, Ruedi JM, Gutierrez A, Jada KD, Babior BM, Eschenmoser A, Lerner RA**, 2002. Evidence for antibody-catalyzed ozone formation in bacterial killing and inflammation. *Science*. **298**: 2195-2199.
- Werr J, Xie X, Hedqvist P, Ruoslahti E, Lindbom L**, 1998. β_1 integrins are critically involved in neutrophil locomotion in extravascular tissue *in vivo*. *The journal of experimental medicine*. **187**: 2091-2096.
- White AC, Thannickal VJ, Fanburg BL**, 1994. Glutathione deficiency in human disease. *Journal of nutrition and biochemistry*. **5**: 218-226.
- Wientjes FB, Hsuan JJ, Totty NF, Segal AW**, 1993. p40phox, a third cytosolic component of the activation complex of the NADPH oxidase to contain src homology 3 domains. *The biochemical journal*. **296**: 557-561.
- Wientjes FB, Panayotou G, Reeves E, Segal AW**, 1996. Interactions between cytosolic components of the NADPH oxidase: p40phox interacts with both p67phox and p47phox. *The biochemical journal*. **317**: 919-924.
- Wilder RL**, 1996. Hormones and autoimmunity: animal models of arthritis. *Bailliere's clinical rheumatology*. **10**: 259-271.
- Winterbourn CC**, 2002. Biological reactivity and biomarkers of the neutrophil oxidant, hypochlorous acid. *Toxicology*. **181-182**: 223-227.

Wise Th, Caton D, Thatcher WW, Lehrer AR, Fields Mj, 1982. Androstenedione, dehydroepiandrosterone and testosterone in ovarian vein plasma and androstenedione in peripheral arterial plasma during the bovine oestrus cycle. *Journal of reproduction and fertility*. **66**: 513-518.

Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillère-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, Jungers P, Descamps-Latscha B, 1996. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uraemia. *Kidney international*. **49**: 1304-1313.

Witko-Sarsat V, Friedlander M, Nguyen Khoa T, Capeillère-Blandin C, Nguyen AT, Canteloup S, Dayer JM, Jungers P, Drüeke T, Descamps-Latscha B, 1998. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *Immunology*. **161**: 2524-2532.

Witko-Sarsat V, Nguyen-Khoa T, Jungers P, Drüeke TB, Descamps-Latscha B, 1999. Advanced oxidation protein products as novel molecular basis of oxidative stress in uraemia. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*. **14** (Suppl. 1): 76-78.

Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND, 2004. Glutathione metabolism and its implications for health. *The journal of nutrition*. **134**: 489-492.

Xie Q, Nathan C, 1994. The high-output nitric oxide pathway: role and regulation. *Journal of leukocyte biology*. **56**: 576-582.

Xiong YQ, Kupferwasser LI, Zack PM, Bayer AS, 1999. Comparative efficacies of liposomal amikacin (MiKasome) plus oxacillin versus conventional amikacin plus oxacillin in experimental endocarditis induced by *Staphylococcus aureus*: microbiological and echocardiographic analyses. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. **43**: 1737-1742.

Yakes FM, Van Houten B, 1997. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*. **94**: 514-519.

Yamada J, Sakuma M, Suga T, 1992. Induction of peroxisomal beta-oxidation enzymes by dehydroepiandrosterone and its sulfate in primary cultures of rat hepatocytes. *Biochimica et biophysica acta*. **11**: 231-236.

Yan LJ, Traber MG, Kobuchi H, Matsugo S, Tritschler HJ, Packer L, 1996. Efficacy of hypochlorous acid scavengers in the prevention of protein carbonyl formation. *Archives of biochemistry and biophysics*. **327**: 330-334.

Yang D, Chertov O, Bykovskaia SN, Chen Q, Buffo MJ, Shogan J, Anderson M, Schroder JM, Wang JM, Howard OM, Oppenheim JJ, 1999. B-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science*. **286**: 525-528.

Yao L, Pan J, Setiadi H, Patel KD, McEver RP, 1996. Interleukin 4 or oncostatin M induces a prolonged increase in P-selectin mRNA and protein in human endothelial cells. *The journal of experimental medicine*. **184**: 81-92.

Yoshida Y, Itoh N, Hayakawa M, Piga R, Cynshi O, Jishage K, Niki E, 2005. Lipid peroxidation induced by carbon tetrachloride and its inhibition by antioxidant as evaluated by an oxidative stress marker, HODE. *Toxicology and applied pharmacology*. **208**(1): 87-97.

Zamze S, Martinez-Pomares L, Jones H, Taylor PR, Stillion RJ, Gordon S, Wong SY, 2002. Recognition of bacterial capsular polysaccharides and lipopolysaccharides by the macrophage mannose receptor. *The journal of biological chemistry*. **277**: 41613-41623.

Zhan S, Vazquez N, Zhan S, Wientjes FB, Budarf ML, Schrock E, Ried T, Green ED, Chanock SJ, 1996. Genomic structure, chromosomal localization, start of transcription, and tissue expression of the p40-phox, a new component of the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase complex. *Blood*. **88**: 2714-2721.

Zhang Z, Araghi-Niknam M, Liang B, Inserra P, Ardestani SK, Jiang S, Chow S, Watson RR, 1999. Prevention of immune dysfunction and vitamin E loss by dehydroepiandrosterone and melatonin supplementation during murine retrovirus infection. *Immunology*. **96**: 291-297.

Zhao X, Lacasse P, 2008. Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control. *Journal of animal science*. **86**: 57-65.

Zlotnik A, Yoshie O, 2000. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*. **12**: 121-127.

7 RINGRAZIAMENTI

Alla fine di questo percorso, credo che il fatto di sentire la necessità di ringraziare tante persone non possa che essere vissuto come un privilegio.

Un ringraziamento a chi mi ha permesso di realizzare questi ultimi passi: al prof. Gabai per avermi trasmesso l'interesse per questo argomento, oltre che per la pazienza e la disponibilità nel seguirmi in ognuna delle fasi che ha portato alla stesura di questa tesi; alla dott.ssa Da Dalt che, oltre ad aver dato un contributo a dir poco fondamentale in questo lavoro, ha colorato di simpatia tutti i momenti in laboratorio; alla dott.ssa Pasotto per i consigli nel campo dell'immunologia e l'assistenza nelle analisi di laboratorio.

I miei pensieri, oltre che la mia più immensa gratitudine, va quindi a chi mi è stato vicino in tutte le fasi che hanno portato fino a qui, anche le più lontane:

ai miei nonni, maestri di vita, che mi hanno mostrato con l'esempio quali sono le vere mete da raggiungere e i problemi per i quali vale la pena di affannarsi, passando oltre quelli che non sembreranno che puntini insignificanti visti con gli occhi dell'esperienza. Per avermi dimostrato che il sentiero per la felicità sta nelle piccole cose;

ai miei genitori, per avermi insegnato a percorrere tra tutte le strade sempre quella in salita, perché la soddisfazione e il guadagno morale del raggiungimento di un traguardo non si possono ottenere se il premio non è stato sudato. Inoltre, per aver sostenuto economicamente tutto ciò, ma soprattutto per aver creduto in me;

ai miei fratelli e ai loro compagni che, consci della loro esperienza, mi hanno consigliato come non inciampare negli ostacoli che avrei incontrato, incitandomi a crederci e a continuare testardamente nei momenti difficili;

ai miei fantastici nipotini: in grado di rendere splendidi le giornate con un solo sorriso;

ai miei amici e compagni di avventure: Aurelio, Alessandra, Irene, Elisa, Stefania, Nicola, Matteo, Sergio, Daniele, Silvia, Serena e Bobe, perché anche se distanti non mi hanno mai fatto sentire sola, oltre che per i momenti indimenticabili;

alla famiglia Sartor: in particolare a Guido, Antonietta, Manuela...e tribù, per avermi sempre fatto sentire a casa, come se avessi una seconda famiglia;

al mitico dott. Mondin: per la professionalità, la bravura e la simpatia dimostrata in questi anni, per avermi seguito (e soprattutto aver pazientato) fin da quando ho iniziato questo studio. Perché solo grazie alla passione che mette nel suo lavoro sono riuscita a scoprire la mia;

al prof. Desidera, per avermi incoraggiato e aiutato nelle prime fasi di questo percorso e per l'amore e la competenza nelle sue materie, che mi hanno permesso di avere solide basi per superare il tanto temuto esame di ammissione;

a Simonetta, per avermi permesso di continuare a suonare il pianoforte quando avrei lasciato per i disguidi della scuola e, successivamente, nonostante i mille impegni dell'università, dandomi la possibilità di avvicinare il mondo della musica e di godere del suo fascino; e al mio meraviglioso Yamaha perché spesso mi ha fatto rintanare in una realtà che cambia faccia tutte le volte e in cui nessun altro può entrare;

infine, a chi vent'anni fa ha acceso la miccia che ha creato l'amore per la medicina veterinaria e ha continuato a darmi motivazioni per perseverare nella più assoluta testardaggine: ai miei animali, che hanno dato luce a tutti questi giorni con la loro personalità. In particolare a Duse che, oltre a tanti ricordi, mi ha lasciato un grande rimprovero e al tempo stesso il guadagno che talvolta, purtroppo, solo un errore può dare;

a tutti loro, che hanno reso possibile la realizzazione di questo sogno, semplicemente la più nobile delle parole: Grazie.