



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PERUGIA

DOTTORATO DI RICERCA IN

*INCREMENTO DELLE PRODUZIONI ZOOTECNICHE E
PATOLOGIE DEGLI ANIMALI DA REDDITO
XXIV CICLO*

Settore scientifico disciplinare 07/H5

***LA FECONDAZIONE IN VITRO DELLE OVOCELLULE
BOVINE IN CONDIZIONI REDOX; RUOLO DELLA
N- ACETIL CISTEINA SULL'INCIDENZA DELLA
POLISPERMIA.***

***IN VITRO FERTILISATION OF BOVINE OOCYTES UNDER
REDOX CONDITIONS: ROLE OF N-ACETYL CYSTEINE ON
RATES OF POLISPERMY.***

Dr. ELAD NGONPUT AGNES

RELATORE:
Prof. MAURIZIO MONACI

COORDINATORE:
Prof. GIOVANNI VITELOZZI

A.A. 2011/2012

To my family.

Ringraziamenti

Desidero ringraziare il Prof. Maurizio Monaci, il mio docente guida, per avermi guidato e sostenuto durante tutto il periodo del mio corso di dottorato.

Grazie di cuore a Dr. Lakamy Sylla per la sua pazienza, disponibilità e soprattutto il suo sostegno sia ,morale che professionale riservato a me durante il mio percorso di studio.

Grazie al Prof. Oliviero Olivieri per i preziosi consigli che mi hanno spinto ad andare avanti.

Grazie a tutto il corpo docenti, i dottorandi ed il tecnico Paolino (Paolo Ciribifera), della Sezione di Ostetricia e Ginecologia Veterinaria, Dipartimento di Patologia Diagnostica e clinica Veterinaria, Facoltà di Veterinaria, Perugia. In questi tre anni siete stati la mia seconda famiglia!!

INDICE

Pagina

<i>RIASSUNTO</i>	6
<i>ABSTRACT</i>	8
<i>Abbreviazioni</i>	10
1. INTRODUZIONE	13
1.1 Importanza della fecondazione in vitro	13
1.2 Cenni di fisiologia della fecondazione bovina	15
<i>1.2.1 Maturazione nucleare</i>	15
<i>1.2.2 Maturazione citoplasmatica</i>	18
<i>1.2.3 Struttura della zona pellucida</i>	20
1.3 Polispermia	23
1.4 Cenni di fisiologia dell'ovidotto.	24
<i>1.4.1 Ruolo della fecondazione in vitro</i>	26
2. TECNICHE DI FERTILIZZAZIONE	34
2.1 Prelievo delle ovocellule	36
2.2 Maturazione in vitro	38
2.3 Fertilizzazione in vitro	39
2.4 Coltura in vitro	43

3. ANTIOSSIDANTI	47
3.1 Specie reattive dell'ossigeno	48
3.2 Stress ossidativo	58
3.3 N-acetilcisteina	59
4. Obiettivo della Tesi	62
PARTE SPERIMENTALE	
1. INTRODUZIONE	65
2. MATERIALI E METODI	67
<i>2.1 Prelievo delle ovaie e raccolta delle ovocellule</i>	<i>67</i>
<i>2.2 Maturazione delle ovocellule in vitro</i>	<i>68</i>
<i>2.3 Preparazione delle ovocellule per la fertilizzazione</i>	<i>69</i>
<i>2.4 Capacitazione spermatica e fertilizzazione in vitro</i>	<i>69</i>
<i>2.5 Disegno sperimentale</i>	<i>70</i>
<i>2.6 Fissazione delle ovocellule e valutazione della fertilità e della polispermia</i>	<i>71</i>
<i>2.7 Gruppi sperimentali</i>	<i>71</i>
<i> 2.7.1 Esperimento 1</i>	<i>71</i>
<i> 2.7.2 Esperimento 2</i>	<i>72</i>
3. RISULTATI	73
4. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	77

RIASSUNTO

La N-acetilcisteina, una sostanza antiossidante che gioca un ruolo di scavenger dei radicali liberi derivanti dalle normali funzioni cellulari, è stata addizionata al terreno di coltura delle ovocellule bovine. A 24 ore post fertilizzazione i presunti zigoti sono stati denudati, fissati e colorati con il lacmoid. Per la valutazione degli effetti della NAC sono stati adottati come parametri i tassi di fertilizzazione e di polispermia nei diversi pool di ovocellule rispetto ai pool controllo.

Nell'esperimento 1, sono state utilizzate 660 ovocellule di seguite suddivise in 3 pool e più precisamente 188 nel pool controllo senza aggiunta di NAC, 234 nel pool a 5mM di NAC e 238 nel pool a 10mM di NAC che veniva aggiunta nel medium IVF al momento della fertilizzazione. Nel pool di ovocellule incubate con della NAC a 5mM si è registrato un significativo aumento del tasso di fertilizzazione ($P < 0.05$) rispetto al pool controllo senza NAC con valori di $82.2 \pm 3.7\%$ e $78 \pm 3.8\%$, rispettivamente ($P < 0.05$); per contro nel pool a 10mM si è osservato una più bassa percentuale pari al $57 \pm 5.7\%$ rispetto al pool controllo ($P < 0.05$) oltre ad un'alta percentuale di degenerazione ovocellulare. La polispermia è risultata più alta nel pool controllo ($14.9 \pm 2.7\%$), rispetto a quelli a 5 e 10mM con valori di $7.2 \pm 1.5\%$ e $3.3 \pm 0.9\%$, rispettivamente ($P < 0.05$).

Nell'esperimento 2 le ovocellule sono state trattate con la NAC ad una concentrazione fissa di 1.25mM. Un totale di 835 ovocellule sono state suddivise in quattro diversi pool di cui uno di controllo; al secondo pool di ovocellule la NAC è stata addizionata nel solo terreno di maturazione (NAC+/-); il terzo pool è stato trattato con la NAC solo al momento della fertilizzazione (NAC-/+) mentre il quarto pool è stato trattato sia al momento della fertilizzazione che durante la fertilizzazione (NAC+/+). Il tasso di fertilizzazione è risultato più alto nel pool NAC+/- ($87.5 \pm 2.5\%$) rispetto al pool NAC -/+ ($83.9 \pm 7\%$), al controllo ($78 \pm 2.3\%$) e al pool NAC+/+ ($60.4 \pm 3.6\%$) ($P < 0.05$). Il tasso di polispermia è risultato maggiore nel pool controllo ($17.5 \pm 5.1\%$) rispetto al pool NAC+/+ ($9.6 \pm 3.1\%$), al pool NAC+/- ($7.9 \pm 1.9\%$) ed al pool NAC+/- ($6.8 \pm 0.9\%$) ($P < 0.05$). Tali risultati dimostrano l'effetto benefico della NAC, addizionata al terreno di maturazione a concentrazioni minori di 10mM, sia per quanto riguarda il tasso di fertilizzazione che quella della polispermia.

ABSTRACT

N-acetylcysteine, an antioxidant considered a free radical scavenger for normal cell metabolisms, was supplemented to in vitro culture mediums of bovine oocytes. At 24 hours post fertilisation presumptive zygotes were denuded, fixed and then stained with lacmoid stain. Effects of NAC were assessed by evaluating fertilisation and polyspermy rates, within several oocyte pools compared to the control group.

In experiment 1, out of 660 oocytes 188 were cultured without NAC (control group), 234 were fertilised in a medium supplemented with 5mM NAC, and 238 supplemented with 10mM of NAC. Fertilisation rates were significantly higher in the 5mM NAC ($82.2 \pm 3.7\%$) pool compared to control ($78 \pm 3.8\%$) ($P < 0.05$). Contrarily, the 10mM NAC pool presented a lower fertilisation rate ($57 \pm 5.7\%$) compared to the other two groups ($P < 0.05$). Polyspermic rates remained higher in the control group compared to the supplemented groups (14.9 ± 3.3 vs $7.2 \pm 1.5\%$ and $3.3 \pm 0.9\%$).

In experiment 2, the oocytes were supplemented with a fixed concentration of 1.25mM of NAC. 835 oocytes were subdivided into 4 groups, namely a control group without NAC supplementation (NAC-/-), a second group supplemented with NAC only during maturation (NAC+/-), a third group supplemented during fertilisation

(NAC-/+) and the fourth supplemented with NAC both during maturation and fertilisation. Fertilisation rate resulted higher in the NAC+/- pool ($87.5 \pm 2.5\%$) compared to the NAC-/+ ($83.9 \pm 7\%$), NAC-/- ($78 \pm 2.3\%$) and NAC+/+ ($60.4 \pm 3.6\%$) ($P < 0.05$). The rate of polyspermy was higher in the control group ($17.5 \pm 5.1\%$) compared to the supplemented groups with values of $9.6 \pm 3.1\%$, $7.9 \pm 1.9\%$ and $6.8 \pm 0.9\%$, respectively ($P < 0.05$).

Abbreviazioni

ALS = Lateral amiotrophic sclerosis (sclerosi laterale amiotrofica)

ATP = Adenosina trifosfato.

BSA = Bovine Serum Albumine (albumina serica bovina).

cAMP = Cyclic adenosine monophosphate (adenosina monofosfato ciclica)

COC = Cumulus ooforo Complex (complesso cumulo ooforo).

DNA = Deoxyribonucleic acid (acido deossiribonucleico).

DTT = Ditionitrito

EGF = Epidermal Growth Factor (fattore di crescita epidermico)

ETS = Elettron Transport System (sistema di trasporto elettronico).

FCS = Fetal Cow Serum (siero fetale bovino).

FSH = Follicle Stimulating Hormone (ormone follicolo stimolante).

GSH = Glutatione

H-SOF = Hapes Synthetic Oviductal Fluid (Soluzione oviduttale sintetico tamponata in HEPES).

ICSI = Intra Cytoplasmatic Sperm Injection (Iniezione intracellulare spermatica)

IGF = Insulin-like Growth Factor (fattore di crescita simil insulina)

IVC = In vitro colture (coltura in vitro)

IVEP = In Vitro Embryo Production (produzione in vitro di embrioni)

IVF = In vitro Fertilisation (fertilizzazione in vitro)

LH = Luteinising Hormone (ormone luteinizzante)

MAPK = Mitogen Activated Protein kinases (proteina chinasi mitogena attivata)

MPF = Maturation Promoting Factor (fattore promotore della maturazione)

MPN = Male Pronucleus (pronucleo maschile)

NADPH = Nucleotideamide diphosphate hydroxide. (idrossido nucleotide amide difosfato)

NAC = N-acetil cisteina

OEC = Oviductal Epithelial cells (cellule epiteliali oviduttali)

OPU = Ovum Pick-up

OMI = Oocyte Maturation Inhibitor (fattore inibitore della maturazione oocitaria)

PBS = Phosphate Buffered Solution

PVS = Perivitelline Space (spazio perivitellino)

RNA = Ribonucleosinamide

RNS = Reactive Nitrogen Species (specie reattive dell'azoto)

ROS = Reactive Oxygen Species (specie reattive dell'ossigeno)

SEM = Scansion Elettron Microscope (microscopio elettronico a scansione)

SOF = Synthetic Oviductal Fluid (fluido oviduttale sintetico)

SOD = Superossido Dismutasi

TALP = Tyrode's Albumine Lactate Pyruvate (Piruvato albumine lattato di Tyrode)

ZP = Zona Pellucida

1 INTRODUZIONE

1.1 Importanza della fecondazione in vitro

Negli ultimi anni, in tutti i Paesi con la zootecnia avanzata ivi inclusa l'Italia, si assiste ad un progressivo e preoccupante declino della fertilità negli allevamenti bovini; ciò rappresenta una rilevante perdita di redditività soprattutto per le bovine da latte. Alcuni autori Americani hanno registrato una significativa riduzione della percentuale di gravidanze alla prima inseminazione dal 1951 al 1996 con valori percentuali del 65% e del 40% , rispettivamente (Butler et al., 1998). Studi più recenti hanno confermato un ulteriore abbassamento della fertilità bovina che è passata dal 55 al 33% (Drost et al., 1999; Cartmill et al., 2001; Pancarci et al., 2002). Tale declino è determinato da diversi fattori critici nella gestione dell'allevamento quale la produzione lattea, l'alimentazione, la scelta del piano di accoppiamento e il controllo delle malattie che possono interferire con la sfera riproduttiva.

Le tecniche di riproduzione assistita sono uno strumento efficace per ovviare alle patologie che influenzano negativamente la fertilità della bovina attraverso l'aumento della mortalità embrionale precoce o il mancato concepimento. Tuttavia, queste tecniche quali

l'inseminazione artificiale, il sessaggio del seme, l'induzione della superovulazione, la produzione in vitro di embrioni e il congelamento degli embrioni, rappresentano anche uno strumento importante nei programmi di selezione genetica nelle specie animali di interesse zootecnico e in quelli di miglioramento della fecondità e della produttività.

La tecnica della fecondazione in vitro (IVF) fu ben documentata per la prima volta nel 1959 da Chang (Chang, 1959) che effettuò con successo il trasferimento di embrioni di conigli derivati dalla fecondazione in vitro dando così inizio alle ricerche atte a migliorare i metodi di fecondazione (Brackett e Williams, 1965, 1968; Brackett, 1969). L'applicazione della IVF si sta sempre più diffondendo in campo animale; tuttavia, le varie fasi della maturazione delle ovocellule e della coltura degli embrioni (IVC) presentano dei punti di difficoltà che determinano un certo grado di insuccessi. Le recenti ricerche sono volte a migliorare i protocolli di IVF, attraverso la conoscenza dei meccanismi della riproduzione cellulare, legati alla fisiologia dei gameti e del processo produttivo in generale. Brevemente l'IVF si compone di tre fasi: Maturazione delle ovocellule (IVM), Fertilizzazione e la coltura degli zigoti e degli embrioni (IVC).

1.2 Cenni di fisiologia della fecondazione

La maturazione dell'ovocellula si compone di due distinte fasi: la maturazione del nucleo e la maturazione citoplasmatica. La maturazione nucleare include tutti quei cambiamenti che avvengono all'interno del nucleo mentre quella citoplasmatica si riferisce alle reazioni fuori dal nucleo. Tali fasi comportano una serie di complesse reazioni sequenziali in vivo, mentre in vitro si possono verificare ad ogni stadio un blocco della maturazione per una carenza di requisiti essenziali nei sistemi adottati. E' da sottolineare che sin dalle prime fasi dell'oogenesi ha inizio la maturazione dell'oocita, fortemente influenzata dall'interazione tra l'ovocellula e le cellule follicolari. La percentuale di maturazione in vitro dipende fortemente dallo stadio di sviluppo dell'ovocita al momento del prelievo dello stesso.

1.2.1 Maturazione nucleare

In vivo le ovocellule nei follicoli primordiali si arrestano nella profase della prima divisione meiotica instaurando un rapporto intimo con il follicolo attraverso la formazione delle giunzioni "gap" le quali vengono interrotte dopo l'aspirazione delle ovocellule o attraverso lo "slicing". Secondo tale ipotesi ci sarebbe un fattore inibitore responsabile del blocco nella fase di meiosi fino al momento dell'ovulazione (Szöllösi et al., 1993) L'inibitore della maturazione

ovocellulare (OMI) è composto da una molecola di purina e dall'ipoxantina dalla struttura non ancora ben definita (Epig et al., 1988) Inoltre, anche l'adenosinammonofosfato (cAMP) esplica un ruolo fondamentale nel blocco della meiosi (Schultz et al., 1987) Infatti, un elevato contenuto di cAMP nelle ovocellule follicolari inibisce la ripresa della meiosi; si osserva una sua riduzione al momento dell'ovulazione e quindi al ripristino della meiosi. Pertanto l'eliminazione degli inibitori dai terreni di coltura induce l'attivazione delle cicline chinasi e fosfatasi e successivamente la trascrizione e la traslazione necessarie alla condensazione della cromatina e la lisi della vescicola germinale (Hunter, 2000). L'ovocellula acquista la "competenza" funzionale nel momento quando essa è in grado di ripristinare la meiosi in vitro. Per contro, in vivo tale capacità viene mediata dalla secrezione dell'ormone luteinizzante (LH) che stimola la rottura delle "gap junctions" in seguito alla deiscenza del follicolo preovulatorio.

Una delle cicline più studiata risulta essere la B-p34cdc2, nota anche come fattore promotore della maturazione (MPF) il quale attiva delle reazioni a cascata che portano alla degenerazione della vescicola germinale, condensazione del materiale cromosomico ed alla formazione dello spindle o fuso mitotico Si riscontra un basso contenuto di MPF nei follicoli preantrali rispetto a quelli preovulatori

dove l'ovocellula ha raggiunto lo stadio di maturazione (Hirao et al., 1995). Altre cicline implicate nella ripresa della meiosi sono le proteine chinasi che attivano la mitosi (MAPK), il fattore promotore dell'attivazione della divisione cellula (Wehrend e Meinecke, 1998).

In definitiva, il picco delle gonadotropine determina la dissoluzione delle giunzioni serrate tra le cellule follicolari e l'ovocellula con conseguente riduzione dei livelli di OMI e di cAMP all'interno della stessa. L'eliminazione dei suddetti inibitori porta all'attivazione delle cicline MPF e MAPK con conseguente attivazione delle proteine cellulari. Tali proteine sono responsabili della degenerazione della vescicola germinale, della condensazione del materiale cromosomico e della divisione cellulare/espulsione del primo corpo polare dell'ovocellula (*Figura 1*). Alla fine della maturazione, l'oocita si arresta nella metafase II fino al momento della fecondazione.

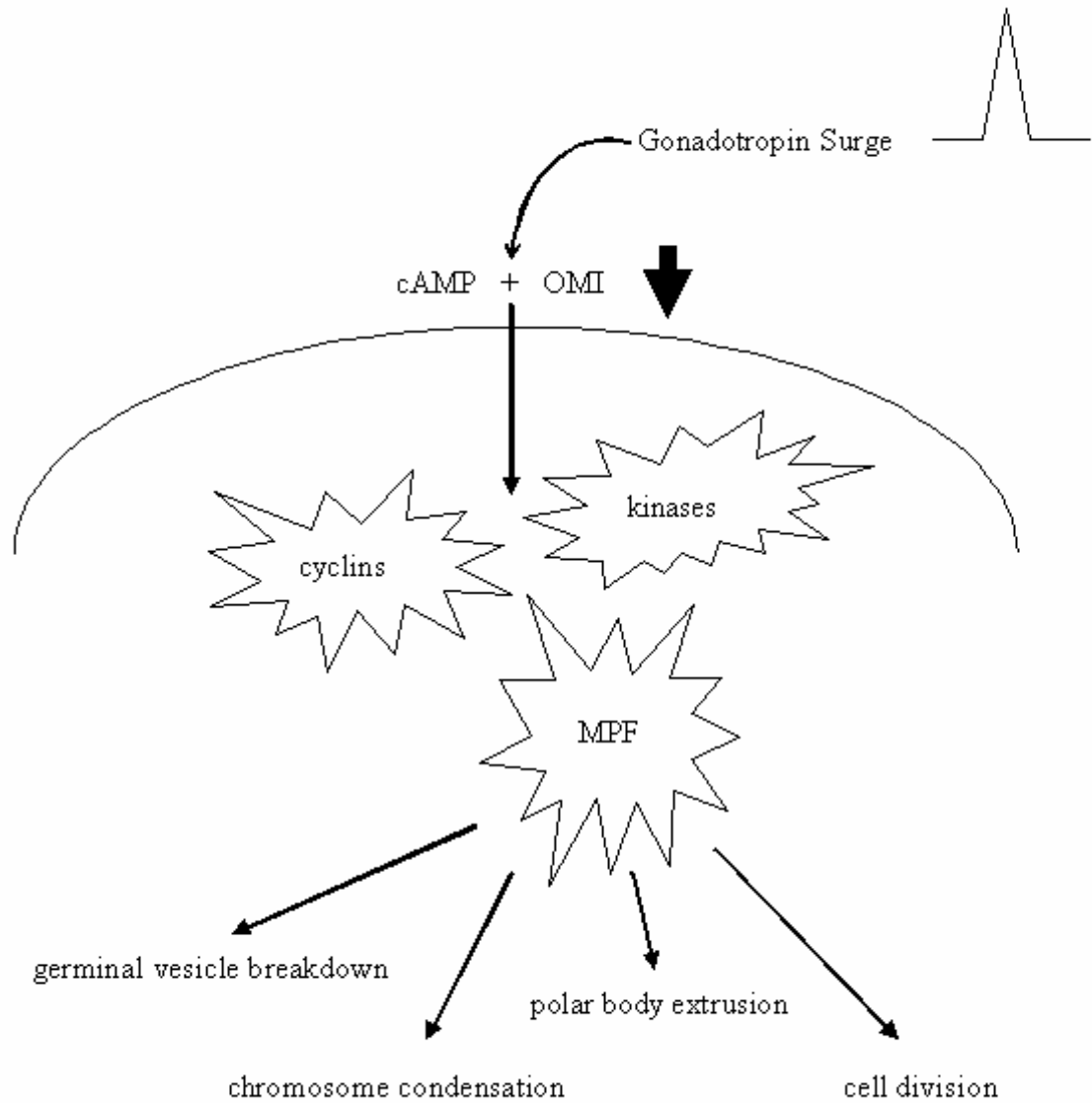


Figura 1: Meccanismi molecolari coinvolti nelle maturazione nucleare

1.2.2 Maturazione citoplasmatica

Le giunzioni serrate tra l'oocita e le cellule follicolari sono di fondamentale importanza per lo sviluppo e la maturazione dell'ovocellula e per il mantenimento dell'omeostasi. L'accoppiamento ionico ed elettronico tra le due categorie cellulari,

unito ai passaggi di nucleosidi, degli aminoacidi e dei fosfolipidi, determina la maturazione citoplasmatica.

Durante la permanenza dell'oozita nel follicolo si possono distinguere due fasi, una prima corrispondente al contemporaneo sviluppo del follicolare e dell'oozita mentre nella seconda si ha solo la crescita del follicolo (Hunter, 2000). Il grado di sviluppo è proporzionale al numero di cellule della granulosa che circondano l'oozita (Herlands, 1984); si ha anche l'aumento della superficie di contatto.

A livello dei mitocondri aumenta la sintesi al momento della maturazione dell'oozita che raggiunge la competenza con conseguente capacità di stoccaggio sotto forma di ATP, che verrà utilizzata durante le fasi della fertilizzazione.

La sintesi dell'RNA avviene prevalentemente nella fase iniziale dello sviluppo ed il 15% dell'RNAm prodotto viene legato ai ribosomi mentre il rimanente viene stoccato per le eventuali necessità cellulari.

Diversi studi ipotizzano che l'RNA viene utilizzato nella formazione della zona pellucida; tale ipotesi è supportata dal fatto che i livelli totali di RNA cellulare vengono quasi totalmente esauriti durante la fertilizzazione (Szöllösi, 1993; Thibault et al., 1993). Inoltre durante la maturazione citoplasmatica avviene la formazione dei granuli corticali dell'apparato di Golgi che migrano verso la membrana plasmatica e vi permangono fino al momento dell'attivazione. A

maturazione completata, i granuli corticali migrano al di sotto della membrana plasmatica e sono pronte per l'esocitosi durante le fasi della fertilizzazione.

1.2.3 Struttura della zona pellucida

La struttura della zona pellucida (ZP) è stata indagata con l'ausilio della microscopia ottica, quella elettronica ed i legami con anticorpi e colorazioni specifiche, i quali hanno rivelato una struttura a rete relativamente disomogenea costituita da 2-3 strati concentrici di catene fibrillo granulare (Parks, 1960; Dumont et al., 1985). Dato che le glicoproteine vengono sintetizzate nelle ovocellule in fase di crescita pertanto risultano estremamente stabili dopo l'incorporazione nella ZP, è verosimile che la disomogeneità sia dovuto ad uno stretching della porzione esterna della stessa, cosa necessaria per bilanciare lo sviluppo dell'ovocellula e che comporta la riduzione della densità delle fibre. Le caratteristiche di base della ZP di topo sono state evidenziate con microscopia elettronica a trasmissione su preparati solubilizzate di ZP. Fondamentalmente è costituita da 2-3 filamenti interconnessi e di larghezza uniforme (circa 7nm). Questi filamenti, al microscopio mostrano una struttura ripetibile ogni 14-15nm quale denota la presenza di etero dimeri ZP2:ZP3. L'elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di sodio dodici

solfato (SDS-PAGE) ha permesso l'identificazione di dimeri ZP2; ZP3 del peso di 180.000M_r e di altri oligomeri ad alto peso molecolare. Le ZP2 e ZP3 son rappresentati in quantità equimolare nella ZP (Wassermann, 1988). Sottoponendo la ZP ad un trattamento con ditionitrotolo (DTT) si ha la riduzione dei legami intermolecolari della ZP1, mentre il trattamento con chimiotripsina determina una proteolisi parziale. Queste osservazioni suggeriscono che la ZP è responsabile delle interconnessioni tra i filamenti della ZP costituendo così una struttura tridimensionale. Essendo la ZP1 un dimero, composto da catene polipeptidi che identiche, le molecole possono parzialmente interagire con due filamenti differenti (Wassermann, 1988).

Nella bovina la ZP è composto da glicoproteine altamente modificate ossia ZP1, ZP2 ZP3- α , ZP3- β e ZP4, inoltre è stato recentemente rivelato che la ZP2 e la ZP4 sono frammenti della ZP1 (Topper et al., 1997). Ciascuno di questi frammenti svolge la propria funzione; nella bovina il recettore spermatico è attribuito alla ZP3- α . La ZP2 serve da recettore secondario nella reazione acrosomiale dello spermatozoo. Dopo la fusione dei gameti gli enzimi rilasciati dai granuli corticali convertono ZP2 e ZP3 in ZP2 f e ZP3 f rispettivamente. Tale reazione ovocellula-indotto gioca un ruolo nel blocco della polispermia (Kopf, 1990). All'osservazione col microscopio elettronico a scansione

(SEM) della ZP la superficie esterna rivela un aspetto reticolare mentre la superficie interna ha un aspetto rugoso (Philips e Shalgi, 1980; Keefe et al., 1997).

Dati riguardanti le proprietà della ZP di ovocellule bovina fecondate in vitro sono limitati, tutta via studi effettuati con l'uso del microscopio elettronico a scansione (SEM) su ovocellule immature rivelano una superficie esterna con una distribuzione irregolare di numerosi pori, screpolature e sporgenze (*Figura 2*), (Ridell et al., 1993). Altrettanto studi effettuati con l'uso della spettroscopia a forza atomica su ovocellule bovine immature, mature e fertilizzate rivelano una superficie composta da un denso reticolo di fasce fibrillare disposte in modo casuale (Papi et al 2009).

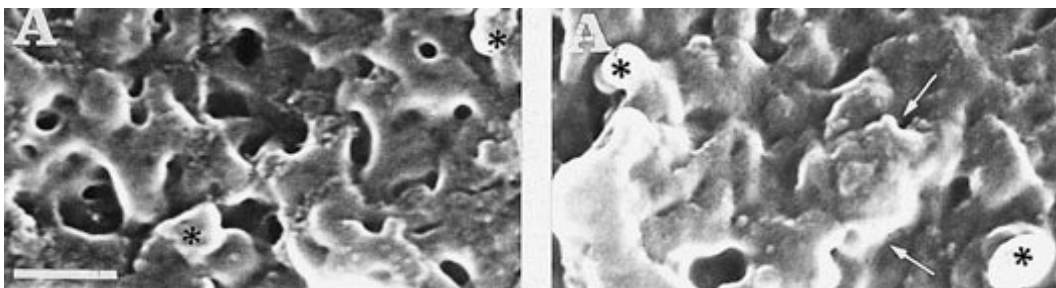


Figura 2: Immagini della microscopia elettronica a scansione della zona pellucida dell'ovocellula maturata bovina.

La ZP svolge diverse funzioni quali; la fusione specie-specifica dello spermatozoo, il blocco della polispermia, previene la dispersione dei blastomeri durante la fase progressiva di preimpiantazione, facilita il passaggio dell'embrione attraverso l'ovidotto proteggendolo inoltre, nella prima fase di sviluppo dello stesso (Wasserman, 1990); Epifano e Dean, 1994).

1.3 Polispermia

La polispermia comporta la penetrazione dell'oocita, di più di un spermatozoo al momento della fecondazione; fenomeno evidenziabile dalla formazione di più di due pronuclei (*Figura 3*). La sua etologia costituisce sia un problema che un mistero per tanti versi per quanto riguarda la IVF in diverse specie, il bovino ivi incluso.



Figura 3: Immagine di ovocellula polispermica della bovina

E' stato dimostrato che episodi di polispermia in vitro siano più frequenti (Leibffreid-Rutledge et al., 1987) rispetto a quelli in vivo, tra l'altro bovino presenta una percentuale circa il 25% rispetto alle altre specie. I motivi per tale fenomeno non sono del tutto chiari. Alcuni studi suggeriscono che la polispermia sia dovuto ad una mancanza di esposizione delle ovocellule, appena prelevate dall'ovidutto, al complesso glicoproteine-eparina ovidutto specifico. Complesso che contribuirebbe a mascherare i siti della fusione spermatica presenti sulle ovocellule (Coy et al., 2008). In fatti dal momento in cui la fertilizzazione dipende dalla penetrazione spermatica attraverso la ZP, una incompleta reazione zonale potrebbe creare una incompleta struttura biomeccanica a livello della membrana plasmatica (Papi et al., 2010). Altri studi recenti sostengono il fatto che le reazioni scatenate dal rilascio dei granuli corticali contribuiscono al blocco della polispermia e dal momento in cui ci sia un malfunzionamento di tale reazioni avviene la polispermia (Dandekar e Talbot, 1992; Hoodby e Talbot, 1994).

1.4 Cenni di fisiologia dell'ovidotto bovino

L'ovidutto si estende dalle immediate vicinanze dell'ovaio fino all'utero con il quale prende direttamente contatto tramite la giunzione utero-tubarica. Esso è una struttura altamente specializzata che prende

origine, durante l'embriogenesi, dalla porzione craniale del primitivo dotto di Müller; ha la forma di un condotto allungato e in esso si riconoscono 4 distinte regioni anatomiche che sono l'infundibulo, l'ampolla, l'istmo e la giunzione utero-tubarica.

L'infundibulo è la porzione più distale dell'ovidutto e si apre nella cavità peritoneale; l'apertura, detta ostio, è rivestita da strutture simili a dei petali densamente ciliati, chiamate fimbrie che, essendo parzialmente attaccate alla superficie dell'ovaio, facilitano la cattura dell'ovocita al momento dell'ovulazione.

La fecondazione avviene nell'ampolla che si estende dall'infundibulo fino alla giunzione istmo-ampollare. Il lume dell'ampolla è più ampio di quello dell'istmo e diminuisce di calibro procedendo dall'infundibulo verso la giunzione istmo-ampollare. L'istmo si estende fino alla giunzione utero-tubarica e si apre direttamente nella cavità uterina. La parete del tratto istmico consta di uno spesso strato di muscolatura liscia che circonda uno stretto lume di circa 0.4 mm. L'epitelio oviduttale è costituito da cellule colonnari che possono essere distinte in due principali categorie, le cellule ciliate e le cellule secernenti. Le prime sono più numerose nella fimbria e nell'ampolla, mentre le secernenti predominano nell'istmo. Entrambi i tipi cellulari subiscono dei cambiamenti strutturali e funzionali sotto l'influenza

degli ormoni secreti dall'ovaio durante le varie fasi del ciclo estrale (Jansen, 1984).

1.4.1 Ruolo dell'ovidotto nel processo della IVF

In vivo, in molte specie di mammifero si assiste ad una drastica riduzione del numero di spermatozoi dopo l'eiaculazione in vagina. Infatti, molti rimangono sequestrati all'interno del "coagulo" che si forma in vagina, e solo quelli dotati di una rapida motilità progressiva sono capaci di attraversare il canale cervicale, il lume dell'utero e pervenire quindi alla giunzione utero tubarica che, a causa del suo stretto diametro, rappresenta un'ulteriore barriera naturale per l'ascesa degli spermatozoi nell'ovidotto. L'ultima fase di selezione è rappresentata dalla zona pellucida che permetterà di far penetrare nell'ovocita un unico spermatozoo, quello più competente alla fecondazione. La notevole riduzione del numero degli spermatozoi implica una forte selezione negativa nel tratto riproduttivo femminile. D'altra parte altri meccanismi devono assicurare che un numero adeguato di spermatozoi si renda disponibile nel sito di fecondazione al momento del rilascio dell'ovocellula dal follicolo preovulatorio.

Uno di questi meccanismi implica, probabilmente, la presenza di sostanze chemiotattiche nell'ovidotto nella fase ovulatoria; infatti, è stato osservato che nell'uomo, il trasporto passivo degli spermatozoi

nelle tube di Falloppio non è simmetrico, ma influenzato dall'ovaio ipsilaterale in cui si è sviluppato il follicolo dominante. È stato osservato che gli spermatozoi si dirigono preferibilmente verso la tuba che contiene l'ovocita e da ciò è stata avanzata l'ipotesi che lo stesso complesso cumulo-ooforo-ovocita (COC) o, più verosimilmente, i fattori rilasciati dopo la deiscenza del follicolo dominante, possano svolgere una funzione chemio tattica nei confronti degli spermatozoi nel sito di fecondazione (Harper, 1994). A tale riguardo, studi recenti nell'uomo durante i cicli di fecondazione assistita hanno dimostrato che solo i fluidi follicolari associati agli ovociti competenti alla fecondazione ed allo sviluppo embrionale sono dotati di un'azione chemiotattica. Sembra che la produzione delle sostanze chemiotattiche sia una prerogativa solo del follicolo dominante, sebbene tuttora non siano state le suddette molecole (Ralt et al., 1991).

Nei bovini il periodo che intercorre tra l'inizio dell'estro e l'ovulazione è di circa 30 ore ed è stato visto che occorrono circa 8 ore affinché nell'ovidutto si raccolga un adeguato numero di spermatozoi, ovvero una riserva spermatica sufficiente ad assicurare un'elevata percentuale di fecondazione. Quindi, gli spermatozoi destinati a fecondare, devono trascorrere circa 22 ore nell'ovidutto (Pollard et al., 1991). Poiché gli spermatozoi messi ad incubare nel solo mezzo di coltura mantengono la loro vitalità e la motilità per

periodi più brevi, devono esistere meccanismi alternativi all'interno dell'ovidutto che preservano la capacità fecondante degli spermatozoi fino al momento dell'ovulazione (Pollard et al., 1991).

È stato proposto che la riserva spermatica descritta nel bovino (Hunter and Wilmut, 1984), nella pecora (Hunter and Nichol, 1983), nella scrofa (Hunter, 1981; Hunter 1984), nel criceto (Battaglia et al., 1979; Smith et al., 1987), nel coniglio (Harper, 1973; Overstreet et al., 1978), nel porcellino d'India (Yanagimachi et al., 1976), nel topo (Zamboni, 1972; Suarez, 1987) e nell'uomo (Mansour et al., 1993; Williams et al., 1993; Thomas et al., 1994; Hunter, 1995; Pacey et al., 1995; Kunz et al., 1996; Baillie et al., 1997) sia limitata alla regione istmica dell'ovidutto e che essa gioca un ruolo fondamentale nell'assicurare la presenza di spermatozoi atti a supportare la fecondazione e lo sviluppo embrionale al momento dell'ovulazione (Figura 2) (Harper, 1973; Hunter and Wilmut, 1984; Hunter, 1984; Smith et al., 1987; Suarez, 1987; Hunter et al., 1991).

Esistono diversi fattori alla base della riserva di spermatozoi nell'istmo:

- 1) costrizione del lume oviduttale nella regione istmica (Suarez, 1987);
- 2) una più bassa temperatura nella parte prossimale dell'istmo (Hunter et al., 1986);

3) la presenza di muco o di particolari sostanze secrete dalle cellule della mucosa dell'istmo (Suarez and Lefebvre, 1997). Le secrezioni presenti nel lume oviduttale potrebbero avere un ruolo fondamentale, sebbene le opinioni sono discordanti. Infatti, nei bovini, è stato riportato che il fluido oviduttale e le specifiche glicoproteine secrete dalle cellule epiteliali della mucosa oviduttale durante la fase follicolare del ciclo estrale, come l'oviduttina, sono in grado di mantenere efficacemente la vitalità e la motilità degli spermatozoi (Abe et al., 1995). Tuttavia l'incubazione degli spermatozoi nel solo fluido dell'istmo nel periodo periovulatorio, determina una riduzione della motilità spermatica con un contemporaneo aumento della percentuale di spermatozoi che vanno incontro alla reazione acrosomiale e, quindi non più disponibili per la fertilizzazione. Altri autori hanno dimostrato che gli spermatozoi, durante il loro soggiorno nell'ovidutto, non si muovono liberamente, ma si legano alla superficie apicale delle cellule epiteliali (Hunter et al., 1991); quindi il legame degli spermatozoi all'epitelio oviduttale è probabilmente il più importante fattore coinvolto nella formazione della riserva spermatica (Bader, 1982; Suarez, 1987; Hunter et al., 1987).

In vivo gli spermatozoi si legano tramite la porzione rostrale della testa, così come osservato attraverso la metodica della trans illuminazione di espianti di ovidutto nel topo (Suarez, 1987) e nel

criceto (Katz et al., 1980). La microscopia elettronica a scansione ha permesso di evidenziare il legame degli spermatozoi all'epitelio oviduttale tramite la regione acrosomiale nel suino, nel bovino ed nel cavallo (*Figura 4*) (Bader, 1982; Hunter et al., 1987; Hunter et al., 1991).

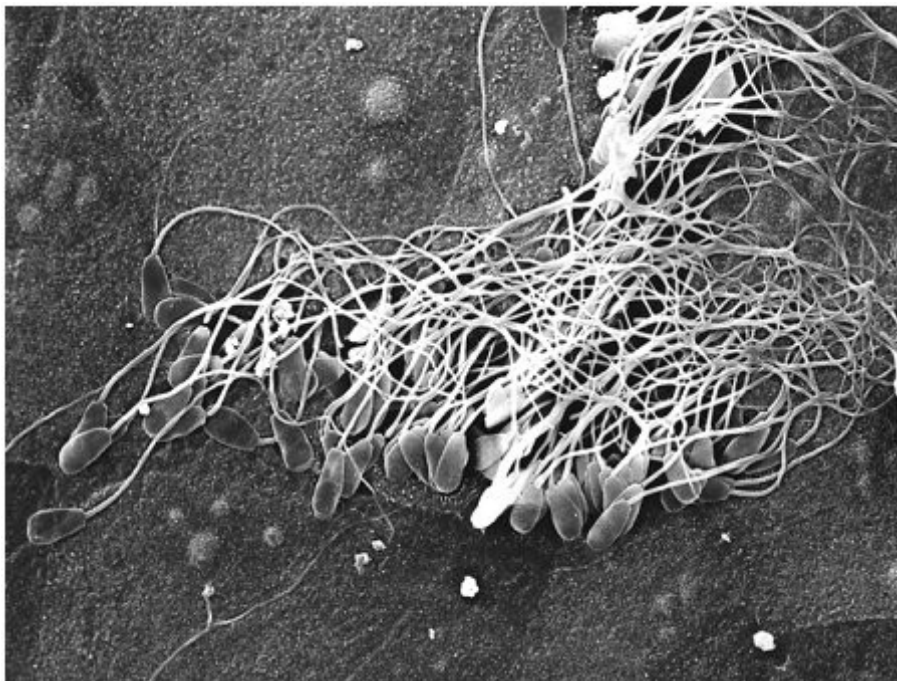


Figura 4: Micrografia elettronica a scansione di spermatozoi bovini adesi a cellule tubariche bovine

In vivo, è stato dimostrato che le giunzioni serrate si formano anche tra gli spermatozoi umani e le cellule oviduttali omologhe (Williams et al., 1993). A ciò si associa anche l'effetto dell'abbondante muco viscoso presente nell'istmo al momento dell'ovulazione che

intrappola gli spermatozoi, contribuendo all'immagazzinamento degli spermatozoi nelle tube uterine (Donnez et al., 1985; Jansen, 1995).

Sembra che i glicoconiugati presenti nel lume oviduttale siano coinvolti nella formazione di tale riserva poiché mediano l'adesione e aumentano la sopravvivenza degli spermatozoi (Williams et al., 1993).

Nelle tube umane, i glicoconiugati delle OEC differiscono da quelli delle cellule ciliate che presentano un residuo di acido sialico e delle cellule secernenti con residui di fucosio (Jansen et al., 1995). Questi residui di fucosio sono distribuiti uniformemente su tutta la superficie della tuba nella donna, mentre i residui di galattosio sono stati trovati solamente nell'istmo, a conferma del fatto che questi residui istmici svolgono un ruolo specifico nel sito di deposito degli spermatozoi (Williams et al., 1993). Ulteriori osservazioni *in vitro*, hanno mostrato che questa interazione preserva efficacemente il mantenimento della motilità degli spermatozoi nel tempo. Alcune ricerche effettuate sui criceti e sui bovini hanno evidenziato che quando gli spermatozoi vengono coincubati *in vitro* con gli estratti di vescicole delle membrane apicali delle cellule oviduttali, si ha il mantenimento della motilità spermatica, analogamente a quanto si osserva *in vivo*; inoltre l'effetto delle vescicole era tessuto-specifico e influenzato dalla fase del ciclo estrale in cui si trova la femmina quando si prelevano le

ovocellule. Solo gli ovociti raccolti nel periodo preovulatorio contenevano le sostanze atte al mantenimento della motilità spermatica (Smith et al., 1998).

L'adesione degli spermatozoi all'ovidutto potrebbe svolgere molteplici funzioni quali:

1) la prevenzione della polispermia, garantendo il rilascio di pochi spermatozoi e quindi di raggiungere l'ovocita al momento opportuno della fecondazione. In uno studio sperimentale effettuato sul suino, è stato aumentato il numero di spermatozoi nel sito di fecondazione attraverso diverse tecniche quali l'inseminazione chirurgica direttamente nell'ovidutto (Polge et al., 1970; Hunter, 1973), la sezione di un tratto dell'ovidutto al fine di bypassare la zona dove si ha la cattura degli spermatozoi (Hunter and Leglise, 1971) e la somministrazione di progesterone (Day and Polge, 1968). In questi casi si osservava un aumento del tasso di polispermia (Nagai and Moor, 1990; Hunter, 1991).

2) il mantenimento della capacità fecondante degli spermatozoi dall'inizio dell'estro al momento dell'ovulazione. La motilità e la fertilità *in vitro* degli spermatozoi bovini viene conservata più a lungo se questi vengono incubati su colture d'organo d'ovidutto rispetto ad altre tipologie tissutali o al solo medium di coltura sintetico (Pollard et al., 1991; Chian and Sirard, 1995).

La capacitazione e la conseguente iperattivazione avverrebbero all'interno della porzione dell'istmo (Hunter and Hall, 1974; Suarez et al., 1998; Ellington et al., 1993). Pertanto, si può presumere che avvenga a livello dell'istmo il rilascio di alcuni fattori periovulatori che raggiungono il sito di fertilizzazione, ovvero l'ampolla, attraverso la loro adesione alle cellule epiteliali. In diverse specie, la capacità degli spermatozoi di aderire all'epitelio sembra essere correlato negativamente alla loro capacitazione; infatti gli spermatozoi capacitati di toro e di criceto si legano alle cellule epiteliali oviduttali in quantità minore rispetto a quelli non capacitati (Smith et al., 1998). La capacitazione è un prerequisito fondamentale alla fertilizzazione ed è costituita da una serie di modificazioni della membrana citoplasmatica che permettono agli spermatozoi di andare incontro alla reazione acrosomiale quando vengono esposti ad un agente induttore quale una glicoproteina costituente la ZP (Chang, 1951; Ellington et al., 1993; Bleil et al., 1980; Bleil and Wassermann et al., 1983). Queste modificazioni consistono nella rimozione, aggiunta e/o nell'alterazione dei componenti della membrana plasmatica spermatica. Parte di quest'ultima avviene nell'ovidutto e potrebbe essere responsabile del rilascio degli spermatozoi dalle cellule epiteliali (Yanagimachi et al., 1994).

2. TECNICHE DI FERTILIZZAZIONE IN VITRO

Il sistema della fertilizzazione in vitro e la successiva coltura embrionale deve rispecchiare le condizioni in vivo. Le tecniche di produzione in vitro degli embrioni si basano sul prelievo di ovociti che hanno completato la propria crescita all'interno del follicolo ovarico. Soltanto gli ovociti presenti all'interno di follicoli con diametro maggiori di 2mm contengono un'ovocellula dotata di competenza per il successivo sviluppo embrionale (Galli e Moor, 1991). Tuttavia le condizioni in vitro risultano inferiori alle condizioni in vivo; tutto ciò è evidenziato dalla bassa percentuale di formazione del pronucleo (MPN) e dall'alta incidenza di polispermia in corso di fertilizzazione in vitro (Hunter, 2000). Le cellule degli zigoti polispermici hanno un peso molecolare più basso rispetto a quelle normali ed una bassa percentuale di clivaggio (Han, 1999). L'impiego di seme di toro congelato comporta una maggior selezione della popolazione spermatica rispetto al seme fresco, oltre a facilitare la ripetibilità, sebbene quello congelato presenti una più bassa motilità (Wang et al., 1991). Tuttavia il reale motivo del più basso successo della IVF è sconosciuto; sono state avanzate delle ipotesi che attribuiscono tale fenomeno all'inadeguata diffusione dei granuli corticali (Cran e Cheng, 1998) oppure alla significativa riduzione dello spessore della ZP e dello spazio perivitellino (PVS) (Wang et

al., 1998). La maturazione *in vitro* avviene dopo circa 24 ore di incubazioni a 38°C al 5% di CO₂; quindi le ovocellule vengono fertilizzate in un medium di fertilizzazione con del seme adeguatamente selezionato. Infine gli eventuali zigoti vengono messi in coltura per 5-6 giorni fino alla formazione delle blastocisti.

Le ovocellule vengono prelevate dalle ovaie attraverso l'OPU ecoguidata o per slicing delle ovaie prelevato la macellazione della bovina al mattatoio (Galli e Moor, 1991; Lazzari e Galli, 1993; Lazzari e Galli, 1996; Galli et al., 2001). Le nuove tecniche di riproduzione assistita consentono di aumentare la pressione di selezione sulla linea femminile (Lohuis, 1995) e sono utilizzate in campo animale non necessariamente per la cura della fertilità bensì per aumentare il numero di embrioni prodotti per ogni singola donatrice. La scelta del metodo di prelievo delle ovocellule dipenderà dalla necessità di operare su delle ovocellule pre o post ovulatorie oppure dall'esigenza di prelevare su bovine in vivo o da soggetti abbattuti. La fertilizzazione *in vitro* mediante ICSI, fondamentale nella riproduzione assistita umana, è effettuabile nel bovino, anche con sperma liofilizzato, ma non è ancora ampiamente applicata (Keskinetepe et al., 2002).

2.1 Prelievo delle ovocellule.

Innanzitutto vanno considerati i metodi di prelievo delle ovocellule quale prima fase della procedura di IVF. Il prelievo delle ovocellule viene eseguito tramite isolamento dei follicoli, la loro dissezione, l'aspirazione oppure "slicing". Nel prelievo da soggetti in vita può essere impiegato sia l'ovariectomia che la laparoscopia con l'ausilio di una sonda ecoguidata (Besenfelder et al., 1999; Besenfelder et al., 2001). Gli stessi autori trovarono utile l'ovariectomia come metodo di recupero di ovaie da animali provenienti dall'estero, ciò ha permesso una più facile identificazione delle donatrici rispetto alle ovaie raccolte indiscriminatamente al mattatoio. Inoltre, tale metodo si è rivelato utile per la conservazione e riproduzione del patrimonio genetico di soggetti con problemi di fertilità.

La tecnica dell'ovum pick-up (OPU) prevede l'utilizzo di un ecografo con una sonda endovaginale di 6MHz per l'individuazione dei follicoli di un diametro minimo di 2-3mm e di un ago collegato ad un aspiratore per la raccolta delle ovocellule direttamente dalle strutture follicolari. La sonda ecografica viene inserita in vagina e attraverso l'altro braccio inserito nel retto si fa avvicinare l'ovaio alla sonda dell'ecografo per effettuare la puntura e la successiva aspirazione del liquido follicolare. Un secondo operatore muove l'ago che è montato

sulla sonda aspirando così i follicoli visualizzati ecograficamente. In media si aspirano 15-20 follicoli e si ottengono 8-10 ovocellule in un intervallo di 15-20 minuti. Durante il prelievo la donatrice è contenuta in un travaglio, sedata e sottoposta ad un'anestesia epidurale. Inoltre tale operazione viene di solito effettuata due volte a settimana per diverse settimane senza provocare delle lesioni anatomiche alla bovina donatrice. Dopo l'ultima sessione di prelievo di norma la bovina rimani manifesta un'estro entro 7-10 giorni.

I vantaggi di questa tecnica si basano sulla possibilità di produrre embrioni anche da donatrici entro i primi 3-4 mesi di gravidanza, da donatrici ipofertili o sterili; in alcuni casi tale metodica svolge anche un effetto terapeutico con il recupero della capacità riproduttiva della bovina. Un altro vantaggio è che non serve un trattamento ormonale per stimolare lo sviluppo follicolare, soprattutto se il prelievo viene effettuato con regolarità, 1-2 volte a settimana; ciò risulta di particolare utilità nei soggetti giovani o ipofertili (Lazzari et al., 1996).

Lo "slicing" delle ovaie consiste nell'effettuare numerose e piccole incisioni con un apparato multilame sulla superficie ovarica in corrispondenza dei follicoli ovarici, al fine di raccogliere anche gli ovociti immaturi. Tale metodo viene impiegato sia come unico mezzo oppure in complemento all'aspirazione con conseguente aumento

della percentuale di recupero delle ovocellule in vitro (Carola et al., 1994; Jain et al., 1995; Mantovani et al., 1999).

2.2 Maturazione in vitro (IVM)

I risultati ottenuti nel campo della produzione embrionale in vitro sono da ricondursi agli studi effettuati sui meccanismi fisiologici dello sviluppo follicolare in vivo. Negli ultimi vent'anni sono stati fatti notevoli progressi sui protocolli impiegati per la maturazione in vitro delle ovocellule, quali lo studio delle interazioni durante le prime ore di maturazione tra le cellule della granulosa e l'ovocellula stessa (Staigmiller e Moor, 1984). Gli oociti per l'IVM possono essere recuperati da diversi tipi di donatrici e con diversi metodi. Essendo gli oociti molto sensibili allo shock termico, è importante monitorare attentamente la temperatura durante le fasi di raccolta. Le condizioni di maturazione adottate dalla maggior parte dei laboratori implicano l'uso del medium di coltura TCM199 supplementato con il 10% di siero fetale bovino (FCS) e delle gonadotropine FSH e LH, in un ambiente al 5% di CO₂ e 20% di O₂ a 38.5°C. Dopo 20-24 h di incubazione le ovocellule completano la maturazione con l'estrusione del primo globulo polare e quindi pronte per la fertilizzazione. In condizioni ottimali oltre il 90% degli oociti raggiungono la metafase II. Prima della fertilizzazione le cellule del cumulo vengono

parzialmente rimosse lasciando solo pochi strati di cellule della corona radiata attorno all'oocita (Galli et al., 2003). Un miglioramento dell'efficienza di produzione embrionale in vitro è stata ottenuta in diverse specie con l'aggiunta al medium di maturazione della cisteamina, composto tiolico di basso peso molecolare. Infatti, è stato dimostrato che la cisteamina migliora lo sviluppo e la quantità di embrioni bovini ed ovini attraverso l'incremento della sintesi del glutatione (GSH) (de Matos et al., 1996; de Matos et al., 2000). Quest'ultimo riveste un ruolo fondamentale nella protezione delle cellule contro lo stress ossidativo, che rappresenta uno dei maggiori fattori che ostacolano lo sviluppo in vitro degli embrioni di mammifero. È stato osservato, infatti, che la concentrazione di GSH aumenta a livello ovarico durante la maturazione in vivo e protegge l'oocita nei successivi stadi di sviluppo (Perreault et al., 1988).

2.3 Fertilizzazione in vitro

Nella specie bovina l'IVF rappresenta un punto critico nel sistema della produzione embrionale in vitro. Infatti, da quanto emerso nella nostra esperienza, a fronte dell'alta percentuale di maturazione nucleare in vitro degli oociti bovini (80%) il cleavage risulta più basso (70%).

Tuttora non è stato chiarito se ciò sia dovuto a problemi nella fase della fertilizzazione in vitro o ad un inadeguato sistema di maturazione, poiché durante quest'ultima fase, si verificano nell'oocita una serie di modificazioni sia a livello nucleare che citoplasmatico che ne consentono poi la fertilizzazione. È stato comunque dimostrato che a seguito del congelamento del seme si verificano dei danni acrosomiali, l'inattivazione degli enzimi, delle alterazioni dello scambio ionico e del pH e la perdita della motilità spermatica (Meur et al., 1988). Un altro limite è rappresentato dalla grande variabilità nella capacità fecondante dei tori: solo il 10% dei tori testati nel nostro laboratorio è caratterizzato da una buona capacità fecondante in vitro.

Un passaggio critico dell'IVF è la capacitazione del seme, che nel bovino può essere ottenuta attraverso diverse metodiche. Il seme può essere preincubato in una soluzione eparinizzata (Madan et al., 1994a; Madan et al., 1994b; Chauhan et al., 1997a; Chauhan et al., 1997b; Chauhan et al., 1997c; Boni et al., 1994b; Boni 1994; Bacci et al., 1991; Boni et al., 1999) oppure la stessa può essere aggiunta direttamente al medium di fertilizzazione (Totey et al., 1992; Totey et al., 1993a; Totey et al., 1996; Gasparrini et al., 2000; Neglia et al., 2001). La concentrazione ottimale di eparina varia in funzione del

toro; pertanto è necessario indagare ogni singolo toro da adibire ai piani di fecondazione in vitro.

Quando si ricorre al seme congelato, è importante effettuare una selezione sulla popolazione spermatica al fine di utilizzare solo gli spermatozoi dotati di una elevata motilità. A questo scopo si può ricorrere alla tecnica dello “swim up” che prevede la stratificazione del mezzo di coltura direttamente sul campione di liquido seminale; gli spermatozoi mobili migrano all’interno del mezzo di coltura stesso. Dopo un periodo d’incubazione di 30 a 90 minuti viene la frazione surnatante contenente gli spermatozoi dotati di buona motilità viene aspirata e trasferita in una nuova provetta che verrà successivamente centrifugata e concentrata (Chuangsoongneon e Kamonpatana, 1991; Madan et al, 1994a; Chauhan et al., 1997a; Chauhan et al., 1997b; Nandi et al., 1998; Boni et al., 1994; Bacci et al., 1991; Boni, 1994; Neglia et al., 2001). Un’altro metodo consiste nello stratificazione del liquido seminale sopra un gradiente discontinuo di Percoll seguita da centrifugazione per un tempo predefinito (Galli e Lazzari, 1996). Sul fondo della provetta si depositano gli spermatozoi dotati di buona motilità; si elimina il surnatante e si racche vengono poi recuperati (Boni et al., 1999; Totey et al., 1993a; Totey et al., 1993b; Gasparrini et al., 2000). Inoltre è stato dimostrato che sostanze quali la caffeina (Totey et al.,

1992; Madan et al., 1994b; Madan et al., 1994a; Chauhan et al., 1997b; Chauhan et al., 1997c; Bacci et al., 1991) e la teofillina (Jainudeen et al., 1993) migliorano la motilità e la capacità fecondante ed allo stesso scopo, sono stati aggiunti con successo al terreno di fertilizzazione penicillamina, ipotaurina ed epinefrina (Madan et al., 1994b; Totey et al., 1993a; Totey et al., 1996). I media più comunemente usati per l'IVF sono il "Tyrode's modified medium", TALP (Totey et al., 1992; Totey et al., 1996; Gasparrini et al., 2000; Boni et al., 1994) o il "Brackett and Olifant BO" (Totey et al., 1992; Madan et al., 1994a; Chauhan et al., 1997a; Chauhan et al., 1997b; Chauhan et al., 1997c; Nandi et al., 1998; Bacci et al., 1991). Un altro fattore che sicuramente influenza l'efficienza della fertilizzazione in vitro è la proporzione di spermatozoi-oociti incubati. I risultati migliori sono stati ottenuti con una concentrazione di 2×10^6 spermatozoi per ml. In questo modo, infatti, si hanno soddisfacenti percentuali di clivaggio. Inoltre è importante sottolineare il ruolo delle cellule del cumulo per il loro effetto positivo sia sul clivaggio che sulla produzione di blastocisti. Ciò è probabilmente dovuto alla capacità delle cellule del cumulo di indurre, o comunque di contribuire sia alla capacitazione sia alla reazione acrosomiale del seme attraverso la secrezione di glicosamminoglicani (Ball et al., 1983) aumentando così la motilità, come dimostrato in campo umano

(Tesarik et al., 1990). Si suppone anche che le cellule del cumulo, attraverso un meccanismo di chemiostassi, catturino gli spermatozoi (Chian et al., 1996) oppure agiscano in modo meno specifico aumentando, semplicemente, la superficie di contatto tra spermatozoi ed oociti (Cox et al., 1993) e selezionando pochi spermatozoi capaci di reagire con l'oocita (Carrel et al., 1993).

Il tempo medio di incubazione del seme con le ovocellule è di 18-20 h, dopo di che gli zigoti vengono completamente denudati e trasferiti nel medium di coltura embrionale (Galli et al., 2003). La coltura comporta lo sviluppo dell'oocita fertilizzato sino allo stadio di blastocisti. Tra i diversi protocolli che possono essere impiegato ci sarebbe la co-coltura cellulare (Eyestone e First, 1989; Hasler et al., 1995; Carnegie et al., 1997), terreni semi-definiti come il Synthetic Oviductal Fluid SOF (Tervit et al., 1972; Gardner et al., 1994) o il CR1 (Rosenkrans e First, 1994) o procedure di coltura in vivo, ossia il trasferimento dello zigote nell'ovidotto di pecora ospite (Eyestone et al., 1987; Galli e Lazzari, 1996).

2.4 Coltura in vitro (IVC)

Un punto di non facile risoluzione, nella prospettiva di migliorare l'efficienza dell'IVEP, è rappresentato dal riconoscimento di un sistema capace di supportare lo sviluppo embrionale in vitro. Nel

1987, grazie alle ricerche di Gandolfi e Moore, si è dato largo spazio al sistema di cocoltura dimostrando la possibilità di sviluppo di embrioni ovini allo stadio di precompattazione, fino allo stadio di blastocisti se coltivati in TCM 199 con aggiunta di siero e di cellule oviduttali. Sono state effettuate ulteriori ricerche con l'intento di creare un sistema di cocoltura con cellule oviduttali al fine di migliorare lo sviluppo di embrioni bufalini in vitro (Totey et al., 1992; Madan et al., 1994a; Jainudeen et al., 1993) che hanno però dato percentuali di blastocisti molto limitate (8.2%). Un aumento dell'efficienza dell'IVEP si è ottenuto nel momento in cui i presunti zigoti sono stati coltivati utilizzando monostrati di cellule del cumulo in presenza di cellule oviduttali (Madan et al., 1994a). L'azione promuovente delle cellule somatiche sullo sviluppo embrionale, è verosimilmente ascrivibile alla secrezione di fattori embriotrofici, quali i fattori di crescita. D'altra parte, le blastocisti coltivate in presenza di IGF-1 (insulin-like growth factor noto anche con il nome di somatomedina) sono caratterizzate da un maggior numero di cellule (Narula et al., 1996) e che l'aggiunta d'insulina nella fase di IVC o l'aggiunta di BSA, di EGF (epidermal growth factor) può aumentare la percentuale di embrioni prodotti (Chauhan et al., 1997b). La disponibilità, poi, in forme di linee cellulari "pathogen free" quali le cellule di fegato di ratto, BRL (Reed et al., 1996) ha fatto sì che

queste venissero preferite alle cellule oviduttali derivanti da organi prelevati potenzialmente contaminanti. Un evento importante nel campo della produzione embrionale in vitro, è stata la formulazione di un medium di coltura definita (Tervit et al., 1972) “synthetic oviductal fluid” (SOF). È stata considerata l’ipotesi di coltivare embrioni bufalini in un sistema privo di siero e di linee cellulari (Boni et al., 1999). Nell’ambito di tale studio, quindi, sono stati confrontati due differenti sistemi di coltura: TCM 199 addizionato di siero fetale bovino al 10% in cocoltura con cellule BRL ed il SOF con 0.5% di amminoacidi essenziali, 1% di amminoacidi non essenziali e 8 mg/ml di albumina sierica bovina (BSA). Nel caso del SOF la tensione di ossigeno dell’ambiente d’incubazione è stata ridotta al 7%. Da questa prova è stata confermata l’importanza del SOF nell’ottenere non solo migliori percentuali di blastocisti rispetto all’uso di cellule come substrato colturale (13.7% vs 7%), ma anche embrioni morfologicamente migliori, con un nodo embrionale più compatto ed in grado di svilupparsi più velocemente. Quest’ultima caratteristica è importante nella valutazione della qualità di embrioni prodotti in vitro; a tal proposito si è dimostrato la diretta correlazione tra l’efficienza della produzione embrionale con un numero di cellula maggiore (Totey et al., 1996). Altro parametro che rappresenta un buon indice di qualità embrionale è la capacità di rompere la zona

pellucida, ossia la capacità di sgusciare (hatching). In un buon sistema IVEP si può, infatti, osservare la presenza di blastocisti sgusciate già a 6 giorni dalla fertilizzazione e la percentuale di embrioni prodotti viene valutata non oltre il giorno 7 post IVF. Questo perché il prolungamento dei tempi di coltura favorisce solo la valutazione numerica delle blastocisti prodotte, ma non aiuta a stabilirne la vitalità, poiché è accertato che gli embrioni che si sviluppano lentamente sono anche meno vitali. Recentemente, nel campo della produzione embrionale in vitro sia nell'uomo che nel bovino, tornano utili i sistemi di coltura con medium sequenziali (Gardner e Lane, 1998). In questo modo è stato possibile adattare alcuni componenti del medium di coltura alle diverse fasi dello sviluppo embrionale, nel tentativo di soddisfare le esigenze metaboliche embrionali che, verosimilmente cambiano tra le prime fasi di divisione ed il raggiungimento dello stadio di blastocisti. Il ricorso a terreni di diversa composizione nel corso della coltura potrebbe, quindi, contribuire al miglioramento dell'efficienza dell'IVEP in particolar nella specie bovina.

3. ANTIOSSIDANTI

L'ossigeno è il secondo elemento più abbondante dell'atmosfera terrestre e nonostante il fatto che sia indispensabile per le forme di vita aerobiche esso ne rappresenta inoltre un grave pericolo (Freeman, 2000; Lane, 2002). Tale molecola, a temperatura e pressione standard è una molecola biatomica anche se la forma più standard è quella della tripletta laddove lo stato più reattivo è quello singlet; inoltre essa costituisce quasi il 21% dell'atmosfera terrestre. Nonostante l'ossigeno atmosferico sia essenziale a la vita aerobica alcuni suoi derivati quali i radicali liberi, le specie reattive (ROS) e l'ossigeno dello stato singlet costituiscono comunque un pericolo. La respirazione anaerobica non prevede l'uso di ossigeno, ma bensì l'uso di un sistema inefficiente di un sistema di produzione energetica sotto forma di adenosina-5'-trifosfato (ATP). Per contro la respirazione aerobica richiede l'ossidazione dei substrati combustibili catalizzata dagli enzimi per la produzione dell'energia destinata al metabolismo della cellula. La respirazione aerobica avviene in due compartimenti della cellula ossia nel citoplasma (ciclo di Krebs) e nel mitocondrio (catena di trasporto degli elettroni ETS). Nella fase glicolitica il glucosio viene convertito in piruvato per poi essere inserito nel ciclo di Krebs, dove subisce la fosforilazione ossidativa, processo continuato poi dalla ETS nella membrana interna dei mitocondri.

L'ossigeno va incontro alla riduzione di quattro elettroni nella ETS così da generare l'ATP.

3.1 Specie reattive dell'ossigeno

L'ossigeno molecolare atmosferico, essendo esso stesso un radicale libero, è relativamente poco reattivo per le restrizioni definite dalle sue condizioni relative di spin. Questa proprietà previene la combustione spontanea dei materiali in un ambiente ricco d'ossigeno. L'ossigeno molecolare viene sottoposto alla riduzione di quattro elettroni per essere convertito in acqua. Le quattro reazioni riduttive generano degli intermedi che sono comunemente e collettivamente chiamate ROS. Le ROS includono specie chimiche radicali e non radicali. Per definizione, qualunque specie chimica (atomo o molecola) con un elettrone spaiato viene definita radicale libero (Lane, 2002).

I tipici radicali liberi dell'ossigeno sono il superossido (O_2^-), il radicale idrossilico ($\cdot OH$), il radicale perossido (RO^2), ed il radicale idroperossido (HO_2). I ROS non radicali sono il perossido di idrogeno (H_2O_2), l'acido ipocloroso, ossigeno singlet (O_2), e l'ozono (O_3). Le specie reattive dell'azoto (RNS) come il perossido nitrico ($OONO\cdot$) e l'ossido nitrico ($NO\cdot$) vengono a volte anche compresi sotto la stessa categoria (*Figura 5*).

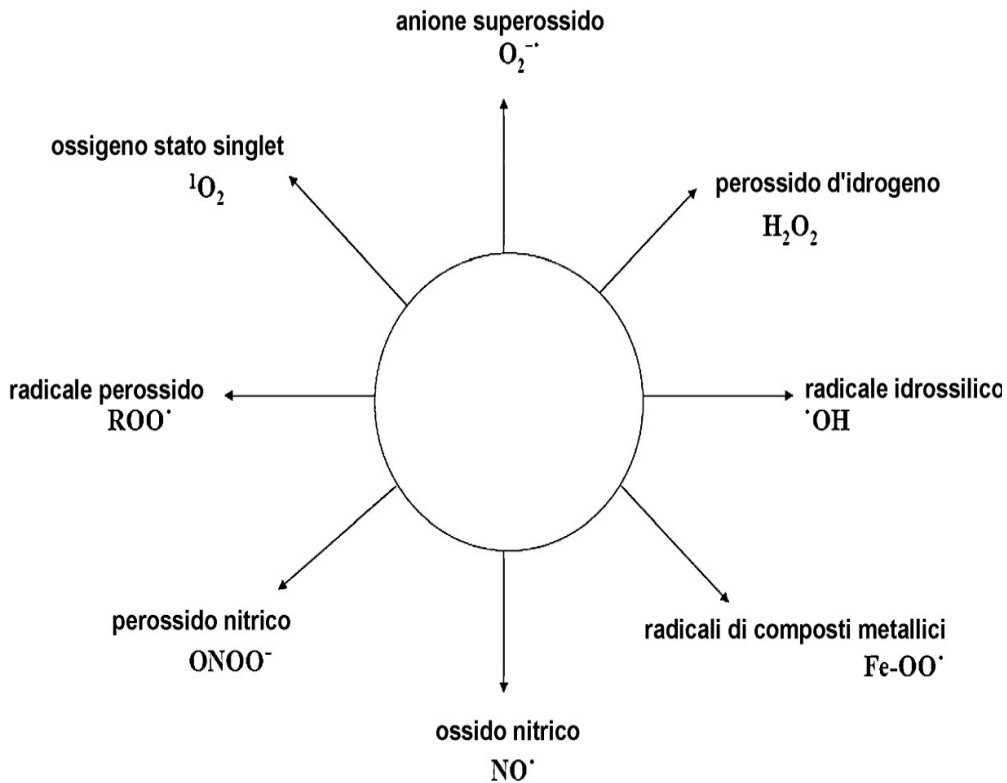


Figura 5: le diverse specie di ROS derivanti dall'ossigeno molecolare.

I ROS sono dotati di una diversa selettività per i vari reagenti chimici insieme ad un ampio spettro di vita; vengono coinvolti nei più svariati sistemi biologici. Inoltre vengono prodotti da meccanismi enzimatici e non.

Le fonti enzimatiche sono la xantina ossidasi, la NADPH reduttasi, la ciclo ossigenasi, la lipoossigenasi, la mieloperossidasi, la glucosio ossidasi e l'ossido nitrico sintetasi; anche il disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa a livello della ETS nei mitocondri produce le

ROS, soprattutto la specie radicale superossido. Sono stati identificati numerosi enzimi che producono le ROS durante il metabolismo.

E' stato dimostrato che le fonti dei ROS possono essere rappresentati dal metabolismo della droghe e dei composti xenobiotici a livello microsomiale, dall'autossidazione delle piccole molecole come le catecolamine e dall'esposizione alle radiazioni (ionizzanti ed ultravioletti). Inoltre la lista delle condizioni patologiche (malattie) in cui si dimostra un coinvolgimento delle ROS nel meccanismo fisiopatologico è sempre in fase di aggiornamento.

L'attivazione dell'ossigeno molecolare può avvenire sia per via enzimatica che quella non enzimatica (radiazioni ionizzanti) con formazione dell'anione superossido (*Figura 6*). Tale molecola viene a sua volta trasformata in perossido d'idrogeno dall'enzima superossido dismutasi. La superossido è anche soggetta a dismutazione spontanea (non proporzionato) in ossigeno molecolare e perossido d'idrogeno. Il superossido reagisce con il perossido d'idrogeno (reazione di Haber-Weiss) per formare ossigeno molecolare, dei radicali idrossilici, e degli ioni idrossilici. I metalli di transizione (Cu^+ , Fe^{2+} , Co^{3+}) catalizzano la degradazione del perossido d'idrogeno (reazione di Fenton) in radicale idrossilico e ione idrossilico. Il perossido d'idrogeno, nonostante sia atossico, porta alla formazione di uno delle ROS più reattive, il radicale idrossilico ($\cdot\text{OH}$) nei sistemi biologici in

presenza di metalli di transizione redox-attivi, soprattutto il Fe^{2+} . E' stato dimostrato che il radicale idrossilico è all'origine di diverse reazioni ROS- mediate nei sistemi biologici (Liebert, 2007).

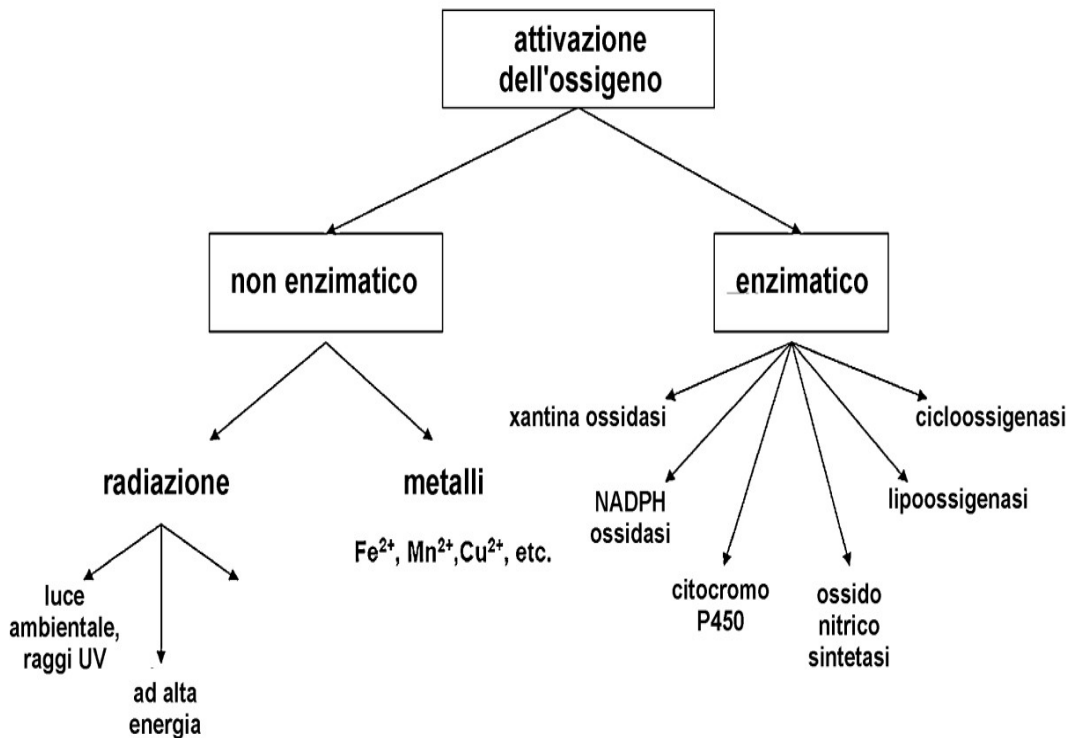


Figura 6: Vie di attivazione dell'ossigeno molecolare

Di conseguenza, i metalli di transizione redox attivi giocano un importante ruolo nella generazione delle ROS a partire dall'ossigeno molecolare. Tuttavia le ROS sono altamente reattive ed in grado di reagire con ogni molecola dell'organismo. La reattività delle ROS con le biomolecole conduce al danno dei lipidi, dei carboidrati, delle proteine e del DNA. La perossidazione dei fosfolipidi di membrana da parte delle ROS risulta essere una reazione a catena altamente dannosa. Pertanto, il danno indotto dalle ROS sulle biomolecole

presenta delle importanti implicazioni in numerosi disturbi fisiopatologici che si verificano a causa delle alterazioni indotte da radicali liberi durante i processi molecolari delle cellule.

Le proteine, sottoposte all'ossidazione da parte delle ROS, danno origine ad una moltitudine di prodotti intermedi che sono essi stessi reattivi o formano dei radicali liberi in seguito alla loro interazione con altre molecole (Aditi et al., 2007).

Il danneggiamento del DNA viene anche indotto dal radicale idrossilico altamente reattivo, determinando dei danni alle basi, la rottura in catene singole e la formazione di legami crociati i quali sono responsabili delle mutazioni indotte chimicamente e della carcinogenesi. Per tale motivo, l'ossigeno gioca un ruolo primario nelle modificazioni ossidative mediate dalle ROS sulle biomolecole dal momento in cui esse derivano dall'ossigeno.

Nonostante le diverse azioni dannose delle ROS, studi condotti hanno dimostrato la loro importanza in numerosi processi fisiologici sia a livello cellulare che sistemico. Pertanto assumono un ruolo importante nell'attivazione dei fattori di crescita cellulari a livello della muscolatura liscia dei vasi. (Baas e Berk, 1995). Essi risultano utili nell'eliminazione delle proteine non funzionali tramite l'ossidazione delle stesse e nel buon funzionamento degli organuli cellulari (Moldovan e Moldovan, 2004). Le ROS sono inoltre coinvolte nel

processo dell'invecchiamento cellulare e della morte programmata della stessa. Inoltre agiscono come mediatori intracellulari e sono indispensabili nella regolazione di svariati processi fisiologici (Lander, 1994; Drost, 2002).

Ossidazione



Riduzione



Reazione Redox



Figura 7: Equazioni generali che rappresentano le reazioni redox.

Gli elettroni che non vengono legati all'ossidante restano come radicali liberi detti specie reattive dell'ossigeno (ROS) e l'accumulo di essi oltre un certo limite all'interno della cellula può danneggiare o addirittura determinare la morte della cellula stessa, dell'organo o dell'individuo.

Gli antiossidanti per definizione rallentano o inibiscono le reazioni ossidative mediate dai radicali liberi attraverso diversi meccanismi (*Figura 8*). La loro principale funzione è quella di proteggere l'organismo dagli effetti dannosi delle ROS e di mantenere

l'omeostasi ossido riduttivo redox dell'organismo; possono pertanto essere raggruppate in due categorie, enzimatiche e non enzimatiche. Gli antiossidanti enzimatici comprendono la superossido dismutasi (SOD), catalasi, la glutatione perossidasi, la glutatione reduttasi e il tioredoxina (Blokhina et al., 2003). Gli antiossidanti non enzimatici sono i tioli quali il glutatione GSH, i tioli proteici, le vitamine A, B6, B12, C ed E, il selenio, l'acido folico ed i β -carotenoidi (Mandelkler, 2004). I vari componenti del sistema di difesa antiossidativo sono correlate tra di loro e si coadiuvano per assicurare una adeguata protezione della cellula. I benefici degli antiossidanti derivano dal fatto che essi diminuiscono o aboliscono l'eccesso di ROS nelle cellule, portando alla prevenzione dall'invecchiamento, dalle malattie cardiovascolari e dalle lesioni neoplastiche; infatti si è dimostrato che lo stress ossidativo rappresenta un importante fattore nosologico. Molti studi sono stati effettuati al fine di chiarire i meccanismi fisiologici degli antiossidanti protettivi, e la possibilità di usare gli antiossidanti come farmaci nella prevenzione di importanti condizioni patologiche. La maggior parte degli antiossidanti naturali possono agire o come pro-ossidanti o antiossidanti. Questo paradosso è molto critico per l'uso della molecola come antiossidante sicuro e efficace. In un ambiente ricco di metalli ed ossigeno, l'antiossidante diviene un pro-ossidante, generando delle molecole ROS, e causa uno stress

ossidativo. Di conseguenza, si deve usare molta prudenza nell'uso di elevate quantità di antiossidanti redox attive o come integratori alimentari o come nutrienti per la prevenzione (Aditi et al., 2007).

Solo recentemente si è scoperto l'importante ruolo degli antiossidanti nel settore della riproduzione in particolare nel miglioramento dello sviluppo embrionale (Ornoy, 2007). In numerosi studi sperimentali è stato valutato l'effetto della N-acetil cisteina (NAC) sulle ovocellule di bovino fertilizzate in vitro e sulla formazione del pronucleo maschile (Perreault et al., 1984; Calvin et al., 1986 Perreault et al., 1988; Yoshida et al., 1992; Yoshida et al., 1993).

Studi effettuati hanno dimostrato che l'aggiunta di sostanze redox come la cisteina, la cisteamina, il β -mercaptoetanololo nel medium IVM di ovocellule bovine aumenta la sintesi di GSH (de Matos et al., 1996). Ciò determina una maggior disponibilità di sostanze antiossidanti determinando un adeguato sviluppo embrionale fino allo stadio di blastocisti (de Matos et al., 1996; Telford et al., 1990; Gardener e Reed, 1995; de Matos et al., 1995).

Il glutatione (L- γ -glutamyl-cisteinil-glicin) conosciuto con la sigla GSH, è la molecola tiolica più diffusa a livello intracellulare (Meister, 1976) ed è un tripeptide non proteico con dei radicali sulfidrilico (GSH) e disulfidrilico (GSSG) (*Figura 8*). La conversione del GSSG in GSH viene prontamente catalizzata dall'enzima glutatione reduttasi

(Figura 9); così il GSH funge da maggior riducente cellulare (Jocelyn, 1959; Meister, 1982). Il GSH intracellulare svolge sia il ruolo di transporter del gruppo aminico (Meister, 1982) che quello di protettore contro lo stress ossidativo (Kosower e Kosower, 1973). Le molecole aminoacidiche (cisteina) vengono trasportate attraverso la membrana plasmatica attraverso il ciclo del γ -glutamil-cisteinil, responsabile della sintesi del GSH. Tali aminoacidi, all'interno del ciclo della γ -glutamil transpeptidasi, attraversano la membrana plasmatica legati ad un carrier. Studi effettuati hanno dimostrato l'importanza del GSH intracellulare nell'incrementare le percentuali di maturazione in vitro, di fertilizzazione e di sviluppo embrionale (Whitaker e Knight, 2004); inoltre sembra che alti livelli di GSH possano ridurre l'incidenza dell'apoptosi e della degenerazione cellulare (Hayes e Mclellan, 1999; Whitaker e Knight, 2004). Nella fase della fertilizzazione in vitro il GSH promuove l'istaurarsi di uno stato redox all'interno del citoplasma (Nagai, 2001) che promuove a sua volta la formazione del pronucleo maschile tramite la rottura dei legami disulfidrilici e la decondensazione della cromatina dello spermatozoo.

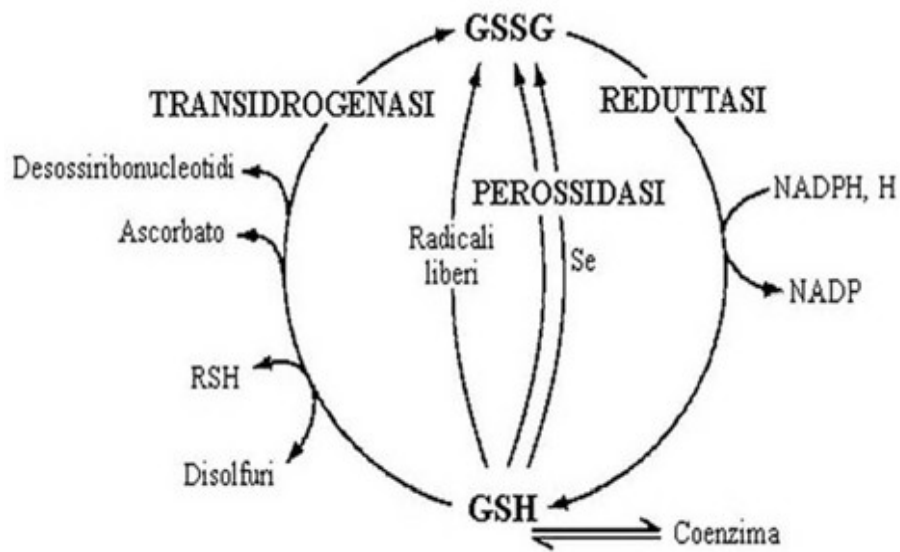
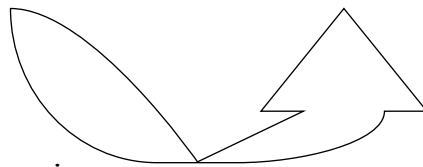
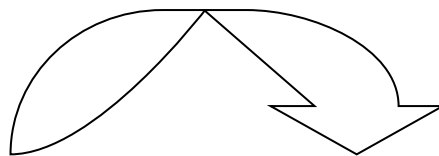


Figura 8: Reazioni di ossidoriduzione del Glutatione



Glutatione Reduttasi



GSSG

2GSH

Figura 9: La conversione del GSSG in GSH.

In vitro, il GSH viene sintetizzato durante la maturazione dell'ovocellula nel topo (Calvin et al., 1986), nel criceto (Perreault et al., 1988), nel suino (Yoshida et al., 1993) e nel bovino (Miyamura et al., 1995; de Matos et al., 1996). Il contenuto glutationico aumenta

nella fase di sviluppo e maturazione dell'oocita in vivo (Perreault et al., 1988). Inoltre alla fine della fecondazione, il GSH partecipa alla decondensazione della cromatina spermatica quindi alla formazione del pronucleo maschile (Calvin et al., 1986; Perreault et al., 1984; Perreault et al., 1988; Yoshida et al., 1992; Yoshida et al., 1993).

3.2 Stress ossidativo

In vivo lo stress ossidativo è coinvolto nella maggior parte delle patologie neurodegenerative come il morbo di Alzheimer, la sindrome di Parkinson, e la sclerosi laterale amiotrofica (ALS) (Clarkson et al., 2005; Mariani. et al., 1995; Mariani. et al., 2005; Simonian e Coyle, 2006; Abou-Sleimann et al., 2006); Inoltre viene implicato nei disturbi vascolari e l'aterosclerosi e malattie cardiache (Cecconi et al., 2003; Heistad, 2003; Mariani et al., 2005). L'azione dei radicali liberi nello squilibrio degli enzimi antiossidanti furono studiati con particolare attenzione al ruolo del SOD che occupa un ruolo centrale nel determinare patologie neoplastiche molto tempo prima che i termini "ROS" e "stress ossidativo" furono introdotti in questo campo di studio (Oberley e Buettner, 1979). Da allora sono stati fatti grandi passi nella comprensione del meccanismo dei ROS nel determinare lo stress ossidativo nel processo della proliferazione cellulare (Brown e

Bicknell, 2001; Bottaro e Liotta, 2003; Storz 2005; Valko et al., 2006).

A livello cellulare lo stress ossidativo viene espresso attraverso la perossidazione dei lipidi di membrana mediata da ROS/RNS, di conseguenza viene alterato l'equilibrio tiolo-redox sotto influenza di attività enzimatiche recando poi un danno al DNA. Le sostanze gassose inquinanti (ossidi di azoto, monossido di carbonio, biossido di carbonio, idrogeno solforoso, e ossidi di zolfo) e l'ossigeno molecolare, influenzano le reazioni metaboliche della cellula regolando la formazione dei radicali liberi che causano gravi danni alla cellula in primis e di conseguenza all'organismo (Pryor et al., 2006).

3.3 N-acetil Cisteina

La N-acetil Cisteina (NAC) è una sostanza dotata di azione antiossidante diretta, e contiene un gruppo tiolico libero (-SH) in grado di interagire direttamente con i radicali liberi.

La sua struttura molecolare le consente inoltre, di attraversare facilmente le membrane plasmatiche dove viene deacetilata rendendo così disponibile la L-cisteina per la sintesi del glutathione (GSH) (*Figura 10*). In questo modo la NAC contribuisce al mantenimento di adeguati livelli di glutathione, proteggendo la cellula da effetti deleteri

a cui può andare incontro a motivo della progressiva deplezione del GSH.

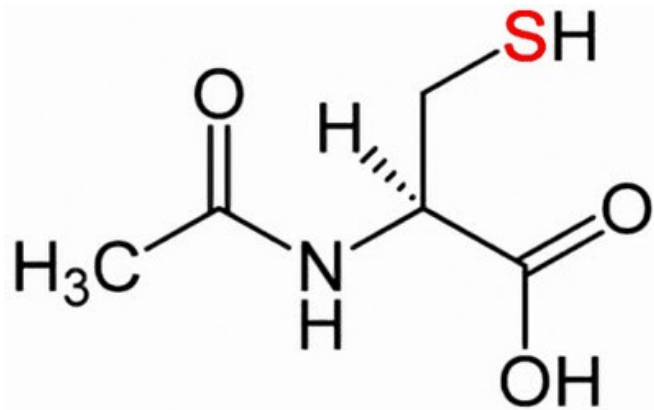


Figura 10: Struttura chimica della N-acetilcisteina

I benefici della NAC sono molteplici intanto ad alti concentrazioni proteggono il sistema emodinamico, la funzionalità renale ed in più giocano un ruolo nelle moderazione di sistemi antinfiammatori dell'organismo (Schaller et al., 2007). Studi recenti suggeriscono che la NAC riesce a riparare del DNA danneggiato oltre a curare linfomi grazie alle sue proprietà riducenti dei ROS (Reimann et al., 2007). Inoltre la somministrazione di NAC promuove la rigenerazione dei tessuti epatico e polmonare modulando l'espressione del gene (Jin et al., 2007).

Da alcuni anni la NAC viene implicata nei processi della riproduzione in vitro sia dal punto di vista genetica (Pfeffer et al., 2005), sia nei

meccanismi contro lo stress ossidativo (Xu et al., 2005), tuttavia risulta un aumentata incidenza di morte embrionale, una volta che essa viene addizionato al terreno nella fase iniziale dello sviluppo (Nishikimi et al., 1999) per contro quando viene addizionata nella fase tardiva si ha l'effetto contrario (Xu et al., 2005). Ciò è indice del fatto che la NAC abbia un influenza diretta sull'attività del fattore nucleare- κ B (NF- κ B) (Nishikimi et al., 1999; Ali et al., 2003; Shao et al., 2004) e il suoi effetti sulle ovocellule sono determinati dal tempo.

4 OBIETTIVO DELLA TESI

Lo stress ossidativo deriva dalla sovrapproduzione delle ROS all'interno delle ovocellule fertilizzate in vitro, i quali vengono generati sia dal metabolismo cellulare che dal medium di coltura (Goto et al., 1993). Ciò determina un ritardo nello sviluppo o l'arresto (Guérin et al., 2000). Precedenti ricerche hanno identificato nel GSH quale principale sostanza antiossidante intracellulare che viene maggiormente sintetizzato in fase della maturazione in vitro (Yoshida et al., 1992). La sua deplezione nel medium IVM determina una drastica riduzione del numero di ovocellule competenti per la fecondazione. A tal proposito la N-acetilcisteina, per le sue proprietà biochimiche (gruppo tiolico e cisteina) viene considerata un supplemento al GSH e quindi aggiungendola al terreno di coltura delle ovocellule si tende ad ovviare alla deplezione naturale di quest'ultimo (Wu et al., 2006) rendendo disponibile la cisteina per la sintesi intracellulare del GSH. Inoltre, mette a disposizione dei gruppi tiolici, necessari per l'attività enzimatica del glutatione S-transferasi (Issel et al., 1988; Nakata et al., 1996). Tuttavia, da studi effettuati, viene messo in discussione la capacità della NAC nel contrastare la formazione dei radicali liberi nel terreno di coltura, affermando che essa abbia effetti negativi o deleteri sullo sviluppo delle stesse ovocellule (de Matos et al., 1997; Ali et al., 2003). In realtà

sembrerebbe che gli effetti della NAC sulle ovocellule bovine varino in relazione al momento della sua addizione al medium (Xu et al., 2005; Nikishimi et al., 1999). Pertanto lo scopo del presente studio è quello di valutare il ruolo della NAC, addizionata al terreno di coltura in diverse concentrazioni, sulla percentuale di fertilizzazione di ovocellule bovine oltre all'indice della polispermia.

PARTE SPERIMENTALE

1 INTRODUZIONE

La fusione dello spermatozoo con l'ovocita innesca una cascata di reazioni mediate da ioni di Ca^{2+} che causa l'esocitosi dei granuli corticali col rilascio del proprio contenuto nello spazio perivitellino (PVS) (Scollosi, 1967; Dandekar et al., 1992; Dandekar e Talbot, 1992;). Tale reazione altera le caratteristiche della zona pellucida bloccando, così, la penetrazione di più spermatozoi e quindi della polispermia.

Numerosi studi effettuati sulla IVF hanno dimostrato una maggior percentuale di polispermia nell'uomo variabile dal 3-30% rispetto a quella in vivo (Van der ven, 1985), con conseguente riassorbimento embrionale precoce, sebbene in alcune specie (rettili, insetti ed uccelli) la polispermia risulta essere fisiologica. Le percentuali inoltre variano tra i diversi mammiferi (28-65% nei maiali, 5-45% nei bovini, 20% nelle pecore). I meccanismi alla base di tale fenomeno non sono stati tuttora chiariti.

Come si è visto nella parte introduttiva la produzione dei ROS può creare uno stress ossidativo generato sia dal metabolismo embrionale che dal medium di coltura (Goto et al., 1993). Tale evento avrebbe come risultato un blocco o un ritardo nello sviluppo delle ovocellule (Guerrin et al., 2001).

Le ovocellule bovine fecondate in vitro vanno incontro ad uno stress ossidativo con formazione di radicali liberi il quale accumulo risulta tossico per il metabolismo della cellula. Tale stress ossidativo risulta essere dovuto alla liberazione dei radicali tossici metabolici, condizione che risulta tossica per la cellula. L'equilibrio fra produzione di radicali liberi nella cellula ed il loro catabolismo da parte delle sostanze riducenti costituisce un punto fondamentale per il successo della fertilizzazione in vitro (de Lamirande et al., 1997). Tra l'altro l'effetto dei radicali liberi sulle ovocellule fecondate in vitro è stato dimostrato in diverse specie animali; a livello molecolare essi inducono una disfunzione mitocondriale col danneggiamento del materiale genetico cellulare inibendo così la fusione tra l'oocita e lo spermatozoo (Comporti, 1989, Aitken et al., 1993). La pressione parziale di O₂ all'interno dell'utero è pari ad un terzo (3-9%) delle di quella standard in vitro (20%) (Mastroianni et al., 1965), condizione che tende a promuovere la formazione dei radicali liberi. Pertanto per proteggere le ovocellule dallo stress ossidativo durante l'incubazione si possono essere utilizzare diverse sostanze ad azione antiossidanti sia enzimatiche (superossido dismutasi e catalasi) che non (Meister, 1983).

La NAC, essendo una potente sostanza antiossidante, può essere considerata uno "scavenger" dei radicali liberi e quindi addizionata al

terreno di coltura funge da coadiuvante del glutatione (GSH), un antiossidante naturale presente nei gameti per l'eliminazione dei radicali liberi.

Nel presente studio viene utilizzata la NAC come sostanza antiossidante da aggiungere al medium di coltura. Sono stati impiegati tre diverse concentrazioni allo scopo di verificarne gli effetti sulle ovocellule fertilizzate in vitro. Sono stati valutati due parametri dell'efficienza della fertilizzazione quali; le percentuali di divisione, e di polispermia a diverse concentrazioni di NAC.

2 MATERIALI E METODI

Tutti i reagenti utilizzati sono stati forniti dalla ditta Sigma (Milano, Italia), se non diversamente specificato

2.1 Prelievo delle ovaie e raccolta delle ovocellule

Le ovaie sono state prelevate da bovine preso il mattatoio locale e trasportate, entro due ore dalla macellazione, al laboratorio in soluzione salina (0.9% NaCl/l) con antibiotico (100mg/l streptomicina) a 37°. Sono state poi lavate con passaggi seriali in soluzione PBS antibiotata e liberate dai residui della borsa ovarica, delle tube uterine e dal contenuto ematico. Successivamente i

complessi oocita-cumulo ooforo (COCs) sono stati isolati mediante dissezione della corticale in corrispondenza dei follicoli protrudenti (2/6mm di diametro) e sottoposte ad una serie di lavaggi con soluzione PBS addizionata di siero fetale bovino al 20%. La sospensione cellulare viene filtrata su supporto cell strainer e la parte corpuscolare riversata su una piastra Petri ($\varnothing=33\text{mm}$) contenente 2ml del medium di dissezione TCM 119. Sono state poi selezionati solo COCs che presentavano un cumulo ooforo intatti di almeno tre strati ed citoplasma uniformemente denso (Hawk et al., 1994). Le ovocellule vengono poi lavate in triplo nel medium di dissezione TCM 119.

2.2 Maturazione delle ovocellula in vitro (IVM)

I COCs così ottenute sono state messe ad incubare in gruppi di 30 in 0.5ml di medium IVM con aggiunta di 20 $\mu\text{l/ml}$ di piruvato, siero fetale al 10%, 10 μl sia di LH e 10 μ di FSH e maturati in vitro a 38.5° in atmosfera di 5% di CO₂ e di 20% di O₂ per 24 ore. L'espansione del cumulo ooforo è stata considerata indice della maturazione oocitaria (metafase II) (Sylla et al., 2005).

2.3 Preparazione della ovocellule per la fertilizzazione

Dopo la maturazione le ovocellule vengono denudate in 2ml medium H-SOF addizionata con 20µl ialuronidasi e attraverso l'azione meccanica della pipettatrice, lasciando solo gli strati cellulari della corona radiata, poi vengono messe ad incubare in termostato fino al momento della fertilizzazione.

2.3 Capacitazione spermatica e fertilizzazione in vitro

E' stato utilizzato del seme congelato per l'esperimento. le paillettes sono state scongelati in acqua ad una temperatura di a 37°C e per poter ottenere un'adeguata concentrazione di spermatozoi mobili da impiegare nella fertilizzazione sono stati fatti stratificare su un gradiente Percoll. Brevemente, in una provetta Falcon da 15 ml sono stati depositati 2 ml di Percoll 90% seguiti da 2 ml di Percoll 45%, la sospensione spermatica è stata stratificata sul gradiente così formato e fatta centrifugare a 2100 rpm per 40 minuti. Poi è stato prelevato il pellet di spermatozoi depositato sul fondo della provetta e lavato in doppio in medium TALP. La concentrazione spermatica è stata determinata con la camera conta globuli e la concentrazione finale è risultata pari a 1×10^6 spermatozoi/ml.

Il medium di fertilizzazione TALP-IVF (1ml) è stato addizionato con 20µl di PHE (penicillina, hypotaurina, eparina) per l'induzione della

capacitazione spermatica. Sono state poi preparate delle aliquote di 300µl per ciascuno dei quattro pozzetti di four well già umidificato con acqua distillata ed in ogni pozzetto sono state depositate una ventina di ovocellule maturate ed il preparato messo ad incubare in atmosfera pari a 5% di CO₂, 20% di O₂ a 38,5° per 22-24 ore.

2.4 Disegno Sperimentale

Il disegno sperimentale ha previsto due gruppi: nel primo le ovocellule sono state trattate con tre diverse concentrazioni di NAC (0mM, 5mM e 10mM) aggiunta al momento della fertilizzazione e sono state valutate le percentuali di fertilizzazione e di polispermia dopo 24 ore dalla fertilizzazione. Per contro nel secondo esperimento, le ovocellule sono state trattate con 1.25mM di NAC, che veniva aggiunta sia nella fase della maturazione che in quella della fertilizzazione. Anche qui sono state valutate le percentuali di fertilizzazione e di polispermia.

2.5 Fissazione delle ovocellule e valutazione della fertilizzazione e della polispermia.

A 24 ore post fertilizzazione i presunti zigoti sono stati denudati e lavati in 2ml H-SOF attraverso l'utilizzo di una pipetta Pasteur di vetro; poi essi sono montati su dei vetrini e fatti espandere il citoplasma tra il vetrino porta-oggetti e quello copri oggetto previa l'applicazione di 2 strisce di vaselina solida. I preparati vengono poi fissati in una soluzione di metanolo e acido acetico glaciale nella proporzione di 3:1 per 24-48 ore; poi vengono schiariti in alcool puro per 30 minuti prima di essere colorati con una soluzione di lacmoid. Alla fine il preparato viene lavato con acido acetico all'1% prima dell'osservazione al microscopio ottico in contrasto di fase per la valutazione del tasso di fertilizzazione e di polispermia.

2.6 Gruppi sperimentali

2.6.1 Esperimento 1

Un pool di ovocellule è stato trattato in diversi replicati con tre diverse concentrazioni di NAC (0mM, 5mM e 10mM) al momento della fertilizzazione per 24 ore e successivamente sono state valutate le percentuali di fertilizzazioni e polispermia. Abbiamo suddiviso i pool di ovocellule in tre gruppi dove nel primo gruppo le ovocellule sono state incubate con le sospensione spermatica senza l'aggiunta della

NAC (Gruppo controllo); nel secondo gruppo è stato integrato al medium di fertilizzazione 5mM di NAC ed in fine nel terzo gruppo di ovocellule la NAC è stata addizionata ad una concentrazione di 10mM.

2.6.2 Esperimento 2

Nel secondo esperimento le ovocellule sono state divise in quattro diversi pool e trattate con NAC alla concentrazione di 1.25mM. Il primo pool di ovocellule, gruppo controllo non è stato trattato, il secondo pool è stato maturato in un medium addizionato di NAC ma senza aggiunta di NAC al momento della fertilizzazione. Nel terzo pool la NAC veniva aggiunta soltanto al momento della fertilizzazione ed in fine al quarto pool di ovocellule è stata aggiunta la NAC sia nella fase di maturazione che in quella di fertilizzazione.

Sono state valutate le percentuali di divisione e di polispermia su ogni gruppo sperimentale.

Ai fini dell'analisi statistica, è stata calcolata la significatività per le percentuali di fertilizzazione e di polispermia utilizzando il test chi quadro (χ^2).

3 RISULTATI

Nel primo esperimento 660 ovocellule sono state maturate in vitro e di cui 188 nel pool controllo, 234 nel pool 5mM e 238 nel pool NAC 10mM.

Nel Grafico 1 vengono riportati i valori percentuali relativi ai gruppi controllo 5 mM e 10Mm di NAC. Il controllo ha presentato un tasso di divisione e di polispermia più alto ($p < 0.05$), pari a $78 \pm 3.8\%$ vs $14.9 \pm 2.7\%$, rispettivamente. Nel gruppo NAC a 5mM, si è riscontrato una discreta motilità spermatica a 24 ore post fertilizzazione ed un tasso di fertilizzazione e di polispermia pari al $82.2 \pm 3.7\%$ vs $7.2 \pm 1.5\%$, rispettivamente ($P < 0.05$).

Invece in quello di NAC 10mM; si è riscontrata una percentuale di fertilizzazione pari al $57 \pm 5.7\%$ vs $3.3 \pm 0.9\%$ di polispermia rispetto ai primi due gruppi ($P < 0.05$). oltre ad un totale assenza della motilità spermatica.

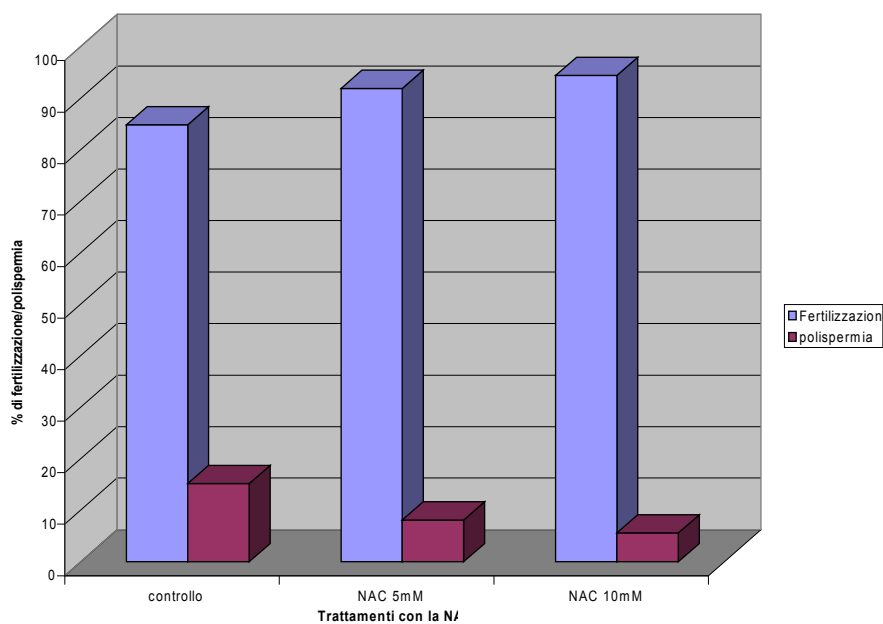


Grafico 1: Percentuali di ovocellule e di polispermia nei gruppi trattate con NAC rispetto al gruppo controllo.

Nell'esperimento 2: 835 ovocellule sono state suddivise in 4 gruppi di seguito descritti nella Tabella 1.

Tabella 1: Distribuzione delle ovocellule in base t di NAC e alla fase in cui essa viene aggiunta

Pool di ovocellule	di IVM	IVF
controllo	-	-
NAC-/+	-	+
NAC+/-	+	-
NAC+/+	+	+

- no aggiunta di NAC

+ = aggiunta di NAC al medium nelle diverse fasi

Nel *gruppo controllo* si è osservata una buona motilità spermatica post fertilizzazione. Il 78 ± 2.3 degli zigoti presentavano due pronuclei indice di fertilizzazione, mentre i casi di polispermia rappresentavano il $15.7 \pm 5.2\%$, per contro nel *gruppo NAC-/+* si è registrato un aumento del tasso di fertilizzazione ed una riduzione di quello di polispermia, 83.9 ± 7 e 6.8 ± 0.9 rispettivamente (*Tabella 2*).

Nel pool di ovocellule trattate con NAC nel medium di maturazione e non di fertilizzazione (NAC +/-) si è registrato un ulteriore aumento del tasso di fertilizzazione (87.5 ± 2.5) rispetto al gruppo NAC +/+ (60.4 ± 3.6) e a quelli precedenti; per contro la polispermia è risultata maggiore (7.9 ± 1.9 vs 9.5 ± 3.1) (*Tabella 2 e Grafico 2*).

Tabella 2: Media della percentuali di fertilizzazione e polispermia nel gruppo di ovocellule trattate con la NAC a 1,25mM.(media \pm ds); $p < 0,05$.

trattamento	controllo	NAC+/-	NAC-/+	NAC+/+
N° ovocellule osservate	135	240	220	240
fertilizzate (%)	$78.7 \pm 2,3$	87.5 ± 2.5	83.9 ± 7.0	60.4 ± 3.6
Polispermia (%)	17.5 ± 5.1	7.9 ± 1.9	6.8 ± 0.9	9.6 ± 3.1

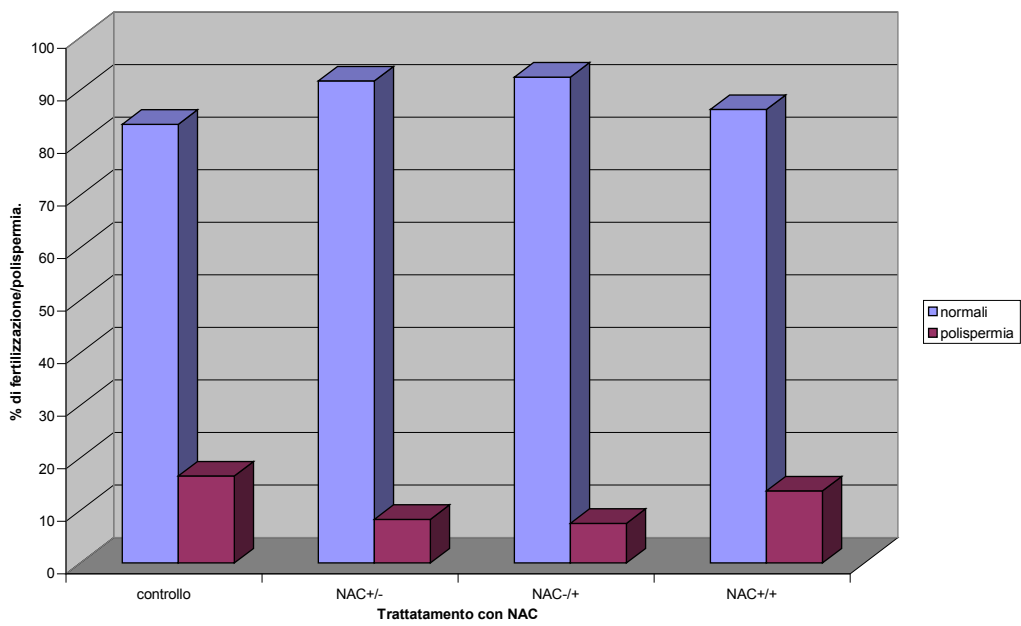


Grafico 2: Effetti della NAC alla concentrazione di 1.25mM aggiunta nelle varie fasi della maturazione, fertilizzazione o della coltura embrionale ($P < 0.05$)

4 DISCUSSIONI E CONCLUSIONI

Precedenti ricerche sono state effettuate con l'obiettivo di valutare gli effetti della NAC sulle ovocellule bovine (de Matos et al., 1997; Ali et al., 2003).

Nel presente studio, sono stati valutati gli effetti della N acetilcisteina sulle ovocellule bovine a diverse concentrazioni (*Esperimento 1*) e nelle diverse fasi della produzione in vitro degli embrioni, e quindi durante la maturazione, la fertilizzazione e nella coltura degli zigoti ad una concentrazione fissa (*Esperimento 2*).

Nel primo esperimento le ovocellule trattate con NAC a 5mM hanno presentato un maggior tasso di fertilizzazione rispetto al gruppo controllo, con una bassa percentuale di polispermia, in accordo con quanto osservato da altri autori nella bovina (Takahashi et al. 1993; de Matos et al. 1995, 2002b; Oyamada e Fukui 2004; Balasubramanian and Rho 2007), nella bufala (Gasparrini et al. 2003; Anand et al. 2008; Singhal et al., 2008), nella pecora (de Matos et al. 2002), nella capra (Zhou et al., 2008), nella scrofa (Gruppen et al. 1995; Kobayashi et al. 2006) e nella cavia (de Matos et al. 2003). Si è osservato lo stesso trend nel pool di ovocellule trattate con NAC alla concentrazione di 10mM. Non si sono registrate differenze significative tra i gruppo per quel che riguarda il tasso di polispermia, sebbene sia stato registrato un decremento nel gruppo di ovocellule

trattate con NAC (*Grafico 1*). Infine, nel gruppo di ovocellule trattate con NAC alla concentrazione di 10mM si è registrato un aumento della degenerazione ovocitaria, riconducibile a nostro avviso, alla citotossicità della NAC ad alte concentrazioni. Per contro l'aumento del tasso di fertilizzazione sarebbe da ricondursi all'effetto di contrasto della NAC all'aumento dello stress ossidativo.

Nel secondo esperimento si è ridotta la concentrazione di NAC a 1.25mM nei medium utilizzati nelle diverse fasi della produzione in vitro degli embrioni, in particolare durante la maturazione e la fertilizzazione. Tuttavia non si sono registrate differenze significative tra le percentuali di divisioni; per contro si è registrato un aumento del tasso di polispermia nel pool di ovocellule trattate sia alla maturazione che al momento della fertilizzazione in vitro (*Grafico 2*). Malgrado le ben note proprietà antiossidanti della NAC nel sistema delle colture cellulari, nel presente studio non stati registrati i suoi effetti benefici sugli esiti della fertilizzazione in vitro.

Studi effettuati hanno dimostrato l'importanza degli antiossidanti che vengono addizionati al terreno di maturazione al fine di implementare le riserve intracellulari di GSH (Yoshida, 1993; Nagai, 1996) indispensabile sia per la formazione del pronucleo maschile che della decondensazione del materiale cromatinico (de Matos e Furnus, 2000). Il GSH ha come precursore la cisteina che viene trasportata

attraverso la membrana plasmatica; comunque, in condizioni favorevoli esso viene trasportato dalle cellule del cumulo ooforo attraverso le giunzioni serrate. Poiché in vitro l'ambiente è subottimale si ha un maggior fabbisogno di sostanze antiossidanti. In vitro, è stato dimostrato il ruolo della NAC nel favorire l'assorbimento della cisteina nelle cellule ovariche (Günzler et al., 1974) e endoteliali (Schultz et al., 2000; Reiman et al., 2007) oltre a quello di induzione della sintesi del glutatione (Grinberg, 2005). La NAC esogena facilita la sintesi del glutatione attraverso la riduzione extracellulare della cistina in cisteina (Issels, 1988) e rendendo disponibili i gruppi tiolici, fondamentali sia per la sintesi del glutatione che per l'attività enzimatica (Nakata et al., 1996).

La fusione dei gameti determina l'esocitosi dei granuli corticali (reazione corticale) che rilasciano il loro contenuto enzimatico nello spazio perivitellino modificando così la conformazione della zona pellucida ed eliminando i recettori extracellulari dell'oocita (reazione o hardening zonale). Sembra che questa reazione sia responsabile del blocco della polispermia nelle ovocellule nel suino (Hunter, 1991; Fléchon et al. 2004). Il tasso di polispermia delle ovocellule fertilizzate in vitro risulta più alto rispetto a quanto avviene in vivo (Hunter, 1991; Niwa, 1993). Sebbene si è visto che il tasso della polispermia venga ridotto attraverso la preincubazione degli

spermatozoi nel liquido oviduttale, coltivando le ovocellule su linee cellulari epiteliali o preincubandole sempre nel liquido oviduttale (Kano et al., 1994), tuttora non sono stati chiariti i meccanismi fisiologici alla base di questo blocco funzionale. Tuttavia studi recenti effettuati sui ricci di mare hanno evidenziato l'esistenza di un enzima chiamato urchin dual oxidase (udx1) il quale, al momento della fecondazione agisce, insieme ad altri componenti cellulari a produrre un'elevata quantità di perossido d'idrogeno sotto la membrana plasmatica contribuendo, in questa maniera, all'indurimento della zona pellucida (Wessel et al., 2004).

In conclusione si può affermare un effetto benefico della NAC sulle ovocellule fecondate in vitro per quanto riguarda il tasso di fertilizzazione, anche se i nostri risultati evidenziano un effetto citotossico ad una concentrazione superiore a 5mM. Sono necessari ulteriori indagini volte al determinismo del meccanismo fisiologico dell'hardening della zona pellucida.

BIBLIOGRAFIA

Abe, H., Sendai Y., Satoh T., and Hoshi H. (1995). Secretory products of bovine oviductal epithelial cells support the viability and motility of bovine spermatozoa in culture in vitro 126. *J. Exp. Zool.* 272:54-61.

Abou-Sleiman P.M, Muqit M.M, and Wood N.W. (2006) Expanding insights of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci* 7: 207–219.

Aitken R.J., Harkiss D. and Buckingham D. (1993). Relationship between iron catalysed lipid peroxidation potential and human sperm function. *J. of Reprod. Fertil.*, 98:73.167.

Ali A.A, Bilodeau J.F, Sirard M.A. (2003). Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during in vitro maturation, fertilization and development. *Theriogenology*; 59:939-949.

Anand T, Kumar D, Chauhan M.S, Manik R.S, Palta P, (2008). Cysteamine supplementation of in vitro maturation medium, in vitro culture medium or both media promotes in vitro development of buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. *Reprod Fertil Dev* 20, 253–257.

Baas A. S and Berk B. C. (1995). Differential activation of mitogen-activated protein kinases by H₂O₂ and O₂⁻ in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 77: 29–36.

Bacci M.L., Galeati G., Mattioli M., Boni R., Seren E. (1991). In vitro maturation and in vitro fertilization of buffalo oocytes. Proc III World Buffalo Congress, Varna,: 599-603.

Bader H. (1982). An investigation of sperm migration into the oviducts of the mare. J. Reprod Fertil Suppl; 32: 59-64.

Baillie H.S, Pacey A.A, Warren M.A, Scudamore I.W, Barrat CLR. (1997). Greater numbers of human spermatozoa associate with endosalpingeal cells derived from the isthmus compared with those from the ampolla. Hum Reprod; 12: 1985-1992.

Balasubramanian S, Rho G.J, (2007). Effect of cysteamine supplementation of in vitro matured bovine oocytes on chilling sensitivity and development of embryos. Anim Reprod Sci, 98; 282-292.

Ball G.D., Leibfried M.L., Lenz R.W., Ax R.L., Bavister B.D First N.L. (1983). Factors affecting successful in vitro fertilization. Bio Reprod; 28:717-725.

Battaglia DE, Yanagimachi R. (1979). Enhanced and coordinated movement of the hamster oviduct during the preovulatory period. J. Reprod Fertil; 56: 515-520.

Besenfelder U., Havlicek V., Mossbacher G., Brem G. (2001). Collection of tubal stage bovine embryos by means of endoscopy: A technique report. Theriogenology, 55, 837–845.

- Besenfelder U., Möblaher G., Brem G. (1999). Oocyte collection. *Reprod Domest Anim Suppl*, v.6, p.38-44.
- Bleil JD, Wassarman PM. (1980) Mammalian sperm egg interaction: identification of glycoprotein in mouse egg zonae pellucidae possessing receptor activity for sperm. *Cell* 20: 873-882.
- Bleil JD, Wassarman PM. (1983). Sperm-egg interactions in the mouse: sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein. *Dev Biol* 95: 317-324.
- Blokhina O, Virolainen E, and Fagerstedt K.V. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review *Ann Bot (Lond)* 91 (spec no); 179–194.
- Boni R. (1994). In vitro production in bovine and buffalo species. *Buffalo J.*, supplement 2:147-160.
- Boni R., Roviello S., Gasparini B., Langella M., Zicarelli L. (1999). In vitro production of buffalo embryos in chemically defined medium. *Buffalo J*;1:115-120.
- Bottaro D. P. and Liotta L. A. (2003). Cancer: out of air is not out of action. *Nature* 423: 593–595.
- Brackett B. G. and Williams W. L. (1965). *Journal of Experimental Zoology*. 160; 217-281.
- Brackett B.G. and Williams W.L. (1969). Fertilisation of rabbit ova in a defined medium. *Fertility and Sterility*. 19: 144-155.

Brown N. S and Bicknell R. (2001). Hypoxia and oxidative stress in breast cancer: oxidative stress: its effects on the growth, metastatic potential and response to therapy of breast cancer. *Breast Cancer Res* 3: 323–327.

Butler W.R. (1998). Effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. *J Dairy Sci*, 81, 2533-2539.

Calvin H.I., Grosshans K., Blake E.J. (1986). Estimation and manipulation of glutathione levels in prepuberal mouse ovaries a ova: relevance to sperm nucleus transformation in the fertilized egg . *Gamete Res*; 14:265-275.

Carnegie J. A, Durnford R., Algire J., Morgan J. (1997). Evaluation of mitomycin-treated vero cells as a coculture system for IVM-IVF derived bovine embryos. *Theriogenology*; 48:377-389.

Carrel D.T., Middleton R.G., Peterson C.M., Jones K.P., Urry R.L. (1993). Role of the cumulus in the selection of the morphologically normal sperm and induction of the acrosome reaction during human in vitro fertilization. *Arch Androl*;31: 133-137.

Cartmill J. A., El-zarkouny S. Z., Hensley B. A., Lamb G. C., Stevenson J. S. (2001). Stage of cycle, incidence, timing of ovulation, and pregnancy rates in dairy cattle after three timed breeding protocols. *J Dairy Sci*, 84, 1051-1059.

Cecconi C., Boraso A., Cargnoni A., and Ferrari R. (2003). Oxidative stress in cardiovascular disease: myth or fact? Arch Biochem Biophys 420: 217–221.

Chang M. C (1959). Fertilization of ova *in vitro*. Nature 184: 466-467.

Chang MC. (1951). Fertilization capacity of spermatozoa deposited in the fallo pian tubes. Nature; 168: 997-998.

Chauhan M.S., Katiyar P.K., Singla S.K., Manik R.S., Madan M.L. (1997a). Production of buffalo calves through in vitro fertilization. Ind.

Chauhan M.S., Manik R.S., Singla S.K., Katiyar P., Madan M.L. (1997b). Effect of insulin on in vitro development of in vitro produced embryos in co-culture sistem. Ind. J. Anim. Prod . Manag. 13: 19-24.

Chauhan M.S., Palta P., Das S.K., Katiyar P., Madan M.L. (1997c). Replacement of serum and hormone additives with follicular fluid in the IVM medium: effect on maturation, fertilization and subsequent development of buffalo oocytes in vitro. Theriogenology; 48: 461-469.

Chian R.C, Park C.K, Sirard M.A (1996):Cumulus cells act as a sperm trap during in vitro fertilization of bovine oocytes. Theriogenology 45: 258.

Chian R.C, Sirard M.A. (1995). Effects of cumulus cells and follicle-stimulating hormone during in vitro maturation on parthenogenetic activation of bovine oocytes. *Mol Reprod Dev.* Dec;42(4):425-31.

Chian R.C., Park C.K., Sirard M.A. 1996. Cumulus cells act as a sperm trap during in vitro fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology* 45: 258.

Chian R.C., Sirard M.A (1995). Fertilizing ability of bovine spermatozoa cocultured with oviduct epithelial cells. *Biol Reprod*; 52: 156-162.

Chuangsoongneon U., Kamonpatana M. (1991). Oocyte maturation, in vitro fertilization and culture system for developing preimplantation Swamp buffalo embryos using frozen-thawed semen. *Buffalo J*;7: 189-198.

Clarkson A.N, Sutherland B.A, and Appleton I. (2005). The biology and pathology of hypoxia-ischemia: an update. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 53: 213–225.

Comporti M. (1989). Three models of free radical-induced cell injury. *Chem. Biol. Inter.* 72: 1-56.

Cox J.F., Hormazabal J. (1993). Santa Maria A. Effect of cumulus on in vitro fertilization of bovine matured oocytes. *Theriogenology*; 40: 1259-1267.

Coy P, Grullon L, Canovas S, Romar R, Matas C, Aviles M, (2008) Hardening of the zona pellucida of unfertilized eggs can reduce polyspermic fertilization in the pig and cow. *Reproduction* 135, 19–27.

Dandekar P. and Talbot P. (1992). Perivitelline space of mammalian oocytes; extracellular matrix of unfertilised oocytes and the formation of a cortical granule envelope following fertilisation. *Mol. Reprod. Dev.* 31: 135-143.

Dandekar P., Aggeler J., Talbot P. (1992). Structure, Distribution and composition of the extracellular matrix of human oocytes and cumulus masses. *Hum. Reprod.* 7: 391-398.

Day BN, Polge C. Effects of progesterone on fertilization and egg transport in the pig. *J. Reprod Fertil* 1968; 17: 227-230.

de Lamirande E., Jiang H., Zini A, Kodama H. and Gagnon C. (1997). Reactive oxygen species and sperm Physiology. *Rev. Reproduction.* 2:48-54

De Matos D G. Furnus C. C, Moses D. F, Baldassare H. (1995) Effect of cysteamine on glutathione level and developmental capacity of bovine oocytes matured in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 42; 432-436.

De Matos D. G, Furnus C. C, Moses D. F. (1997) Glutathione synthesis during in vitro maturation of bovine oocytes: role of cumulus cells. *Biol Reprod*;57:1420–5.

De Matos D. G., Gasparini B., Pasqualini S. R., Thompson J. G. (2002) Effect of glutathione synthesis stimulation during in vitro maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content. *Theriogenology*; 57: 1443-1451.

De Matos D.G., Furnus C.C. (2000) The importance of having high glutathione level after bovine in vitro maturation on embryo development: effect of b-mercaptoethanol, cysteine and cystine. *Theriogenology*; 53 (3): 761-771.

De Matos D.G., Furnus C.C., Moses D.F., Martinez A.G., Matkovic M. (1996) Stimulation of glutathione synthesis of in vitro matured bovine oocytes and its effect on embryo development and freezability. *Molec. Reprod. Dev.*;45: 451-457.

De Matos D.G., Noguiera D., Cortvrindt R., Herrera C., Adrienssens T., Pasqualini R.S. Smitz J (2003). Capacity fo the adult and prepubertal mouse oocytes to undergo embryo development in the presence of cysteamine. *Mol. Reprod. Dev.* 64: 214-218.

Donnez J, Casans-Roux, F, Caprassse, J. et al. Cyclic changes in ciliation, cell height, and mitotic activity in human tubal epithelium during reproductive life. *Fertil Steril* 1985; 43: 554-559.

Droge W (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82: 47–95.

Drost M., Ambrose J.D., Thatcher M.J., Cantrell C.K, Wolfsdorf K.E, Hasler J.F, Thatcher W.W. (1999). Conception rates after artificial insemination or embryo transfer in lactating dairy cows during summer in Florida. *Theriogenology*, 52, 1161-1167.

Dumont, J.N., and Brummett, A.R. (1985). Egg envelopes in vertebrates. In: *Developmental Biology: A Comprehensive Synthesis*, ed. L. Browder, vol 1 (Oogenesis), New York: Plenum Press: 235-288.

Ellington J.E, Ball B.A, Blue B.J, Wilker C.E. (1993) Capacitation-like membrane changes and prolonged viability *in vitro* of equine spermatozoa cultured with uterine tube epithelial cells. *Am J Vet Res* 54: 1505-1510.

Epifano O, Dean J. (1994). Biology and structure of the zona pellucida: a target for immunocontraception. *Reprod Fertil Dev*; 6:319–330.

Eppig J. J, Downs S. M. (1988). The role of purines in the maintenance of meiotic arrest in mammalian oocytes. *Prog Clin Biol Res*; 267:103-113.

Eyestone W.H., First N.L. (1989). Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. *J Reprod Fertil*;85:715-720.

Eyestone W.H., Leibfried-Rutledge, L., Northey, D.L., Gillman, B.G. and First, N.L. (1987). Culture of bovine one and two-cell bovine embryos to the blastocyst stage in the ovine oviduct. *Theriogenology*, 28: 1-7

Fléchon JE, Kopečný V, Pavko J, Pavlok A, Motlik J (2004) Texture of the zona pellucida of the mature pig oocyte. The mammalian egg envelope revisited. *Reprod Nutr Dev* 44:207–218.

Freeman BA (2000). Oxygen: the air-borne nutrient that both sustains and threatens life. *Nutrition* 16: 478-480.

Galli C, Crotti G, Notari C, Turini P, Duchi R, Lazzari G. (2001). Embryo production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology*;55:1341-1357.

Galli C, Lazzari G. (1996). Practical aspects of IVM-IVF in cattle. *Anim Reprod Sci*;42:371-379.

Galli C., Duchi R., Ponderato N., Colleoni S., Lagutina G. (2003). Bovine embryo technologies. *Theriogenology*, 59:599-616.

Galli, C and Moor, R.M. (1991). Development of immature bovine oocytes into viable embryos in vitro. *Bulletin de l'Association des Anatomistes*, 75, 228: 67-71.

Gandolfi, F. & Moor, R.M. (1987) Stimulation of early development in sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. *Reprod. Fert.* 81, 23-28.

Gardiner C.S, Salmen JJ, Brandt CJ, Stover SK. (1998). Glutathione is present in reproductive tract secretions and improves development of mouse embryos after chemically induced glutathione depletion. *Biol Reprod.*; 59:431-436.

Gardiner C.S. and Reed D.J. (1995). Synthesis of glutathione in the pre implantation embryo. *Arch. Biochem. Biophys.* 318: 30-36.

Gardner DK, Lane M, Spitzer A, Batt PA. 1994. Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage in vitro in the absence of serum and somatic cells: Amino acids, vitamins, and culturing embryos in groups stimulated development. *Biol Reprod* 50:390–400.

Gasparini, S., Saviane, C., Voronin, L.L., and Cherubini, E. (2000). Silent synapses in the developing hippocampus: Lack of functional AMPA receptors or low probability of glutamate release? *PNAS* 97 9741–9746.

Gasparrini B., Sayoud H., Neglia G., Matos D.G., Donnay I, Zicarelli L (2003). Glutathione synthesis during in vitro maturation of buffalo oocytes: effects of cysteamine on embryo development. *Theriogenology* 60:943-952.

Goto Y, Noda Y, Mori, Nakano M. (1993). Increased generation of reactive oxygen species in embryos cultured un vitro. *Free Radical Bio Med* 15, 69 -75.

Grinberg L , Fibach E, Amer J, Atlas D. (2005). N-acetylcysteine amide, a novel cellpermeating thiol, restores cellular glutathione and protects human red blood cells from oxidative stress. *Free Radic Biol Med*; 38:136–145.

Gruppen C.G, Nagashima H, Nottle M.B. (1995). Cysteamine enhances in vitro development of porcine oocytes matured and fertilized in vitro. *Biol Reprod* 53, 173–178.

Guerin P, El Mouatassim S, Menezo Y, 2001: Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the preimplantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update* 7:175-189.

Günzler W.A, Kremers H., Flohé L. (1974). An improved coupled test procedure for glutathione peroxidase (EC 1-11-1-9-) in blood. *Z Klin Chem Klin Biochem*; 12:444-448.

Han YM, Wang WH, Abeydeera LR, Petersen AL, Kim JH, Murphy C, Day BN, Prather RS. Pronuclear location before the first cell division determines ploidy of polyspermic pig embryos. *Biol Reprod* 1999; 61:1340-1346.

Harper M.J.K. (1973). Stimulation of sperm movement from the isthmus to the site of fertilization in the rabbit oviduct. *Biol Reprod* 8: 369-377.

Harper M.J.K. (1994). Gamete and zygote transport. In: Knobil E, Neill JD (eds.), *The Physiology of Reproduction*, vol.1, 2nd ed. New York: Raven Press, Ltd; 123-187.

Hasler JF, Henderson WB, Hurtgen PJ, Jin ZQ, McCauley A,D et al., (1995). Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology*;43:141-152.

Hawk, H.W., Wall, R.J., 1994. Improved yields of bovine blastocysts from in vitro-produced oocytes. I. Selection of oocytes and zygotes. *Theriogenology* 41: 1571–1583

Hayes JD, McLellan LI. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radical Research* 1999; 31:273-300.

Heistad D.D. Mikamo (2003). Lecture: A radical view of the superfamily of cardiovascular risk factors. *Circulation J*.;67:805–809.

Herlands R. L, Schultz R. M. (1984). Regulation of mouse oocyte growth: probable nutritional role for intercellular communication between follicle cells and oocytes in oocyte growth. *J Exp Zool*; 229:317-325.

Hirao Y., Tsuji Y., Miyano T., Okano A., Miyake M., Kato S., Moor R.M. (1995). Association between p34cdc2 levels and meiotic arrest in pig oocytes during early growth. *Zygote*; 3:325-332.

Hunter et al. (1986). Norepinephrine uptake in canine saphenous veins in the presence and absence of halothane. *Anesth Analg.* 65(4):360-4.

Hunter MG. Oocyte maturation and ovum quality in pigs. *Rev Reprod* 2000; 5:122-130.

Hunter R.H, Flechon B., Flechon J.E. (1987). Pre- and peri-ovulatory distribution of viable spermatozoa in the pig oviduct: a scanning electron microscope study. *Tissue Cell.* 19(3):423-36.

Hunter R.H. (1984). Pre-ovulatory arrest and peri-ovulatory redistribution of competent spermatozoa in the isthmus of the pig oviduct. *J Reprod Fertil.* 72(1):203-11.

Hunter R.H., Flechon B., Flechon J.E. (1991). Distribution, morphology and epithelial interactions of bovine spermatozoa in the oviduct before and after ovulation: a scanning electron microscope study. *Tissue Cell.*23(5):641-56.

Hunter R.H.F. (1973). Polyspermic fertilization in pigs after tubal deposition of excessive numbers of spermatozoa. *J. Exp Zool.* 183: 57-64.

Hunter R.H.F. (1991). Oviduct function in pigs, with particular reference to pathological condition of polyspermy. *Mol Reprod Dev* 29: 385-391.

Hunter R.H.F. (1995). Human sperm reservoirs and fallopian tube function: a role for the intramural portion? *Acta Obstet Gynecol Scand* 74: 667-681.

Hunter R.H.F., Wilmut L. (1984). Sperm transport in the cow: periovulatory redistribution of viable cells within the oviduct. *Reprod Nutr Dev* 24:597-608.

Hunter RHF, Leglise PC. Polyspermic fertilization following tubal surgery in pigs, with particular reference to the role of the isthmus. *J. Reprod Fertil* 1971; 24: 233-246.

Hunter RHF, Nichol R. (1983). Transport of spermatozoa in the sheep oviduct: preovulatory sequestering of cells in the caudal isthmus. *J. Exp Zool*; 228: 121-128.

Hunter RHF. Sperm transport and reservoirs in the pig oviduct in relation to the time of ovulation. *J. Reprod Fertil* 1981; 63: 109-117.

Hunter, R.H.F. & Hall. J.P. (1974) Capacitation of boar spermatozoa: The influence of post-coital separation of the uterus and the Fallopian tube. *Anat. Rec.* 180, 597-604.

Issels RD, Nagele A, Eckert KG, Wilmanns W, 1988: Promotion of cystine uptake and its utilization for glutathione biosynthesis induced by cysteamine and N-acetylcysteine. *Biochem Pharmacol* 37, 881–888.

J. Anim. Sci.; 67: 306-308.

- Jain, A.K., Kheshgi, H.S., Hoffert, M.I. & Wuebbles, D.J. (1995). Distribution of Radiocarbon as a Test of Global Carbon Cycle Models, *Global Biogeochemical Cycles* 9: 153-166.
- Jainudeen M.R., Takahashi Y., Nihayah M., Kanagawa H. (1993). In vitro maturation and fertilization of swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes. *Anim. Reprod. Sci.* 31: 205-212.
- Jansen RPS, Fraser IS, Song JY (1995). Hysteroscopic lysis of intrauterine under ultrasound guidance. *Gynaecological Endoscopy*;4: 35.
- Jansen, D. J., van Dishoeck, E. F., Black, J. H., Spaans, M., & Sosin, C. (1995). *A&A*, 302, 223.
- Jansen, R.P.S. (1984) Endocrine response in the fallopian tube. *Endocr. Rev.*; 5: 525-551.
- Jin X, Wang L, Wu HS, Zhang L, Wang CY, Tian Y, Zhang JH. N-acetylcysteine inhibits activation of toll-like receptor 2 and 4 gene expression in the liver and lung after partial hepatic ischemia-reperfusion injury in mice. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2007; 6:284-289.
- Jocelyn, P. C. (1959). Oxydation of glutathione. *Symp. Biochem. J.* 72, 11 P.
- Jovine L., Darie C.C, Ltsher E.S. and Wasserman P.M. (2005) *Annu. Rev. Biochem.* 74, 83.

Julian Wong, Robbert Créton, Gary M. Wessel (2004). “The Oxidative Burst at Fertilization Is Dependent upon Activation of the Dual Oxidase Udx1”. *Developmental Cell* Vol. 7, No. 6

Kano K, Miyano T, Kato S. Effect of oviductal epithelial cells on fertilization of pig oocytes in vitro. *Theriogenology* 1994; 42:1061-1068.

Katz DF, Yanagimachi R. Movement characteristics of hamster spermatozoa within the oviduct. *Biol Reprod* 1980; 22: 759-764.

Keefe D, Tran P, Pellegrini C, Oldenbourg R. Polarized light microscopy and digital image processing identify a multilaminar structure of the hamster zona pellucida. *Hum Reprod* 1997; 12:1250–1252.

Keskintepe L, Pacholczyk G., Machnicka A, Norris K, Curuk MA, Khan I, Brackett BG. (2002). Bovine blastocyst development from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. *Biol Reprod*; 67:409-415.

Kobayashi M, Lee ES, Fukui Y (2006). Cysteamine or β -mercaptoethanol added to a defined maturation medium improves blastocyst formation of porcine oocytes after intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology* 65:1191–1199.

Kopf GS. Zona pellucida-mediated signal transduction in mammalian spermatozoa. *J Reprod Fertil Suppl* 1990; 42:33–49.

Kosower N.S, Kosower E.M. (1973). Protection of membranes by glutathione. In: Flohe L, Benohr C, Sies H (eds), Glutathione. New York: Academic Press, Inc.; 216-226.

Kunz G., Beil D., Deininger H. et al. The dynamics of rapid sperm

Lane N. (2002). Oxygen; The molecule that made the world. Oxford: Oxford University Press.

Lazzari, G. and Galli, C., 1993. Salvage of Yaluable germplasm of sterile cattle by in vitro technologies. 9^e Réunion Association Européenne de Transfert Embryonnaire, Lyon, 10-11 September, pp. 87-99.

Lazzari,G. & Galli, C. (1996). In vitro embryo production and its application to cattle breeding. Report of the 12th Scientific Meeting of the European Embryo Transfer Association, pp 73-82.

Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Eyestone WH, Northey DL, First NL. Development potential of bovine oocytes matured *in vitro* or *in vivo*. Biol reprod 1987;36:376-383.

Lohuis MM. Potential benefits of bovine embryo-manipulation technologies to genetic improvement programs. Theriogenology 1995;43:51-60.

Madan M.L., Chauhan M.S., Singla S.K., Manik R.S. Pregnancies established from Water buffalo (*Bubalus bubalis*) blastocysts derivad

from in vitro matured, in vitro fertilized oocytes and cocultured with cumulus and oviductal cells. *Theriogenology* 1994a;42: 591-600.

Madan M.L., Das S.K., Palta P. Application of reproductive technologies to buffaloes. *Anim. Reprod. Sci.* 1996;42: 299-306.

Madan M.L., Singla S.K., Chauhan M.S., Manik R.S. In vitro production and transfer of embryos in buffaloes. *Theriogenology* 1994b;41: 139-143.

Mandelker L. (2004). The natural activities of cells: the role of reactive oxygen species, and their relation to antioxidants, nutraceuticals, botanicals, and other biologic therapies. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 34: 39–66.

Mansour R.T., Aboulghar M.A., Serour G.I. (1993). *In vivo* survival of spermatozoa in the human fallopian tube for 25 days: a case report. *J. Assist Reprod Genet*; 10: 379-380.

Mantovani, M., Cavagna, G. A. and Heglund, N. C. (1999). Effect of stretching on undamped elasticity in muscle fibres from *Rana temporaria*. *J.Muscle Res. Cell Motil.* 20, 33-43.

Mariani E, Polidori MC, Cherubini A, and Mecocci P. (2005). Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: an overview. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 827: 65–75.

Mary Ann Liebert, Inc. Antiossidanti & meccanismi regolatori (2007). REDOX Volume 9, numero 10.

Meister A, Tate SS. 1976. Glutathione and the related g-glutamyl compounds: Biosynthesis and utilization. *Ann Rev Biochem* 45:559–604.

Meister A. (1983). Selective modification of glutathione metabolism. *Science*, 220.

Meister A. Amino acids and glutathione. *Proc Biochemical Symp* 1982; 5-27.

Meur S.K., Roy S.B., Mohan G., Dhoble R.I. Cryogenic changes in seminal proteins of cattle and buffalo. *Theriogenology* 1988; 30: 1005-1010.

Miyamura M., Yoshida M., Hamano S., Kuwayama M. Glutathione concentration during maturation and fertilization in bovine oocytes. *Theriogenology* 1995; 43(1):282.

Moldovan L and Moldovan N.I. (2004). Oxygen free radicals and redox biology of organelles. *Histochem Cell Biol* 122: 395–412.

Moor R.M., Smith M.W., Dawson R.M.C. (1980). Measurement of inter cellular coupling between oocyte and cumulus cells using inter cellular markers. *Exp cell Res.* 126:15-29.

Myers JA., Hardy J, Dunckley T et al. (2007). GAB2 alleles modify Alzheimer's risk in APOE epsilon4 carriers *Neuron* 54:713-720.

Nagai T, Moor RM. (1990). Effect of oviduct cells on the incidence of polyspermy in pig eggs fertilized in vitro. *Molecular Reproduction and Development* 26:377–382.

Nagai T. (1996). In vitro maturation and fertilization of pig oocytes. *Animal Reproduction Science* 42:153–163.

Nagai T. (2001). The improvement of in vitro maturation systems for bovine and porcine oocytes. *Theriogenology*, 55:1291–1301.

Nakata K, Kawase M, Ogino S, Kinoshita C, Murata H, Sakaue T, Ogata K, Ohmori S, 1996: Effects of age on levels of cysteine, glutathione and related enzyme activities in livers of mice and rats and an attempt to replenish hepatic glutathione levels of mouse with cysteine derivatives. *Mech Ageing Dev* 90, 195–207.

Nandi S., Chauhan M.S., Palta P. Effect of cumulus cells and sperm concentration on cleavage rate and subsequent embryonic development of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes matured and fertilized in vitro. *Theriogenology* 1998;50: 1251-1262.

Narula A, Taneja M, Totey S.M. (1996). Morphological development, cell number, and allocation of cells to trophectoderm and inner cell mass of in vitro fertilized and parthenogenetically developed buffalo embryos: the effect of IGF-I. *Mol Reprod Dev.* 44:343–351.

Neglia G., Gaparrini B., Caracciolo di Brienza V., Presicce G.A., Zicarelli L. Buffalo and bovine in vitro embryo production from Ovum Pick-up and abattoir derived oocytes. Proc of A.S.P.A. XIV Congress, Firenze, June 12–15 2001: 624–626.

Nishikimi A, Mukai J, Yamada M, 1999: Nuclear translocation of nuclear factor kappa B in early 1-cell mouse embryos. Biol Reprod 60, 1536–1541.

Niwa K, 1993: Effectiveness of in vitro maturation and in vitro fertilization techniques in pigs. J Reprod Fertil Suppl 48, 49–59.

Nogushi S., N. Yonezawa, T. Katsumata, K. I. Hashizume, M. Kuwayama, S. Hamano, S. Watanabe and M. Nakano, (1994). Biodim. Biophys. Acta 1202; 7.

Oberley LW and Buettner GR. (1979). Role of superoxide dismutase in cancer: a review. Cancer Res 39: 1141–1149.

Ornoy A. Embryonic oxidative stress as a mechanism of teratogenesis with special emphasis on diabetic embryopathy. Reprod Toxicol 2007; 24:31-41.

Overstreet JW, Cooper GW, Fatz DF. Sperm transport in the reproductive tract of the female rabbit: II. The sustained phase of transport. Biol Reprod 1978; 19: 115-132.

Oyamada T, Fukui Y, 2004: Oxygen tension and medium supplements for *in vitro* maturation of bovine oocytes cultured individually in a chemically defined medium. *J Reprod Dev* 50, 107–117.

Pacey AA, Davies N, Warren MA, Barrat CLR and Cooke ID. Interaction may assist human spermatozoa to detach from intimate association with the endosalpinx. *Hum Reprod* 1995b; 10: 2603-2609.

Pacey AA, Hill CJ, Scudamore IW, Warren MA, Barrat CL, Cooke ID. The interaction *in vitro* of human spermatozoa with epithelial cells from the human uterine (fallopian) tube. *Hum Reprod* 1995a; 10: 360-366.

Pancarci SM, Jordan ER, Risco CA, Schouten MJ, Lopes FL, Moreira F, Thatcher WW. (2002). Use of estradiol cypionate in a presynchronized timed artificial insemination program for lactating dairy cattle. *J Dairy Sci*, 85, 122-131.

Papi M, Brunelli R, Sylla L, Parasassi T, Monaci M, Maulucci G, Missori M, Arcovito G, Ursini F, De Spirito M. (2010). Mechanical properties of zona pellucida hardening. *Eur Biophys J*; **39**:987-269 992.

Papi M., Sylla L., Parassi T., Brunelli B., Monaci M., Maulucci G., Arcovito G., Ursini F., De Spirito M (2009). Evidence of elastic transition in the zona pellucida of oocytes using atomic force microscopy. *App. Phys Lett* 94; 153902, 1-3.

Perreault S.D., Barbee R.R., Slott V.L. Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocytes. *Dev. Biol.* 1988;125: 181-186.

Perreault S.D., Wolff RA, Zirkin BR. The role of disulfide bond reduction during mammalian sperm nuclear decondensation in vivo. *Dev Biol* 1984;101:160–7.

Pfeffer U, Ferrari N, Dell'Eva R, Indraccolo S, Morini M, Noonan DM, Albin A. Molecular mechanisms of action of angiopreventive anti-oxidants on endothelial cells: microarray gene expression analyses. *Mutat Res* 2005; 591:198-211.

PHILLIPS D M. and SHALGI R M Surface Properties of the Zona Pellucida(1980) *The JOURNAL OF EXPERIMENTAL ZOOLOGY* 213: 1-8

Phillips D, Shalgi R. Surface properties of the zona pellucida. *J Exp Zool* 1980; 213:1–8.

Polge C, Salamon S, Wilmut I. (1970). Fertilizing capacity of frozen boar semen following surgical insemination. *Vet Rec*; 87: 424-428.

Pollard JW, Plante C, King WA, Hansen PJ, Betteridge KJ, Suarez SS. Fertilizing capacity of bovine sperm may be maintained by binding to oviductal epithelia cells. *Biol Reprod*; 1991; 44:1202-1207.

Pryor WA, Houk KN, Foote CS, Fukuto JM, Ignarro LJ, Squadrito GL, and Davies KJ. (2006). Free radical biology and medicine: it's a gas, man! *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291: R491–R511.

Ralt et al. (1991). Sperm attraction of follicular factor(s) correlates with human egg fertilizability. *Procl. Natl. Acad. Sci. USA*; 88: 1180-1182.

Reed W.A. , T.K. Suh, T.D. Bunch, K.L. White Culture of in vitro fertilized bovine embryos with bovine oviductal epithelial cells, buffalo rate liver (BRL) cells, or BRL-cell-conditioned medium *Theriogenology*, 45 (1996), pp. 439–449

Reimann M, Loddenkemper C, Rudolph C, Schildhauer I, Teichmann B, Stein H, Schlegelberger B, Dorken B, Schmitt CA. The Myc-evoked DNA damage response accounts for treatment resistance in primary lymphomas in vivo. *Blood* published 11 June 2007; PMID: 17562874.

Riddell K.P., D.A. Stringfellow, B.W. Gray, M.G. Riddell, J.C. Wright, P.K. Galik (1993). Structural and viral association comparisons of bovine zonae pellucidae from follicular oocytes, day-7 embryos and day-7 degenerated ova *Theriogenology*, 40 pp: 1281–1291

Riddell KP, Stringfellow DA, Gray BW, Riddell MG, Wright JC, Galik PK. Structural and viral association comparisons of bovine zonae pellucidae from follicular oocytes, day-7 embryos and day-7 degenerated ova. *Theriogenology* 1993; 40:1281–1291.

Rosenkrans CF Jr, First NL. Effect of free amino acids and vitamins on cleavage and development rate of bovine zygotes *in vitro*. J Anim Sci 1994;72:434-437.

Rosenkrans, C.F., Jr and First, N.L. (1994). Effect of free amino acids and vitamins on cleavage and developmental rate of bovine zygotes *in vitro*. J, Anim, Sci., 72, 434–437.

Schultz J, Copley RR, Doerks T, Ponting CP, Bork P. (2000). SMART: a web-based tool for the study of genetically mobile domains. Nucleic Acids Research 28: 231-234.

Schultz R. Molecular aspects of oocyte growth and maturation. In: Rossant J, Pedersen R.A (eds), (1987). Experimental Approaches to Mammalian Embryonic Development. Cambridge: University Press; 195-237.

Shalgi R. and Philips D.M (1980). Mechanics of *in vitro* in the hamster. Biol. Reprod. 23: 433-444.

Shao DZ, Lee JJ, Huang WT, Liao JF, Lin MT, 2004: Inhibition of nuclear factor-kappa B prevents staphylococcal enterotoxin A-induced fever. Mol Cell Biochem 262,177–185.

Simonian N. A and Coyle J. T. (2006). Oxidative stress in neurodegenerative diseases. Annu Rev Pharmacol Toxicol 36: 83-106.

Singhal VK, Kaur D, Kumar P, (2008). Effect of cytomixis on the pollen size in 'Seabuckthorn' (*Hippophae rhamnoides* L., Elaeagnaceae). *Cytologia* 73: 167–172. doi:10.1508/cytologia.

Smith TT, Mc Kinnon-thompson CA, Wolf DE. Changes in lipid diffusibility in the hamster sperm head plasma membrane during capacitation *in vivo* and *in vitro*. *Mol Reprod Dev* 1987; 50(1): 86-92.

Smith, C.W., L'Heureux, J., Ness, N.F., Acuna, M.H., Burlaga, L. F. and Scheifele, J. (1998). The ACE magnetic fields experiment, *Space Sci. Rev.*; 86, 613.

Staigmiller RG, Moor RM. (1984). Effect of follicle cells on the maturation and developmental competence of ovine oocytes matured outside the follicle. *Gamete Res*; 9:221–229.

Storz P. (2005). Reactive oxygen species in tumor progression. *Front Biosci* 10: 1881–1896.

Suarez SS, Brockman K and Lefebvre R. Distribution of mucus and sperm in bovine oviducts after artificial insemination: the physical environment of the oviductal sperm reservoir. *Biol Reprod* 1997; 56: 447-453.

Suarez SS, Revah I, Lo M, Kollé S. Bull sperm binding to oviductal epithelium is mediated by a Ca^{++} - dependent lectin on sperm that recognizes Lewis-a trisaccharide. *Biol Reprod* 1998; 59: 39-44.

Suarez SS. Sperm transport and motility in the mouse oviduct: observation in situ. Biol Reprod 1987; 376: 203-210.

Suzuki H, Yang X, Foote RH. Surface characteristics and size changes of immature, in vitro matured and in vitro fertilized bovine oocytes. Theriogenology 1994; 41:abstract 307.

Swann K. Ca⁺⁺ oscillations and sensitization of Ca⁺⁺ release in unfertilized mouse eggs injected lead a sperm factor. Cell Calcium 1994;15, 331-339.

Sylla L., Stradaioli G., Manuali E., Rota A., Zelli R., Vincenti L., and Monaci M, (2005). The effect of *Mycoplasma mycoides* ssp. *Mycoides* LC of bovine origin on in vitro fertilizing ability of bull spermatozoa and embryo development. Anim. Reprod. Sci. 85, 81-93.

Szöllösi D. Oocyte maturation. In: Thibault C, Levasseur MC, Hunler RHF (eds), (1993) Reproduction in Mammals and Man. Paris: Ellipses: 307-325.

Takahashi M., Nagai T., Hamano S., Kuwayama M., Okamura N., Okano A. Effect of thiol compounds on in vitro development and intracellular glutathione content of bovine embryos. Biol Reprod 1993; 49: 228-232.

Takahashi M., T. Nagai, S. Hamano, M. Kuwayama, N. Okamura, A. Okano (1993). Effect of thiol compounds on in vitro development and

intracellular glutathione content of bovine embryos. *Biol Reprod.* 49:228–232.

Tanghe S., Van Soom A., Nauywnck H., Coryn M., de Kruif A. (2002). Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation and fertilisation. *Mol. Repeod. Dev.* 61: 414-424.

Telfer JF, Norman JL, Cameron L. Identification of nitric oxide in human uterus. *Human Reprod.* 1995; 10:19-23.

Telford N. A., Watson A. J., Schultz G. A. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. *Mol Reprod Dev* 1990; 26: 90-100.

Telford N. A., Watson A. J., Schultz G. A. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. *Mol Reprod Dev* 1990; 26: 90-100.

Tervit H.R., Whittingham D.G., Rowson L.E. Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. *J. Reprod. Fertil.* 1972;30 (3):493-497.

Tesarik J., Mendoza Oltras C., Tesart J. Effect of the human cumulus oophorus on movement characteristics of human capacitated spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 1990; 88: 665-675.

Thibault C, Levasseur MC, Hunler RHF (eds), (1993) *Reproduction in Mammals and Man.* Paris: Ellipses: 307-325.

Thomas PG, Ball BA, Miller PG, Brinsko SP, Southwood L. A subpopulation of morphologically normal, motile spermatozoa attach to equine oviductal epithelial cell monolayers. *Biol Reprod* 1994; 51:303-309.

Topper E, Kruijt L, Calvete J, Mann K, Toepfer-Petersen E, Woelders H. Identification of bovine zona pellucida glycoproteins. *Mol Reprod Dev* 1997; 46:344–350.

Totey S.M., Daliri M, Appa Rao KBC, Pawshe CH, Taneja M, Chillar RS. Differential cleavage and developmental rates and their correlation with cell number and sex ratios in buffalo embryos generated in vitro. *Theriogenology* 1996b;45:521-533.

Totey S.M., Pawshe C.H., Appa Rao K.B.C.. In vitro maturation of buffalo oocytes: role of insulin and its interaction with gonadotrophins. *J. Reprod. Fert. Supplement* 1996;50: 113-119.

Totey S.M., Pawshe C.H., Singh G.P. Effects of bull and heparin, and sperm concentrations on in vitro fertilization of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes matured in vitro. *Theriogenology* 1993a; 39: 887-898.

Totey S.M., Pawshe C.H., Singh G.P. In vitro maturation and fertilization of buffalo oocytes (*Bubalus bubalis*): effects of media, hormones and sera. *Theriogenology* 1993b;39: 1153-1171.

Totey S.M., Singh G., Teneja M., Pawshe C.H., Talwar G.P. In vitro maturation, fertilization and development of follicular oocytes from buffalo (*Bubalus bubalis*). *J. Reprod. Fertil.* 1992;95: 597-607.

Toyokuni S, Okamoto K, Yodoi J, and Hiai H. (1995). Persistent oxidative stress in cancer. *FEBS Lett* 358: 1-3.

transport through the female genital tract: evidence from vaginal sonography of uterine peristalsis and hysterosalpingoscintigraphy. *Hum Reprod* 1996; 11: 627-632.

Valko M, Rhodes C. J, Moncol J, Izakovic M, and Mazur M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 160: 1-40.

Van der Ven H.N. Al Hasani S., Diedricg K., Hamerich U., Lehmann F., Kebs D. (1985). Polispermy in in vitro fertilisation of human oocytes: frequency and possible causes. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 442: 88-95.

Wang W, Ballatori N, 1998: Endogenous glutathione conjugates: occurrence and biological functions. *Pharmacol Rev* 50, 335–356.

Wang W-H, Okuda K, Niwa K. In vitro penetration of pig oocytes matured in culture by frozen-thawed ejaculated spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1991; 93:491–499.

Wassarman PM. Regulation of mammalian fertilization by zona pellucida glycoproteins. *J Reprod Fertil Suppl* 1990; 42:79–87.

Wasserman P. (1988). Zona pelhida glycoproteins. *Annu. Rev. Biochem.* 57:415-442.

Wasserman PM (1990). Profile of a mammalian sperm receptor. *Development* 10: 1-7.

Wehrend A, Meinecke B. (1998). The meiotic cell cycle in oocytes of domestic animals. *Reprod Domest Anim*; 33:289-297.

Whitaker BD, Knight JW, 2004: Exogenous c-glutamyl cycle compounds supplemented to in vitro maturation medium influence in vitro fertilization, culture, and viability of porcine oocytes and embryos. *Theriogenology* 62, 311–322.

Williams M, Hill CJ, Scudamore I, et al. Sperm numbers and distribution within the human fallopian tube around ovulation. *Hum Reprod* 1993; 8:2019-2026.

Wu W, Goldstein G, Adams C, Mathews R. H, Ercal N. (2006) Separation and quantification of N-acetyl-L-cysteine and N-acetyl-L-cysteine amide by HPLC with fluorescence detection. *Biomed Chromatogr* 20, 415-422.

Xu DX, Chen YH, Wang H, Zhao L, Wang JP, Wei W, (2005). Effect of N-acetylcysteine on lipopolysaccharide-induced intra-uterine fetal death and intra-uterine growth retardation in mice. *Toxicol Sci* 88, 525–533.

Xu DX, Chen YH, Wang H, Zhao L, Wang JP, Wei W. Effect of N-acetylcysteine on lipopolysaccharide-induced intra-uterine fetal death and intra-uterine growth retardation in mice. *Toxicol Sci* 2005; 88:525–533.

Yanagimachi R, in: E. Knobil, J.D. Neil (eds.), *The Physiology of Reproduction*, Raven Press, New York, 1994; 189-317.

Yanagimachi, R., Yanagimachi, H. and Rogers, B.J. 1976. The use of zona-free animal ova as test-system for the assessment of fertilizing capacity of human spermatozoa. *Biology of Reproduction* 15:471-476.

Yoshida M, Ishigaki K, Nagai T, Chikyu M, Pursel V.G (1993) Glutathione concentration during maturation and after fertilisation in pig oocytes; relevance to the ability of oocytes to form male pronucleus. *Biol Reprod* 49, 89-94.

Yoshida M, Ishigaki K, Pursel VG, 1992: Effect of maturation media on male pronucleus formation in pig oocytes matured in vitro. *Mol Reprod Dev* 31, 68–71.

Zamboni L. Fertilization in the mouse. In: Moghissi KS, Hafez ESE (eds), *Biology of Mammalian Fertilization and Implantation*. Springfield, Il.: Charles C, Thomas; 1972; 213-262.

Zhou, P., Wu, Y.G., Li, Q., Lan, G.C., Wang, G., Gao, D., Tan, J.H. (2008). The interactions between cysteamine, cystine and cumulus

cells increase the intracellular glutathione level and developmental capacity of goat cumulus-denuded oocytes.

Reproduction 135:605-611.