

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

**SCUOLA DI DOTTORATO IN SANITÀ E PRODUZIONI ANIMALI: SCIENZA,
TECNOLOGIA E BIOTECNOLOGIE**

Dipartimento di Scienze Animali

**CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN
Biotecnologie Applicate alle Scienze Veterinarie e Zootecniche
Ciclo XXIII**

**TESI DI DOTTORATO DI RICERCA
LA BOVINA DA LATTE COME MODELLO PER LO STUDIO DEL PRECOCE
INVECCHIAMENTO OVARICO: ASPETTI MORFOLOGICI E MOLECOLARI**

VET/01

Dott.ssa Irene TESSARO
Matricola n. R07710

TUTOR: Prof.ssa Silvia C. Modina

COORDINATORE DEL DOTTORATO: Chiar.mo Prof. Fulvio Gandolfi

A.A. 2009-2010

INDICE

ABSTRACT	6
INTRODUZIONE	7
IL GAMETE FEMMINILE	7
Ovogenesi	7
Follicologenesi	9
CRONOLOGIA DELLA FERTILITA' NEI MAMMIFERI E INVECCHIAMENTO DELLA GONADE E DEL GAMETE FEMMINILE	15
Invecchiamento a livello ovarico	22
Invecchiamento dell'ovaio e dinamica della popolazione follicolare	23
Invecchiamento a livello follicolare	24
Aspetti cellulari e molecolari dell'invecchiamento del follicolo	24
Alterazioni della microcircolazione perifollicolare	27
Ruolo dello stress ossidativo nell'invecchiamento del follicolo	30
<i>Il glutatione</i>	35
<i>Il sistema ossido nitrico/ossido nitrico sintasi</i>	38
Invecchiamento a livello ovocitario	42
Alterazioni mitocondriali	44
Aneuploidia	45
Marker locali dell'invecchiamento ovarico	47
INVECCHIAMENTO RIPRODUTTIVO PRECOCE NELLA DONNA (PREMATURA INSUFFICIENZA OVARICA)	51
IPOFERTILITA' PRECOCE NELLA BOVINA DA LATTE	53
MORFOLOGIA DELL'OVAIO E COMPETENZA ALLO SVILUPPO	54
SCOPO DEL LAVORO	57

DISEGNO SPERIMENTALE	58
MATERIALI E METODI	61
PRODOTTI CHIMICI E REAGENTI	61
RACCOLTA E CLASSIFICAZIONE DELLE OVAIE	61
ANALISI MACROSCOPICA DELLE OVAIE	63
VALUTAZIONI ISTOLOGICHE ED ISTOCHIMICHE	63
Analisi morfologiche e morfometriche	63
Analisi istochimiche ed immunoistochimiche	65
Valutazione della vascolarizzazione perifollicolare e follicolare	65
Valutazione dell'espressione dell'ossido nitrico sintasi di tipo endoteliale	67
Quantificazione dei livelli di vascolarizzazione e dell'espressione dell'enzima eNOS nella parete dei follicoli antrali medi	68
Valutazione della componente connettivale perifollicolare	69
ANALISI DEGLI OVOCITI E PRODUZIONE IN VITRO DI EMBRIONI	69
Raccolta degli ovociti	69
Determinazione del contenuto intracellulare di GSH nell'ovocita denudato	70
Localizzazione immunocitochimica dell'eNOS nell'ovocita denudato	72
Maturazione in vitro	74
Fecondazione in vitro	74
Coltura in vitro	76
Valutazione dei parametri di sviluppo e qualità embrionale dopo somministrazione di cisteamina durante IVM	77
Valutazione dei parametri di sviluppo e qualità embrionale dopo somministrazione di molecole donatrici di NO durante IVM	77
Analisi del cariotipo degli ovociti	78

Valutazione dell'attività mitocondriale	80
ANALISI DEI LIQUIDI FOLLICOLARI	81
Raccolta dei liquidi follicolari	81
Quantificazioni ormonali	81
ANALISI STATISTICA	82
RISULTATI	83
DISTRIBUZIONE DELL'ETA' DEI SOGGETTI CON FENOTIPO L _o	83
ANALISI MACROSCOPICA DELLE OVAIE	84
VALUTAZIONI ISTOLOGICHE ED ISTOCHIMICHE	87
Analisi morfologiche e morfometriche	87
Analisi istochimiche ed immunoistochimiche	91
Valutazione della vascolarizzazione perifollicolare e follicolare	91
Valutazione dell'espressione dell'ossido nitrico sintasi di tipo endoteliale	93
Valutazione della componente connettivale perifollicolare	98
ANALISI DEGLI OVOCITI E PRODUZIONE IN VITRO DI EMBRIONI	101
Determinazione del contenuto intracellulare di GSH nell'ovocita denudato	101
Localizzazione immunocitochimica dell'eNOS nell'ovocita denudato	102
Valutazione dei parametri di sviluppo e qualità embrionale dopo somministrazione di cisteamina durante IVM	103
Valutazione dei parametri di sviluppo e qualità embrionale dopo somministrazione di molecole donatrici di NO durante IVM	105
Analisi del cariotipo degli ovociti	113
Valutazione dell'attività mitocondriale	117
VALUTAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE FOLLICOLARE DI PROGESTERONE, ESTRADIOLO E ORMONE ANTI-MULLERIANO	120

DISCUSSIONE	123
BIBLIOGRAFIA	161
ELENCO PUBBLICAZIONI	203
RINGRAZIAMENTI	206

ABSTRACT

Several studies in women indicate that precocious ovarian aging is a disorder characterized by an accelerated decline of reproductive potential. We demonstrated that ovaries recovered from 4-8 years old dairy cows with a low antral follicle count generate oocytes with low developmental competence, high aneuploidy rate after maturation, a reduced amount of active mitochondria and a lower glutathione synthesis capability. Interestingly, these ovaries have a reduced volume, show a low proportion of healthy primordial follicles and an increased stromal tissue. Moreover this is accompanied by reduced perifollicular vessels and endothelial nitric oxide (NO) synthase concentration. Interestingly, the administration of NO donor molecules partially reverse the defective oocyte developmental capability in vitro.

Finally, follicular fluids recovered from these ovaries have a high progesterone concentration, low estrogen/progesterone ratio and low Anti-Mullerian hormone concentration, which accounts for a low follicle reserve. Altogether, morphological changes, ovarian and endocrine functions consistently indicate a condition of precocious ovarian failure in young adult dairy cows and validate the use of this population as an animal model to study the accelerated decline of fertility in women.

INTRODUZIONE

IL GAMETE FEMMINILE

Ovogenesi

Gli ovociti di mammifero sono cellule altamente specializzate [1], che si sviluppano e differenziano grazie ad un lungo “viaggio” definito ovogenesi, attraverso il quale una cellula germinale primordiale, diploide, diventa un ovocita, aploide e competente al successivo sviluppo embrionale [2].

Durante la vita fetale, le cellule germinali primordiali migrano dall'endoderma del sacco vitellino verso le creste genitali, dove diventano oogoni. Dopo un'intensa proliferazione mitotica, decisiva per la formazione della riserva di ovociti che coprirà l'intera vita riproduttiva, inizia la sintesi del DNA funzionale alla meiosi e l'oogone diventa così ovocita primario. Durante le fasi terminali della vita fetale, gli ovociti iniziano la meiosi attraversando gli stadi transitori della profase della prima divisione meiotica (leptotene, zigotene e pachitene), caratterizzata principalmente da scambi di materiale genetico tra i cromatidi materni e paterni (crossing-over). Ogni cromosoma comincia a condensarsi, diventa più spesso e si allinea al suo omologo per formare una tetrade di quattro cromatidi. Allo stadio di diplotene, il complesso del sinaptonema si degrada e i bivalenti rimangono strettamente uniti attraverso i siti di ricombinazione. Prima della nascita, tutta la riserva di ovociti rimane bloccata allo stadio di

diplotene, noto come stadio di vescicola germinale. In molte specie i cromosomi si decondensano in modo più o meno esteso e diventano trascrizionalmente attivi pur rimanendo così arrestati fino al raggiungimento della maturità sessuale [3]. L'arresto meiotico si protrae per diversi mesi o anni secondo la specie [4-7]. Durante questo periodo, gli ovociti crescono in modo interdipendente dallo sviluppo follicolare, ma non sono in grado di riprendere la meiosi.

La crescita in dimensioni del gamete è accompagnata da modificazioni strutturali, quali la redistribuzione degli organuli citoplasmatici in posizione periferica, la comparsa dello spazio perivitellino, la riduzione del reticolo endoplasmatico sia liscio che rugoso [8-10] e un'intensa attività trascrizionale e traduzionale [11, 12]. Appena prima del picco pre-ovulatorio dell'ormone luteotropo (LH), aumenta il contenuto lipidico dell'ovocita, l'apparato di Golgi si riduce e i granuli corticali si spostano completamente verso l'oolemma. In seguito allo stimolo dell'LH, riprende la meiosi, si osserva la rottura della vescicola germinale e la formazione del fuso meiotico che, insieme ai bivalenti, si porta verso la superficie dell'ovocita. La prima divisione meiotica (riduzionale) prosegue con la ripartizione delle diadi in due cellule, una corrispondente a quasi tutto l'ovocita iniziale, l'altra ad una sorta di "protuberanza" citoplasmatica che, una volta resasi indipendente con il processo di citodieresi, si trasforma nel primo globulo polare. A questo punto il ciclo dell'ovocita si arresta alla metafase della seconda divisione, dove rimane fino alla fecondazione [4].

La seconda divisione meiotica (equazionale) si svolge con modalità analoghe alla prima: l'ovocita secondario si divide in una cellula aploide che conserva quasi tutto il citoplasma ed in un secondo globulo polare che, come il primo, ha solo la funzione di eliminare la metà del patrimonio cromosomico dell'ovocita senza intaccare i materiali di riserva accumulati nel citoplasma (Figura 1). Il peculiare meccanismo di divisione cellulare, proprio del gamete femminile, assicura dunque l'accumulo di RNA messaggeri, di ribosomi e di polipeptidi che verranno utilizzati dall'embrione nelle successive fasi di sviluppo fino all'attivazione del genoma embrionale [13-18]. Alla cellula uovo spetta, infatti, la gestione di un fondamentale programma di sviluppo: dirigere la transizione da ovocita ad embrione, utilizzando le sostanze accumulate durante l'ovogenesi.

Follicologenesi

Nei mammiferi, l'organo preposto alla produzione dei gameti femminili è l'ovaio, la cui unità funzionale è il follicolo. Il follicolo è la struttura cellulare che separa l'ovocita dai tessuti ovarici circostanti, assicurando così la "sopravvivenza" del gamete e creando un ambiente adatto per le successive fasi di crescita e maturazione.

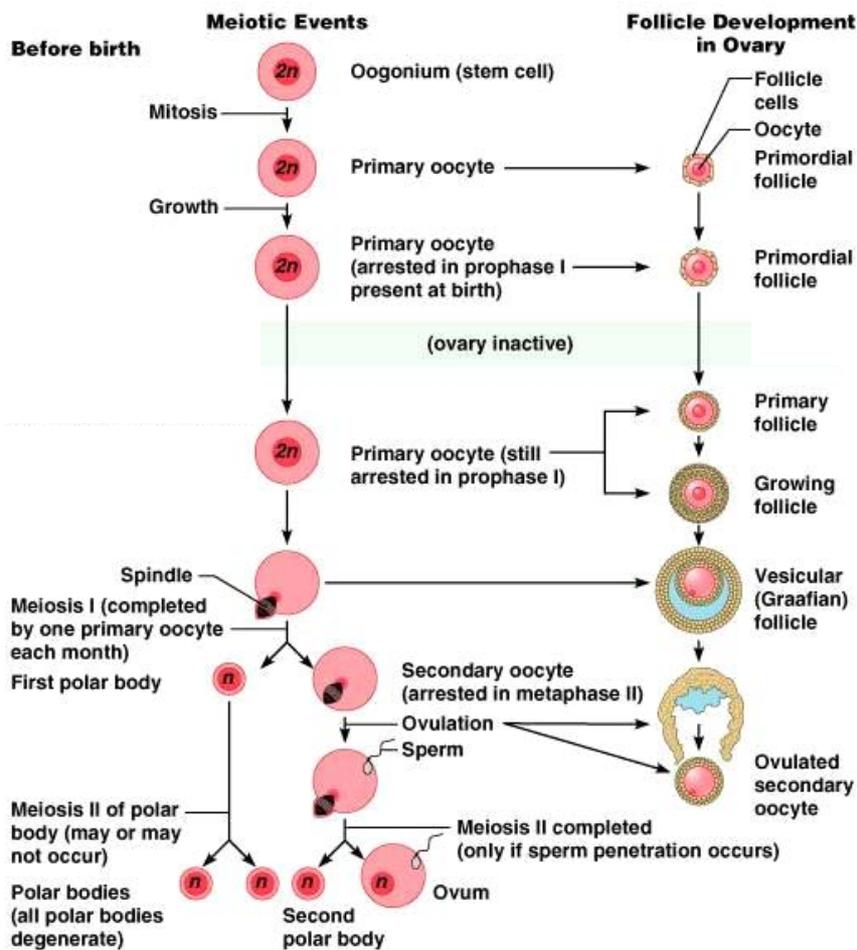


Figura 1: Rappresentazione schematica di ovogenesi e follicologenesi; da: [http://academic.pgcc.edu/~aimholtz/AandP/206_ONLINE/Repro/Image s/oogenesis](http://academic.pgcc.edu/~aimholtz/AandP/206_ONLINE/Repro/Image%20s/oogenesis).

Le cellule germinali primordiali sono situate nella parte più interna della corticale ovarica e, non appena raggiungono lo stadio di diplotene della I divisione meiotica, vengono circondate da un singolo strato di cellule mesodermiche appiattite, precursori delle cellule della granulosa, sostenute da una membrana basale completa: si formano in questo modo i *follicoli primordiali*. I cambiamenti morfologici e funzionali che avvengono durante l'ovogenesi sono accompagnati da importanti modificazioni della

struttura follicolare, nota con il termine di follicologenesi (Figura 1). I fattori coinvolti nella formazione del follicolo primordiale non sono ancora stati caratterizzati precisamente, anche se molta attenzione è stata posta sulla molecola c-kit e sul suo recettore; è stato infatti dimostrato nella specie murina che queste molecole svolgono un'azione centrale nel dirigere la migrazione e determinare la sopravvivenza delle cellule germinali durante la vita fetale [19]. Altre molecole che potrebbero essere coinvolte nella formazione del follicolo primordiale sia nella specie murina sia nell'uomo e nel bovino sono i fattori di crescita della famiglia dei "transforming growth factor β " (TGF β) [20-22] e nel topo i proto-oncogeni della famiglia "B-cell lymphoma/leukemia-2" (bcl-2) [23].

Durante l'attivazione dei follicoli primordiali, le cellule della granulosa diventano cubiche e cominciano a proliferare [10, 24]. È stato ipotizzato che l'attivazione del follicolo primordiale sia dovuta a fattori che stimolano la loro proliferazione.

In questo contesto la "bone morphogenetic protein-7" (BMP-7) nel ratto [25], l'"insuline-like growth factor-I" (IGF-I) nella pecora, nel ratto, nel suino e nell'uomo [26, 27] e l'"epidermal growth factor" (EGF) [28] sono molecole che potrebbero essere coinvolte in questa fase della follicologenesi, poiché è stato dimostrato che sono in grado di stimolare la proliferazione ed il differenziamento delle cellule della granulosa. Recentemente è stato inoltre osservato che l'ovocita stesso è in grado di promuovere lo sviluppo del follicolo primario grazie all'azione

fondamentale del “growth and differentiation factor-9” (GDF-9), una molecola ovocita-specifica della famiglia dei TGF β , la cui espressione è stata evidenziata già allo stadio di follicoli primari, nel topo, nel ratto e nell'uomo [29-33].

Il passaggio da follicolo primordiale a *follicolo primario* è caratterizzato dalla deposizione di una sostanza glicoproteica che andrà a costituire la zona pellucida [34]. A partire da questo momento, gli strati di cellule della granulosa aumentano di numero, si accresce il diametro dell'ovocita ed il follicolo si ingrandisce, diventando *secondario*. Queste modificazioni si accompagnano anche a cambiamenti del citoplasma della cellula uovo, nella quale si osserva, fra l'altro, la formazione dei granuli corticali. A questo stadio di sviluppo i follicoli cominciano ad essere sensibili alle gonadotropine. Infatti, studi condotti nel bovino, nell'ovino e nel ratto [35-38] hanno dimostrato che l'RNA messaggero del recettore per l'FSH è espresso nei follicoli che presentano da uno a due strati di cellule della granulosa.

Quando l'ovocita è circondato da 2-7 strati di cellule della granulosa, comincia a formarsi l'antra, una cavità che viene gradualmente riempita dal fluido follicolare. A questo punto il follicolo si trova allo stadio di *follicolo antrale precoce*. Le cellule della granulosa si differenziano in due sottopopolazioni: le cellule della granulosa murale, disposte lungo la parete del follicolo e le cellule del cumulo ooforo più strettamente associate all'ovocita [39].

Nella transizione da follicolo primario a secondario si osserva l'inizio della formazione delle giunzioni di tipo gap ("gap junctions") tra ovocita e cellule del cumulo ooforo e tra cellule della granulosa. Lo sviluppo di questo sistema di comunicazione e il cosiddetto "cross-talk" fra compartimento somatico e germinale sono fondamentali per la follicologenesi, la crescita dell'ovocita e l'acquisizione della sua competenza allo sviluppo [40]. Contemporaneamente si osserva, a partire dallo stroma perifollicolare, la proliferazione di altri elementi cellulari che vanno a costituire la teca interna e la teca esterna. Numerosi piccoli vasi attraversano la teca esterna per formare un ricco plesso di capillari nella teca interna, mentre lo strato delle cellule della granulosa rimane privo di vasi per tutto il periodo di accrescimento del follicolo. Durante la formazione della teca interna è già possibile rilevare l'RNA messaggero del recettore dell'LH nelle cellule della teca [38].

I follicoli antrali continuano a crescere ed aumentano di dimensioni fino a raggiungere lo stadio di *follicolo preovulatorio* o *di Graaf* che, nella specie bovina, ha un diametro di circa 1,5-2 cm [41].

Nel follicolo ovulatorio, le cellule della granulosa e quelle della teca interna sono separate da una spessa lamina basale. Quelle che poggiano direttamente sulla lamina basale hanno un aspetto colonnare, mentre quelle che si affacciano verso il lume del follicolo hanno un aspetto poliedrico. Dal punto di vista ultrastrutturale queste cellule sono caratterizzate dalla presenza di abbondante reticolo endoplasmatico liscio,

numerosi mitocondri e un apparato del Golgi molto ben sviluppato, indice di un'intensa attività secretoria. A questo stadio la teca interna raggiunge il suo massimo sviluppo ed è costituita da grossi elementi fusiformi o poliedrici che possiedono attività secretoria, avvolti da un sottile intreccio di fibre reticolari e da numerosi capillari sanguigni. La teca esterna è invece costituita da fibre disposte concentricamente e da cellule fusiformi che non sembrano avere attività secernente. All'interno del follicolo ovulatorio l'ovocita raggiunge il diametro finale che nella specie bovina è di 120-130 μm [41] e appare circondato da numerosi strati di cellule del cumulo ooforo che, nelle ultime fasi della crescita follicolare, perdono gradatamente le connessioni con l'ovocita. La disgregazione del cumulo ooforo non coinvolge però lo strato di cellule disposto radialmente intorno all'ovocita, che nell'insieme costituisce la corona radiata la quale circonda il gamete anche dopo l'ovulazione [41].

L'accrescimento e lo sviluppo dei follicoli si accompagnano a modificazioni dei gameti in essi contenuti (Figura 2).

Durante la follicologenesi, l'ovocita acquisisce gradualmente la capacità di riprendere e completare la divisione meiotica (competenza meiotica) ed intraprendere lo sviluppo embrionale dopo la fecondazione (competenza di sviluppo) [42, 43]

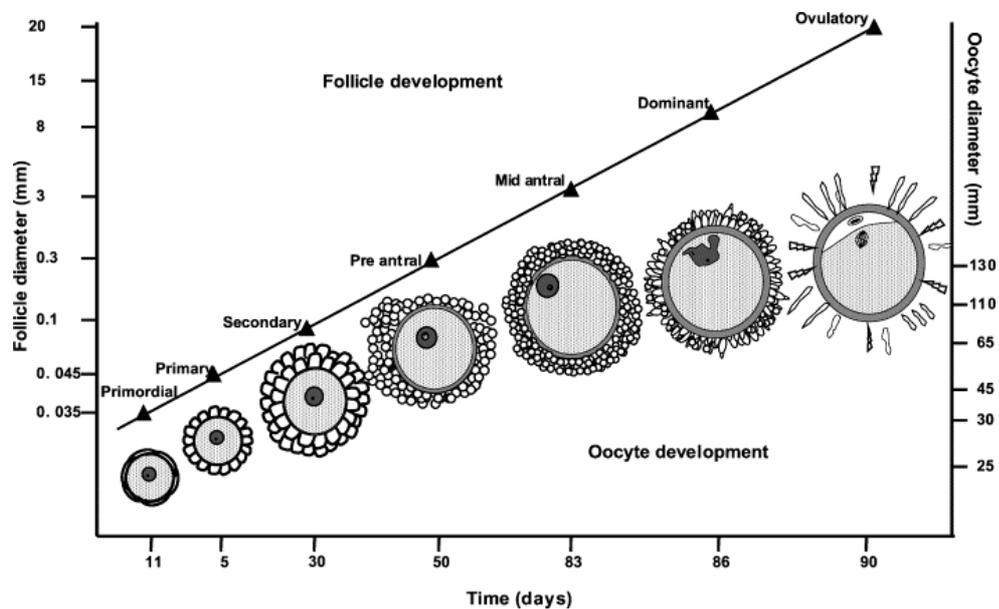


Figura 2: Relazione tra lo sviluppo del follicolo e dell'ovocita nella specie bovina; da [44].

CRONOLOGIA DELLA FERTILITA' NEI MAMMIFERI ED INVECCHIAMENTO DELLA GONADE E DEL GAMETE FEMMINILE

Nei mammiferi, durante la vita riproduttiva, dalla pubertà fino al declino della fertilità [45-47], gruppi di follicoli primordiali e primari riprendono periodicamente lo sviluppo ed entrano nella fase di crescita, caratterizzata dall'accrescimento volumetrico dell'ovocita e dalla formazione delle strutture follicolari precedentemente descritte.

Nelle specie mono-ovulatorie, durante la fase luteale del ciclo estrale, una coorte di follicoli antrali medi viene reclutata e inizia la crescita, ma un solo follicolo viene selezionato per completare la maturazione e ovulare.

Nella donna ad esempio il ciclo estrale (mestruale) è caratterizzato da 2 o 3 ondate follicolari delle quali soltanto l'ultima è ovulatoria [48, 49]; un comportamento analogo si osserva nella bovina, dove ognuna delle 2/3 ondate follicolari è costituita da una coorte di 3-5 follicoli che si sviluppano in sincronia [50-52].

La fase finale della crescita follicolare nei mammiferi è un processo che dipende dalle gonadotropine e comprende tre passaggi: reclutamento della coorte di follicoli, selezione e dominanza. Il reclutamento è l'ingresso del "pool" di follicoli nella fase gonadotropine-dipendente. Questa dipende dalla dimensione dei follicoli e dalla disponibilità di recettori per le gonadotropine nel comparto somatico. La fase di selezione prevede l'emergenza di un solo follicolo dalla coorte reclutata [48, 53, 54], mentre gli altri follicoli vanno incontro ad un processo degenerativo chiamato atresia follicolare (Figura 3). Il follicolo dominante continua la fase di crescita per diversi giorni (fase della dominanza). In assenza del picco di LH, anche questo follicolo regredisce, stimolando l'inizio di una nuova ondata follicolare. Nel caso invece si verifichi il picco di LH, il follicolo dominante cresce ulteriormente, formando il follicolo preovulatorio, e l'ovocita al suo interno ultima la maturazione, con il completamento della prima divisione meiotica, la successiva rottura della parete follicolare e

l'ovulazione. Questo processo avviene con le stesse modalità anche nella specie bovina [50, 55-57].

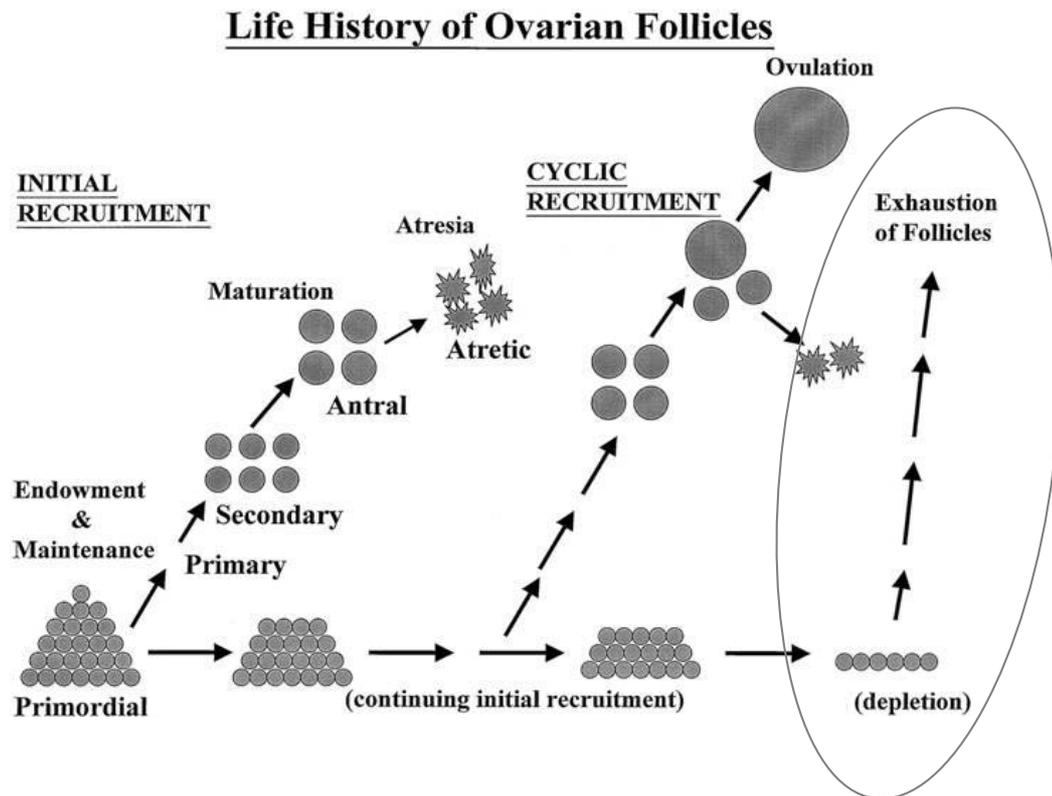


Figura 3: rappresentazione schematica del sistema di reclutamento dei follicoli e dell'esaurimento della popolazione follicolare al termine della vita riproduttiva (evidenziato); da [58].

L'atresia costituisce il più comune destino dei follicoli, poiché solo una minima percentuale di essi arriva all'ovulazione [59-61]. Con il termine atresia ci si riferisce alla regressione follicolare, di cui l'apoptosi è riconosciuta come principale responsabile. Nei follicoli antrali, l'apoptosi interessa soprattutto le cellule della granulosa e si estende

progressivamente alle cellule della teca [62-69]. Fenomeni tipici dell'apoptosi quali la frammentazione del DNA e l'espressione di geni pro-apoptotici vengono facilmente identificati in queste cellule.

E' stato ipotizzato che fenomeni di atresia siano coinvolti anche nella deplezione dei follicoli quiescenti osservata durante la vita riproduttiva [59, 70] sia nella donna che nella bovina [71].

Questo è un fenomeno ancora poco conosciuto, ma si ipotizza che possa essere un evento decisivo per stabilire la durata della vita riproduttiva dei mammiferi. I meccanismi responsabili dell'atresia non sono stati ancora completamente chiariti, comunque, in diverse specie, nei follicoli primordiali e primari sembra che sia l'ovocita stesso a rendersi responsabile della regressione follicolare [59, 61, 70, 72]. Da questi dati sembrerebbe quindi che i follicoli immaturi siano particolarmente vulnerabili all'apoptosi indotta da segnali intra-ovocitari, mentre i follicoli in fase di crescita siano più sensibili ai segnali provenienti dalle cellule stromali.

Nell'ambiente follicolare, quindi, il corretto equilibrio fra segnali di morte cellulare programmata e sopravvivenza determina il destino del follicolo stesso. E' evidente che elevate percentuali di apoptosi e, quindi, frequenti quadri di atresia potrebbero ripercuotersi sulla fertilità, fino a causare un arresto prematuro e irreversibile della funzionalità ovarica [60].

Nei ruminanti e nei primati il numero di follicoli presenti in un ovaio è determinato durante la vita fetale [58, 73]. La formazione di questi follicoli è un processo molto lungo, tanto che alcuni vengono attivati prima che altri si formino [74]. Nei ratti e nei topi invece la stabilizzazione della popolazione follicolare avviene entro pochi giorni dalla nascita [75]. Il pool di follicoli primordiali costituisce una riserva di follicoli e ovociti la cui dimensione e la cui stabilità determinano la lunghezza della vita riproduttiva [76-79].

La durata della vita riproduttiva è, quindi, garantita dallo stato di quiescenza dei follicoli primordiali, che permane, nel caso della donna, per decenni; il mantenimento di questo stato è fondamentale per evitare la perdita della riserva follicolare in seguito ad attivazioni improprie o degenerazione [73, 74].

Con il progredire dell'età, le successive ovulazioni o i fenomeni di atresia determinano quindi una progressiva deplezione della popolazione follicolare che causa in parallelo un calo fisiologico della fertilità (Figura 3). Questo processo è stato descritto nella donna [80-82], nel bovino [56], nel cavallo [83, 84], nel maiale [85], nel ratto [86], nel topo [87] e nella scimmia [88].

Studi condotti sia nella donna [77, 89-91] che nella bovina [62, 92-94], hanno chiaramente dimostrato che il progredire dell'età cronologica è, accompagnato da una graduale e fisiologica diminuzione della fertilità.

Nella donna questo processo porta ad una diminuzione della capacità di portare a termine una gravidanza, sia naturale [95, 96] che assistita [97, 98].

Nella specie umana, il processo dell'invecchiamento riproduttivo culmina con la menopausa [47]; il primo evidente sintomo clinico è l'accorciamento di 2-3 giorni del ciclo mestruale [99], come risultato di una contrazione della fase follicolare dovuta ad una precoce selezione e maturazione del follicolo dominante [100, 101]. Questo fenomeno sembra essere conseguente alla diminuzione del numero dei follicoli antrali e quindi alla minor concentrazione di inibina B in circolo e all'aumento dei livelli di FSH [102].

Sebbene la menopausa rappresenti la fase conclusiva e più facilmente riconoscibile della vita riproduttiva di una donna, la fertilità mensile decresce drammaticamente dall'età di 30 anni [103, 104] e termina in modo definitivo mediamente all'età di 41 anni [91, 105]. La menopausa è, infatti, sintomo di un pool follicolare ormai esausto [106].

Questi cambiamenti si ripercuotono sui programmi di riproduzione assistita [77], la cui efficienza dipende comunque dall'età della donna [98, 104, 107]: anche in questo caso le percentuali di concepimento iniziano a diminuire dopo i 30 anni (Figura. 4).

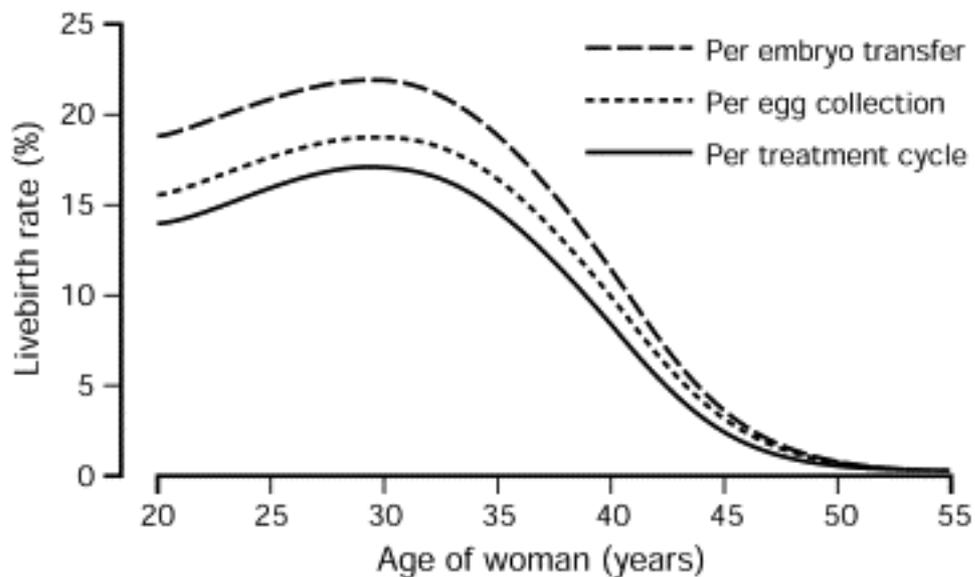


Figura 4: diminuzione dell'efficacia dei programmi di riproduzione assistita con il progredire dell'età della donna; da [98].

Nella specie bovina, l'aspettativa di vita è stimata attorno ai 19 anni e si calcola che il 55% degli animali sia sterile già intorno ai 13 [108]. Come nella donna [109], le vacche anziane presentano elevate concentrazioni di FSH circolante [110]; tuttavia, nonostante l'elevata concentrazione di quest'ormone, in questi animali viene reclutato un minor numero di follicoli di 4-5 mm per ondata follicolare rispetto a soggetti più giovani (1-4 anni) [110]. Inoltre negli animali anziani la velocità di crescita sembrerebbe essere inferiore in quanto il follicolo ovulatorio presenta dimensioni minori rispetto a quelle degli animali giovani; questo potrebbe essere dovuto ad un ridotto numero o ad una minore sensibilità dei recettori per le gonadotropine presenti nel follicolo. La tendenza ad avere follicoli ovulatori più piccoli è stata riscontrata anche nelle ovaie di donne in

prossimità della menopausa [100, 109]. In accordo con quest'ipotesi, nelle vacche in età avanzata, si osserva una ridotta risposta alla superstimolazione ovarica che porta ad un minor numero di follicoli di 2-5 mm all'inizio dell'ondata follicolare [93] e di follicoli preovulatori successivamente [111]. Questo si ripercuote sulle percentuali di gravidanza, in quanto diminuiscono le percentuali di successo delle fecondazioni in vivo; inoltre il numero di embrioni raccolti da vacche di 13-16 anni è significativamente inferiore al numero raccolto dalle figlie di 3-6 anni [92]. Questo supporta l'ipotesi che la qualità degli ovociti diminuisca con l'età. Tuttavia gli embrioni che raggiungono lo stadio di morula o blastocisti non sono di qualità inferiore rispetto a quelli derivati da animali giovani, in quanto, una volta trasferiti, presentano la stessa capacità di sviluppo [92].

Invecchiamento a livello ovarico

Nella donna, i cambiamenti quali-quantitativi che si osservano a carico dei gameti con il progredire dell'età, si accompagnano a modificazioni morfofunzionali di tutta la gonade.

Si osserva infatti la transizione da un organo ricco di follicoli ed attivo, dal punto di vista della secrezione ormonale, ad un organo povero di follicoli, ricco di stroma ed ipofunzionale [112, 113].

Invecchiamento dell'ovaio e dinamica della popolazione follicolare

L'invecchiamento della gonade è caratterizzato, quindi, da cambiamenti morfo-funzionali che accompagnano, come abbiamo ormai più volte ripetuto, la progressiva scomparsa dei follicoli. Nella donna è stato proposto un modello matematico [78] per descrivere il graduale impoverimento di follicoli nell'ovaio.

Nel quarto mese di gravidanza, l'ovaio del feto contiene 6-7 milioni di follicoli primordiali, che in gran parte vanno incontro, durante la seconda metà della vita fetale, a fenomeni di apoptosi. Alla nascita rimangono 1-2 milioni di follicoli [61] e al raggiungimento della maturità sessuale questo numero è ulteriormente sceso a 300000-400000.

Durante la vita riproduttiva la riduzione ha una velocità costante fino ad un "valore-soglia", stimato a 25000 ovociti e fisiologicamente raggiunto intorno ai 37 anni d'età, quando il numero di follicoli inizia a diminuire molto più rapidamente fino all'età della menopausa (circa 51 anni), quando si stima che rimangano un migliaio di follicoli, un numero insufficiente a sostenere il processo ormonale necessario per il ciclo mestruale [106] (Figura 5). Queste dinamiche sono state riscontrate anche nello scimpanzé [114].

Non esistono in letteratura studi analoghi condotti negli animali domestici, tuttavia le notevoli similitudini fra la fisiologia riproduttiva della bovina e della donna, soprattutto per quanto riguarda il comportamento della gonade femminile e le dinamiche follicolari [55, 110, 111], permettono di

ipotizzare che la deplezione follicolare dell'ovaio bovino possa avvenire secondo le modalità sopradescritte.

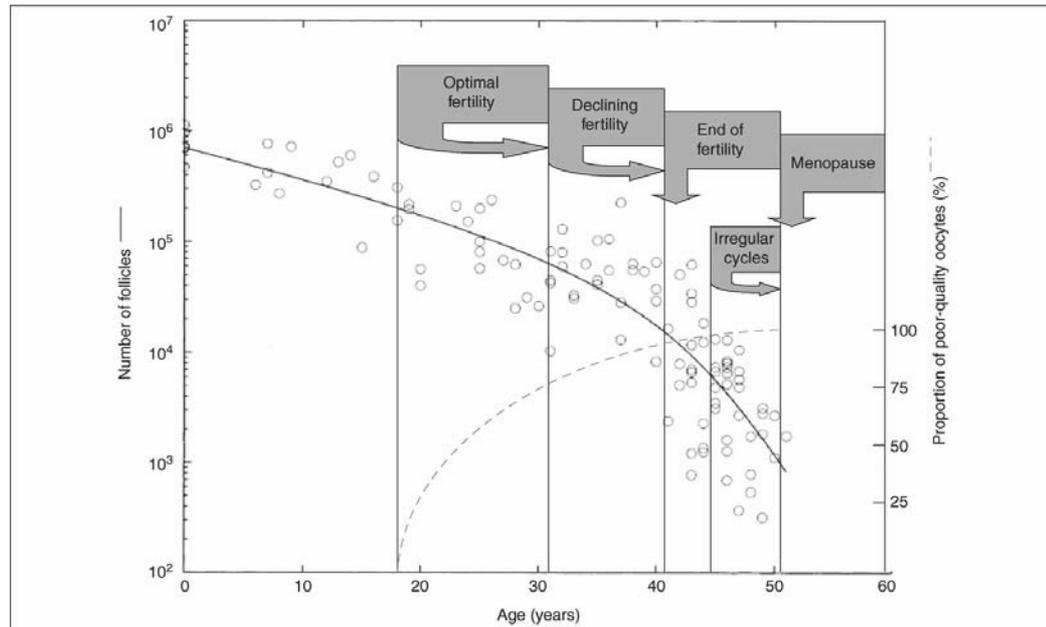


Figura 5: effetto dell'età della donna sul numero di follicoli e sulla qualità degli ovociti in essi contenuti, in relazione alla fertilità generale; da [77].

Invecchiamento a livello follicolare

Aspetti cellulari e molecolari dell'invecchiamento del follicolo

Se le tempistiche della progressiva diminuzione dei follicoli ovarici dovuta all'invecchiamento sono state ampiamente studiate e, almeno nella donna, sono abbastanza chiare, poco ancora si conosce degli aspetti cellulari e molecolari che sono alla base di questa riduzione, anche se, in questi ultimi anni, sono stati pubblicati numerosi lavori, soprattutto in campo umano e murino, su questi argomenti.

Da questi studi appare chiaro come i fenomeni di morte cellulare programmata siano alla base della follicologenesi e dell'oogenesi durante tutta la vita riproduttiva nei mammiferi e di come ne controllino, di conseguenza, la fertilità [60].

Numerosi studi hanno dimostrato che l'apoptosi interviene nell'invecchiamento ovarico ed in particolare in quello follicolare [115-118].

L'aumento del potenziale apoptotico degli ovociti invecchiati sembra essere dovuto a segnali pro-apoptotici provenienti dalle cellule del cumulo che circondano l'ovocita [118]. La comunicazione tra l'ovocita ed il comparto somatico si stabilisce molto presto, già quando le cellule follicolari circondano l'ovocita formando il follicolo primordiale [119-121].

Durante lo sviluppo follicolare, le cellule della granulosa comunicano tra di loro e con l'ovocita attraverso le gap-junctions per assicurare la crescita e la maturazione dell'ovocita stesso [40, 44, 122-124]. Diversi studi condotti nel topo hanno evidenziato il ruolo del compartimento somatico anche nella regolazione dell'atresia follicolare [118, 125]. Negli ovociti invecchiati, le cellule del cumulo hanno, infatti, la capacità di attivare i segnali di morte programmata, tramite specifici fattori, quali la ceramide, molecola chiave coinvolta nella senescenza cellulare [118, 125]. Si è, infatti, osservato che la ceramide passa dalle cellule del cumulo nell'ovocita, attraverso le gap-junctions, inducendone l'apoptosi. La massiccia presenza di fenomeni apoptotici osservata negli ovociti di individui invecchiati è concomitante, tra l'altro con un aumento della

sensibilità dell'ovocita alla ceramide citosolica e con un aumento dell'espressione dell'mRNA e delle proteine di Bax.

I fenomeni apoptotici si accompagnano ad alterazioni qualitative dei follicoli, probabilmente dovute ad un progressivo accumulo di danni a carico dei follicoli che rimangono quiescenti nell'ovaio per decenni, anche se alcuni autori hanno ipotizzato che la qualità del follicolo sia determinata già all'inizio della follicologenesi [126].

Dall'analisi di biopsie ovariche di donne sane con un'età media intorno ai 41 anni [126], sono state riscontrate alterazioni nella popolazione di follicoli primordiali caratterizzate da fenomeni di atresia accompagnati da cambiamenti morfologici ultrastrutturali sia a livello ovocitario che delle cellule della granulosa: in particolare negli ovociti quiescenti si sono rilevati un aumento della vacuolizzazione del citoplasma, una diminuzione della quantità di mitocondri e una dilatazione del reticolo endoplasmatico liscio e del complesso di Golgi, associati ad un minor numero di mitocondri, fenomeno riscontrato anche a carico delle cellule della granulosa. Questi specifici cambiamenti potrebbero essere sintomi di alterazioni metaboliche che comprometterebbero la produzione di ovociti competenti oppure indurrebbero l'atresia del follicolo in seguito alla sua attivazione [127].

Sebbene probabilmente la compromissione dell'ovocita avvenga soprattutto durante il lungo stadio di quiescenza nel follicolo primordiale, è comunque plausibile che danni sia nucleari sia citoplasmatici possano

avvenire anche durante le fasi di crescita e maturazione, sotto l'influenza del microambiente del follicolo di Graaf.

Questa ipotesi è supportata dal fatto che la regolazione della crescita follicolare dipende dalla disponibilità di un adeguato sostegno vascolare che assicuri l'apporto di sostanze nutrienti e segnali regolatori [128]; d'altra parte è stata osservata una riduzione del letto vascolare nello stroma ovarico di donne con più di 40 anni [129].

Studi compiuti su cellule della granulosa di follicoli preovulatori appartenenti a donne con più di 38 anni hanno infatti dimostrato che queste cellule sono in numero minore [132], producono meno steroidi [133] e glicoproteine [134], presentano una maggior incidenza di delezioni a livello del DNA mitocondriale [135] ed una minore espressione di enzimi antiossidanti [136] rispetto alle cellule raccolte da donne più giovani.

Alterazioni della microcircolazione perifollicolare

La microvascolarizzazione perifollicolare riveste un ruolo fondamentale durante la follicologenesi, soprattutto nei follicoli antrali, per sostenere una corretta crescita e maturazione dell'ovocita, indispensabile all'acquisizione della competenza al successivo sviluppo [75, 137].

A differenza, infatti, dei follicoli preantrali che ricevono l'apporto ematico dalla rete stromale, i follicoli antrali dipendono strettamente dallo sviluppo di capillari nella teca [138].

I processi angiogenetici, influenzano la maturazione del follicolo preovulatorio e la selezione del dominante [128, 139]. I follicoli dominanti, infatti, ricevono un maggior apporto di gonadotropine [128]; a tal proposito, diversi studi condotti nella donna hanno riportato una correlazione positiva tra il grado di vascolarizzazione perifollicolare e l'esito dei cicli di fecondazione in vitro [140-142]. Anche nel maiale, il processo di angiogenesi è cruciale per sostenere l'aumento delle richieste metaboliche durante la crescita del follicolo; la disponibilità di un adeguato apporto vascolare potrebbe avere un ruolo fondamentale nella selezione del follicolo dominante [143, 144]. Nel bovino la vascolarizzazione del follicolo preovulatorio è stata messa in relazione con l'instaurarsi della gravidanza [145], oltre che con il successo della fecondazione e dello sviluppo embrionale in vitro [146], confermando la connessione tra l'apporto ematico al follicolo e la qualità dell'ovocita in esso contenuto.

Poiché la qualità dell'ovocita dipende dalla tensione parziale di ossigeno che è in grado di ricevere dai capillari tecali attraverso le cellule della granulosa, il liquido follicolare e la zona pellucida, l'abilità di un follicolo di sviluppare un sufficiente apporto ematico diventa cruciale. Un'adeguata vascolarizzazione perifollicolare è inoltre indispensabile per l'apporto di fattori di crescita, nutrizionali e gonadotropine che, complessivamente, rivestono un ruolo fondamentale per l'acquisizione della competenza allo sviluppo embrionale del gamete femminile [147].

In questo contesto i fattori angiogenetici rivestono un ruolo molto importante. Studi condotti nella specie bovina e ovina [148-150] hanno, infatti, dimostrato che il Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) e l'ossido nitrico sintasi di tipo endoteliale (eNOS), espressi a livello follicolare, sono coinvolti nella regolazione della crescita follicolare e nella selezione del follicolo dominante, interagendo con l'estradiolo (E_2), gli Insulin Growth factors (IGF) e le Insulin Growth factor binding proteins (IGFBP) [151-154].

Nella donna la ridotta vascolarizzazione perifollicolare rappresenta uno dei fattori locali sicuramente coinvolti nella senescenza dell'ovocita [138, 155]. Infatti, alterazioni quali anomalie del fuso meiotico e dei cromosomi, osservate in ovociti maturi prelevati da ovaie di donne invecchiate, rispecchiano la situazione osservata in gameti raccolti in donne giovani, ma il cui follicolo di provenienza presentava una ridotta vascolarizzazione e una minore tensione parziale di ossigeno [155, 156].

D'altra parte, sempre nella donna, la diminuzione del flusso ematico nell'area perifollicolare [157] porta ad un aumento della concentrazione di VEGF nel liquido follicolare [158-160]. Questo è probabilmente il sintomo di una sovraespressione trascrizionale da parte delle cellule della granulosa e della teca stimulate dall'"hypoxia-inducible factor-1", per prevenire l'esaurimento dell'ossigeno e la morte cellulare [161, 162]. L'hypoxia-inducible factor-1 è, infatti, un fattore di trascrizione prodotto

dalle cellule della granulosa e della teca come risposta allo stimolo delle gonadotropine [163]; è attivato da basse concentrazioni di ossigeno [164] e gioca un ruolo centrale nella regolazione dei processi angiogenetici dell'ovaio [160] e nella crescita dei follicoli [165]. L'incapacità delle cellule della granulosa e della teca nel compensare l'ipossia anche in presenza di elevati livelli di VEGF potrebbe essere dovuta ad una minore sensibilità delle cellule endoteliali al fattore di crescita oppure ad un aumento della distanza tra il letto capillare perifollicolare e il follicolo stesso, come confermato da studi istologici condotti su sezioni di ovaio di donne in età avanzata [138].

Ruolo dello stress ossidativo nell'invecchiamento del follicolo

Lo stress ossidativo è considerato essere la causa principale dei danni cellulari caratteristici dell'invecchiamento [166].

Il metabolismo aerobico di tutti i sistemi cellulari è basato sulla riduzione di molecole di ossigeno che porta alla formazione di molecole con attività ossidante, definite "specie reattive dell'ossigeno" (ROS). Tra questi troviamo: l'anione superossido (O_2^-), il perossido di idrogeno (H_2O_2) ed il radicale idrossile (OH) [167, 168].

Nelle cellule le ROS sono quindi prodotte continuamente come conseguenza sia di reazioni biochimiche, come la catena respiratoria dei mitocondri, sia di fattori esterni [169].

I processi evolutivi hanno, infatti, dotato gli organismi aerobi di meccanismi specifici per smaltire, contrastare o annullare gli effetti negativi dell'ossigeno e dei suoi metaboliti reattivi. Questi meccanismi rivestono un ruolo di particolare importanza nel proteggere l'omeostasi cellulare dai danni ossidativi operati dai radicali liberi e dalle altre molecole ossidative generate durante la riduzione dell'ossigeno e sono stati identificati anche negli embrioni e nei fluidi follicolari e oviduttali. Gli antiossidanti per definizione sono sostanze che, presenti a basse concentrazioni rispetto al substrato ossidabile, sono in grado di ritardare o inibire l'ossidazione del substrato stesso [170, 171]. Questa definizione include composti di natura, sia enzimatica sia non enzimatica. Gli antiossidanti enzimatici sono rappresentati da rame-zinco superossido dismutasi (a livello citosolico), manganese superossido dismutasi (a livello mitocondriale), catalasi (nel fluido tubale) e glutathione perossidasi e reduttasi che riduce il perossido di idrogeno in acqua e alcool [172]. Gli antiossidanti non enzimatici comprendono le vitamine A, C, E, il piruvato e composti a base di zolfo, come il glutathione, l'ipotaaurina e la cisteamina [173].

Quando la generazione di ROS e di altre specie radicali non è più in equilibrio con l'azione contrastante delle molecole antiossidanti si verificano situazioni di stress ossidativo.

Lo stress ossidativo causa perossidazione dei lipidi, alterazioni strutturali e funzionali del DNA e delle proteine, promuove l'apoptosi e aumenta il

rischio di patologie croniche quali il cancro o malattie cardiache, in quanto ha effetti su pathway di trasmissione dei segnali e sull'espressione genica [174].

Le ROS giocano un ruolo fondamentale nella modulazione dell'intero spettro delle funzionalità riproduttive fisiologiche e, in particolare, sono direttamente coinvolte nella maturazione dell'ovocita [175], nella steroidogenesi, nell'attività del corpo luteo e, di conseguenza, nei processi di fecondazione, sviluppo embrionale e mantenimento della gravidanza [169, 172, 176, 177].

Studi clinici, in vitro e su modelli animali hanno mostrato come lo stress ossidativo sia coinvolto nei fenomeni legati all'invecchiamento sia nella donna sia nell'uomo [166, 178-185].

Il declino delle attività respiratorie cellulari, associato all'età, determina un aumento da parte dei mitocondri della produzione di ROS che a loro volta colpiscono, oltre a proteine e lipidi mitocondriali, anche il DNA mitocondriale (mtDNA) [186, 187], il quale risulta essere particolarmente sensibile a causa della sua localizzazione in prossimità della membrana mitocondriale interna, proprio dove sono formati i ROS, e della mancanza dell'effetto protettivo degli istoni e dei meccanismi di riparazione del DNA [188]. L'accumulo di danni causati da stress ossidativo determina mutazioni o perdita di mtDNA, sintesi di proteine anomale e alterazioni

nella composizione lipidica delle membrane. Tutti questi effetti potrebbero inibire la replicazione mitocondriale, ridurre l'efficienza della catena di trasporto degli elettroni, aumentare la probabilità di formazione di ROS, disattivare enzimi chiave del metabolismo e aumentare la permeabilità di membrana causando una riduzione dei mitocondri integri dal punto di vista funzionale e quindi della concentrazione di ATP [188-193].

Numerosi studi condotti nella donna hanno dimostrato che danni dovuti all'aumento dei livelli di ROS sono direttamente coinvolti nell'invecchiamento ovarico [189, 198]. Infatti, i follicoli primordiali nella donna rimangono quiescenti per lungo tempo e, durante questo periodo, l'accumulo di stress ossidativo generato dall'ovocita e/o dalle cellule somatiche che lo circondano compromette la vitalità e la competenza dell'ovocita e conseguentemente dell'embrione, determinando una diminuzione delle percentuali di gravidanza [80, 199].

La somministrazione di antiossidanti per via orale in topi invecchiati è effettivamente in grado di contrastare gli effetti negativi dell'invecchiamento sulla qualità degli ovociti [200], mentre gli stessi trattamenti danneggiano la fertilità di topi giovani [201]. Inoltre, sempre nel modello murino, si è osservato che ovociti giovani ma sottoposti a stress ossidativo presentano anomalie del citoscheletro che derivano da una minore produzione di ATP, come avviene durante l'invecchiamento [202].

Ricerche condotte su modelli animali e sulla donna hanno evidenziato, infatti, che l'età determina un indebolimento delle difese antiossidanti e quindi una situazione di stress ossidativo che danneggia sia i follicoli primordiali sia i preovulatori [89]. Nelle donne in età avanzata, in particolare, nel pool di follicoli primordiali si sono riscontrati danni alla struttura dell'ovocita e delle cellule della granulosa derivati da stress ossidativo [126]. Anche nell'ambiente dei follicoli periovulatori, si sono notate alterazioni legate all'età nel pattern di enzimi antiossidanti normalmente presenti nel liquido follicolare della donna, quali superossido dismutasi (SOD), catalasi (CAT) e glutatione perossidasi (GSSPx) [203]; queste modificazioni potrebbero quindi compromettere l'efficacia del follicolo di eliminare le ROS. Sempre nella donna, l'indebolimento delle difese antiossidanti avviene anche a livello delle cellule della granulosa nelle quali l'invecchiamento è associato ad una sottoespressione dei geni di Cu/ZnSOD, MnSOD e CAT e ad un accumulo di danni ossidativi in particolare a carico dei mitocondri [136].

Come per gli altri sistemi biologici, l'invecchiamento a livelli ovarico sembra quindi essere associato sia ad un abbassamento delle difese enzimatiche antiossidanti sia ad un aumento della produzione di ROS da parte di svariati sistemi enzimatici, tra cui un ruolo cruciale è ricoperto dall'apoptosi delle cellule della granulosa [204].

Un importante fattore coinvolto nella produzione dei ROS intracellulari è la tensione di ossigeno nell'ambiente extracellulare. Condizioni sia di ipossia

che di iperossia determinano, infatti, stress ossidativo e l'ipossia potrebbe anche essere la causa diretta della produzione di ROS [162]. Così come già riportato, un fattore decisivo nello stress ossidativo associato all'invecchiamento del gamete potrebbe essere dovuto ad un insufficiente sviluppo di capillari nella teca del follicolo maturo. Poiché l'ovocita nelle fasi terminali della crescita va incontro ad un aumento del metabolismo mediato dall'ossigeno [205], è plausibile che un ridotto apporto di questa molecola causi stress ossidativo [89]. Questa ipotesi è ulteriormente supportata dall'osservazione che i mitocondri delle cellule della granulosa di donne di età avanzata mostrano danni strutturali simili a quelli osservati in altre cellule esposte ad ipossia [136, 206].

Il glutatione

Il glutatione (GSH) è un agente riducente che protegge le cellule dalle ossidazioni da parte delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) e partecipa a numerosi eventi del metabolismo cellulare [207].

È un tripeptide formato da cisteina, glutammato e glicina; negli organismi viventi è sintetizzato principalmente dal fegato e viene rilasciato nel sangue e nella bile in forma ridotta (GSH) e ossidata (GSSG).

La sua azione protettiva contro i danni cellulari è coadiuvata dall'interazione con vari enzimi, come la glutatione perossidasi e la glutatione reduttasi [208].

Le glutatione perossidasi (GPX) sono la più grande famiglia di selenio proteine; esse catalizzano l'inattivazione delle specie attive dell'ossigeno dando origine a composti innocui quali il GSSG e acqua a partire da H_2O_2 e perossidi organici. Il GSH viene poi rigenerato mediante la riduzione del GSSG da parte del NADPH grazie all'azione dell'enzima glutatione reduttasi (Figura 6).

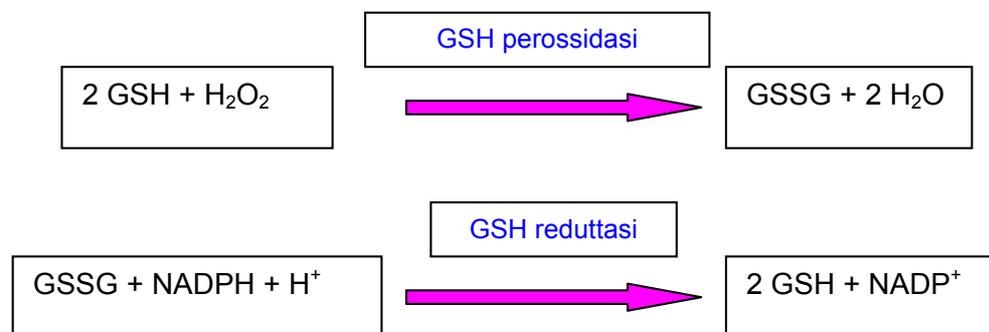


Figura 6: reazioni di ossido-riduzione in cui è coinvolto il GSH.

Una serie di studi ha dimostrato il coinvolgimento del GSH in disfunzioni associate all'invecchiamento [209]. Infatti, con il progredire dell'età, si osserva un graduale abbassamento dei livelli cellulari di GSH ed in generale dei sistemi antiossidanti [210-212], probabilmente in seguito ad una diminuzione dell'attività delle g-glutamilmisteina ligasi e glutatione sintetasi [213], della g-cistationasi [214] e della glutatione reduttasi [215, 216].

Il GSH riveste un ruolo molto importante sia durante la maturazione dell'ovocita, in quanto preserva e mantiene integra la struttura del fuso meiotico [217], sia durante la fecondazione, essendo coinvolto nella formazione del pronucleo maschile; è infatti in grado di fornire il potere riducente necessario per iniziare la decondensazione della cromatina prima della formazione del pronucleo maschile [218].

La concentrazione di GSH nell'ovocita aumenta durante la maturazione in vitro (IVM) [219-223]. La protezione dell'embrione dai ROS e, di conseguenza, la sua capacità di proseguire nello sviluppo embrionale deriva quindi probabilmente dalla quantità e qualità degli enzimi antiossidanti che vengono immagazzinati nell'ovocita durante le ultime fasi di maturazione [173].

Nelle pratiche di riproduzione assistita la sintesi di GSH da parte dell'ovocita riveste particolare importanza ai fini di una corretta maturazione citoplasmatica e del successivo sviluppo embrionale [219, 220, 224, 225]. I gameti femminili, infatti, quando vengono prelevati dall'ovaio e sottoposti a tecniche di coltura in vitro, si trovano esposti ad un livello di ossigeno superiore a quello intracorporeo e quindi possono andare incontro a problemi di stress ossidativo. La concentrazione di GSH in ovociti maturati in vivo è, tra l'altro, molto più alta di quella degli ovociti maturati in vitro [226].

La biosintesi del GSH dipende dalla disponibilità di L-cisteina nel medium, ma questo aminoacido tende ad ossidarsi con facilità trasformandosi in

cistina. L'utilizzo di altri composti tiolici quali la cisteamina, mantiene la cisteina nel suo stato ridotto promuovendo la sua disponibilità cellulare ed aumentando la sintesi di GSH all'interno dell'ovocita [227-229]. Numerosi lavori hanno infatti dimostrato che l'aggiunta di composti tiolici quali la cisteamina al medium di maturazione determina un aumento del contenuto del GSH e, di conseguenza, un miglioramento dello sviluppo e della qualità dell'embrione in diverse specie [219, 220, 223, 225, 230-236].

Il sistema ossido nitrico/ossido nitrico sintasi

Nel contesto dello stress ossidativo, l'ossido nitrico (NO) rappresenta una delle molecole più interessanti in quanto ha sia funzioni antiossidanti [172, 237] sia angiogenetiche e partecipa alla regolazione del flusso ematico [172, 238, 239].

L'ossido nitrico (NO) è un composto inorganico a vita breve, presente nell'organismo in forma gassosa e che, data la sua alta solubilità, può diffondere facilmente attraverso le membrane [240].

L'azione del NO è conseguente al suo legame con enzimi che contengono un gruppo eme. Questo legame innesca diverse vie di trasduzione che determinano i numerosi meccanismi d'azione della molecola [241]. Una via attraverso cui il NO agisce è l'inibizione diretta del citocromo P450 aromatasi coinvolto nella steroidogenesi [242]. La produzione ridotta di steroidi a causa del NO è stata osservata in molti animali tra cui il ratto [243]; l'uomo [244, 245]; il maiale [246-248] e il bovino [249, 250].

Un altro meccanismo d'azione molto importante è l'attivazione della guanilato ciclasasi solubile. Il legame del NO sul gruppo ferro-eme di questa molecola induce la produzione di guanosin-monofosfato ciclico (cGMP) che agisce sui vasi come secondo messaggero [251]. Il NO in particolare induce vasodilatazione, inibizione dell'aggregazione piastrinica e inibizione dell'adesione dei neutrofili alle cellule endoteliali. Inoltre riduce la proliferazione delle cellule muscolari lisce e la loro migrazione, sostiene le funzioni della barriera creata dalle cellule endoteliali [244] e mantiene l'omeostasi [252].

Il NO viene sintetizzato a partire dalla L-arginina che è convertita in L-citrullina e NO tramite gli enzimi ossido nitrico sintasi (NOS) in presenza di NADPH e ossigeno [253].

Esistono tre isoforme di NOS classificate sulla base delle proprietà funzionali e del tessuto di origine [253-255]; due isoforme sono costitutive, il NOS endoteliale (eNOS) e quello neuronale (nNOS), mentre la terza è una forma inducibile (iNOS) [256]. Questi enzimi sono largamente diffusi in diverse cellule e tessuti, inoltre una cellula può esprimere più di un'isoforma [257, 258].

Le NOS sono delle eme-proteine con caratteristiche molto simili al citocromo-P450 [259-262], hanno un'omologia di sequenza del 50-60% [263, 264] ed hanno in comune una struttura con due domini funzionali, un dominio con attività riducente alla porzione C-terminale ed un dominio ossidante alla porzione N-terminale [256].

La prima isoforma di NOS ad essere stata purificata [265, 266] e clonata [260] è stata quella neuronale. Nel genoma umano il gene codificante l'nNOS è presente in singola copia, consiste di 29 esoni e 28 introni, copre una regione di 200 kb ed è in grado di codificare una proteina di 1434 aa [267]. Nel topo e nell'uomo l'nNOS è localizzato sia a livello del sistema nervoso, centrale e periferico [268] che in diversi altri tessuti compreso il muscolo scheletrico [269].

L'eNOS è una forma costitutiva e calcio-calmodulina dipendente con una modalità d'azione simile all'nNOS [256]. Il gene che codifica l'eNOS è altamente conservato in tutte le specie [270] e consta di 26 esoni e 25 introni codificanti una proteina di 1203 aa [271, 272]. È principalmente espressa nelle cellule endoteliali vascolari, tuttavia si è scoperta anche in molti altri organi e tessuti tra cui il corpo luteo e l'ovaio.

La terza isoforma di NOS viene prodotta in seguito a stimolazione da parte di citochine e altre molecole infiammatorie [273]. Il gene codificante l'iNOS consiste di 26 esoni e 25 introni in grado di codificare una proteina di 1153 aa [274]. L'isoforma inducibile ha un peso molecolare di circa 130 kDa ed è calcio-calmodulina indipendente.

Diversi studi hanno dimostrato che il NO è implicato nei meccanismi che regolano i processi riproduttivi [244, 256]. È stato dimostrato, mediante tecniche di immunistochemica e Western blot, che eNOS e iNOS sono presenti nelle ovaie di ratto e che i loro livelli sono regolati dalle gonadotropine [275]. Anche nel topo sono state localizzate queste due

isoforme, oltre che nell'endotelio vasale, all'interno di ovociti, cellule della granulosa e della teca di follicoli a diversi stadi di sviluppo [276]. Nelle ovaie di maiale sono state trovate tutte le isoforme, con espressione e localizzazione diverse secondo lo stadio di sviluppo del follicolo. In generale però la loro concentrazione è inferiore nei primi stadi di sviluppo follicolare [277]. Recentemente eNOS e iNOS sono stati localizzati anche nell'ovaio di bovino, in particolare nell'ooplasma durante tutta la follicologenesi, nelle cellule della granulosa e della teca, oltre che nel corpo luteo e nell'epitelio germinativo [278].

La presenza di eNOS nei diversi distretti dell'ovaio, nell'ovocita e nell'endotelio vasale, regolata dalle gonadotropine, oltre all'ipotesi del suo coinvolgimento nella maturazione e nell'attivazione dell'ovocita [279-282], conferma il ruolo del NO nella funzionalità della gonade femminile.

Il NO sembra essere coinvolto quindi nel processo di maturazione dell'ovocita, in quanto topi privi del gene per eNOS generano ovociti che non sono in grado di raggiungere la maturazione nucleare o mostrano configurazioni cromosomiche anormali [288].

Aumentando o diminuendo la quantità di NO presente nel medium di maturazione mediante l'utilizzo di molecole donatrici di NO (sodio nitroprusside, SNP) o inibitori del NOS (N-nitro-L-arginina metilestere, L-NAME), alcuni autori hanno dimostrato che il NO interviene nella maturazione degli ovociti di topo. Sengoku e colleghi [280] hanno osservato che, nel topo, l'aggiunta di basse dosi di SNP stimola la

maturazione meiotica aumentando il numero di ovociti che raggiungono lo stadio di metafase della seconda divisione meiotica (MII) e che l'inibizione dell'eNOS, al contrario, riduce il numero di ovociti maturi. Risultati analoghi sono stati ottenuti anche da Bu [289], sempre nel topo, e da Tao [290] nel maiale.

Un'altra molecola donatrice di NO, l'S-nitroso-N-acetil-penicillamina (SNAP), è stata utilizzata durante l'IVM nel maiale, determinando un aumento della competenza meiotica [282, 291]. Al contrario, alte concentrazioni di SNAP hanno influenzato negativamente la meiosi in ovociti di bovino [292]. È, infatti, stato provato che il NO svolge un ampio spettro di effetti intracellulari [293]; per questo l'effetto sulla maturazione dell'ovocita può essere sia stimolante sia inibitore secondo la concentrazione [289, 294, 295]. Queste osservazioni consentono di affermare che il NO previene l'invecchiamento dell'ovocita funzionando anche da antiossidante, vista la sua capacità di interagire con le specie reattive dell'ossigeno e altri radicali.

Invecchiamento a livello ovocitario

L'invecchiamento dell'ovocita è caratterizzato da una sequenza di processi cellulari e molecolari che inficiano la successiva fecondazione e lo sviluppo embrionale. Dal punto di vista morfologico si sono osservate alterazioni strutturali dei microvilli della membrana plasmatica, l'indurimento della zona pellucida, l'aumento delle dimensioni dello spazio

perivitellino, la parziale esocitosi dei granuli corticali, alterazioni a carico del citoscheletro e della struttura del fuso meiotico con conseguente prematura e ineguale separazione dei cromosomi. Infine, sono state messe in evidenza la diminuzione del potenziale di membrana dei mitocondri e la degenerazione del globulo polare [296].

Le anomalie nella segregazione dei cromosomi rappresentano l'effetto evidente di un meccanismo cellulare fortemente compromesso. Le ricerche condotte negli ultimi anni hanno evidenziato che gli ovociti cresciuti e maturati in un organismo in età avanzata hanno ridotte potenzialità di raggiungere un livello di maturazione nucleare e citoplasmatica sufficiente a sostenere lo sviluppo dell'embrione. Lo stato compromesso dell'ovocita è sottolineato da alterazioni dei pattern di espressione genica e, di conseguenza, da una compromissione dell'accumulo di RNA materno necessario per il successivo sviluppo dell'embrione prima dell'attivazione del suo stesso genoma [297, 298]. I geni espressi in modo differente sono soprattutto quelli coinvolti con la funzionalità mitocondriale e lo stress ossidativo; tuttavia sono strettamente interessati anche quelli che intervengono nella regolazione del ciclo cellulare, nell'organizzazione del citoscheletro, nel controllo di pathways energetici e della trascrizione [89].

Alterazioni mitocondriali

I mitocondri sono sensibilmente coinvolti nel processo riproduttivo in quanto il loro stato funzionale influenza la qualità dell'ovocita e contribuisce ai processi di fecondazione e di sviluppo embrionale [299]. L'analisi dei trascritti degli ovociti maturi raccolti da organismi invecchiati ha rivelato significativi cambiamenti dell'espressione di geni coinvolti nella funzionalità mitocondriale [297, 298]. In particolare, geni codificati nel genoma mitocondriale e coinvolti nella catena di trasporto degli elettroni sembrano essere maggiormente espressi negli ovociti invecchiati, mentre quelli codificati nel genoma nucleare e importanti per i pathways energetici e per la funzionalità mitocondriale sono meno espressi. Queste considerazioni concordano con l'osservazione che gli ovociti invecchiati contengono meno ATP [300] e hanno mitocondri con difetti morfologici, genetici e funzionali, tra cui un minor potenziale elettrico a livello della membrana interna ($\Delta\psi$) [301] e più alti livelli di mutazioni puntiformi e di riarrangiamenti del DNA [296, 302-304].

Sebbene non sia stato ancora del tutto chiarito il ruolo dei mitocondri nell'invecchiamento dell'ovocita, alcune affascinanti evidenze supportano il coinvolgimento di questi organuli nelle alterazioni che si osservano nell'ooplasma di gameti femminili provenienti da soggetti invecchiati. Anomalie nella localizzazione dei mitocondri sono state per esempio associate a diverse anomalie cellulari e morfologiche dell'ovocita, tra cui lo

“scattering” e la decondensazione dei cromosomi e la frammentazione cellulare [305]. Inoltre ovociti giovani in cui sono stati indotti danni mitocondriali hanno mostrato effetti simili a quelli riscontrati negli ovociti invecchiati, quali un’inibizione della rottura della vescicola germinale (GV), della formazione del fuso meiotico, della segregazione dei cromosomi e dell’estrusione del globulo polare [306].

Aneuploidia

In questo contesto, l’aumento dei fenomeni di aneuploidia dovuti all’età rappresenta il fenomeno più peculiare dell’invecchiamento del gamete femminile e costituisce la causa più importante della sua drastica riduzione della competenza allo sviluppo embrionale [307, 308].

I numerosi fenomeni di aneuploidia legati all’età derivano da anomalie che si verificano durante la prima divisione meiotica ed in particolare ai processi di formazione e accumulo delle molecole coinvolte nel controllo del ciclo cellulare durante la transizione dalla metafase I all’anafase I. La separazione dei cromatidi fratelli o dei cromosomi omologhi durante l’anafase è un evento chiave della meiosi ed errori che si verificano in questa fase possono facilmente determinare l’insorgenza di aneuploidie [309]. Per evitare questo genere di errori, si sono evoluti dei meccanismi di sorveglianza (il cosiddetto *spindle checkpoint*) per controllare il legame dei cromatidi fratelli o dei cromosomi omologhi ai microtubuli. Questo meccanismo è in grado di trovare anche un singolo cromosoma non

allineato e arrestare il ciclo cellulare alla metafase della prima divisione meiotica (MI) per permettere ai cromosomi di spostarsi nella corretta disposizione all'equatore del fuso prima della separazione [309]. Tra le proteine coinvolte nello spindle checkpoint riveste un ruolo importante il "mitotic arrest deficiency 2" (MAD2), la cui down-regolazione è stata correlata con una minor durata della prima meiosi, alcune anomalie dell'apparato meiotico e un aumento dell'aneuploidia negli ovociti [202, 310]. Oltre a questo meccanismo di controllo, un altro sistema per prevenire le aneuploidie è dato dall'azione delle proteine di coesione, tra cui la "structural maintenance of chromosome beta1 (SMCbeta1) che mantiene la connessione fra i cromatidi fratelli e facilita una segregazione ordinata dei cromosomi sia nella prima sia nella seconda divisione meiotica [311]. Il ruolo di queste proteine nelle aneuploidie dovute all'invecchiamento è sostenuto dalla scoperta che ovociti sia umani sia murini invecchiati hanno minori quantità di trascritti di MAD2 e di SMCbeta1 [131, 312]. Questa situazione implica che gli ovociti invecchiati siano più inclini ad una precoce segregazione dei cromosomi durante la ripresa della meiosi, ad un'accelerazione della transizione verso l'anafase I e verso la metafase II e ad una serie di anomalie nella coordinazione degli eventi nucleari e citoplasmatici della meiosi [131, 303].

MARKER LOCALI DELL'INVECCHIAMENTO OVARICO

La diminuzione delle dimensioni della coorte di follicoli antrali determina importanti cambiamenti endocrinologici sull'ovaio stesso e sul sistema ipotalamo-ipofisi (Figura 7). Queste variazioni rappresentano marker importanti per valutare in modo diretto o indiretto la riserva ovarica e la sua funzionalità.

Dagli studi condotti nella specie umana [313], si evidenzia che l'ormone anti-mulleriano (AMH), le inibine e l'FSH sono i marker più accreditati, tuttavia non si può escludere che anche gli ormoni sessuali estradiolo e progesterone subiscano oscillazioni dovute al calo della fertilità che accompagna fisiologicamente l'invecchiamento ovarico.

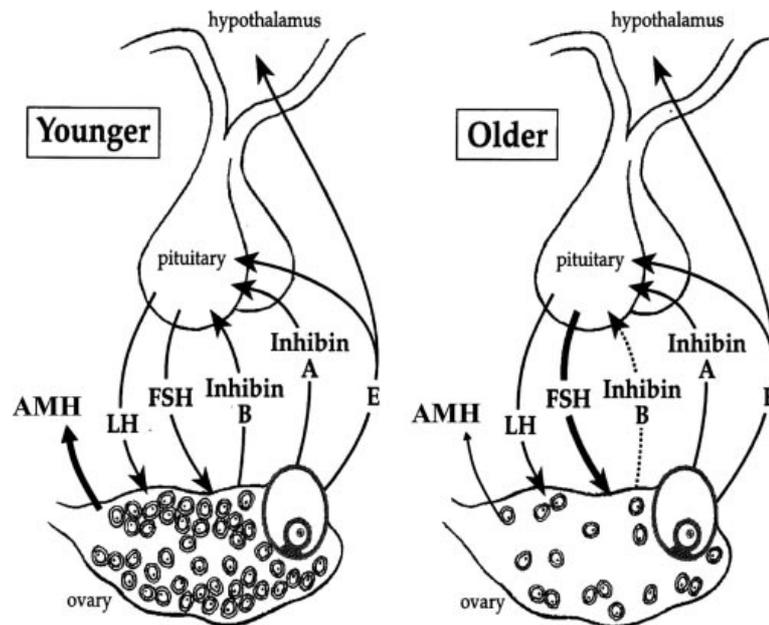


Figura 7: illustrazione schematica dei cambiamenti della riserva follicolare con l'invecchiamento e del loro effetto su vari fattori endocrinologici dell'ovaio stesso e del sistema ipotalamo-ipofisi; da [80].

L'AMH è una glicoproteina dimerica di 140 kDa sintetizzata solamente nelle gonadi. È stata originariamente identificata per il suo ruolo nel differenziamento sessuale del maschio durante lo sviluppo embrionale [314], ma studi successivi hanno dimostrato che l'AMH svolge un ruolo inibitorio sullo sviluppo e la funzionalità degli organi sessuali in entrambi i sessi [315, 316]. Studi condotti in diverse specie hanno dimostrato che le cellule della granulosa sono deputate alla produzione dell'AMH (donna [317, 318]; bovino [319-321]; pecora [322]; ratto [323-325]; topo [326, 327]; gallina [328]).

L'espressione dell'AMH è elevata nelle cellule della granulosa dei follicoli preantrali e antrali precoci e diminuisce col progredire della crescita follicolare [329]; basse concentrazioni di AMH sono, infatti, state trovate nei follicoli antrali preovulatori nella donna [330-332] come nella bovina [319].

L'azione dell'AMH è prevalentemente autocrina e paracrina sullo sviluppo follicolare, ma quantità misurabili si trovano anche nel siero [333]. La fonte principale dell'AMH sierico è probabilmente rappresentata dai follicoli antrali poiché hanno un maggior numero di cellule della granulosa e sono maggiormente irrorati rispetto ai follicoli pre-antrali.

Con la diminuzione dei follicoli antrali dovuta all'invecchiamento, la concentrazione ematica di AMH si abbassa [334-336] e tende a diventare impercettibile con la menopausa [337]. Recenti studi hanno, infatti, suggerito che l'AMH sierico possa essere un indice della riserva ovarica [338] e al momento rappresenta il migliore indicatore predittivo della riserva follicolare nella donna [339]; simili osservazioni sono state compiute di recente anche nel topo [333] e nel bovino [340].

Le inibine sono ormoni proteici eterodimerici che appartengono alla superfamiglia dei "transforming growth factor beta" (TGF- β).

Sia l'inibina A sia la B sopprimono direttamente la secrezione di FSH ipofisario [341, 342]. Mentre l'inibina A è prodotta dal follicolo maturo e dal corpo luteo [343, 344], l'inibina B è prodotta dai follicoli antrali più piccoli e

per questo è un indice realistico della grandezza della popolazione follicolare. È più alta nelle fasi precoci della fase follicolare, diminuisce con l'avvicinarsi dell'ovulazione ed è molto bassa nella fase luteale [343]. Alcuni studi hanno evidenziato come donne più anziane con un normale ciclo mestruale presentino una concentrazione normale di inibina B nel follicolo dominante [345], ma più bassa nel plasma [102, 345, 346].

Estradiolo e Progesterone

Nelle donne anziane si è osservato un impressionante aumento dei livelli sierici di FSH [347-350], causato da un ridotto feedback negativo dell'inibina B e dell'estradiolo in seguito alla diminuzione del pool follicolare FSH-sensibile [102]. Livelli di FSH così elevati sono sintomi inconfutabili di invecchiamento riproduttivo e situazioni simili sono state riscontrate anche in bovine di 13-14 anni [110].

Una diretta relazione fra il comportamento di estradiolo e progesterone e il calo della fertilità dovuto all'invecchiamento è, quindi, biologicamente plausibile, tuttavia, nella donna, i dati presenti in letteratura sono piuttosto contraddittori. Alcuni lavori, infatti, indicano una diminuzione sierica di questi ormoni nelle donne anziane [337, 349, 351-353], mentre altri descrivono un innalzamento delle concentrazioni [345, 354-356] ed altri ancora nessuna differenza rispetto a quanto si osserva nelle donne in età fertile [347, 356, 357].

Sebbene in letteratura siano stati condotti fino a questo momento pochi studi sulla specie bovina, Malhi e coll. hanno osservato un aumento dell'estradiolo e una diminuzione del progesterone in circolo nelle vacche anziane [110]. Sempre in questa specie, sono stati condotti numerosi studi volti a misurare le concentrazioni di estradiolo e progesterone nei fluidi follicolari mettendoli in relazione ai livelli di atresia determinata in seguito ad una valutazione morfologica [62, 358-363]. Da questi lavori è emerso che la diminuzione dell'estradiolo e, in alcuni casi, l'aumento del progesterone sembrano essere marker attendibili del processo di atresia follicolare.

INVECCHIAMENTO RIPRODUTTIVO PRECOCE NELLA DONNA (PREMATURA INSUFFICIENZA OVARICA)

Negli ultimi anni la riproduzione assistita ha contribuito a comprendere i processi alla base dell'invecchiamento riproduttivo nella specie umana. È ormai assodato che il deterioramento della funzionalità ovarica è un processo continuo e graduale, di cui il primo segno è la bassa risposta all'iperstimolazione ovarica e l'ultimo è la menopausa. Del tutto recentemente è stato osservato che l'1-2% delle donne sotto i 40 anni e lo 0.1% delle donne sotto i 30 è affetto da un invecchiamento riproduttivo precoce [364], caratterizzato dall'assenza della normale funzionalità riproduttiva in seguito ad una prematura deplezione del pool dei follicoli

primordiali. I segni riconoscibili di questa situazione sono l'amenorrea, l'ipoestrogenismo ed elevati livelli di gonadotropine.

Le donne colpite dall'invecchiamento precoce presentano sintomi simili a quelli riscontrabili durante la menopausa fisiologica [365], associati ad una perdita di fertilità dovuta principalmente all'assenza di follicoli o, in altri casi, all'incapacità della popolazione follicolare di rispondere alla stimolazione ormonale [366]. Il potenziale riproduttivo risulta essere quello di una donna più anziana, associato ad una maggiore incidenza di gemelli dizigoti [367-370], di aneuploidia [371-373] e di aborti [374].

L'invecchiamento riproduttivo precoce sembra essere collegato ad un invecchiamento prematuro generale [375]; pazienti con sindrome di Werner, atassia teleangectasica, progeria di Hutchison-Gilford e sindrome di Down generalmente sono sterili o vanno incontro ad una menopausa precoce [376-379]. Altri studi hanno mostrato un'associazione tra la menopausa precoce e una minore aspettativa di vita [380-382].

Le cause sono molte e di varia natura, incluse malattie autoimmuni, condizioni iatrogeniche, infezioni e difetti genetici. Spesso l'invecchiamento precoce è associato a mutazioni dei geni presenti sul cromosoma X o sui cromosomi autosomici [365, 383-385].

Nei casi di invecchiamento precoce le gonadi presentano dimensioni ridotte, superficie raggrinzita e aspetto cerebroide, tutte caratteristiche dell'ovaio nella menopausa [386]. L'esame microscopico di ovaie raccolte da donne soggette ad invecchiamento precoce, confermato da studi di

ultrastruttura, ha mostrato un'alta concentrazione di fibre collagene e di fibroblasti, disposti in modo eterogeneo, con zone più o meno prive di cellule [387]. Nell'80% dei casi non sono stati osservati follicoli, mentre in tutti i campioni era presente un corpus albicans. La morfologia di questo tipo di ovaie appare quindi simile a quella di ovaie in menopausa fisiologica [387].

IPOFERTILITA' PRECOCE NELLA BOVINA DA LATTE

L'attuale popolazione delle bovine da latte ad alta produzione è ipofertile [388]; molti animali vengono, infatti, riformati dopo poche lattazioni, in piena età fertile, a causa di un precoce calo delle performance riproduttive che si traduce in bassi tassi di gravidanza e alta percentuale di mortalità embrionale.

Dalla letteratura emerge una situazione caratterizzata da un calo della fertilità, contemporaneamente ad un significativo miglioramento genetico finalizzato alla produzione di latte [389, 390]. Questa situazione di ipofertilità dipende da fattori sanitari, fisiologici e manageriali che derivano da alterazioni di diversi processi fisiologici, tra cui la gluconeogenesi, la ripartizione dei nutrienti, la resistenza all'insulina e lo stimolo dell'appetito [391]. Presumibilmente questi cambiamenti avvengono in quanto offrono dei vantaggi per quanto riguarda la produzione latte, ma si rivelano deleteri per le performance riproduttive [392]. Oltre all'aumento della

produzione di latte per animale, sembrano essere comunque coinvolti altri fattori di tipo manageriale, tra i quali l'aumento delle dimensioni degli allevamenti, la nutrizione inadeguata, la scorretta gestione delle dinamiche riproduttive, l'aumento dell'incidenza di patologie e, in generale, lo scarso interesse per il benessere dell'animale [393, 394].

I fattori coinvolti sono quindi molteplici e agiscono sia direttamente sia indirettamente sull'apparato genitale femminile, in particolare sulla gonade, e, di conseguenza, sulla qualità dell'ovocita [388, 395]. Il buono stato dell'ambiente ovarico è, infatti, una condizione essenziale perché l'ovocita cresca e maturi correttamente, in modo da acquisire la competenza al successivo sviluppo embrionale [396, 397].

Ad oggi, non sono ancora però stati condotti studi dettagliati volti a valutare i meccanismi cellulari e molecolari alla base di questa ridotta fertilità.

MORFOLOGIA DELL'OVAIO E COMPETENZA ALLO SVILUPPO DELL'OVOCITA

Alla nascita, il "pool" di follicoli e ovociti sani presenti nelle gonadi femminili della donna [398-400] e del bovino [71] (riserva ovarica) è altamente variabile e diminuisce con l'avanzare dell'età. Questo calo non è solo quantitativo, ma anche qualitativo, in quanto la progressiva diminuzione numerica dei follicoli si accompagna al decremento della

qualità dei gameti femminili. Tutto questo, quindi, comporta che, negli individui adulti, la riserva ovarica sia altamente variabile durante la vita riproduttiva [71, 398-400].

Molti studi suggeriscono che un elevato numero di follicoli sia positivamente associato ad una buona funzionalità ovarica e ad ottimali livelli di fertilità, sia nella donna [401-406] che nella bovina [71, 108, 407-410].

Ne consegue che il basso numero di follicoli non solo è indice di ridotta funzionalità ovarica, di bassa competenza allo sviluppo del gamete femminile e di livelli di fertilità subottimali, ma anche dell'inadeguata efficienza riproduttiva delle specie mono-ovulanti.

La modalità secondo cui l'alto numero di follicoli [71, 398] incide positivamente sulla funzionalità ovarica, sulla qualità dell'ovocita e, più in generale, sulla fertilità non è del tutto nota, soprattutto perché non sono stati ancora messi a punto adeguati modelli animali [411].

In accordo con quanto riportato in precedenza, anche in nostri recenti studi abbiamo accertato una stretta relazione fra competenza allo sviluppo del gamete femminile e morfologia dell'ovaio.

Partendo da una serie di osservazioni di carattere anatomico, condotte in sede di macellazione sulle ovaie di bovine da latte, abbiamo classificato questi organi in tre categorie ben distinte, caratterizzate dalla presenza di un solo follicolo di diametro > 10 mm; di più di 10 follicoli di diametro

compreso fra 2 e 5 mm e nessun follicolo con diametro > 10 mm ed infine meno di 10 follicoli di diametro di 2-5 mm e nessun follicolo con diametro > 10 mm.

Questa classificazione ci ha consentito di verificare che la qualità degli ovociti provenienti dalla categoria di ovaie con meno follicoli è significativamente inferiore a quella degli ovociti raccolti dalle altre due categorie [412].

La popolazione ovarica è soggetta a numerose e complesse dinamiche mediate da fattori intraovarici e sistemici. Sebbene non siano del tutto noti i meccanismi e le molecole direttamente coinvolte in queste dinamiche, è opinione comune che la presenza di un follicolo dominante possa modulare lo sviluppo dell'intera popolazione follicolare come pure la crescita e la maturazione degli ovociti [56, 57].

Partendo da questi presupposti, in un successivo lavoro [413] abbiamo focalizzato l'attenzione solo sul numero di follicoli antrali medi (2-6 mm di diametro), dimostrando così che ovaie che presentano un numero di follicoli antrali medi inferiore a 10 generano ovociti caratterizzati da una bassa competenza allo sviluppo embrionale, **ovaie Lo** (Low developmental competence), mentre gli ovociti isolati da ovaie con un numero di follicoli antrali medi superiore a 10 presentano un'alta competenza al successivo sviluppo embrionale **ovaie Hi** (High developmental competence), confermando quindi i dati ottenuti in precedenza.

SCOPO DEL LAVORO

A partire da quanto descritto, lo scopo di questo lavoro è stato quello di verificare se nella popolazione di bovine da latte ad alta produzione il frequente e prematuro declino della fertilità che si osserva in età riproduttiva potesse essere ascrivibile ad un precoce invecchiamento ovarico. A tal fine, abbiamo condotto una serie di studi volti ad analizzare il quadro morfologico e funzionale della gonade e del gamete femminile, anche attraverso la valutazione di parametri endocrinologici riconosciuti come marcatori di un precoce declino riproduttivo, a partire dal quadro d'apparente diminuzione della riserva ovarica (ovaie Hi e Lo).

Questo studio ci consentirà di definire una relazione tra ipofunzionalità riproduttiva e invecchiamento prematuro nella bovina da latte e ci permetterà di contribuire alla validazione di questa specie quale modello per lo studio dei meccanismi coinvolti nella precoce involuzione ovarica nella donna.

DISEGNO SPERIMENTALE

Il nostro studio si è articolato in tre fasi. Nella **prima fase**, dopo aver valutato l'incidenza e l'età dei soggetti che presentavano ovaie contraddistinte da un ridotto numero di follicoli antrali medi (ovaie Lo) nella popolazione di bovine da latte portate al macello, abbiamo caratterizzato gli aspetti morfologici, macroscopici e microscopici di questi organi, valutando le dimensioni e il peso, la consistenza delle riserve follicolari ed il quadro isto-fisiologico, ponendo particolare attenzione al grado di connettivizzazione ed allo stato di vascolarizzazione dell'organo. L'invecchiamento ovarico è, infatti, caratterizzato, sia nella donna sia nella bovina, da una diminuzione delle riserve follicolari e da un progressivo aumento della componente stromale.

Nella **seconda fase** sono stati considerati gli aspetti funzionali dell'organo e del gamete femminile.

Dall'analisi dei dati presenti in letteratura emerge che uno dei fattori maggiormente coinvolti nei processi legati all'invecchiamento dei sistemi cellulari è lo stress ossidativo, processo quest'ultimo che vede nel mitocondrio uno degli organuli maggiormente esposti all'effetto delle specie reattive dell'ossigeno (ROS).

Abbiamo quindi valutato la relazione tra lo stato di vascolarizzazione e l'espressione/funzione del sistema NO/eNOS, direttamente coinvolta

nell'angiogenesi follicolare e nei processi che prevengono i danni causati dalle ROS.

Abbiamo inoltre considerato un'altra molecola coinvolta nella protezione dei sistemi cellulari dagli stress ossidativi, il glutatione (GSH), di cui l'ovocita necessita per coordinare i processi di maturazione e singamia.

Per verificare il ruolo di queste due specie molecolari (NO, GSH), abbiamo analizzato l'effetto della somministrazione di loro precursori durante la maturazione in vitro dell'ovocita al fine di convalidare le pathway metaboliche coinvolte nella perdita dell'efficienza riproduttiva.

Poiché l'invecchiamento dell'ovocita è accompagnato da alterazioni della funzionalità mitocondriale, durante questa fase abbiamo caratterizzato la popolazione di mitocondri negli ovociti provenienti dalle ovaie di tipo Lo. Inoltre, i mitocondri rivestono un ruolo fondamentale nel processo di formazione del fuso meiotico e segregazione dei cromosomi. Abbiamo valutato l'incidenza dei fenomeni di aneuploidia al termine della meiosi, come ulteriore indice del grado di compromissione di questi organuli.

Nella **terza fase**, a partire da quanto noto in letteratura riguardo ai profili endocrinologici (ematologici e follicolari), associati al prematuro invecchiamento ovarico e alla menopausa nella donna, abbiamo condotto uno studio comparativo delle concentrazioni di Estradiolo (E_2), Progesterone (P_4) e ormone anti-Mulleriano (AMH) nei liquidi follicolari

In tutte le fasi dello studio, come controllo, sono stati considerati soggetti appartenenti alla stessa razza ed intervallo d'età delle bovine con ovaie Lo, che presentavano ovaie morfologicamente normali, caratterizzate cioè da un numero elevato di follicoli antrali medi (ovaie Hi).

MATERIALI E METODI

PRODOTTI CHIMICI E REAGENTI

I prodotti chimici ed i reagenti, dove non specificato diversamente, sono stati acquistati presso la Sigma (St. Louis Mo, USA).

RACCOLTA E CLASSIFICAZIONE DELLE OVAIE

Le ovaie di bovino sono state raccolte in sede di macellazione (presso INALCA JBS S.p.A., Ospedaletto Lodigiano, LO, IT 2270M) da vacche preventivamente sottoposte a visita veterinaria ante-mortem, in accordo con la normativa vigente (89/5567ECC e successive modifiche).

Le ovaie utilizzate per le analisi morfologiche, istochimiche, immunoistochimiche e biochimiche sono state trasportate in ghiaccio, mentre per tutte le altre analisi sono state trasportate a 26°C in soluzione salina sterile.

In ciascun animale è stata valutata la morfologia della coppia di ovaie, che sono state classificate in due categorie, come descritto in precedenza [413]:

- Ovaie **Lo** (Low developmental competence): ovaie con meno di 10 follicoli antrali medi (2-6 mm di diametro) e assenza di follicoli ≥ 10 mm (Figura 8);

- Ovaie **Hi** (High developmental competence): ovaie con più di 10 follicoli antrali medi (2-6 mm di diametro) (Figura 8);

Per entrambe le categorie di ovaie, la presenza del corpo luteo non è stata presa in considerazione. Per questo studio sono state considerate coppie di ovaie Hi o Lo provenienti dal medesimo animale.

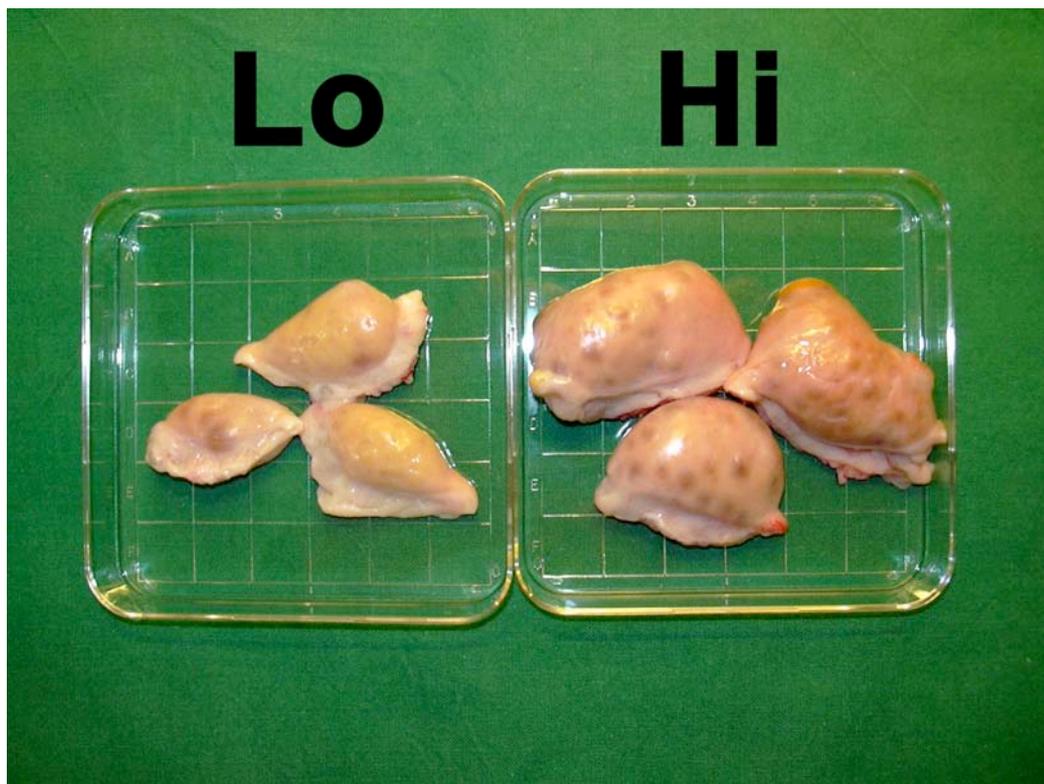


Figura 8: esempio di ovaie di tipo Lo (sinistra) e di ovaie di tipo Hi (destra).

ANALISI MACROSCOPICA DELLE OVAIE

Per ogni organo è stato valutato, mediante l'utilizzo di un righello [149] il diametro dei follicoli antrali visibili e si è proceduto alla registrazione del numero di quelli antrali medi (2-6 mm).

Per ogni ovaio inoltre si sono valutati il peso e le dimensioni, intese come lunghezza dell'asse maggiore e dell'asse minore dell'organo.

VALUTAZIONI ISTOLOGICHE ED ISTOCHIMICHE DELLE OVAIE

Analisi morfologiche e morfometriche

Per la valutazione dei **follicoli preantrali e antrali precoci (< 2 mm di diametro)**, ogni ovaio è stato diviso in due parti lungo l'asse maggiore dell'organo, quindi ogni semi-ovaio è stata ulteriormente diviso in 4 parti di dimensioni simili. Ogni campione è stato quindi fissato in fissativo B5 (Bio-Optica S.p.A., Milano) per 12 ore, disidratato tramite un gradiente di alcoli, chiarificato in xilene e incluso in paraffina.

Basandosi sull'approccio più diffuso per stimare la quantità dei follicoli, che prevede un campionamento del tessuto ovarico, seguito dall'applicazione di un fattore di correzione [414], un campione per ogni ovaio è stato tagliato serialmente al microtomo ogni 8 μm e la quarantesima sezione raccolta è stata colorata con ematossilina-eosina per la determinazione del numero e della qualità dei follicoli durante tutti

gli stadi della follicologenesi, secondo il protocollo descritto da Ireland e coll. [415].

Sono stati contati soltanto i follicoli in cui era visibile il nucleo dell'ovocita, quindi è stato stimato il numero totale di follicoli sani e atresici in ogni stadio di sviluppo per ogni campione. In particolare, seguendo parametri comunemente utilizzati in letteratura [57, 62], si sono considerati:

- *Follicoli primordiali*: follicoli in cui l'ovocita è circondato da uno strato di cellule appiattite;
- *Follicoli primari*: follicoli in cui l'ovocita è circondato da uno strato di cellule cubiche;
- *Follicoli secondari*: follicoli in cui l'ovocita è circondato da due o più strati di cellule della granulosa;
- *Follicoli antrali precoci*: follicoli in cui la cavità antrale ha già iniziato a formarsi, ma che non raggiungono i 2 mm di diametro;

Sono stati valutati come morfologicamente sani, i follicoli di forma regolare, con cellule somatiche ordinatamente distribuite, prive di vacuolizzazione citoplasmatica e/o nucleare e alterazioni della morfologia della cromatina, con lamina basale completa e regolare e strato tecale ben strutturato. L'ovocita doveva presentare una forma circolare, con citoplasma omogeneo, senza vacuolizzazioni e la zona pellucida intatta. Sono stati invece considerati danneggiati i follicoli che presentavano almeno una delle seguenti alterazioni: cellule della granulosa distaccate dalla membrana basale o dalla zona pellucida, numerosi nuclei picnotici,

membrana basale raggrinzita o discontinua, ovociti deformati o vacuolizzati e con cromatina addensata e ammassata, cellule della teca interna scollate dall'area esterna del follicolo [62, 416, 417].

La conta istologica è stata quindi moltiplicata per un fattore di correzione indicato in letteratura e pari a 320, dato dalla moltiplicazione del numero indicativo dei piani di 8 μm della corticale ovarica (40) per il numero di parti del semiovaio (4) per le 2 semiovaie [415] ed espresso per grammo di tessuto ovarico.

Analisi istochimiche ed immunoistochimiche

Valutazione della vascolarizzazione perifollicolare e follicolare

Per valutare la distribuzione dei vasi nell'ovaio e quantificare i livelli di vascolarizzazione dei follicoli antrali medi è stata utilizzata la Lectina BS-1 (isolata da *Bandeiraea simplicifolia*), in grado di legarsi in maniera specifica ai residui di α -N-acetilgalattosamina e α -galattosio presenti nel glicocalice delle cellule endoteliali [149].

I **follicoli antrali medi** sono stati isolati da frammenti di corticale, fissati ed inclusi in gruppi, secondo il protocollo descritto in precedenza. La valutazione morfologica dei follicoli e le successive indagini sono state effettuate su una sezione corrispondente al diametro maggiore del follicolo. Sono stati considerati solo follicoli che presentavano la

membrana basale intatta, le cellule della granulosa correttamente organizzate e con pochi nuclei picnotici e l'ovocita intatto [415-417]

Sezioni di follicoli antrali medi provenienti da ovaie Hi e Lo e di corticale di ovaio sono state poste su vetrini trattati con Vectabond (Vector laboratories, Burlingame, CA, USA) per aumentare l'aderenza del tessuto ed incubate in metanolo con H₂O₂ al 3% per eliminare l'attività di eventuali perossidasi endogene presenti nel tessuto che avrebbero potuto interferire con la specificità della reazione.

Successivamente le sezioni sono state incubate per 2 ore a 37°C con Lectina BS-1 biotinilata (Vector laboratories) alla concentrazione di 10 µg/ml in tampone costituito da HEPES 10 mM e NaCl 0.15 M, lavate per due volte nello stesso tampone e incubate per 30 minuti in una soluzione contenente il complesso avidina/biotina-perossidasi, secondo le istruzioni della casa produttrice (Vectastain Elite ABC kit, Vector laboratories). La reazione colorimetrica è stata sviluppata in presenza di diaminobenzidina (DAB; Vector Laboratories), in qualità di cromogeno.

Dopo successivi lavaggi in acqua di fonte ed acqua distillata per bloccare la reazione enzimatica, alcune sezioni sono state contro-colorate con il colorante nucleare ematossilina QS (Vector laboratories), disidratate e montate con un montante a secco (Poly-Mount, Polysciences Inc., Warrington, PA, USA).

Sulle sezioni destinate all'analisi semiquantitativa della lectina nei follicoli antrali medi non è stata fatta alcuna contro-colorazione.

Sezioni di aorta di bovino sono state utilizzate come controllo positivo della reazione; per effettuare i controlli negativi, è stata omessa la Lectina BS-1 biotinilata.

Valutazione dell'espressione dell'ossido nitrico sintasi di tipo endoteliale

Per valutare la presenza dell'eNOS nell'ovaio e localizzare e quantificare la proteina nei follicoli antrali medi, sezioni di corticale ovarica e sezioni di follicoli antrali medi provenienti da ovaie Hi e Lo sono state processate secondo quanto descritto da Grazul-Bilska et al. [149].

Le sezioni sono state poste su vetrini trattati con Vectabond, come descritto in precedenza, e sottoposte alla procedura di "smascheramento" dei siti antigenici, mediante trattamento in pentola a pressione in presenza di tampone citrato a pH 6.

Successivamente si è proceduto alla neutralizzazione delle perossidasi endogena con le stesse modalità descritte per le lectine e all'incubazione dei campioni in tampone fosfato (phosphate buffered saline, PBS) addizionato di siero normale di capra al 10%, Triton X-100 allo 0.3% e albumina sierica bovina (BSA) al 3% per 30 minuti per bloccare i legami aspecifici dell'anticorpo secondario.

I vetrini sono stati quindi incubati per 30 minuti con un anticorpo anti-eNOS specifico per il bovino, sviluppato in coniglio, e diluito 1:400 in PBS addizionato di BSA all'1% e Triton X-100 allo 0.3%. Il riconoscimento dell'avvenuto legame antigene anticorpo è stato individuato tramite un

anticorpo biotinilato diretto contro le IgG di coniglio (Vector laboratories) diluito 1:400 in PBS addizionato di BSA all'1% e il complesso avidina-biotina perossidasi (Vectastain Elite ABC kit - Vector laboratories). La reazione colorimetrica è stata sviluppata mediante DAB, come descritto in precedenza.

Per meglio evidenziare la localizzazione cellulare dell'eNOS nei vari distretti del follicolo e nel tessuto stromale circostante, alcune sezioni sono state contro-colorate con ematossilina QS. Sulle sezioni di follicoli antrali medi, destinate all'analisi semiquantitativa non è stata fatta alcuna contro-colorazione.

I controlli negativi sono stati effettuati omettendo l'anticorpo primario.

Quantificazione dei livelli di vascolarizzazione e dell'espressione dell'eNOS nella parete dei follicoli antrali medi

Le analisi sono state condotte esclusivamente su follicoli morfologicamente sani. Per ogni follicolo, sono stati fotografati 9 campi scelti casualmente fra 3 sezioni seriali. Su ogni campo è stata determinata la percentuale di area in cui era avvenuta la reazione colorimetrica rispetto all'area totale [149], utilizzando il software di analisi dell'immagine ImageJ 1.41g, (National Institutes of Health, USA) [418]. Brevemente, l'immagine è stata convertita in scala di grigio ed è stato impostato un valore soglia per identificare la colorazione specifica.

Valutazione della componente connettivale perifollicolare

Sezioni di follicoli antrali medi di ovaie Hi e Lo sono state colorate con Azan Tricromico (Bio-Optica), colorazione specifica per i connettivi, secondo le indicazioni del produttore. Questa procedura permette di evidenziare in rosso (tramite Azocarminio) la cromatina e quindi i nuclei delle cellule e in rosso pallido i citoplasmi e in blu (tramite la miscela policroma di Mallory) le fibre collagene del tessuto connettivo.

Successivamente, è stata calcolata la percentuale di follicoli completamente circondati da uno spesso strato connettivale, rispetto ai follicoli in cui l'addensamento di fibre collagene era nei limiti della norma, cioè esiguo o del tutto assente, secondo quanto descritto da [138].

ANALISI DEGLI OVOCITI ED EMBRIOGENESI IN VITRO

Raccolta degli ovociti

I complessi ovocita-cumulo ooforo (COC), sono stati aspirati dai follicoli antrali medi delle ovaie Hi e Lo secondo il seguente protocollo. Il contenuto di ogni follicolo è stato aspirato in provette a fondo conico da 25 ml mediante un sistema di aspirazione COOK-IVF V-MAR 5100 (Cook, Brisbane, QLD, Australia) ad una pressione negativa costante pari a 28 mm di Hg, cui è stato collegato un ago 16 G (Terumo Italia SRL, Roma, Italia). La procedura di aspirazione è stata effettuata utilizzando il medium

M199D costituito da medium TCM199 addizionato con 0.4% di BSA Frazione V (BSA FrV), HEPES 25 mM e 10 µg/ml di eparina, al fine di evitare la formazione di coaguli. Il medium M199D è stato aggiunto in ragione di circa 2 ml per ogni 10 ml di fluido follicolare aspirato.

Dopo la raccolta, i COC sono stati trasferiti in una piastra petri da 60 mm contenente M119D e sono stati selezionati utilizzando uno stereomicroscopio a 16 ingrandimenti, dotato di piastra termostata regolata a 38°C. I COC sono stati selezionati seguendo i criteri morfologici comunemente accettati nelle pratiche di maturazione in vitro [419-422]. In particolare sono stati utilizzati soltanto COC che presentavano un ovocita con citoplasma omogeneo e di colore marrone chiaro, circondati da cinque o più strati completi di cellule del cumulo. Al termine della selezione, i COC sono stati lavati due volte in 2 ml di medium M199D. L'intera procedura è stata svolta in circa 30-45 minuti ad una temperatura compresa fra i 35-38°C.

Determinazione del contenuto intracellulare di GSH nell'ovocita denudato

Al fine di valutare la concentrazione intracellulare di GSH, i COC prelevati da ovaie di tipo Lo e da ovaie di tipo Hi sono stati privati delle cellule del cumulo mediante l'uso del vortex 35 Hz per 2 minuti, come precedentemente descritto [235]. Gli ovociti denudati (OD) sono stati sottoposti a tre lavaggi in PBS contenente 2 mg/ml di BSA. Sono quindi

stati trasferiti singolarmente sotto uno stereomicroscopio sul fondo di una provetta a fondo conico con una pipetta di piccolo calibro ed il PBS in eccesso è stato rimosso tramite aspirazione. I campioni quindi sono stati immersi per circa 3 secondi in azoto liquido e conservati a -80°C fino al momento dell'analisi.

La valutazione del contenuto intracellulare di GSH è stata eseguita mediante 5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB)-GSH reductase recycling micro-GSH test secondo il protocollo descritto da Baker e coll. [423] e successivamente modificato [235]. In particolare, le provette contenenti gli ovociti sono state poste in ghiaccio e ad ogni provetta sono stati aggiunti 50 μl di acqua deionizzata. Tutti i campioni sono stati congelati in azoto liquido e successivamente scongelati. Il contenuto di ogni provetta è stato mescolato tramite vortex e centrifugato per 20 secondi a 12000 rpm. Questa procedura è stata ripetuta 3 volte. Contemporaneamente sono stati preparati gli standard contenenti da 0 a 200 pmol di GSH in 50 μl di acqua. Sia gli standard che i campioni sono stati tenuti in ghiaccio fino al momento in cui sono stati posti nella micropiastra per la determinazione colorimetrica.

Successivamente sono stati aggiunti 50 μl di ogni campione e degli standard in una micropiastra a 96 pozzetti. La miscela di reazione è stata preparata aggiungendo DNTB 0.15 mM, NADPH 0.2 mM e 1.0 U/ml di GSH reductasi in tampone fosfato 0.1 M addizionato con EDTA 1 mM (pH=7.8), come precedentemente indicato [235].

Ad ogni pozzetto della piastra sono stati quindi aggiunti immediatamente 0.1 ml della soluzione di reazione e la piastra è stata analizzata a 405 nm mediante un lettore di micropiastre (SpectraCount, Packard, USA); le letture sono state ripetute ogni 2 minuti per un intervallo di 30 minuti.

Localizzazione immunocitochimica dell'eNOS nell'ovocita denudato

Dopo la raccolta, i COC selezionati dalle ovaie Lo e Hi sono stati privati delle cellule del cumulo ooforo mediante dispersione meccanica operata in vortex (35 Hz per 3 minuti), in provette a fondo tondo da 6 ml in presenza di 500 µl di medium M199D.

Gli ovociti sono stati poi recuperati dalla provetta e trasferiti in una petri da 35 mm al fine di valutare la totale rimozione delle cellule del cumulo.

Gli OD sono stati lavati 2 volte per 5 minuti in PBS con 0.1% di polivinilalcol (PBS/PVA) e fissati prima in PBS col 3% di paraformaldeide per 20 minuti e successivamente in PBS con paraformaldeide al 3% e contenente lo 0.3% di Triton X-100 per 10 minuti. Questo secondo passaggio serve a permeabilizzare le membrane per consentire un miglior accesso degli anticorpi.

Dopo la fissazione, i campioni sono stati lavati 3 volte per 5 minuti in PBS/PVA e incubati in PBS contenente siero d'asino al 10%, BSA all'1% e Triton X-100 allo 0.3% allo scopo di ridurre i siti di legame aspecifici. In seguito sono stati incubati a 4°C per una notte in una soluzione di PBS contenente 1% di BSA e 0.3% di Triton X-100 e l'anticorpo anti-eNOS (lo

stesso utilizzato per l'immunolocalizzazione della proteina nelle sezioni d'ovaio) diluito 1:400. Il giorno seguente sono stati lavati 2 volte per 10 minuti in PBS/PVA ed esposti agli anticorpi secondari di asino specifici per le immunoglobuline di coniglio coniugati con tetrametil rodamina isotiocianato (TRITC; Jackson immunoresearch laboratories, Inc., West Grove, PA, USA) diluiti 1:100 in PBS/PVA per 30 minuti. Infine, dopo 2 lavaggi da 10 minuti in PBS/PVA al fine di eliminare gli anticorpi secondari non legati, si è proceduto alla colorazione del DNA mediante 4',6-Diamidino-2-fenilindolo (DAPI) di-lattato diluito 1 μ g/ml in un montante specifico per prevenire il decadimento della fluorescenza (Vectashield, Vector laboratories). I controlli negativi sono stati effettuati omettendo l'anticorpo primario.

Gli ovociti sono stati processati in sospensione utilizzando piastre a quattro pozzetti contenenti 500 μ l di soluzione, tutte le procedure sono state eseguite a temperatura ambiente, tranne dove specificato diversamente

L'osservazione dei campioni è avvenuta tramite un microscopio convenzionale ad epifluorescenza (Eclipse E 600, Nikon, Tokyo, Japan).

Ogni OD, è stato fotografato e l'intensità della fluorescenza nell'ooplasma corrispondente è stata stimata utilizzando lo stesso software di analisi dell'immagine indicato in precedenza. Brevemente, le immagini sono state convertite in scala di grigio e i valori medi di grigio sono stati calcolati per ogni ovocita.

Maturazione in vitro

I COC selezionati dalle ovaie Lo e Hi sono stati maturati in vitro nelle seguenti condizioni, in accordo con il disegno sperimentale:

1. In presenza di Medium base, costituito da TCM-199 addizionato di 0.68 mM di L-glutamina, 0.2 mM di piruvato di sodio, 25 mM di NaHCO₃, 0.4% di BSA fatty-acid-free (FAF), 0.1 UI/ml di FSH ricombinante umano (rhFSH, Gonal-F, Serono, Roma, Italia). [235].
2. In presenza di Medium base addizionato con cisteamina 100 µM [220, 424].
3. In presenza di Medium base addizionato con 1 dei seguenti donatori di Ossido Nitrico (NO):
 - S-nitroso acetil penicillamina (SNAP) 100 µM [425];
 - sodio nitroprusside (SNP) 10 µM [426];

Per ciascun trattamento sono stati messi in coltura gruppi di circa 15 COC, in 500 µl di medium di maturazione, in piastre da quattro pozzetti (four-well dishes, NUNC, Roskilde, Danimarca) per 24 ore alla temperatura di 38.5 °C in atmosfera umidificata e addizionata del 5% di CO₂.

Fecondazione in vitro

Dopo 24 ore di maturazione in vitro (IVM), gli ovociti sono stati fecondati utilizzando seme congelato (C.I.Z. S.Miniato, Pisa) come

precedentemente descritto [235]. In breve, il seme è stato scongelato in acqua ad una temperatura di 35°C per 60 secondi e la motilità degli spermatozoi è stata valutata in microscopia a contrasto di fase, ponendo circa 10 µl di seme su un vetrino portaoggetti pre-riscaldato a 38°C. In ogni esperimento è stato utilizzato solo seme che, allo scongelamento, presentava una motilità superiore al 60%. Successivamente si è proceduto alla separazione degli spermatozoi vitali, da quelli danneggiati, utilizzando un gradiente discontinuo di Percoll 45-90%, costituito da 2 ml di una soluzione di Percoll al 90% sormontato da 2 ml di una soluzione di Percoll al 45%, in una provetta a fondo conico da 15 ml. Il Percoll è stato diluito in medium Tyrode's modificato addizionato di BSA-FAF allo 0.4%, lattato di sodio 25 mM e piruvato di sodio 1 mM secondo Bavister et al. (TALP, [427]). Dopo scongelamento il seme è stato caricato sulla superficie del gradiente e centrifugato per 30 minuti ad una velocità di 700 g. Al termine della centrifugazione gli spermatozoi vitali, sedimentati sul fondo della provetta, sono stati trasferiti in un'altra provetta a fondo conico da 15 ml contenente 5 ml di medium TALP e centrifugati per ulteriori dieci minuti a 500 g, al fine di rimuovere i residui di Percoll. Successivamente, il surnatante è stato rimosso lasciando sul fondo della provetta un volume di circa 150 µl di sospensione di spermatozoi vitali. Il seme così preparato è stato mantenuto ad una temperatura di 38.5°C fino al suo utilizzo. Prima della fecondazione la concentrazione degli spermatozoi in sospensione è stata valutata mediante conta in camera di Neubauer. Infine un'aliquota

della sospensione di spermatozoi è stata trasferita in 300 μl di medium di fecondazione in una piastra a 4 pozzetti ad una concentrazione finale 0.75×10^6 spermatozoi/ml. Il medium di fecondazione è costituito da medium TALP contenente 0.6% di BSA-FAF, 10 $\mu\text{g/ml}$ eparina per capacitare gli spermatozoi [428], 20 μM penicillamina, 1 μM di epinefrina e 100 μM di ipotaurina, quali fattori coadiuvanti la motilità [427].

Al termine dell'IVM, i COC sono stati trasferiti in medium di fecondazione e incubati con gli spermatozoi per 16-18 ore ad una temperatura di 38.5°C in atmosfera umidificata e modificata al 5% di CO_2 .

Coltura in vitro

Dopo la fecondazione in vitro (IVF), i presunti zigoti sono stati lavati e decumulati mediante vortex per 2 minuti in 500 μl di medium "Synthetic Oviduct Fluid" (SOF, [429]) modificato e addizionato di 0.3% di BSA-FAF, una soluzione di aminoacidi essenziali e non essenziali, 0.72 mM di piruvato di sodio, 10 mM di HEPES e 5 mM di NaHCO_3 .

In seguito gli zigoti sono stati coltivati in vitro (IVC) in 500 μl di medium di coltura costituito da SOF addizionato con una soluzione di aminoacidi essenziali e non essenziali, 0.72 mM di sodio piruvato, 2.74 mM di mioinositolo, 0.34 mM di citrato di sodio, 5% di siero bovino e tamponato con 25 mM di NaHCO_3 . Gli embrioni sono stati quindi coltivati per 7 giorni ad una temperatura di 38.5°C in atmosfera di gas umidificata e composta dal 5% CO_2 , 5% O_2 ed il 90% N_2 .

Valutazione dei parametri di sviluppo e qualità embrionale dopo somministrazione di cisteamina durante IVM

Negli esperimenti che hanno portato alla valutazione dell'effetto della cisteamina somministrata in maturazione, la capacità di sviluppo nei diversi gruppi sperimentali è stata determinata sulla base della percentuale di embrioni che hanno raggiunto lo stadio di 2-4 cellule e della percentuale di quelli che hanno raggiunto lo stadio di blastocisti rispettivamente 48 ore (d+2) e 186 ore (d+8) dall'inizio della fecondazione. Al termine del periodo di coltura, le blastocisti sono state fissate in metanolo al 60% in PBS e colorate con ioduro di propidio come precedentemente descritto [430]. La qualità degli embrioni è stata quindi valutata attraverso la conta del numero dei nuclei, indicativi della quantità di blastomeri, mediante osservazione con microscopio rovesciato a fluorescenza, a 400 ingrandimenti (Olympus IX50, Tokyo, Giappone).

Valutazione dei parametri di sviluppo e qualità embrionale dopo somministrazione di molecole donatrici di NO durante IVM

Dopo 186 ore dall'inizio della fecondazione sono state valutate, in ciascun gruppo sperimentale, la percentuale di embrioni che aveva raggiunto lo stadio di blastocisti e la percentuale di blastocisti sgucciate, mediante osservazione allo stereo microscopio a 16 ingrandimenti. Inoltre, per valutare il numero totale di cellule per blastocisti, la percentuale di nuclei

apoptotici (quale marker di un avanzato stadio di apoptosi) e la percentuale di cellule caspasi-positivo (come indicatore precoce di apoptosi), è stato utilizzato il CaspaTag Pan-Caspase in situ Assay kit, Fluorescein (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA; [431]). Questo kit è basato sull'utilizzo di inibitori specifici dell'attività delle caspasi che si legano irreversibilmente con le caspasi attive presenti all'interno delle cellule e sono coniugati con carbossifluoresceina e pertanto in grado di emettere una fluorescenza verde. In seguito all'incubazione di 1 ora a 38.5°C con il 5% di CO₂ in presenza degli inibitori dell'attività delle caspasi, gli embrioni sono stati lavati, fissati e i nuclei dei blastomeri colorati con propidio ioduro.

Questi esperimenti sono stati ripetuti 8 volte per la maturazione in presenza di SNAP e 5 volte per la maturazione in presenza di SNP.

Analisi del cariotipo degli ovociti

Al termine delle 24 ore di IVM in Medium base, i COC raccolti dalle ovaie Hi e dalle ovaie Lo sono stati decumulati meccanicamente mediante vortex al fine di poter selezionare quindi solo gli ovociti che presentavano il globulo polare, come segno del raggiungimento dello stadio di Metafase della seconda divisione meiotica (MII).

I campioni sono stati processati secondo le indicazioni riportate da Takeuchi [432] e modificate in collaborazione con il Dott. Pietro Parma del

Laboratorio di Citogenetica del Dipartimento di Scienze Animali dell'Università degli Studi di Milano.

Gli ovociti sono stati posti in una soluzione ipotonica (0.075 M di KCl) per 20 minuti e trasferiti delicatamente in un pozzetto contenente metanolo, acido acetico e acqua deionizzata in proporzione 5:1:4 per 5 minuti. Successivamente sono stati fatti cadere da un'altezza di 5 cm su un vetrino bagnato in acqua di fonte, riscaldato a 37°C e inclinato di 45° in 10 µl del medesimo fissativo al fine di separare i cromosomi e ottenere una piastra metafasica leggibile. Dopo che la goccia si è diffusa, gli ovociti, ormai adesi al vetrino, sono stati ricoperti con metanolo, e acido acetico in proporzione 3:1. I vetrini sono stati immersi completamente nel medesimo fissativo per 10 minuti e trasferiti in metanolo, acido acetico e acqua deionizzata in proporzione 3:3:1 per 1 minuto e lasciati ad asciugare all'aria per tutta la notte.

La colorazione dei cromosomi è stata effettuata con una soluzione al 4% di GIEMSA per 15 minuti, seguita da abbondanti lavaggi con acqua di fonte e deionizzata. Prima della lettura, i vetrini sono stati lasciati ad asciugare a 37°C per 30 minuti e montati con montante a secco Poly-Mount (Polysciences Inc.).

La lettura delle piastre metafasiche e il conteggio dei cromosomi sono stati effettuati in campo chiaro, con un microscopio Leica all'ingrandimento 40X, utilizzando il software Leica CW4000 Karyo (Leica Microsystems, Wetzlar, Germania).

Ogni lettura è stata effettuata da due operatori in tempi diversi e l'esperimento è stato replicato per 6 volte. L'allestimento dei preparati, è avvenuto a 26°C, tranne quando diversamente specificato [433].

Valutazione dell'attività mitocondriale

L'analisi dell'attività mitocondriale è stata condotta su ovociti isolati da ovaie Hi e Lo, sia al momento dell'isolamento dall'ambiente ovarico, che dopo IVM (medium Base), mediante l'utilizzo di specifici coloranti mitocondriali fluorescenti. In particolare sono stati utilizzati MitoTracker FM Green (MTG, Invitrogen by Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) che è in grado di legarsi ai mitocondri indipendentemente dal loro potenziale di membrana ed è pertanto utilizzato come misura relativa della massa mitocondriale [434, 435] e MitoTracker Orange CMTMRos (MTO, Invitrogen) il cui legame dipende dalla presenza di un potenziale di membrana mitocondriale ($\Delta\psi$) [436-438].

Brevemente, gli ovociti sono stati privati delle cellule del cumulo ed incubati per 30 minuti in presenza di MTG 300 nM e MTO 200 nM a 38.5°C in atmosfera umidificata e al 5% di CO₂. Dopo l'incubazione gli ovociti sono stati lavati velocemente in PBS/PVA, montati su vetrino ed immediatamente osservati al microscopio ad epifluorescenza (Eclipse E 600, Nikon) esponendo i preparati a lunghezza d'onda di 488 nm e 546 nm, specifiche rispettivamente per MTG ed MTO. Per ciascun campione sono state acquisite immagini digitali per entrambi i coloranti fluorescenti

che sono state utilizzate per la quantificazione della fluorescenza relativa mediante il programma di analisi dell'immagine ImageJ.

In particolare in ogni campione è stato calcolato il rapporto della fluorescenza relativa tra i due coloranti (Ratio MTO/MTG) quale misura del $\Delta\psi$ indipendente dalla massa [439].

ANALISI DEI LIQUIDI FOLLICOLARI

Raccolta dei liquidi follicolari

I fluidi follicolari sono stati aspirati dai follicoli antrali di 2-6 mm di diametro con una siringa da 2 ml munita di ago da insulina. Il liquido raccolto è stato centrifugato a 10000 rpm per 30 secondi al fine di eliminare tutte le cellule follicolari. Successivamente si è proceduto alla raccolta del surnatante che è stato stoccato in aliquote e conservato a -20°C . Per la determinazione di AMH, E_2 e P_4 sono stati raccolti pool di liquidi aspirati da 5/6 follicoli antrali medi provenienti da gruppi di 3-5 ovaie appartenenti alla medesima categoria.

Quantificazioni ormonali

L'analisi quantitativa di E_2 e P_4 è stata effettuata su 400 μl di liquido follicolare tramite radioimmunoassay (RIA).

La quantificazione dell'AMH è stata effettuata tramite l'Active Mullerian Inhibiting Substance/Anti-Mullerian Hormone ELISA kit (Diagnostic

Systems Laboratories, Webster, Texas, USA), un kit per il dosaggio immunoenzimatico dell'AMH nel siero umano, utilizzato anche nel topo [333] nel ratto [440] e recentemente validato per l'utilizzo nel liquido follicolare del bovino [319, 340, 411]. L'AMH è stato misurato su 10 μ l prelevati da un pool di liquidi follicolari raccolti da coppie di ovaie diluiti 1:200 [411]. I campioni, eseguiti in doppio, sono stati fatti reagire con un substrato costituito da anticorpo anti-AMH presente sul fondo dei pozzetti di una piastra 96-well. Il legame è stato rilevato con un secondo anticorpo anti-AMH biotinilato e una successiva reazione colorimetrica con un complesso streptavidina-perossidasi e tetrametilbenzidina. La piastra è stata quindi analizzata mediante un lettore di piastre Multiskan Reader MS (LMTX Lab Systems, Inc., Virginia, U.S.A.) alla lunghezza d'onda di 450 nm.

ANALISI STATISTICA

I risultati di ogni esperimento sono stati sottoposti ad analisi della varianza (SPSS 17.0; Chicago, Illinois, USA) seguiti dal Fisher's LSD test. I valori di probabilità inferiori allo 0.05 sono stati considerati statisticamente significativi.

RISULTATI

DISTRIBUZIONE DELL'ETA' DEI SOGGETTI CON FENOTIPO Lo

Sul totale degli animali analizzati il 93% era rappresentato da soggetti di razza Frisona con un'età compresa tra i 2 e i 18 anni. Come indicato nella Figura 9, non sono state osservate evidenti differenze nella distribuzione tra categoria Lo e categoria Hi. Per le successive indagini sono stati considerati solamente i soggetti con un'età compresa tra i 4 e gli 8 anni che rappresentavano il 68% degli animali in entrambe le categorie e di cui il 96% era di razza Frisona.

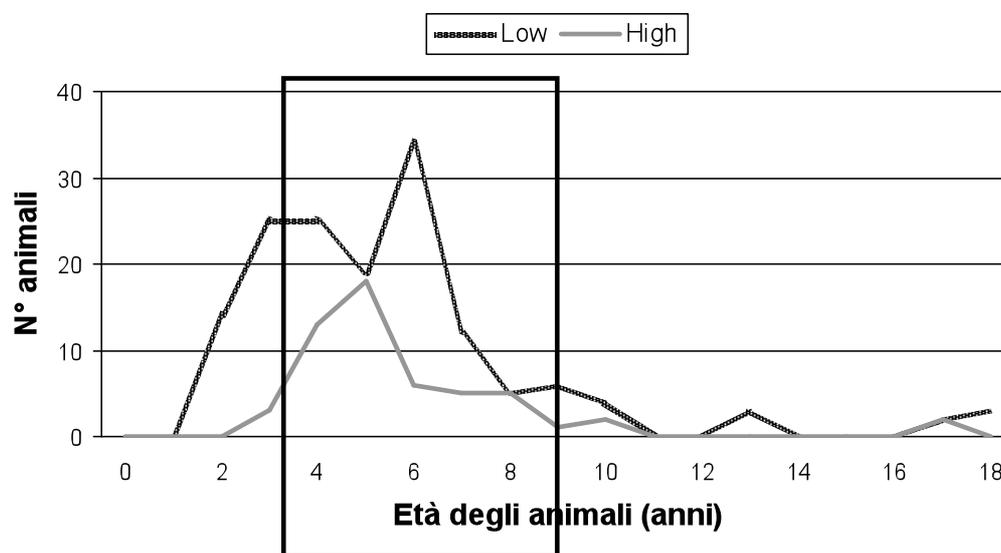


Figura 9: distribuzione dell'età degli animali da cui sono state isolate le ovaie in sede di macellazione. Il 68% degli animali (evidenziati dal rettangolo) ha un'età compresa tra i 4 e gli 8 anni.

ANALISI MACROSCOPICA DELLE OVAIE

La valutazione macroscopica delle ovaie è stata effettuata su 24 paia di ovaie di tipo Lo e 14 paia di ovaie di tipo Hi.

Le ovaie di tipo Lo sono risultate più piccole di quelle di tipo Hi, come dimostrato dal minor peso e dalle dimensioni inferiori, calcolate misurando i diametri maggiori e minori degli organi (Figura 10); l'ovaio Lo possiede in media 4.51 ± 3.05 follicoli del diametro compreso fra i 2 e i 6 mm, mentre le ovaie della categoria Hi sono caratterizzate da un numero di follicoli antrali medi decisamente superiore, pari a 31.93 ± 13.89 (Tabella 1).

Le ovaie di tipo Lo sono caratterizzate da una consistenza fibrosa, apprezzabile alla palpazione, e una superficie omogenea, di colore chiaro. Si apprezzano residui cicatriziali di vecchi follicoli e/o corpi lutei (corpora albicantes).

Sia nelle ovaie Hi che nelle ovaie Lo la midollare dell'organo è caratterizzata da una ricca rete di capillari sanguigni.

Ovaie	N ovaie	Follicoli antrali medi/ovaio
Lo	48	4.51 ± 3.05
Hi	28	31.93 ± 13.89

Tabella 1: distribuzione dei follicoli antrali medi nelle due popolazioni di ovaie. I dati sono espressi come media ± deviazione standard.

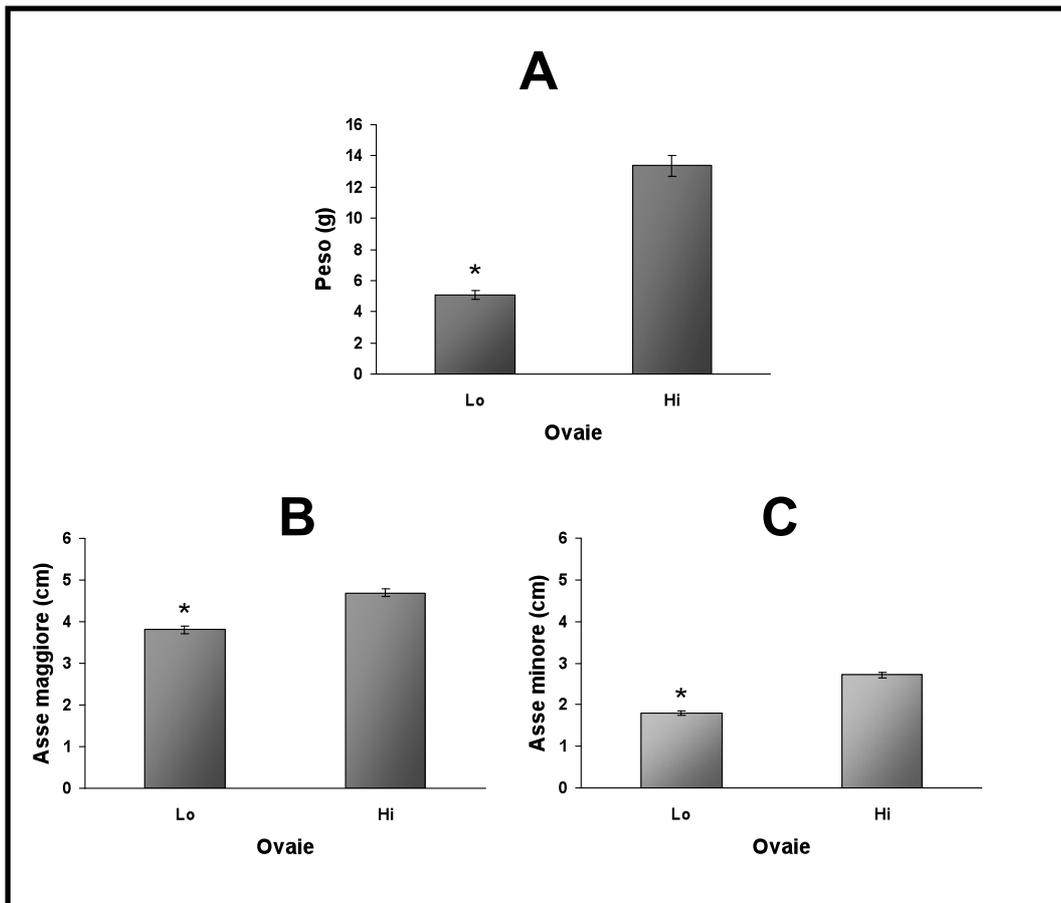


Figura 10: analisi macroscopica della morfologia delle ovaie di tipo Lo e Hi. I grafici rappresentano il peso **(A)** e le dimensioni degli assi maggiore **(B)** e minore **(C)** delle ovaie. I valori sono espressi come media \pm errore standard e sono analizzati mediante ANOVA, seguita da Fisher protected LSD test. L'asterisco indica una differenza statisticamente significativa per quanto riguarda ogni parametro valutato ($P < 0.001$).

VALUTAZIONI ISTOLOGICHE ED ISTOCHIMICHE

Analisi morfologiche e morfometriche

La valutazione morfologica e morfometrica della popolazione follicolare è stata effettuata su 22 campioni di ovaie Lo raccolti da 11 animali e 20 campioni di ovaie Hi raccolti da 10 animali.

Le analisi quantitative della popolazione follicolare hanno evidenziato che le ovaie Lo hanno un numero di follicoli significativamente inferiore rispetto alle ovaie Hi, considerando i preantrali e gli antrali di diametro $<$ ai 2 mm (rispettivamente 1444.30 ± 349.24 follicoli/g e 2734.68 ± 505.94 follicoli/g, $P < 0.05$). In particolare, valutando i singoli stadi di sviluppo, non esistono differenze significative, tranne che nella popolazione dei follicoli primordiali (671.8 ± 222.83 follicoli/g nelle ovaie Lo rispetto a 1751.26 ± 369.67 follicoli/g nelle Hi, $P < 0.001$; Figura 11-A).

L'analisi quali-quantitativa della popolazione follicolare (Figura 12) ci ha permesso di osservare che nelle ovaie Lo i follicoli primordiali sono più frequentemente atresici rispetto alla stessa classe dei follicoli Hi (rispettivamente $74.85 \pm 8.79\%$ e $50.10 \pm 6.99\%$, $P < 0.05$). La percentuale di follicoli antrali precoci atresici è significativamente maggiore nelle ovaie Hi rispetto alle ovaie Lo (Figura 11-B).

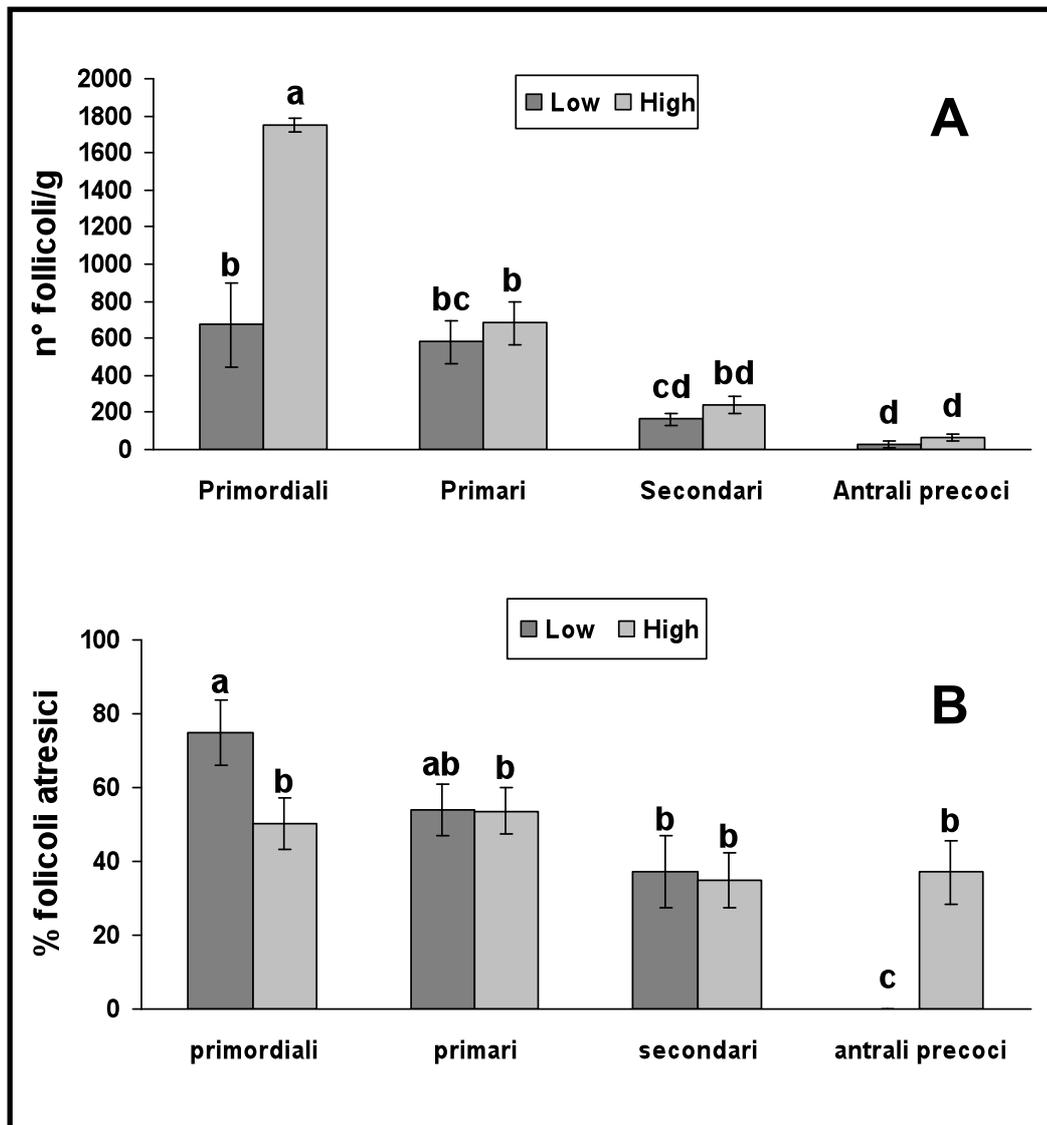


Figura 11: analisi quantitativa della popolazione follicolare nelle ovaie di tipo Lo e di tipo Hi. I grafici rappresentano il numero di follicoli per grammo di ovaio (**A**) e la percentuale di atresia (**B**) nella popolazione dei follicoli preantrali e antrali precoci.

I valori sono espressi come media \pm errore standard e sono analizzati mediante ANOVA, seguita da Fisher protected LSD test. In ogni grafico, a, b, c, d indicano differenze statisticamente significative ($p < 0.05$).

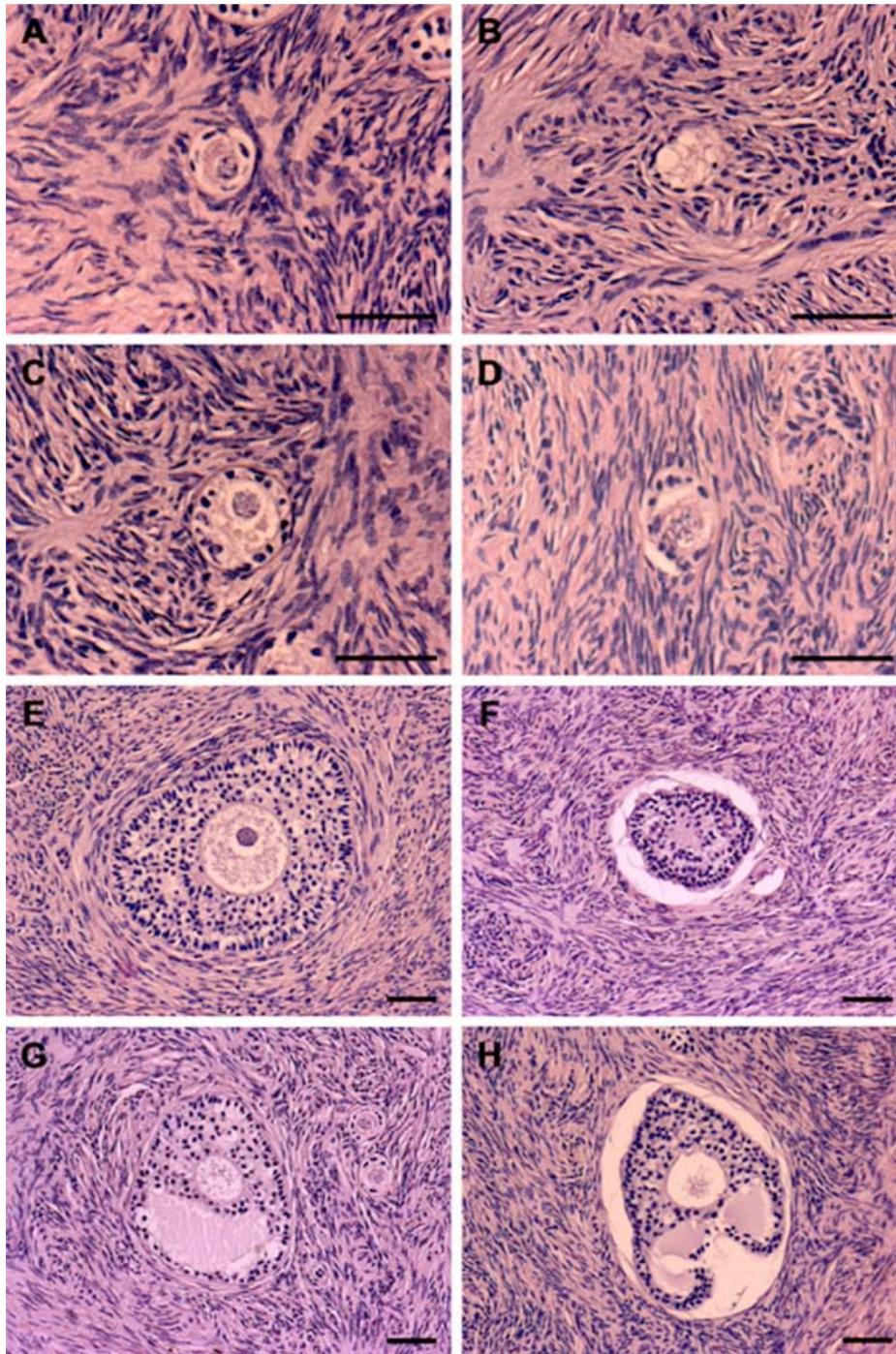


Figura 12: Follicoli a vari stadi di sviluppo: primordiali (A, B), primari (C, D), secondari (E, F) e antrali precoci (G, H). Le immagini di sinistra (A, C, E, G) mostrano follicoli morfologicamente sani, mentre le immagini di

destra (**B, D, F, H**) presentano follicoli agli stessi stadi della follicoligenesi, ma con evidenti segni morfologici di regressione atresica, quali assenza della membrana basale (**B**), distacco del follicolo dalle cellule stromali circostanti (**D, E, F**) e danni a carico dell'ovocita (**F**). Le barre corrispondono a 50 μm .

Analisi istochimiche ed immunoistochimiche

Valutazione della vascolarizzazione perifollicolare e follicolare

L'indagine istochimica effettuata utilizzando la Lectina BS1 biotinilata, specifica per il riconoscimento dei residui di α -N-acetilgalattosamina e α -galattosio presenti nel glicocalice delle cellule endoteliali, ha permesso di evidenziare sia i vasi sanguigni presenti nello stroma ovarico che quelli organizzati nei compartimenti tecali dei follicoli. Dal punto di vista qualitativo non si sono osservate particolari differenze nella distribuzione dei vasi a livello della regione stromatica dell'organo (Figura 13-A).

L'analisi semi-quantitativa della vascolarizzazione dei follicoli antrali medi effettuata sul comparto tecale di 5 follicoli provenienti da 3 animali con entrambe le ovaie di tipo Hi e di 8 follicoli da 3 animali con entrambe le ovaie di tipo Lo, ha indicato l'area di legame con Lectina BS1, indicativa del grado di vascolarizzazione, è significativamente inferiore nei follicoli provenienti da ovaie Lo rispetto alle ovaie Hi (rispettivamente $7.83 \pm 1.62\%$ e $15.86 \pm 3.16\%$; $P < 0.05$; Figura 13-B).

Infine, le Lectine BS-1 hanno riconosciuto anche residui glucidici presenti nel citoplasma di ovociti di follicoli ai primi stadi di sviluppo (da primordiale a secondario), con una localizzazione eterogenea e differente in intensità, mentre negli ovociti dei follicoli antrali la positività è limitata alla zona pellucida. La GV è risultata invece sempre negativa.

I controlli negativi non hanno mostrato segni di positività.

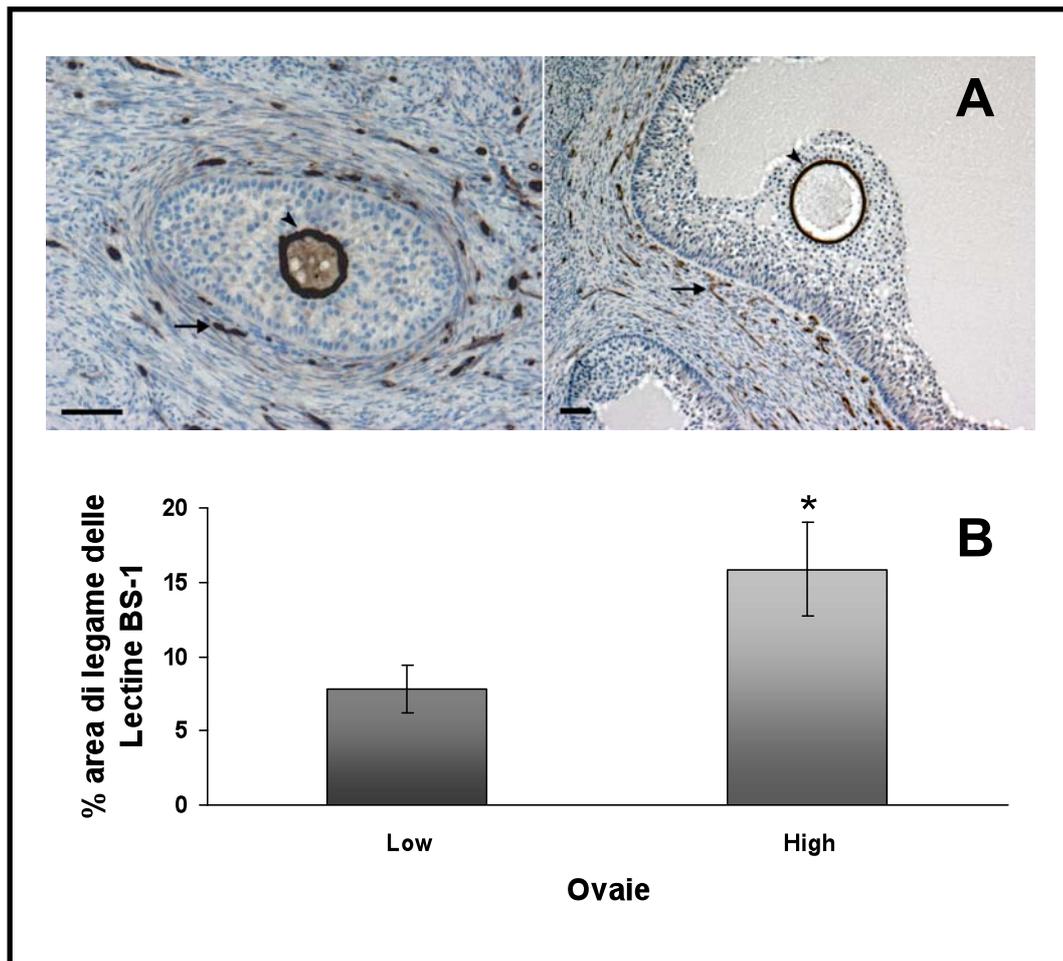


Figure 13: Localizzazione della lectina BS-1 a livello follicolare.

(A): immagini rappresentative della localizzazione del legame con la Lectina BS-1 in un follicolo pre-antrale (sinistra) e in un follicolo antrale medio (destra); le frecce indicano le cellule endoteliali dei vasi sanguigni, le punte di freccia indicano la positività della zona pellucida; le barre corrispondono a 50 μ m. **(B):** il grafico descrive la percentuale di area che presenta positività per il legame con le Lectine BS-1 e quindi il livello di vascolarizzazione dei follicoli antrali medi isolati da ovaie di bovino di tipo Lo e Hi; i valori sono espressi come media \pm errore standard e sono analizzati mediante ANOVA, seguita da Fisher protected LSD test; l'asterisco indica una differenza statisticamente significativa ($P < 0.05$).

Valutazione dell'espressione dell'ossido nitrico sintasi di tipo endoteliale

L'analisi immunohistochimica, condotta mediante anticorpi specifici per l'eNOS, ha permesso di verificare che la proteina è espressa durante tutta la follicologenesi. Nei follicoli preantrali, a partire dal follicolo primordiale, l'eNOS è localizzato nel citoplasma dell'ovocita e delle cellule follicolari e nei capillari della parete del follicolo, dove il segnale è particolarmente intenso (Figura 14-a). Nei follicoli antrali, sia precoci che medi, la proteina è presente nel citoplasma di alcune cellule della murale, immediatamente adese alla membrana basale del follicolo (Figura 14-b, c) e, nei follicoli medi, anche a livello del cumulo ooforo (Figura 14-d).

In tutte le classi, il citoplasma dell'ovocita presenta una leggera positività che, talvolta, si estende anche al nucleo (Figura 14-d) Inoltre l'eNOS è presente nell'endotelio dei vasi dello strato tecale (Figura 14-c).

La colocalizzazione di eNOS e Lectine BS-1 (Figura 14-e, f) conferma che eNOS è espresso anche nell'endotelio vasale. I controlli negativi non hanno mostrato alcuna colorazione sulle sezioni.

Non sono state rilevate differenze nella localizzazione dell'eNOS nelle ovaie Lo e Hi sia a livello follicolare che stromale.

Al contrario, l'analisi semi-quantitativa condotta su 10 follicoli provenienti da 4 animali con ovaie Hi e su 10 follicoli provenienti da 6 animali con ovaie Lo, a livello delle cellule della granulosa e della teca interna, valutata sulla percentuale di area positiva rispetto alla superficie totale del campione, ha evidenziato che i follicoli isolati dalle ovaie Lo esprimono

eNOS in maniera significativamente inferiore rispetto ai follicoli isolati da ovaie Hi (rispettivamente $6.18 \pm 0.94\%$ e $11.34 \pm 0.85\%$, $P < 0.001$; Figura 15).

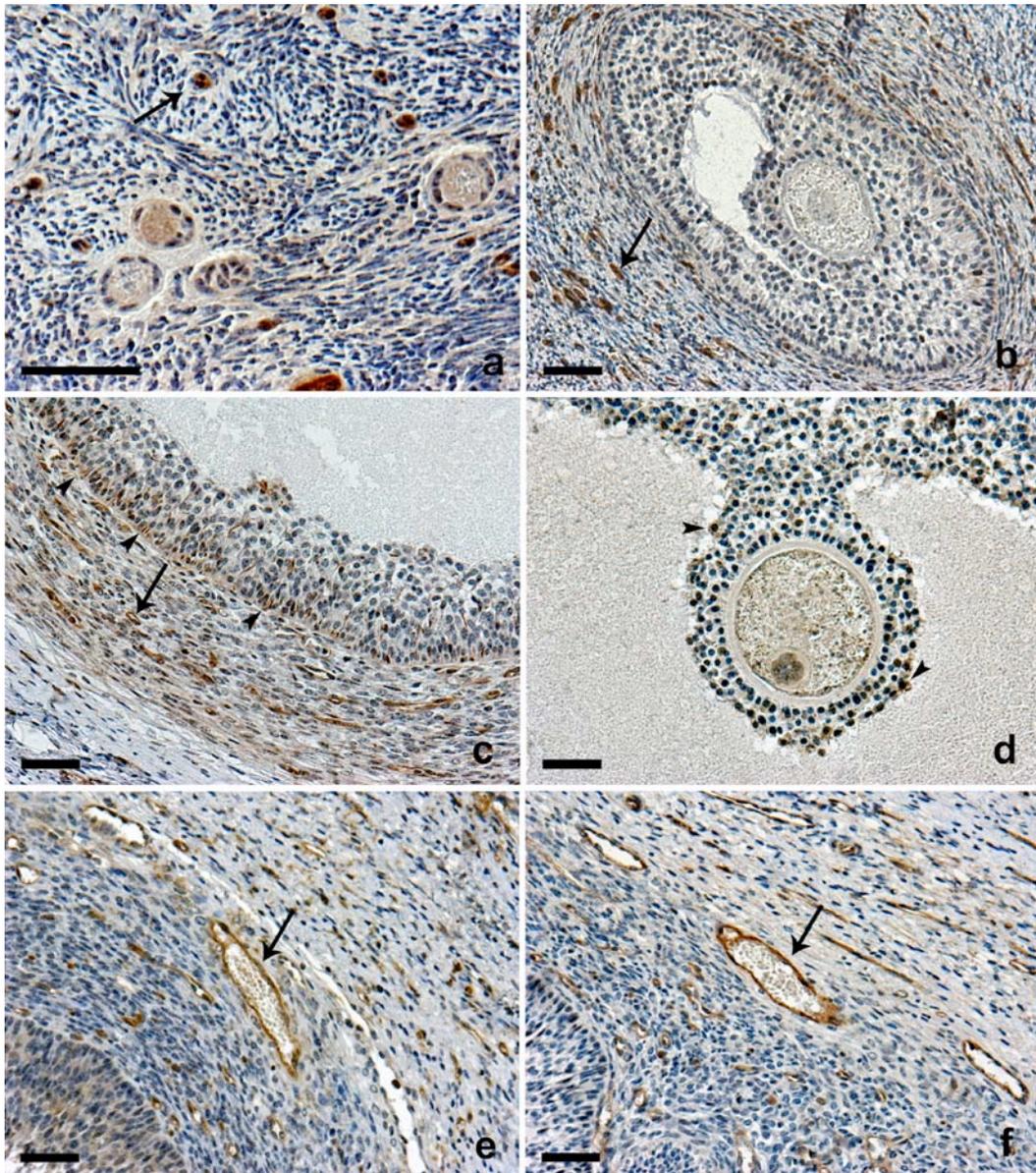


Figura 14: localizzazione della proteina eNOS nei follicoli primordiali e primari (**a**), in un follicolo antrale precoce (**b**), nella parete di un follicolo antrale medio (**c**), in un complesso cumulo-ovocita (**d**). Le frecce mostrano l'intensa colorazione dei capillari sanguigni (**a, b, c, e**), mentre le punte di freccia indicano la presenza dell'eNOS nelle cellule murali e del cumulo (**c, d**). La co-localizzazione dell'eNOS (**e**) e delle Lectine BS-1 (**f**),

come indicato dalle frecce, conferma la specificità dell'eNOS per l'endotelio vasale dei capillari sanguigni. Le barre corrispondono a 50 μm .

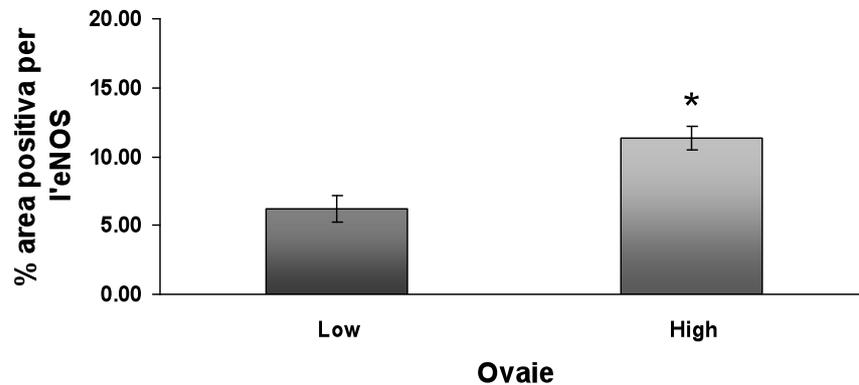


Figura 15: espressione proteica dell'eNOS nelle cellule della teca e della granulosa di follicoli antrali medi, morfologicamente sani, isolati da ovaie Lo e da ovaie Hi.

Il grafico rappresenta la percentuale di area che mostra positività in seguito alla reazione immunohistochimica. I valori sono espressi come media \pm errore standard e sono analizzati mediante ANOVA, seguita da Fisher protected LSD test. L'asterisco indica una differenza statisticamente significativa ($P < 0.001$).

Valutazione della componente connettivale perifollicolare

Per la valutazione dei livelli di connettivizzazione perifollicolare, sono stati presi in considerazione 27 follicoli isolati da 11 ovaie di tipo Lo e 23 follicoli isolati da 10 ovaie di tipo Hi. La colorazione istochimica Azan tricromica ha permesso di evidenziare che tutti i follicoli, indipendentemente dalle ovaie di provenienza, sono immersi in uno stroma in cui sono presenti fasci di fibre collagene; tuttavia, in alcuni casi, i fasci di fibre formano uno strato compatto e visibilmente apprezzabile che circonda in modo più o meno completo il follicolo (Figura 16-A). Questo ispessimento è maggiormente presente intorno ai follicoli delle ovaie di tipo Lo rispetto ai follicoli delle ovaie di tipo Hi (rispettivamente nel $57.27 \pm 12.92\%$ e nel $16.67 \pm 7.03\%$; $P < 0.05$; Figura 16-B).

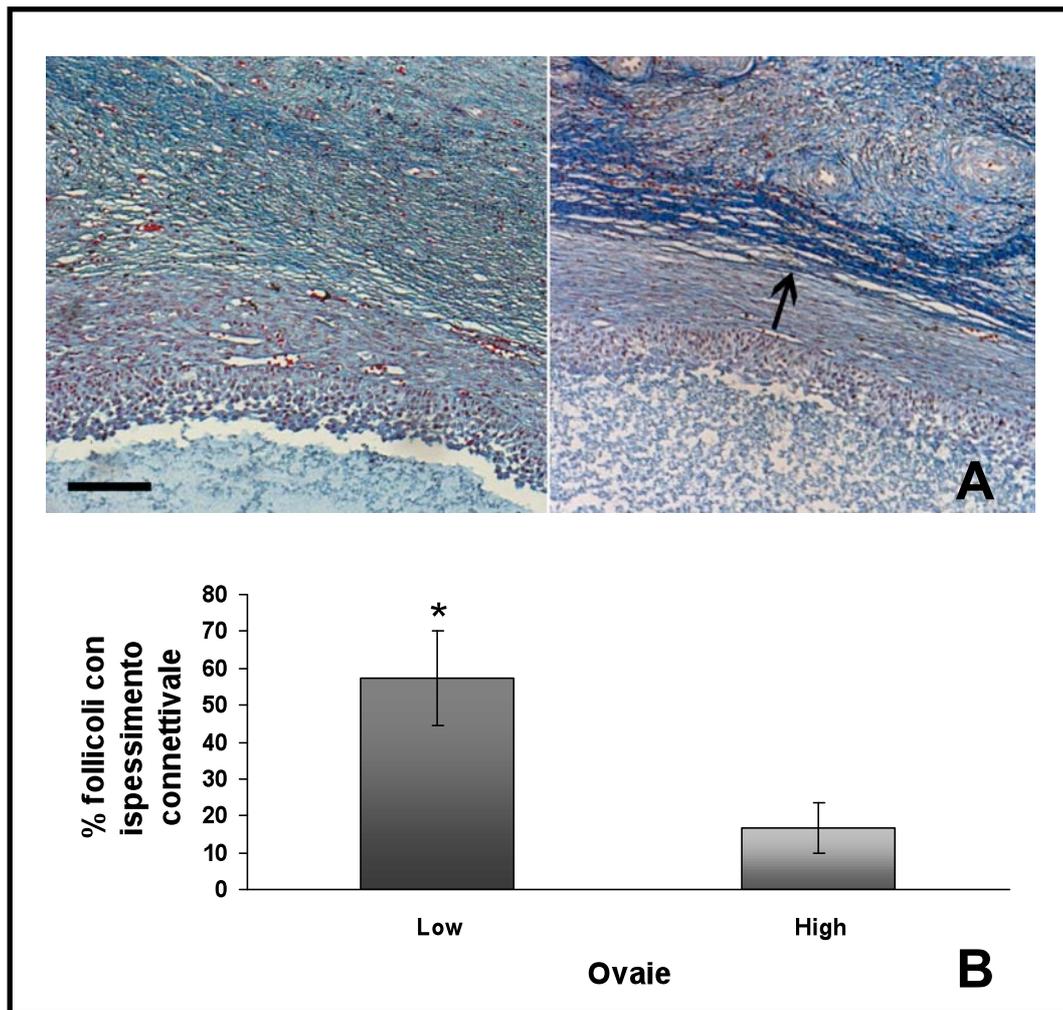


Figura 16: valutazione dell'ispessimento connettivale intorno ai follicoli antrali medi morfologicamente sani isolati da ovaie Lo e Hi, in seguito a colorazione con Azan tricromico.

Le immagini **(A)** mostrano un follicolo circondato da una regolare distribuzione di fibre collagene (sinistra) e un follicolo avvolto da un evidente ispessimento di fibre di collagene (destra; freccia); la barra corrisponde a 100 μ m.

Il grafico **(B)** mostra la percentuale di follicoli completamente o parzialmente circondati da un ispessimento connettivale sul totale dei follicoli considerati. I valori sono espressi come media \pm errore standard e

sono analizzati mediante ANOVA, seguita da Fisher protected LSD test.
L'asterisco indica una differenza statisticamente significativa ($P < 0.05$).

ANALISI DEGLI OVOCITI E PRODUZIONE IN VITRO DI EMBRIONI

Determinazione del contenuto intracellulare di GSH nell'ovocita denudato

Alla raccolta, i gameti isolati dai due tipi di ovaie mostrano un contenuto di GSH simile, mentre, come si può osservare dalla Tabella 2, dopo 24 h di maturazione, il contenuto di questo tiolo è significativamente superiore negli ovociti isolati da ovaie di tipo Hi, mentre non è stato osservato alcun aumento significativo del contenuto di GSH nei gameti di tipo Lo. La presenza di cisteamina nel medium di coltura durante 24h di IVM induce in entrambi i tipi di ovociti un aumento significativo della concentrazione di GSH, portando il quantitativo presente nei gameti isolati dalle ovaie Lo ai livelli di quello contenuto negli ovociti raccolti da quelle di tipo Hi.

	N	Tempo 0 h	N	Tempo 24 h
Lo	65	4.31 ± 0.41 ^a	55	4.36 ± 0.31 ^a
Lo+cisteamina	-	-	80	9.88 ± 0.77 ^c
Hi	85	4.51 ± 0.42 ^a	65	6.59 ± 0.39 ^b
Hi+cisteamina	-	-	85	10.45 ± 0.88 ^c

Tabella 2: contenuto di GSH (pmol/ovocita) all'interno di ovociti isolati da ovaie Lo e Hi, alla raccolta e coltivati in vitro per 24 ore sia in presenza che in assenza di cisteamina 100 µM. I valori sono espressi come media ± ES.(ANOVA, seguita da Fisher protected LSD test). a,b, e c indicano differenze significative (P < 0.05)

Localizzazione immunocitochimica dell'eNOS nell'ovocita denudato

L'analisi condotta mediante immunofluorescenza su 38 ovociti raccolti da ovaie Lo e 39 ovociti raccolti da ovaie di tipo Hi ha permesso di verificare che, come già dimostrato mediante le indagini immunocitochimiche condotte su sezione, l'eNOS si presenta diffuso in maniera omogenea nell'ooplasma e, in alcuni campioni, localizzato anche a livello di membrana della vescicola germinale (Figura 17). Tuttavia la quantità di proteina, valutata tramite analisi dell'immagine, non è risultata differente tra le due popolazioni di ovociti (54.61 ± 2.28 per le Lo e 51.70 ± 1.38 per le Hi; $P > 0.05$).

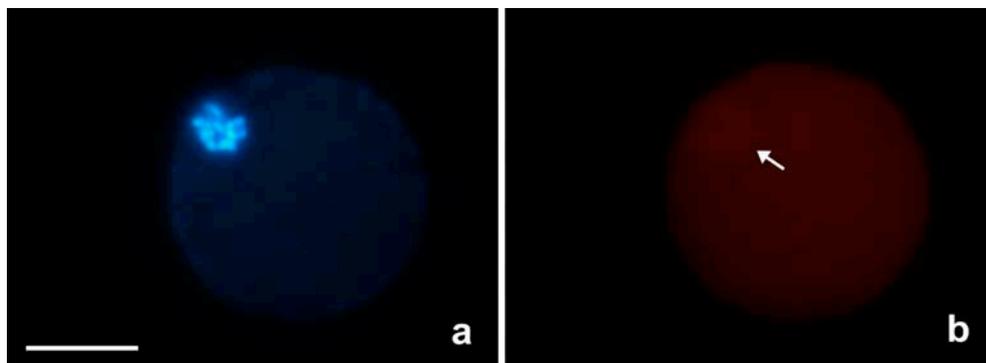


Figura 17: immunolocalizzazione dell'eNOS. La vescicola germinale è visibile in **(a)** colorata con DAPI. La proteina è uniformemente distribuita nell'ooplasma con una maggiore intensità in corrispondenza della vescicola germinale **(b, freccia)**. La barra corrisponde a 50 μm .

Valutazione dei parametri di sviluppo e qualità embrionale dopo somministrazione di ciste amina durante IVM

Come presentato in Tabella 3, l'aggiunta di cisteamina al medium di maturazione induce un aumento significativo del numero di ovociti isolati da ovaie Lo in grado di raggiungere lo stadio di blastocisti che, tuttavia, rimane significativamente inferiore alla percentuale di blastocisti ottenute dagli ovociti isolati dalle ovaie di tipo Hi. Questi ultimi, infine, non risentono della presenza del precursore del GSH nel medium di maturazione.

Trattamenti	N° ovociti	% Divisi (d+2)	% Blastocisti sui divisi (d+8)	% Blastocisti sul totale (d+8)	Numero cellule
Lo	201	86.9 ± 1.3 ^a	7.2 ± 1.9 ^a	6.2 ± 1.6 ^a	84.9 ± 6.9
Lo + cisteamina	196	84.3 ± 3.1 ^a	24.2 ± 3.8 ^b	20.1 ± 2.9 ^b	96.5 ± 6.2
Hi	212	94.9 ± 0.5 ^b	36.1 ± 2.6 ^c	34.2 ± 2.4 ^c	88.9 ± 5.4
Hi + cisteamina	218	96.4 ± 1.2 ^b	34.6 ± 3.9 ^c	33.3 ± 3.8 ^c	99.8 ± 5.8

Tabella 3: effetti della somministrazione di cisteamina durante la maturazione di COC prelevati da ovaie Lo e Hi. I valori sono espressi come media ± ES (ANOVA, seguita da Fisher protected LSD test).

a,b,c indicano differenze significative ($P < 0.05$).

Valutazione dei parametri di sviluppo e qualità embrionale dopo somministrazione di molecole donatrici di NO durante IVM

SNAP

L'effetto dell'aggiunta di SNAP durante la maturazione in vitro dell'ovocita è stata valutata su un pool di 232 COC raccolti da ovaie Lo, di cui 120 assegnati al gruppo trattato con SNAP e 112 al gruppo di controllo negativo e 237 COC raccolti da ovaie di tipo Hi, di cui 119 assegnati al gruppo trattato con SNAP e 118 COC al gruppo di controllo negativo.

Gli ovociti isolati dalle ovaie Lo hanno mostrato una ridotta potenzialità di sviluppo embrionale rispetto agli ovociti isolati dalle ovaie Hi, calcolata sulla percentuale di blastocisti ottenute dopo 7 giorni di cultura in vitro ($13.66 \pm 2.86\%$ e $29.84 \pm 5.65\%$, rispettivamente; $P < 0.05$; Figura 18-A).

L'aggiunta di SNAP al medium di maturazione ha portato un modesto aumento della percentuale di blastocisti ottenute dagli ovociti raccolti dalle ovaie Lo, portandola a valori statisticamente simili a quelli ottenuti dagli ovociti raccolti da ovaie Hi ($20.42 \pm 4.3\%$ e $29.84 \pm 5.65\%$, rispettivamente; $P > 0.05$; Figura 18-A), mentre non ha avuto alcun effetto sulla percentuale di blastocisti ottenute degli ovociti raccolti da ovaie Hi (Figura 18-A). D'altra parte la percentuale di blastocisti sgusciate risulta significativamente diminuita negli ovociti provenienti da ovaie Hi che vengono maturati in presenza di SNAP.

Inoltre la somministrazione di SNAP ha aumentato la percentuale di blastocisti sgusciate ottenute dagli ovociti isolati dalle ovaie Lo, anche se non in modo statisticamente significativo (Figura 18-A).

Dal punto di vista qualitativo (Figura 19), non sono state osservate differenze rispetto al numero di cellule per blastocisti (Figura 18-B), come pure rispetto alla percentuale di cellule caspasi-positivo, indice di apoptosi precoce (valutati mediante il CaspaTag Pan-Caspase in situ Assay kit) sia in presenza che in assenza del NO donor SNAP durante la maturazione in vitro (Figura 18-C).

Al contrario, la valutazione dei quadri di apoptosi avanzata, effettuata mediante l'intercalante nucleare ioduro di propidio, ha messo in evidenza che l'aggiunta di SNAP diminuisce in modo significativo la percentuale di cellule con nuclei apoptotici nelle blastocisti derivate da ovociti raccolti da ovaie Lo, rendendola paragonabile a quanto osservato nelle ovaie Hi (Figura 18-C).

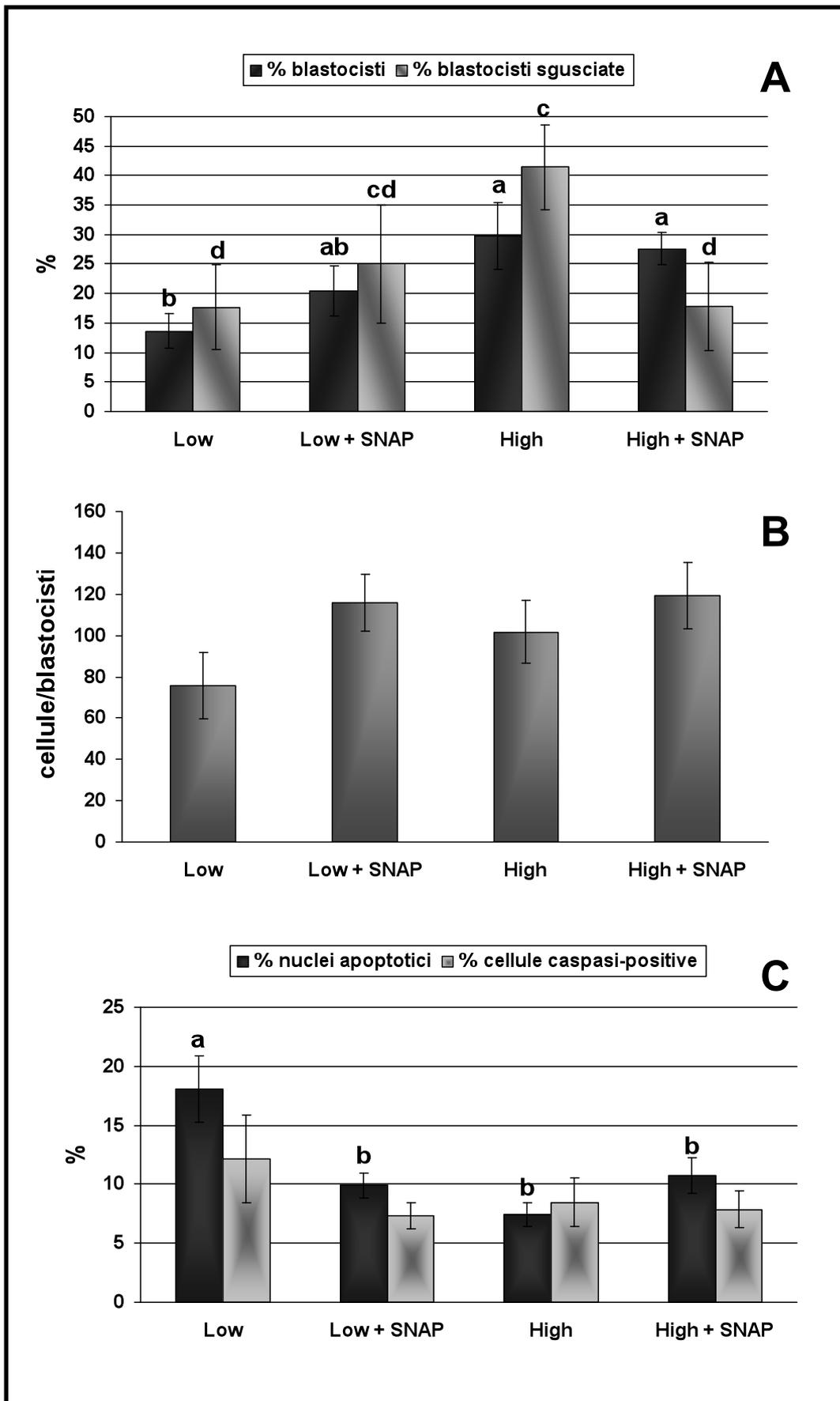


Figura 18: Effetto della somministrazione di SNAP durante l'IVM sulla capacità di sviluppo embrionale di ovociti isolati da ovaie Lo e Hi.

(A) effetto della somministrazione di SNAP sulla percentuale di blastocisti e sulla percentuale di blastocisti sguasciate. I valori sono espressi come media \pm errore standard e sono analizzati mediante ANOVA, seguita da Fisher protected LSD test.

a, b indicano differenze statisticamente significative ($P < 0.05$) nella percentuale di blastocisti.

c, d indicano differenze statisticamente significative ($P < 0.05$) nella percentuale di blastocisti sguasciate.

(B) effetto della somministrazione di SNAP sul numero di cellule per blastocisti. I valori sono espressi come media \pm errore standard e sono analizzati mediante ANOVA, seguita da Fisher protected LSD test.

Non esistono differenze statisticamente significative tra i gruppi sperimentali.

(C) effetto della somministrazione di SNAP sulla percentuale di nuclei apoptotici e di cellule caspasi-positive per blastocisti. I valori sono espressi come media \pm errore standard e sono analizzati mediante ANOVA, seguita da Fisher protected LSD test.

a, b indicano differenze statisticamente significative ($P < 0.05$) nella percentuale di nuclei apoptotici per blastocisti.

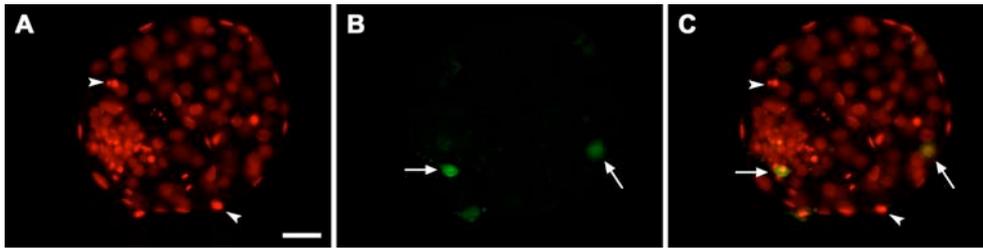


Figura 19: analisi qualitativa delle blastocisti tramite CaspaTag Pan-Caspase in situ Assay kit. I nuclei totali e apoptotici (caratterizzati da cromatina condensata e degradata; punte di freccia) sono visibili in **(A)** colorati di rosso con il propidio ioduro, mentre le cellule caspasi-positive (freccie) sono visibili in **(B)**, colorate di verde con fluoresceina. In **(C)** è visibile la sovrapposizione delle immagini precedenti. La barra corrisponde a 50 μm .

SNP

L'effetto dell'aggiunta di SNP durante la maturazione in vitro è stato valutato su un pool di 169 COC raccolti da ovaie Lo, di cui 83 assegnati al gruppo trattato con SNP e 86 al gruppo di controllo negativo e 137 COC raccolti da ovaie di tipo Hi, di cui 78 assegnati al gruppo trattato con SNP e 95 COC al gruppo di controllo negativo.

L'aggiunta di SNP al medium di maturazione non ha influenzato né la percentuale di blastocisti né la percentuale di blastocisti sgucciate, ottenute dagli ovociti isolati da entrambi le categorie di ovaie (Figura 20-A).

Dal punto di vista qualitativo, non sono state osservate differenze nel numero di cellule per blastocisti (Figura 20-B), come pure nella percentuale di cellule caspasi-positive e di cellule con nuclei in avanzato stato di apoptosi, come evidenziato dalla morfologia dei nuclei colorati con propidio ioduro (Figura 20-C).

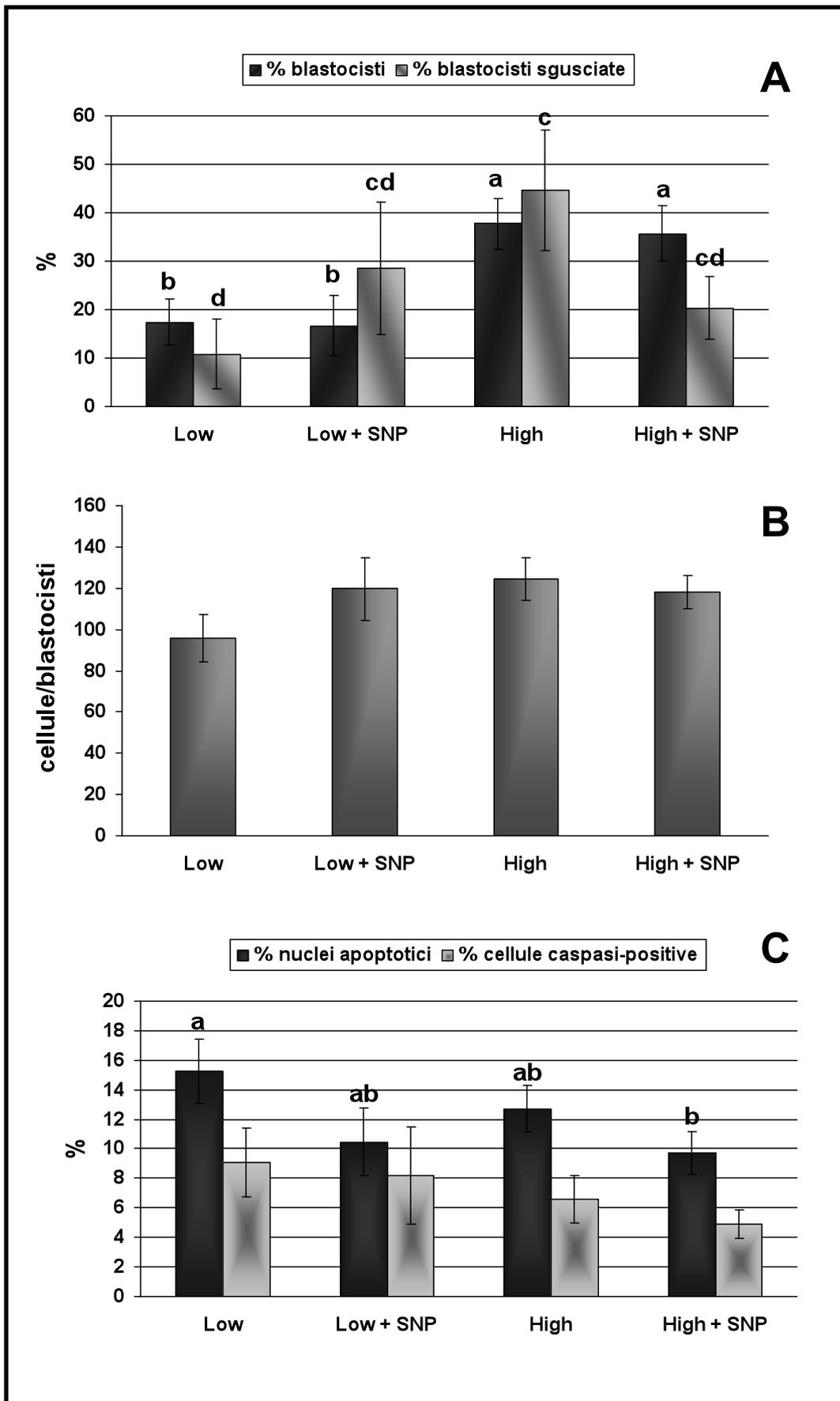


Figura 20: Effetto della somministrazione di SNP durante l'IVM sulla capacità di sviluppo embrionale di ovociti isolati da ovaie Lo e Hi.

(A) effetto della somministrazione di SNP sulla percentuale di blastocisti e sulla percentuale di blastocisti sgusciate. I valori sono espressi come media \pm errore standard e sono analizzati mediante ANOVA, seguita da Fisher protected LSD test.

a, b indicano differenze statisticamente significative ($P < 0.05$) nella percentuale di blastocisti; c, d indicano differenze statisticamente significative ($P < 0.05$) nella percentuale di blastocisti sgusciate.

(B) effetto della somministrazione di SNP sul numero di cellule per blastocisti. I valori sono espressi come media \pm errore standard e sono analizzati mediante ANOVA, seguita da Fisher protected LSD test. Non esistono differenze statisticamente significative tra i gruppi sperimentali.

(C) effetto della somministrazione di SNP sulla percentuale di nuclei apoptotici e di cellule caspasi-positive per blastocisti. I valori sono espressi come media \pm errore standard e sono analizzati mediante ANOVA, seguita da Fisher protected LSD test.

a, b indicano differenze statisticamente significative ($P < 0.05$) nella percentuale di nuclei apoptotici per blastocisti.

Analisi del cariotipo degli ovociti

L'analisi del cariotipo, effettuata su 40 ovociti raccolti da ovaie Lo e 57 ovociti raccolti da ovaie Hi, maturati in vitro, ha rivelato che i gameti raccolti dalle ovaie Lo hanno una percentuale di aneuploidia significativamente maggiore degli ovociti raccolti dalle ovaie Hi (59.89 ± 13.58 e $20.75 \pm 3.91\%$, rispettivamente; $P < 0.05$; Figura 22 e Figura 23).

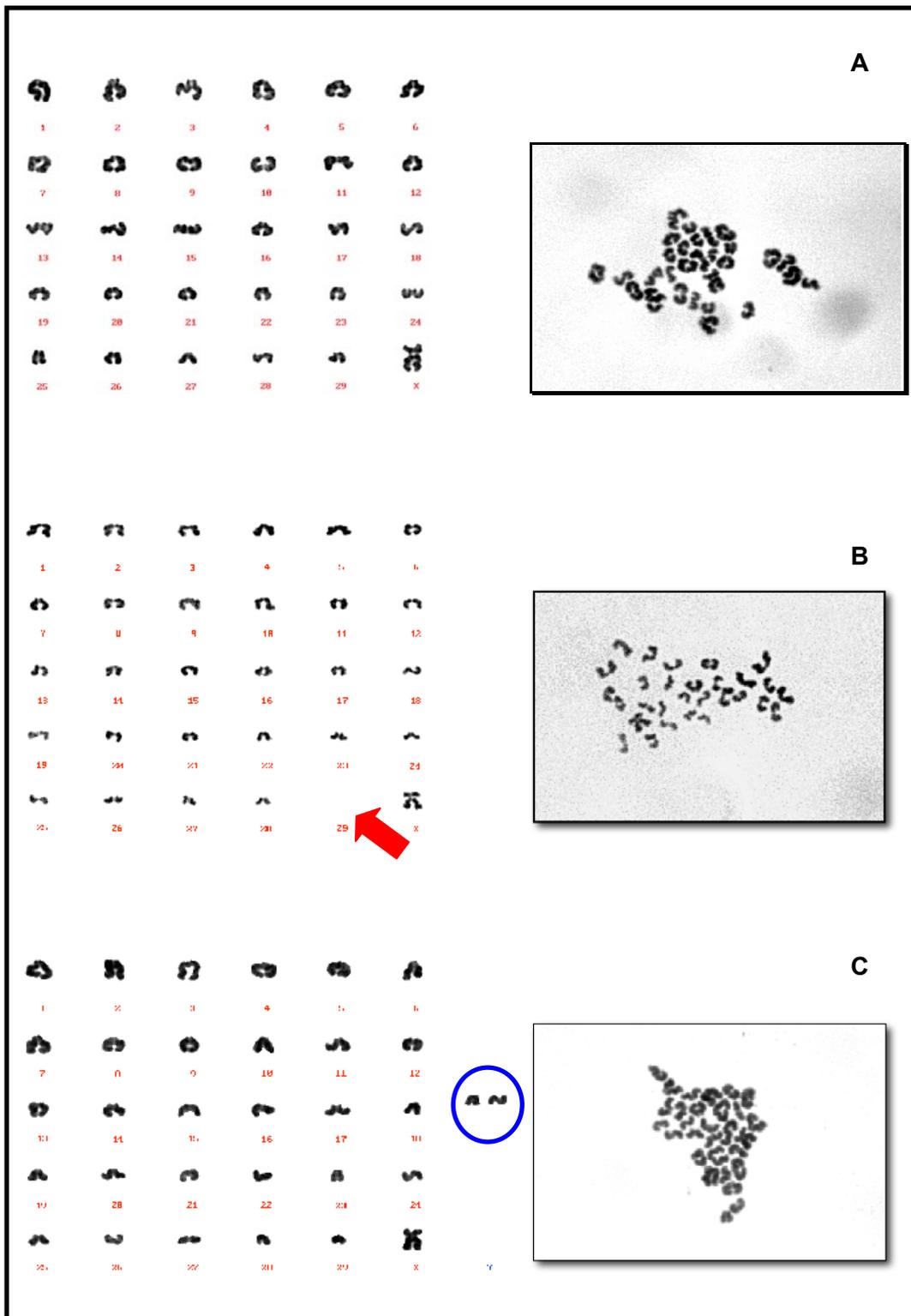


Figura 22: immagini rappresentative dei cromosomi (sinistra) e dei relativi cariogrammi (destra) ottenute da ovociti raccolti da ovaie Lo e Hi, dopo maturazione in vitro.

(A) esempio di assetto cromosomico euploide (30,X) da un ovocita isolato da un ovaio Hi.

(B) esempio di assetto cromosomico ipoploide (29,X) da un ovocita isolato da un ovaio Lo; la freccia rossa indica il cromosoma mancante.

(C) esempio di assetto cromosomico iperploide (32,X) da un ovocita isolato da un ovaio Lo; il cerchio blu indica i due cromosomi in eccesso.

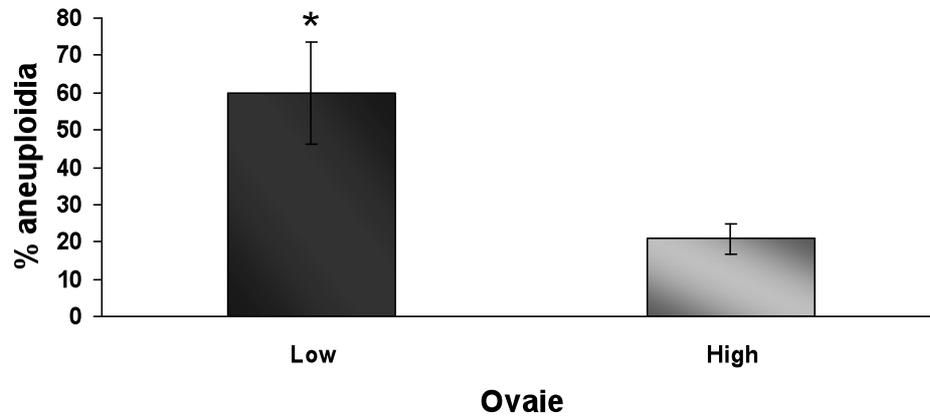


Figura 23: analisi del cariotipo negli ovociti maturati in vitro, raccolti da ovaie di tipo Lo e di tipo Hi.

(A) percentuale di aneuploidia nelle piastre metafasiche di ovociti dopo IVM; i valori sono espressi come media \pm errore standard e sono analizzati mediante ANOVA, seguita da Fisher protected LSD test.

L'asterisco indica una differenza statisticamente significativa ($P < 0.05$).

Valutazione dell'attività mitocondriale

L'analisi dell'attività mitocondriale è stata condotta su 42 ovociti isolati da ovaie Hi e 30 ovociti isolati da ovaie Lo.

I risultati, riportati in Figura 24, sono stati ottenuti mediante l'utilizzo di coloranti fluorescenti specifici per i mitocondri, ed evidenziano che al momento dell'isolamento dall'ambiente ovarico gli ovociti derivanti da ovaie Hi sono caratterizzati da un Ratio MTO/MTG, indice del $\Delta \psi$ mitocondriale, significativamente più elevato rispetto agli ovociti isolati da ovaie Lo. Questo rapporto decresce significativamente nel corso dell'IVM, fino ad arrivare a valori simili per entrambe le categorie dopo 24 ore di coltura.

Come illustrato in Figura 24 A e B, i mitocondri sono distribuiti in modo eterogeneo nella zona corticale dell'ovocita. Non sono state rilevate differenze nella localizzazione dei mitocondri nelle due categorie di gameti, né al momento dell'isolamento, né in seguito a IVM.

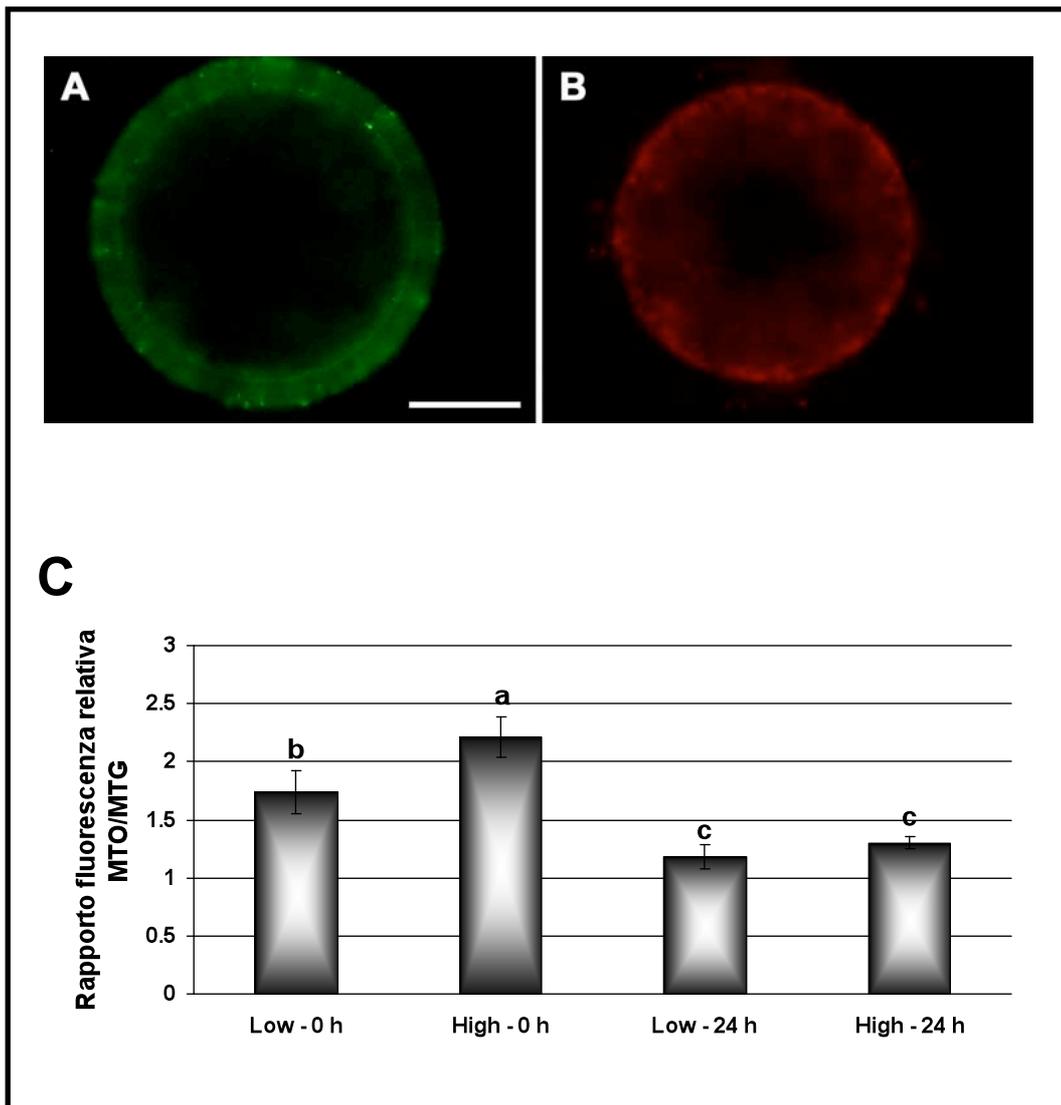


Figura 24: analisi dell'attività mitocondriale in ovociti immaturi (0 ore) e allo stadio di metafase II (24 ore), raccolti da ovaie Lo e da ovaie Hi.

(A-B) immagini esemplificativa della distribuzione della popolazione di mitocondri totali **(A)** e della popolazione di mitocondri attivi **(B)** negli ovociti immaturi. La barra corrisponde a 50 μm .

(C) Rapporto tra la fluorescenza relativa di MTO e MTG nelle due popolazioni di ovociti provenienti da ovaie di tipo Hi e Lo. I valori sono espressi come media \pm errore standard e sono analizzati mediante ANOVA, seguita da Fisher protected LSD test.

a, b, c indicano una differenza statisticamente significativa ($P < 0.05$).

VALUTAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE FOLLICOLARE DI PROGESTERONE, ESTRADIOLO E ORMONE ANTI-MULLERIANO

Come mostrato nei grafici della Figura 21, la concentrazione di progesterone, valutata mediante RIA, è risultata essere significativamente maggiore nei liquidi follicolari aspirati dalle ovaie Lo rispetto a quella dei liquidi raccolti dalle ovaie Hi (95.35 ± 11.23 e 57.87 ± 11.99 ng/ml, rispettivamente; $P < 0.05$; Figura 21-A). Al contrario la concentrazione di estradiolo è risultata essere maggiore nei fluidi follicolari delle ovaie Hi rispetto a quelli delle Lo (4.58 ± 0.86 e 2.53 ± 0.25 ng/ml, rispettivamente; $P < 0.05$; Figura 21-A). Il rapporto estradiolo/progesterone è quindi superiore nei follicoli delle ovaie Hi rispetto ai follicoli delle ovaie Lo (0.28 ± 0.08 e 0.04 ± 0 , rispettivamente; $P < 0.05$; Figura 21-B). L'analisi di questi profili ormonali è stata effettuata su 5 campionamenti per ogni popolazione ovarica.

L'analisi della concentrazione di AMH, valutata mediante ELISA kit, ha dimostrato come questo ormone sia significativamente maggiore nei liquidi follicolari delle ovaie di tipo Hi, rispetto alle ovaie di tipo Lo (584.25 ± 34.70 e 354.64 ± 77.80 , rispettivamente; $P < 0.05$; Figura 21-C). La quantificazione dell'AMH è stata effettuata su 17 campioni raccolti da ovaie Lo e su 25 campioni raccolti da ovaie Lo.

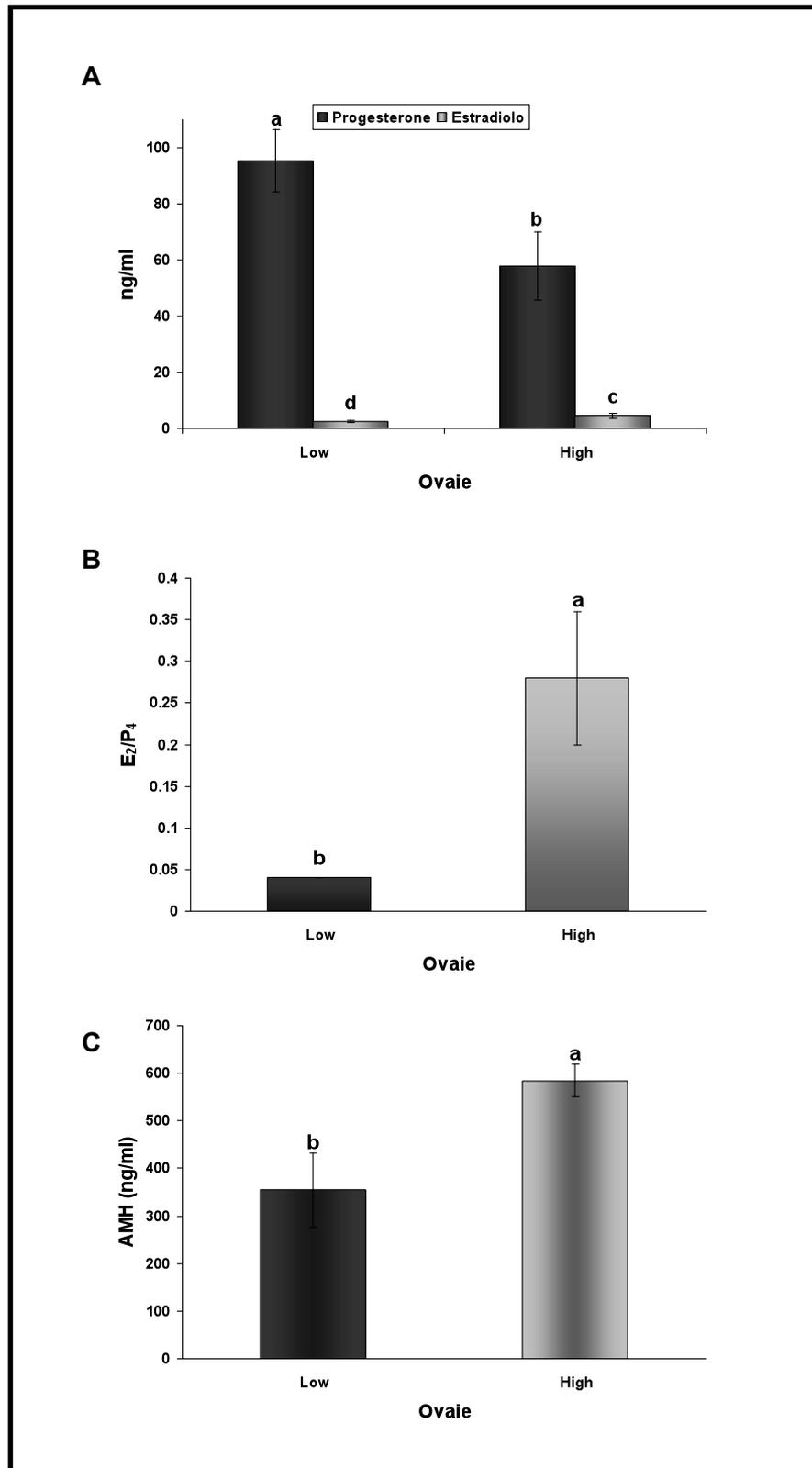


Figura 21: Concentrazione di E_2 , P_4 e AMH nei liquidi follicolari raccolti da follicoli antrali medi appartenenti ad ovaie Lo e Hi.

(A) concentrazione di P_4 ed E_2 ; i valori, espressi come media \pm errore standard, sono stati analizzati mediante ANOVA, seguita da Fisher protected LSD test.

a, b indicano differenze statisticamente significative ($P < 0.05$) nella concentrazione di P_4 .

c, d indicano differenze statisticamente significative ($P < 0.05$) nella concentrazione di E_2 .

(B) rapporto tra E_2 e P_4 nei liquidi follicolari; i valori, espressi come media \pm errore standard, sono stati analizzati mediante ANOVA, seguita da Fisher protected LSD test.

a, b indicano differenze statisticamente significative ($P < 0.05$).

(C) concentrazione di AMH nei liquidi follicolari; i valori, espressi come media \pm errore standard, sono stati analizzati mediante ANOVA, seguita da Fisher protected LSD test.

a, b indicano differenze statisticamente significative ($P < 0.05$).

DISCUSSIONE

Le nostre ricerche ci hanno permesso di caratterizzare alcuni eventi cellulari e molecolari coinvolti nella scarsa competenza allo sviluppo embrionale di ovociti raccolti da bovine che presentavano ovaie con un ridotto numero di follicoli antrali medi (ovaie Lo).

L'età e la razza degli animali da cui sono state raccolte le ovaie Lo, gli aspetti morfo-funzionali dell'ovaio e degli ovociti e la valutazione di alcuni parametri endocrinologici indicativi di un declino riproduttivo ci hanno permesso di delineare un quadro indicativo di un prematuro invecchiamento della gonade femminile.

Le bovine da latte ad alta produzione presentano problemi di ipofertilità caratterizzati da alterazioni dei cicli estrali (a volte completamente assenti, a volte anovulatori, a volte non manifesti), dovuti per lo più a patologie ovariche o a scarsa attività del corpo luteo. Presentano, inoltre, difficoltà di impianto e di successivo sviluppo embrionale, che secondo alcuni autori potrebbero essere imputabili ad una scarsa qualità dell'ovocita. Infine, fra le cause di ipofertilità, vanno considerate anche l'incapacità dell'utero e/o della placenta di sostenere la gravidanza. Per i motivi qui sopra elencati, questi soggetti vengono riformati, pur essendo in età fertile [388, 395, 441].

Questa ricerca ha preso spunto da quanto osservato nel corso di due precedenti studi condotti nel nostro laboratorio [412, 413], nei quali abbiamo dimostrato che gli ovociti raccolti da ovaie con un numero ridotto di follicoli medi antrali (< 10 - ovaie Lo) presentano una competenza al successivo sviluppo embrionale inferiore a quella degli ovociti raccolti da ovaie con un numero di follicoli superiore a 10 (ovaie Hi).

Partendo da queste osservazioni, durante **la prima fase** della ricerca abbiamo stabilito che le ovaie Lo appartengono a bovine di razza Frisona Italiana di un'età compresa fra i 4 e gli 8 anni, le quali, dal punto di vista cronologico, dovrebbero essere ancora in piena attività riproduttiva.

In questo contesto, è interessante notare che, sebbene presso la struttura alla quale ci rivolgiamo, arrivino bovine di un'età compresa fra i 2-18 anni, il 68% di esse corrisponde a soggetti di età compresa fra i 4-8 anni; di queste il 96% appartiene alla razza Frisona.

Ci siamo quindi dedicati alla valutazione di alcuni aspetti morfologici, macroscopici e microscopici, delle ovaie di tipo **Lo**, prendendo in considerazione le dimensioni e il peso, la consistenza delle riserve follicolari ed il quadro isto-fisiologico, con particolare attenzione al grado di connettivizzazione ed allo stato di vascolarizzazione dell'organo.

Queste indagini ci hanno permesso di ipotizzare, anche sulla base di dati presenti in letteratura, per lo più nella specie umana, che le gonadi da noi studiate presentano caratteristiche tipiche degli organi invecchiati.

Le ovaie di tipo Lo, infatti, hanno dimensioni e peso inferiori rispetto a quelle di tipo Hi, consistenza fibrosa e colore molto chiaro dovuti all'abbondanza della componente stromale. Le osservazioni macroscopiche trovano riscontro nelle analisi microscopiche, sia istologiche che istochimiche, che evidenziano la presenza di spessi e disordinati fasci di fibre collagene, soprattutto a livello della parte profonda della corticale dell'organo.

Quadri simili sono stati descritti nelle ovaie di donne in menopausa o affette da precoce invecchiamento ovarico [387, 442-446].

Nella donna, l'ovaio invecchiato è più piccolo, come si può chiaramente osservare tramite ecografia vaginale [442, 443] o tramite un esame istologico [447]. Presenta un aspetto raggrinzito [447], diverse alterazioni della vascolarizzazione [448], può contenere granulomi, cicatrici ialine e cisti da inclusione epiteliale [447] attribuibili a processi di rimodellamento del corpus albicans [449]. Presenta, inoltre, aree prive di epitelio germinativo che lasciano esposto lo stroma sottostante [450]. Un altro aspetto interessante dell'ovaio invecchiato è rappresentato dalle alterazioni della vascolarizzazione, dovute a depositi di collagene e glicogeno nella parete dei vasi con conseguente diminuzione del lume [444]. Si osservano inoltre variazioni numeriche e strutturali delle anastomosi arteriose [448].

Le dimensioni dell'ovaio invecchiato dipendono principalmente dal numero e dalle dimensioni dei corpora albicantia, che derivano dall'involutione dei corpi lutei. Sono strutture allungate, composte nella parte centrale da fibroblasti che producono collagene, da macrofagi sia nella parte centrale sia in quella periferica e da miofibroblasti localizzati nella parte periferica [444]; queste strutture permangono nell'ovaio per molti anni.

Durante la vita riproduttiva, la corticale e la midollare ovarica possono essere facilmente distinte: nella corticale sono presenti i follicoli a vari stadi di sviluppo, nella midollare è presente tessuto connettivo lasso con fibre elastiche, qualche miocita, vasi ematici e linfatici e nervi [447]. Nell'ovaio invecchiato, invece, la distinzione tra corticale e midollare non è più così netta e la corticale tende a ridursi. L'ovaio risulta impoverito di follicoli e composto prevalentemente da tessuto fibroso, corpora albicantia, vasi e nervi. La perdita di follicoli e i diversi cambiamenti dell'ovaio sono dovuti principalmente a fenomeni apoptotici [451-454].

Quadri del tutto sovrapponibili sono stati descritti nelle gonadi femminili di soggetti affetti da un invecchiamento precoce dell'organo in età fertile [387].

Le analisi microscopiche effettuate su sezioni di ovaie Hi e Lo hanno evidenziato che alla riduzione del numero dei follicoli antrali medi corrisponde un decremento dell'intera popolazione follicolare. La corticale delle ovaie Lo appare depauperata di strutture follicolari, anche

appartenenti agli stadi più precoci della follicologenesi, infatti il numero di follicoli preantrali e antrali precoci, rapportata alle dimensioni dell'ovaio di provenienza, è inferiore del 50% rispetto a quello delle ovaie Hi. E' interessante notare che questa grossa differenza è imputabile alla diminuzione della riserva di follicoli primordiali.

Accanto alle variazioni quantitative, si osservano anche variazioni qualitative della popolazione di follicoli primordiali; le percentuali di degenerazione follicolare sono decisamente elevate (circa 75%) rispetto a quanto osservato durante gli altri stadi della follicologenesi e nelle ovaie di tipo Hi (circa 50%).

Lavori precedenti hanno valutato i tassi di atresia durante la follicologenesi, evidenziando, sempre nei follicoli primordiali, percentuali molto maggiori (95%) rispetto a quelle calcolate in questo studio, a parità di età dell'animale [71]. Questa discrepanza potrebbe essere dovuta all'approccio più accurato utilizzato nei nostri studi per valutare gli aspetti di atresia.

La deplezione follicolare che si osserva con l'avanzare dell'età nella donna è un fatto ormai assodato; per spiegarla sono stati proposti modelli matematici [106, 400] che dimostrano come questo fenomeno subisca un'accelerazione intorno ai 37-38 anni [78, 106, 400]. Tuttavia i meccanismi attraverso i quali avviene questo processo non sono stati ancora del tutto chiariti.

Del tutto recentemente è stato osservato che questo fenomeno corrisponde a un aumento della densità dei vasi sanguigni a livello dello strato più superficiale della corticale ovarica [455].

Si è ipotizzato che sia la stessa scomparsa dei follicoli primordiali ad indurre un aumento della vascolarizzazione, oppure che intervengano fattori angiogenici secreti dai follicoli in crescita. Sebbene, infatti, durante l'invecchiamento ovarico si osservino frequenti fenomeni di atresia dei follicoli attivati, posti nello stato più profondo della corticale [129], i fattori angiogenetici secreti dai capillari delle cellule tecali in regressione potrebbero permanere nello stroma e diffondere fino alla corticale [455].

In alternativa, questo fenomeno potrebbe essere considerato una risposta ai processi di ialinizzazione che si osservano nei vasi della midollare e dello strato più profondo della corticale con l'avanzare dell'età [456] che porta ad una obliterazione del lume e conseguente riduzione dell'apporto di ossigeno [457].

Partendo da questi possibili meccanismi è stato ipotizzato che l'incremento dei fenomeni angiogenici nella corticale delle gonadi invecchiate potrebbe consentire il passaggio di segnali regolatori dell'arresto e della crescita dei follicoli, prodotti localmente, quali il testosterone, l'AMH, il "kit-ligand", il "growth differentiation factor 9" ed altri [458]. Questi fattori potrebbero quindi attivare i follicoli primordiali e contribuire alla deplezione follicolare che si osserva con l'avanzare dell'età [400]. D'altra parte, mediante modelli murini transgenici, è stato dimostrato

che la soppressione dell'attivazione follicolare è un fenomeno necessario per preservare la riserva ovarica. La perdita di funzionalità di una delle molecole inibitorie, tra cui "phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10" (PTEN), Foxo3a, p72 e foxl2 determina un'attivazione prematura e irreversibile del pool dei follicoli primordiali fino ad un esaurimento della riserva; questo potrebbe essere una delle cause della precoce perdita di funzionalità dell'ovaio di mammifero [73, 76, 459].

Dopo aver preso in considerazione la morfologia delle ovaie, nella **seconda fase** di questo studio abbiamo cercato di valutare possibili alterazioni funzionali dell'organo e del gamete che potessero essere alla base della ridotta qualità degli ovociti che derivano dai follicoli delle ovaie con fenotipo Lo. La qualità dell'ovocita è, infatti, strettamente correlata all'ambiente in cui il gamete stesso cresce e si differenzia [13, 460, 461]. Disturbi dell'ovogenesi dovuti a fattori ambientali o a cambiamenti nello stato di salute o nella fisiologia materna possono compromettere la qualità dell'ovocita, causando arresti dello sviluppo embrionale, riduzione della fertilità e difetti epigenetici che si ripercuotono sulla salute della progenie. Tra i molti i cambiamenti che possono verificarsi nell'ambiente ovarico nel corso della vita riproduttiva, le alterazioni della vascolarizzazione perifollicolare e follicolare possono giocare un ruolo determinante [75, 137, 462].

Le nostre ricerche hanno evidenziato che i follicoli antrali medi delle ovaie Lo presentano una vascolarizzazione perifollicolare ridotta rispetto a quelli delle ovaie Hi. Poiché la qualità dell'ovocita dipende dalla quantità di ossigeno che riceve dai capillari tecali attraverso le cellule della granulosa, il liquido follicolare e la zona pellucida, nonché dal giusto apporto di fattori nutrizionali, di crescita e gonadotropine [147], possiamo ipotizzare che la scarsa qualità dei gameti proveniente dalle ovaie di tipo Lo sia riconducibile all'incapacità dei follicoli di provenienza di sviluppare un sufficiente apporto ematico.

Nella donna, indagini ultrasonografiche hanno permesso di caratterizzare la popolazione follicolare in base alla vascolarizzazione. Da questi studi è emerso che ci sono follicoli nei quali l'apporto ematico è variabile [140, 463], limitato ad alcune aree del follicolo o addirittura assente [156, 464, 465]. Inoltre, la situazione vascolare in un ovaio può essere estremamente eterogenea [464]. Quando lo stato di vascolarizzazione perifollicolare è stato messo in relazione con l'esito dei cicli di fecondazione in vitro, è stata osservata una correlazione positiva [140-142]. L'analisi di ovociti maturati in vivo ha inoltre mostrato differenze significative nella percentuale di gameti con anomalie del citoscheletro e aneuploidie provenienti da follicoli omogeneamente vascolarizzati (<5%) e da follicoli scarsamente vascolarizzati (>35%) [156, 466].

L'angiogenesi e la degenerazione dei capillari durante la crescita del follicolo, è stata descritta anche nella specie bovina, dove si è visto come

uno spostamento dell'equilibrio verso l'uno o l'altro di questi fenomeni rifletta differenze nel microambiente follicolare, determinando il destino del follicolo stesso [137, 462]. Inoltre, studi recenti hanno dimostrato come il mantenimento della vascolarizzazione e un appropriato apporto ematico siano essenziali per stabilire la dominanza del follicolo; solo un follicolo dominante con un buon grado di vascolarizzazione può avere possibilità di raggiungere la maturazione finale e ovulare [467].

Nella donna, la ridotta vascolarizzazione perifollicolare rappresenta uno dei fattori ambientali sicuramente coinvolti nella senescenza [138, 155]. Infatti, le alterazioni osservate in ovociti maturi isolati da donne anziane, quali anomalie del fuso meiotico e dei cromosomi, ricordano la situazione osservata in gameti raccolti da donne giovani, ma il cui follicolo di provenienza presenta una ridotta vascolarizzazione e un minor contenuto di ossigeno [155, 156]. D'altra parte, sempre nella donna, la diminuzione del flusso ematico nell'area perifollicolare [129, 157] porta a un aumento della concentrazione di VEGF nel liquido follicolare [158-160] e questo è probabilmente il sintomo di una sovraespressione trascrizionale da parte delle cellule della granulosa e della teca stimulate dall'"hypoxia-inducible factor-1", per prevenire l'esaurimento dell'ossigeno e la morte cellulare [161, 162]. L'hypoxia-inducible factor-1 è, infatti, un fattore di trascrizione prodotto dalle cellule della granulosa e della teca come risposta allo stimolo delle gonadotropine [163] e attivato da basse concentrazioni di ossigeno [164]; questo fattore gioca un ruolo centrale nella regolazione

dei processi angiogenetici dell'ovaio [160] e nella crescita dei follicoli [165]. L'incapacità delle cellule della granulosa e della teca di compensare l'ipossia anche in presenza di elevati livelli di VEGF potrebbe essere dovuta ad una minore sensibilità delle cellule endoteliali al fattore di crescita oppure ad un aumento della distanza tra il letto capillare perifollicolare e il follicolo stesso, come confermato da studi istologici condotti su sezioni di ovaio di donne in età avanzata [138].

Partendo quindi dall'ipotesi formulata in base alla descrizione macroscopica dell'ovaio, secondo la quale le ovaie di tipo Lo potrebbero appartenere a soggetti affetti da un precoce invecchiamento riproduttivo, abbiamo valutato se la ridotta vascolarizzazione, accertata mediante l'utilizzo della Lectina BS-1, fosse accompagnata anche da ipertrofia connettivale dell'area perifollicolare, la quale potrebbe contribuire a creare una barriera fisica che impedisce il corretto apporto di nutrienti e ossigeno nell'ambiente follicolare.

L'indagine istochimica ha effettivamente permesso di verificare che quasi il 60% dei follicoli antrali medi delle ovaie Lo è circondato da un ispessimento dello stroma connettivale circostante e che questo è presente solo nel 20% dei follicoli delle ovaie Hi.

Queste osservazioni sono in accordo con diversi studi dove è stato osservato che le ovaie di donne in menopausa come pure quelle affette da "premature ovarian failure" presentano un assottigliamento della corticale che difficilmente si distingue dalla midollare, anche per la

riduzione del numero di follicoli e la presenza di un'abbondante quantità di tessuto fibroso [387, 444].

Secondo la nostra ipotesi quindi, alla base della ridotta competenza degli ovociti provenienti dalle ovaie Lo potrebbe esserci una condizione di ipossia nell'ambiente follicolare, che potrebbe portare ad alterare i meccanismi che controllano lo stress ossidativo causando quindi sofferenza per l'ovocita.

Questa situazione è aggravata anche dal fatto che, al termine della fase di crescita, l'ovocita presenta un aumento del metabolismo ossidativo [205]. La produzione di energia è, infatti, fondamentale per ovociti ed embrioni ed è necessaria per supportare lo sviluppo durante le fasi embrionali pre-impianto. La generazione di energia da parte della cellula dipende soprattutto dalla fosforilazione ossidativa, un processo che utilizza l'ossigeno quale substrato. L'ossigeno diventa, così, un indice dell'attività metabolica totale degli ovociti e degli embrioni [468]. Utilizzando modelli di coltura embrionale in vitro, è stato dimostrato che la sovra-produzione di ROS intracellulari durante le prime fasi di sviluppo embrionale si ripercuote sul metabolismo ed è dannosa per la sopravvivenza embrionale [173, 469].

Poiché molte ricerche in ambito biologico e clinico sostengono il coinvolgimento dei danni da stress ossidativo nell'invecchiamento ovarico [89], in questa fase abbiamo valutato la capacità degli ovociti di

proteggersi dagli stress ossidativi, attraverso la quantificazione del glutatione (GSH) [207].

Il GSH viene sintetizzato durante la maturazione dell'ovocita [219-223] e rappresenta il principale meccanismo di difesa non enzimatico dell'ovocita stesso contro i radicali dell'ossigeno [207]. La sua sintesi inizia con la ripresa della meiosi e termina con l'arresto dell'ovocita in MII [470, 471]. L'accumulo di GSH ottenuto al completamento della meiosi è inoltre essenziale nella formazione del pronucleo maschile al momento della fecondazione [470] e favorisce lo sviluppo dell'embrione pre-impianto [219, 472]. Poiché un'insufficiente difesa dallo stress ossidativo viene messa in relazione con la bassa qualità e vitalità embrionale, la quantità di GSH nell'ovocita diventa un fattore critico, in quanto il suo livello diminuisce in seguito alla fecondazione e rimane basso durante le prime fasi di sviluppo embrionale [473].

Sebbene non siano state riscontrate differenze nella concentrazione di GSH negli ovociti provenienti da ovaie Lo e Hi al momento del loro isolamento, dopo 24 ore di maturazione è stato osservato un innalzamento significativo del contenuto della molecola negli ovociti provenienti da ovaie Hi indicando un coinvolgimento dei meccanismi di sintesi/accumulo del GSH. Infatti, la somministrazione di un precursore come la cisteamina durante la maturazione in vitro, è in grado di recuperare, anche se solo parzialmente, il contenuto di GSH negli ovociti

Lo e di indurre un aumento significativo della capacità di sviluppo embrionale degli ovociti Lo.

Alterazioni della concentrazione del GSH ed in generale dei sistemi antiossidanti sono fortemente legate alle disfunzioni associate all'invecchiamento [209]. Infatti, con il progredire dell'età, si osserva un graduale abbassamento dei livelli cellulari di GSH [210-212], probabilmente in seguito a una diminuzione dell'attività delle g-glutamylcisteina ligasi e delle glutathione sintetasi [213], della g-cistationasi [214] e della glutathione reduttasi [215, 216]. Bassi livelli di GSH sono, infatti, stati descritti in ovociti di topi invecchiati [474].

Diversi studi suggeriscono che il NO, analogamente al GSH, è coinvolto nella prevenzione dei danni dovuti all'invecchiamento, grazie alla sua capacità di eliminare le ROS [172, 425, 475]. Infatti la somministrazione di NO può determinare una riduzione dei danni causati dall'invecchiamento dell'ovocita, quali alterazioni delle dinamiche dei microtubuli, esocitosi dei granuli corticali e indurimento della zona pellucida, mentre la somministrazione di inibitori delle NOS causa un peggioramento di tutti questi parametri [425]. Il NO è quindi in grado di prevenire l'invecchiamento dell'ovocita funzionando anche da antiossidante, vista la sua capacità di interagire con le specie reattive dell'ossigeno e altri radicali.

Il NO è una molecola ubiquitaria e una componente fondamentale del microambiente dell'ovocita dalla follicologenesi fino alle prime fasi dello sviluppo embrionale [288]. Insieme all'enzima deputato alla sua sintesi, l'eNOS, media importanti processi fisiologici quali la follicologenesi, la steroidogenesi, l'ovulazione, la maturazione dell'ovocita e lo sviluppo embrionale [244, 476], oltre ad essere coinvolto nell'angiogenesi follicolare.

Partendo quindi da questi presupposti, abbiamo voluto verificare se e come il sistema dell'eNOS/NO fosse coinvolto nell'acquisizione della competenza allo sviluppo degli ovociti raccolti dalle ovaie di tipo Lo, caratterizzate da un basso numero di follicoli antrali e con evidenti segni di invecchiamento precoce.

Le nostre indagini hanno evidenziato che l'eNOS è presente durante tutta la follicologenesi, sia nelle ovaie Lo che in quelle Hi, senza alcuna apparente differenza rispetto alla sua localizzazione nei vari distretti dei follicoli. Nei follicoli preantrali, a partire dal follicolo primordiale, l'eNOS è localizzato nel citoplasma dell'ovocita e delle cellule follicolari e dove presente, anche nelle cellule tecali e nei vasi che le circondano. Nei follicoli antrali la proteina è presente nel citoplasma di alcune cellule della granulosa, soprattutto a livello della murale e del cumulo ooforo. In tutti gli stadi della follicologenesi, il citoplasma dell'ovocita presenta una leggera positività che, talvolta, si estende anche al nucleo.

I nostri risultati completano le osservazioni condotte da Pires sempre nel bovino [278], introducendo una più dettagliata descrizione della localizzazione della proteina durante la follicologenesi in questa specie. Nel bovino, infatti, la proteina eNOS era già stata identificata nelle cellule endoteliali dei vasi dei follicoli soprattutto dominanti [149], oltre che nelle cellule della granulosa durante tutta la follicologenesi, nel corpo luteo e nell'epitelio germinativo [278].

L'eNOS è espresso nelle ovaie, oltre che di bovino [149, 278, 477], anche di ratto [275, 285, 478], di maiale [277, 479], di topo [276, 480] e di ovino [148, 481].

La localizzazione dell'eNOS osservata in questo lavoro trova riscontro in quanto descritto nel ratto da Jablonka-Shariff [275]. In questo studio, gli autori riportano la presenza di eNOS nelle cellule della teca e della granulosa di follicoli di animali trattati con gonadotropina del siero di cavalla gravida (PMSG), mentre, negli animali che non hanno subito il trattamento, solo le cellule della teca risultano positivamente marcate, suggerendo che l'espressione di questa proteina avvenga con modalità diverse durante la crescita e lo sviluppo del follicolo.

Risultati analoghi a quelli ottenuti nel ratto sono stati ottenuti anche nel maiale. Diversi lavori hanno infatti dimostrato la presenza di eNOS in tutti i follicoli, a partire dallo stadio primordiale, con un aumento del segnale nei follicoli antrali [277, 479, 482]. In questi studi però la positività per eNOS è limitata agli ovociti, alle cellule della teca e ai vasi sanguigni. Nessun

segnale è stato evidenziato nelle cellule del cumulo ooforo. Questa discrepanza rispetto ai nostri risultati potrebbe essere dovuta alla differenza di specie e/o all'età degli animali esaminati. Per lo studio condotto nel maiale infatti non sono state utilizzate ovaie provenienti da animali adulti, come nei nostri esperimenti, bensì ovaie di animali prepuberi (con meno di 10 mesi d'età), non ancora ciclanti, confermando ulteriormente il fatto che l'espressione di questa proteina sia influenzata dalle gonadotropine.

D'altra parte, Takesue e collaboratori [483] hanno dimostrato, mediante esperimenti condotti in vitro, sempre nel maiale, che l'FSH è in grado di incrementare i livelli di mRNA codificante l'enzima eNOS in cellule della granulosa coltivate in vitro.

Analoghi risultati sono stati ottenuti da Van Voorhis [242] nel ratto, dimostrando che la stimolazione delle ovaie di ratto con FSH induce un aumento dell'espressione di mRNA codificante eNOS nei diversi compartimenti del follicolo e dell'ovaio, mentre, in assenza di stimolazione, l'eNOS è presente solo a livello dei vasi sanguigni.

Nel topo, Mitchell [276] ha ottenuto risultati molto simili ai nostri, evidenziando l'eNOS nelle cellule della teca, nella granulosa e nei vasi sanguigni. Nella pecora, l'espressione dell'mRNA e della proteina dell'eNOS cambiano durante la crescita e l'atresia follicolare [148]. L'RNA messaggero è stato ritrovato nelle cellule della granulosa e della teca [148], mentre la proteina è stata immunolocalizzata esclusivamente nei

vasi della teca interna ed esterna dei follicoli sani. Si è quindi ipotizzato che l'espressione proteica dell'eNOS segua il pattern di sviluppo vasale durante la follicologenesi [139].

Riguardo la localizzazione ovocitaria, sia la proteina sia l'mRNA sono stati trovati nel citoplasma di ovociti di bovino durante vari stadi della follicologenesi [278], come pure in altre specie, quali il ratto [484], il maiale [479, 482] e il topo [276]. Anche negli ovociti isolati, sia immaturi sia maturati in vitro, è stato identificato l'eNOS, in forma di piccoli granuli uniformemente distribuiti nel citoplasma [278, 485], in accordo con quanto osservato nei roditori [275, 288] e negli embrioni ai primi stadi di sviluppo [485].

La localizzazione dell'eNOS che abbiamo osservato nelle cellule della granulosa durante tutta la follicologenesi sostiene l'ipotesi che queste cellule siano direttamente coinvolte nella sintesi del NO presente nel liquido follicolare [249, 486].

Non avendo osservato differenze di localizzazione dell'eNOS nelle due popolazioni di ovaie, abbiamo svolto un'analisi semi-quantitativa dell'espressione della proteina negli ovociti raccolti dai follicoli antrali medi e nella parete di questi stessi follicoli. Non abbiamo riscontrato differenze fra l'ooplasma degli ovociti raccolti dalle ovaie Lo e Hi, mentre abbiamo osservato una minore espressione di eNOS nel comparto tecale e nelle cellule della granulosa dei follicoli antrali medi delle ovaie Lo. Questa

considerazione, accompagnata dalla dimostrazione di una ridotta vascolarizzazione, suggerisce che la ridotta competenza allo sviluppo degli ovociti isolati dalle ovaie Lo possa essere una conseguenza di alterazioni della vascolarizzazione e di una riduzione della disponibilità di NO nel liquido follicolare, che deriva da un sistema eNOS/NO deficitario a livello del microambiente follicolare, più che nel gamete stesso.

Il sistema NOS/NO ricopre un ruolo importante nell'ovulazione, probabilmente inducendo un aumento della produzione di prostaglandine e, di conseguenza, nei processi infiammatori coinvolti nell'ovulazione [284]. Nel ratto, i livelli di eNOS nella teca e dello stroma aumentano in concomitanza dell'ovulazione [285]. Topi knock out per il gene di eNOS mostrano un potenziale ovulatorio ridotto in seguito a trattamenti di superovulazione [287, 487].

Il NO sembra essere coinvolto anche nel processo di maturazione dell'ovocita; topi privi del gene per eNOS ovulano, infatti, ovociti non maturi, arrestati in MI o che mostrano configurazioni cromosomiche anomale [288]. Un'altra conferma del ruolo fondamentale del NO nella maturazione dell'ovocita arriva dal lavoro di Huo [488] che dimostra come l'inibizione selettiva dell'iNOS blocchi gli ovociti di topo allo stadio di profase della prima divisione meiotica. Gli stessi autori dimostrano anche che l'iNOS si localizza a livello della GV negli ovociti immaturi e rimane in prossimità dei cromosomi nelle fasi successive della maturazione, tanto che è possibile osservare la positività a livello di piastra metafasica. La

nostra osservazione riguardo la localizzazione dell'eNOS a livello della GV potrebbe far supporre che nella specie bovina questo enzima abbia una modalità d'azione simile a quella dell'iNOS nel maiale.

Per confermare l'ipotesi che la bassa competenza degli ovociti osservata nelle ovaie Lo possa essere causata, tra l'altro, da un sistema eNOS/NO difettivo, abbiamo cercato di ristabilire la necessaria concentrazione di NO durante la maturazione in vitro, mediante molecole donatrici di NO, valutando l'effetto di tale aggiunta sul successivo sviluppo embrionale.

L'invecchiamento dell'ovocita è, infatti, accompagnato da anomalie cellulari e molecolari; queste alterazioni possono essere prevenute, ritardate o annullate in varia misura. La modulazione delle condizioni di coltura o il trattamento degli ovociti con vari agenti, tra i quali la caffeina, il DL-ditiotreitolo, la tricostatina A o, appunto, l'ossido nitrico possono correggere pathways molecolari compromessi dall'invecchiamento e migliorare le possibilità di successo delle tecniche di riproduzione assistita [89, 130].

La scelta delle molecole donatrici di NO si è basata su quanto emerso in letteratura negli ultimi anni, sia nel topo che nel bovino. Numerosi autori hanno infatti messo a punto protocolli di modulazione delle concentrazioni del NO durante la maturazione e/o lo sviluppo embrionale, mediante donatori di NO [279, 280, 289, 294, 295, 425, 426, 489-491] o inibitori del NOS [485, 490, 492]. Molti di questi sono stati sviluppati nella specie bovina [294, 426, 485, 489, 493].

Nel nostro sistema di IVM, l'aggiunta di SNAP 100 μM ha migliorato, se pur in modo non significativo, la percentuale di embrioni prodotti in vitro, sia allo stadio di blastocisti che di blastocisti sgusciate ottenute dagli ovociti raccolti dalle ovaie Lo, portandole a livelli paragonabili a quelli raggiunti dagli ovociti isolati da ovaie Hi, mentre non ha prodotto alcun effetto positivo sugli ovociti provenienti dalle ovaie Hi, dove, al contrario ha causato una diminuzione della percentuale di blastocisti sgusciate.

Questi risultati, e l'ultimo in particolare, sembrano suggerire un effetto positivo del donatore di NO solo negli ovociti provenienti da follicoli in cui il sistema eNOS/NO sembrerebbe compromesso, mentre non vi è alcun effetto negli ovociti provenienti da follicoli in cui questo sistema è integro e la concentrazione di NO è presumibilmente ottimale. Tutto questo potrebbe essere frutto dell'effetto dose-dipendente che è stato osservato da numerosi autori nei sistemi in vitro nella specie bovina come in altre specie [289, 426, 494].

In precedenti lavori sul bovino in particolare, l'aggiunta di SNAP 10 μM , durante la maturazione in vitro di ovociti raccolti da ovaie che normalmente danno una corretta percentuale di blastocisti, migliora la competenza allo sviluppo embrionale [292]; invece, alte dosi di SNAP (10 μM - 1 mM) incidono negativamente sulla capacità dell'ovocita di maturare in vitro [292].

A conferma che l'effetto del NO sulla maturazione può essere stimolante o inibitorio a seconda della sua concentrazione, anche in altre specie sono

stati osservati effetti dose-dipendenti dopo la somministrazione di SNAP durante l'IVM, ad esempio nel topo [289, 295, 425], nel ratto [279] e nel maiale [282, 495].

Dai nostri esperimenti è emerso che l'aggiunta di SNAP al medium di maturazione non induce differenze qualitative negli embrioni ottenuti, sia per quanto riguarda il numero di cellule per blastocisti sia per quanto riguarda la percentuale di cellule con quadri precoci di morte nucleare programmata, evidenziata dalla presenza di caspasi, senza differenza tra i gruppi sperimentali. I dati ottenuti ci permettono quindi di ipotizzare che la dose di SNAP impiegata in questo protocollo sperimentale non migliora la qualità delle blastocisti, valutata in termini di numero di blastomeri, né esercita un effetto anti-apoptotico. Tuttavia, è in grado di rallentare, se non bloccare, i fenomeni di morte cellulare, anche se solo nelle blastocisti ottenute da ovociti di ovaie Lo, nei quali i quadri di apoptosi sono imponenti e significativamente maggiori rispetto a quelli presenti negli embrioni derivati da Hi.

Il NO svolge, infatti, un'azione che può essere pro-apoptotica o anti-apoptotica [496] a seconda delle condizioni di coltura [479], tanto che, pur agendo in un intervallo di concentrazioni molto ristretto, spesso esercita funzioni opposte [289]. Concentrazioni elevate di NO durante l'IVM potrebbero causare un aumento dell'apoptosi nell'embrione. La composizione del medium di maturazione può infatti aumentare i fenomeni apoptotici embrionali, alterando l'espressione di geni coinvolti nella

sopravvivenza e nell'apoptosi cellulare nell'embrione, senza compromettere gli stessi geni negli ovociti [497, 498].

L'apoptosi è stata frequentemente associata con la qualità embrionale, sebbene non è ancora stato chiarito il limite superato il quale questo processo, necessario per lo sviluppo dell'embrione, diventa dannoso [499]. Le conseguenze dell'apoptosi nell'embrione sono difficili da misurare e la competenza allo sviluppo non sembra essere strettamente in relazione con l'apoptosi nell'ovocita, nelle cellule del cumulo o nell'embrione [499]. Vandaele [431] ha osservato che i fenomeni di apoptosi in un embrione di otto giorni non sono correlati alla qualità dell'ovocita di partenza; questi autori ipotizzano che l'effetto della qualità dell'ovocita termina prima che l'embrione diventi blastocisti.

Risultati tendenzialmente simili, anche se non significativi dal punto di vista statistico, si sono ottenuti aggiungendo l'SNP 10 μ M al medium di maturazione, a differenza di quanto osservato da Viana [426], sempre nel bovino, in presenza delle medesime dosi di questo donatore di NO.

Il miglioramento della maturazione citoplasmatica, come pure l'incremento della percentuale di blastocisti, osservate da questi autori, potrebbero essere dovute alle diverse condizioni sperimentali applicate. La letteratura del bovino è infatti piuttosto discorde riguardo all'effetto dell'SNP, in quanto sembra influenzare maturazione e sviluppo embrionale in modo differente e addirittura opposto a seconda sia della concentrazione sia del

sistema di coltura [294, 426, 475, 489]. Anche nel topo sono descritti effetti contrastanti; l'aggiunta di basse concentrazioni (0.1 μM) di SNP durante la maturazione stimola infatti il raggiungimento della MII, ma blocca lo sviluppo embrionale nel passaggio da morula a blastocisti, se aggiunto al medium di coltura [280]. Inoltre una concentrazioni di SNP maggiore (1mM) durante la coltura embrionale induce l'arresto dello sviluppo allo stadio di 4 cellule [280].

Nel maiale, la coltura di follicoli pre-antrali con SNP 300 μM inibisce la formazione dell'antro e l'IVM con SNP 100 μM riduce la percentuale di estrusione del primo globulo polare [479].

Il mancato effetto della somministrazione di SNP durante l'IVM potrebbe essere dovuto al fatto che SNAP e SNP producono NO secondo modalità diverse [500, 501].

La dimostrazione che la somministrazione in vitro di NO riesce parzialmente a ristabilire la qualità dei gameti provenienti da ovaie di tipo Lo, mentre non ha effetto su ovociti per i quali la concentrazione di NO è presumibilmente ottimale, conferma il coinvolgimento del sistema eNOS/NO follicolare nel raggiungimento della competenza al successivo sviluppo embrionale.

I nostri dati portano quindi a supporre che l'ambiente dei follicoli antrali medi delle ovaie Lo possa risentire di stress ossidativi a causa di una

diminuita vascolarizzazione perifollicolare accompagnata da una sorta di isolamento dall'ambiente circostante.

Le nostre osservazioni sui sistemi del GSH e dell'eNOS/NO, entrambi coinvolti nella protezione dagli effetti deleteri delle ROS, sostengono questa ipotesi. D'altra parte la capacità anti-ossidante dei liquidi follicolari è stata recentemente messa in relazione con l'efficienza delle tecnologie di riproduzione assistita nella donna in rapporto all'età materna [502].

Che la qualità dei gameti ed in particolare del gamete femminile risenta degli stress ossidativi, sia in vitro che in vivo, è ormai un fatto accertato [503]. Più recentemente, studi condotti sia in campo biologico che clinico hanno associato lo stress ossidativo alla diminuita competenza allo sviluppo dell'ovocita provenienti da ovaie invecchiate [89].

Partendo da queste osservazioni, abbiamo voluto verificare nel nostro modello sperimentale se una compromissione del metabolismo ossidativo intrafollicolare fosse in relazione ad alterazioni nucleari e citoplasmatiche. È stato dimostrato che un ambiente follicolare fortemente compromesso e probabilmente ipossico determina un aumento degli errori di disgiunzione dei cromosomi, anche causati da una alterata funzionalità mitocondriale [303, 304].

Lo studio sugli eventi di aneuploidia condotto in questa ricerca ha evidenziato un aumento significativo della percentuale di divisioni

asimmetriche dei cromosomi al termine della prima divisione meiotica (MII) tra ovociti Lo e ovociti Hi (rispettivamente 60% e 21%, $P < 0.05$).

Fenomeni di aneuploidia, legati all'età, sono stati descritti negli ovociti di topo [504, 505] e di donna [506, 507] con percentuali molto variabili nei diversi studi, che raggiungono punte del 47% [508]; nella specie bovina i dati presenti in letteratura, seppur piuttosto scarsi, descrivono le percentuali di aneuploidia nei sistemi in vitro. Un recente lavoro ha stimato, grazie alla metodica dell'ibridazione in situ (FISH), che la percentuale di aneuploidia per ogni singolo cromosoma è dell'1% e che i cromosomi hanno tutti la stessa probabilità di essere soggetti ad asimmetrie di divisione [509]; gli autori hanno quindi ipotizzato una frequenza di aneuploidia media del 30% negli ovociti bovini maturati in vitro. Questa frequenza, simile a quella che abbiamo osservato nel gruppo di controllo, è alta se paragonata alle percentuali (circa 7%) riportate precedentemente nel bovino [510, 511] per le quali erano state usate le tecnologie di citogenetica tradizionali, ma è molto vicina ai valori ottenuti nel maiale sempre con la FISH. Infatti, circa il 27% degli ovociti di maiale maturati in vitro sono risultati aneuploidi [512], mentre i metodi convenzionali indicavano percentuali del 4-5% [513, 514].

Nell'embrione la maggior parte delle aberrazioni del numero di cromosomi derivano dall'ovocita e l'età materna è considerata il fattore chiave di

rischio nella donna [308], come nel topo [504] e nelle scimmie [515]. La probabilità di gravidanze trisomiche (un embrione con un cromosoma sovrannumerario) aumenta drammaticamente con l'età, dal 2% per una donna di 20 anni al 35% per una donna di 40 [516]. La maggior parte delle trisomie e tutte le monosomie autosomali non sono vitali e le poche che lo sono determinano gravi problemi di sviluppo. Generalmente le aneuploidie embrionali derivano, come già accennato, dall'ovocita piuttosto che dallo spermatozoo e, in particolare, da errori nella segregazione dei cromosomi durante la prima divisione meiotica [506]. La frequenza di questi errori aumenta con l'età materna e sembra essere dovuta al prolungato arresto meiotico dallo sviluppo fetale fino alla ripresa della meiosi nell'adulto. Sebbene l'importanza di questo problema sia universalmente riconosciuta, le basi molecolari che stanno alla base dell'aneuploidia legata all'invecchiamento sono tuttora sconosciute [504]. Le ipotesi avanzate includono possibili difetti nel processo di ricombinazione, l'inefficienza del sistema dello "spindle assembly checkpoint" e la prematura perdita della coesione tra cromosomi [506, 517].

Anche nei topi invecchiati (60-70 settimane) si è riscontrata una maggiore incidenza di ovociti anuploidi rispetto a topi più giovani (6-8 settimane) [518]. Recenti studi hanno identificato dei trascritti espressi in modo differenziale negli ovociti vecchi rispetto ai giovani; questi trascritti riguardano il sistema dello "spindle assembly checkpoint", che ne risulta compromesso e non più in grado di controllare il corretto legame tra

microtubuli e cromosomi prima dell'anafase [518]. Questo meccanismo non sembra comunque essere l'imputato principale dell'aneuploidia legata all'età [519]. Difatti, i cinetocori dei cromatidi fratelli sono più lontani sia durante la metafase I sia durante la metafase II negli ovociti di topi anziani (16-19 mesi) rispetto agli ovociti dei topi giovani (6-14 settimane) [504]. Questo suggerisce che la coesione dei centromeri potrebbe essere indebolita negli ovociti di animali vecchi. Poiché questa coesione si stabilisce durante la fase pre-meiotica, durante la vita fetale, e perdurare fino alla ripresa della meiosi nella vita adulta, l'alterazione di questa adesione è probabilmente dovuta all'invecchiamento [517].

Inoltre, in un ceppo di topi caratterizzato da senescenza accelerata (SAM), gli ovociti presentano un aumento di errori nell'allineamento dei cromosomi associato all'età, che origina da fattori nucleari. Infatti, la quantità di coesine posizionate fra i cromatidi fratelli risulta notevolmente inferiore negli ovociti dei topi anziani [520]. In questi topi, è stato quindi dimostrato che la coesina difettiva è associata ad un aumento dell'incidenza di un erroneo allineamento dei cromosomi e una prematura segregazione dei cromatidi fratelli [520]. Poiché il complesso delle coesine è intimamente associato con i cromosomi nel nucleo, non sorprende che il trasferimento della GV in un ooplasma raccolto da un animale giovane non sia in grado di ripristinare i difetti meiotici associati all'età [521, 522].

I risultati di questo studio hanno mostrato come, anche nel nostro modello, l'ambiente follicolare compromesso da un incremento dello stress

ossidativo a causa di un ridotto apporto vascolare e di un'insufficiente sistema anti-ossidante, determini anomalie nella segregazione dei cromosomi e, di conseguenza, una diminuzione della potenzialità di sviluppo del gamete femminile [303], così come osservato durante l'invecchiamento [89].

Anche le disfunzioni mitocondriali sono considerate tra le cause principali della predisposizione alla non-disgiunzione dei cromosomi durante la prima e la seconda divisione meiotica e agli errori durante le mitosi negli embrioni e per questo indicate quali responsabili della scarsa qualità e potenzialità di sviluppo embrionale negli ovociti di individui invecchiati [138, 300, 304, 505, 523-525].

Una scarsa funzionalità mitocondriale potrebbe quindi essere critica per gli stadi finali della maturazione dell'ovocita e per l'embriogenesi precoce fino all'attivazione del genoma embrionale. Per questo motivo, la funzionalità mitocondriale è considerata una garanzia della competenza dell'ovocita [205, 304, 526].

Abbiamo, quindi, deciso di valutare la popolazione dei mitocondri degli ovociti raccolti dalle ovaie Lo e di confrontarla con quella raccolta dalle ovaie Hi.

La popolazione mitocondriale dell'ovocita va incontro a numerosi cambiamenti stadio-specifici, accompagnati da modificazioni della distribuzione e della funzionalità [8, 299, 527]. Tipicamente allo stadio di

GV, i mitocondri sono distribuiti più o meno omogeneamente nella zona corticale dell'ooplasma [528]. Dalla rottura della GV (Germinale Vescicle Break Down, GVBD), i mitocondri si radunano nelle vicinanze dei cromosomi, per poi disperdersi nuovamente [529]. Quindi alcuni mitocondri vengono reclutati attorno al fuso meiotico [131, 528, 530], mentre altri rimangono nella parte sub-corticale dell'ovocita [304]. Tra gli stadi di MI e MII, la distribuzione diventa temporaneamente più omogenea [530], per poi concentrarsi nuovamente intorno al fuso e sotto l'oolemma. Questo pattern di distribuzione presumibilmente riflette la generazione locale e rapida di energia necessaria, rispettivamente, per la formazione del fuso e per l'attivazione dell'ovocita in seguito alla fecondazione [531]. La diffusione dei mitocondri dopo GVBD, MI e MII sembra essere correlata con un breve ed intensa produzione di ATP [529]. Anomalie nella distribuzione dei mitocondri sono state osservate con maggiore frequenza negli ovociti maturati in vitro, specialmente denudati, [205, 528, 530] e sono state correlate negativamente con la competenza alla maturazione e allo sviluppo [530, 532].

Nell'ovocita bovino allo stadio di GV, i mitocondri sono stati descritti in piccoli gruppi localizzati prevalentemente alla periferia dell'ooplasma, con quantità diverse e distribuzioni più o meno omogenee secondo la qualità morfologica dell'ovocita stesso [533]. Dopo la maturazione in vitro, i raggruppamenti di mitocondri sono aumentati e sono stati osservati anche nella parte centrale dell'ooplasma [533]. Le nostre osservazioni sulla

localizzazione sono in accordo con quanto osservato nei precedenti studi e non hanno evidenziato differenze tra i gameti provenienti da ovaie Lo e Hi.

Tuttavia, lo studio funzionale ha evidenziato che gli ovociti immaturi isolati dalle ovaie Lo presentano una diminuzione del potenziale di membrana mitocondriale rispetto agli ovociti isolati dalle Hi. Questo dato conferma, nel nostro modello, come le disfunzioni mitocondriali possano compromettere la competenza dell'ovocita [205, 299, 303, 534] ed essere una causa dell'aumento dell'incidenza di fenomeni di aneuploidia. Ovociti provenienti da donne anziane e clinicamente sterili presentano mitocondri con le stesse caratteristiche delle cellule somatiche senescenti o degenerate, quali vacuolizzazioni e rigonfiamenti [8, 126], oltre ad un aumento dei processi di degradazione o di autofagia [535]. Il progressivo declino del potenziale di membrana mitocondriale può determinare importanti difetti metabolici che aumentano progressivamente con l'età [187, 505, 525] e scarsi livelli di ATP nell'ovocita sono stati correlati sia con ritardi nello sviluppo pre-impianto e post-impianto [536] sia con mosaicismi genetici nelle blastocisti umane [537]. Inoltre, i mitocondri di ovociti umani invecchiati posseggono maggiori livelli di mutazioni puntiformi e riarrangiamenti del DNA mitocondriale [538]. Misurazioni quantitative dell'attività mitocondriale hanno confermato che questa è ridotta nelle donne anziane [539], facendo supporre che questa attività possa determinare la capacità dell'ovocita di generare un embrione di

buona qualità. È stato infatti suggerito che l'arresto e le anomalie osservati durante lo sviluppo potessero essere il risultato dell'incapacità di generare ATP sufficiente per supportare la corretta segregazione dei cromosomi e le normali attività biosintetiche dei blastomeri [540].

Per studiare il fenomeno dell'invecchiamento mitocondriale in ovociti di topo, recenti studi hanno dimostrato che irradiando i mitocondri, precedentemente trattati con sonde specifiche fluorescenti, è possibile indurre un danno mitocondriale e causare quindi alterazioni simili a quelle osservate con l'invecchiamento [306, 541-543]. Con questo tipo di esperimenti si è dimostrato che i danni mitocondriali dovuti alla fotosensibilizzazione inibiscono la GVBD, la formazione del fuso meiotico, la segregazione dei cromosomi e l'estrusione del globulo polare [306]. Al contrario di quanto osservato negli studi sulle coesine, il trapianto della GV in un ooplasto non fotosensibilizzato ha ripristinato gli eventi di ripresa e completamento della meiosi [306].

Il declino della funzionalità mitocondriale che accompagna l'invecchiamento è considerato una conseguenza delle alterazioni delle difese anti-ossidanti, quali il GSH [189, 301, 543], come abbiamo osservato anche nel nostro studio. Infatti, il GSH è coinvolto nella detossificazione dei perossidi mediata dalla glutatione-perossidasi. Due isoforme di questo enzima sono state identificate nei mitocondri e una di queste agisce direttamente sui perossidi lipidici; per questo potrebbe

essere coinvolta nel mantenimento del potenziale di membrana mitocondriale [544].

In precedenti studi abbiamo evidenziato che i complessi ovocita-cumulo ooforo presentano una significativa diminuzione dello stato di accoppiamento funzionale mediato da gap-junctions tra gamete e cellule follicolari [545]. Considerato che il GSH viene trasportato proprio attraverso queste giunzioni, i mitocondri di questi ovociti potrebbero essere particolarmente esposti ai danni dello stress ossidativo. Inoltre, a questo proposito, è stato ipotizzato che anche il NO, proveniente proprio dalle cellule del cumulo, potrebbe essere coinvolto nel mantenimento del potenziale di membrana dei mitocondri [546]. Le nostre osservazioni sono in accordo anche con quanto recentemente dimostrato e cioè che le gap junctions tra ovociti e cellule del cumulo scompaiono durante l'IVM più rapidamente nei gameti raccolti da vacche anziane rispetto a quelli raccolti da animali più giovani [547].

Da tutto quanto descritto fino a questo momento, appare evidente che l'analisi dei liquidi follicolari possa costituire uno strumento fondamentale per comprendere meglio le dinamiche che modulano i rapporti fra ambiente ovarico e follicolo e che determinano la competenza allo sviluppo dell'ovocita.

I liquidi follicolari rappresentano, infatti, l'ambiente in cui gli ovociti

crescono e si sviluppano; per questo la loro composizione è fondamentale per la qualità dei gameti stessi [548]. I liquidi follicolari contengono sostanze derivanti sia dal plasma sanguigno sia dall'attività secretoria delle cellule tecali e della granulosa [549]. L'analisi dei componenti dei liquidi follicolari potrebbe, inoltre, fornire informazioni sui cambiamenti metabolici nel siero [550].

Partendo da questi presupposti e dai dati presenti in letteratura, **nella terza fase della nostra ricerca** abbiamo analizzato le concentrazioni follicolari dell'AMH, che viene considerato un marker dell'invecchiamento ovarico nella specie umana [335, 337], mentre in quella bovina è strettamente correlato alla competenza dell'ovocita, in funzione del tipo di follicolo dal quale deriva e del numero di follicoli per ovaio [319, 340, 411]. Abbiamo quindi valutato anche le concentrazioni di E_2 e P_4 sulla base delle numerose ricerche presenti in letteratura nella specie bovina, secondo le quali le oscillazioni di questi ormoni sono un indice dello stato di salute del follicolo e indirettamente dell'ovocita da esso raccolto [62, 411].

Le nostre ricerche ci hanno permesso di verificare che nei follicoli antrali medi provenienti dalle ovaie Lo la concentrazione di AMH è inferiore a quella dei follicoli provenienti dalle ovaie Hi. Contrariamente ai nostri risultati, alcuni autori hanno evidenziato che le cellule della granulosa e

del cumulo ooforo di follicoli provenienti da ovaie di bovino con un basso numero di follicoli antrali (meno di 15 follicoli del diametro di almeno 3 mm) producono le stesse quantità di AMH delle cellule raccolte dalle ovaie con un alto numero di follicoli (almeno 25). Tuttavia presentano una quantità dello specifico messaggero circa 20 volte inferiore [411].

Nel bovino, l'AMH nel plasma è stato positivamente correlato alla popolazione di follicoli antrali di 3 – 7 mm e all'abilità dell'animale di rispondere ai trattamenti di superovulazione [340]. Questa popolazione follicolare è, infatti, il target principale di questi trattamenti e contiene le maggiori concentrazioni di AMH nel liquido follicolare e più alti livelli di mRNA a livello delle cellule della granulosa rispetto ai follicoli di dimensioni maggiori [340]. Le variazioni dell'AMH intrafollicolare però non sempre rispecchiano i livelli di mRNA nelle cellule della granulosa; si è visto, infatti, che il drastico calo della concentrazione ormonale, osservato con l'aumento delle dimensioni del follicolo, non si accompagna ad una altrettanto massiccia riduzione dei livelli di espressione dell'RNA messaggero. Queste osservazioni suggeriscono che i meccanismi trascrizionali e post-trascrizionali, tra i quali la velocità di secrezione, il legame a proteine della matrice extracellulare e la diluizione nel liquido follicolare, possono giocare un ruolo determinante nel regolare l'accumulo di AMH nell'antro [340].

Pur non avendo considerato l'espressione dell'RNA messaggero nei follicoli dei due tipi di ovaie valutate, possiamo ipotizzare che la ridotta

concentrazione di AMH nelle ovaie di tipo Lo possa essere dovuta proprio ad una alterazione dei meccanismi molecolari sopra elencati, fra i quali, in particolare, la modalità di secrezione dell'ormone, che potrebbero in qualche modo essere compromessi a causa della ridotta vascolarizzazione e, indirettamente, degli stress ossidativi che potrebbero condizionare negativamente il microambiente follicolare [411].

In uno studio condotto su donne affette da una precoce cessazione della funzionalità ovarica, è stato osservato che i follicoli antrali esprimono minori quantità di AMH rispetto ai follicoli di donne della stessa età. Gli autori suggeriscono che questo problema potrebbe esser legato a disfunzioni del comparto somatico ed in particolare delle cellule della granulosa, verificatisi probabilmente durante lo sviluppo follicolare; la bassa produzione di AMH, in questi soggetti, potrebbe alterare il meccanismo di reclutamento follicolare [551]. In questo contesto, potremmo, quindi, inserire anche le ovaie di tipo Lo, considerando che provengono da vacche da latte ad alta produzione, le quali sono state riformate per un precoce calo della fertilità. D'altra parte, è importante sottolineare che i follicoli atresici sia umani [318] sia di altre specie, quali ratto [329] e pecora [322], non esprimono AMH.

Poiché le cellule della granulosa e i loro prodotti di secrezione sono coinvolti nell'acquisizione della competenza embriogenica dell'ovocita [552-557], è possibile ipotizzare un collegamento diretto tra l'attitudine

delle cellule della granulosa alla produzione di AMH e la qualità funzionale dell'ovocita [558].

D'altra parte, Takahashi ha osservato, nella donna, che gli ovociti sono maggiormente competenti alla fecondazione quando il follicolo da cui provengono produce grandi quantità di AMH; infatti, il livello di AMH nei follicoli i cui ovociti sono andati incontro a fecondazione è risultato tre volte maggiore di quello raccolto da follicoli i cui ovociti non si sono fecondati [559].

Nella specie bovina, le variazioni della riserva ovarica possono influenzare l'attività del follicolo e la competenza dell'ovocita, mediante l'espressione di geni chiave per il differenziamento, la funzionalità e la sopravvivenza delle cellule del cumulo, della granulosa e della teca, fra i quali, in particolare, quello per l'AMH, il quale risulta sotto espresso nelle ovaie con un basso numero di follicoli antrali medi. Particolarmente interessante è l'osservazione che questo andamento è accompagnato da una sovraespressione di altri geni, ma da livelli bassi livelli di estradiolo [411].

Nel nostro modello sperimentale, abbiamo verificato che i follicoli provenienti dalle ovaie Lo hanno una minore quantità di estradiolo e una maggiore concentrazione di progesterone rispetto ai follicoli delle ovaie Hi. Di conseguenza anche il rapporto E_2/P_4 è minore nelle ovaie Lo.

Nel bovino, in generale, il livello assoluto sia di P_4 sia di E_2 aumenta con lo sviluppo del follicolo fino all'ovulazione [361]. In particolare, però, l'inibizione dei pathways di produzione degli estrogeni è considerata una

caratteristica dei follicoli atresici [359]. Numerosi studi sui follicoli maggiori di 5 mm hanno valutato la concentrazione di ormoni steroidei nei liquidi follicolari in relazione a diversi indicatori di atresia o morte cellulare [360-363, 560]. L'ipotesi più accreditata è che i follicoli sani abbiano maggiori livelli di E_2 rispetto agli atresici, mentre questi ultimi presentino maggiori livelli di P_4 [62].

Nei follicoli antrali non ovulatori si è osservato che i quadri atresici si accompagnano ad una minore concentrazione di E_2 , senza però variazioni significative per quanto riguarda la concentrazione di P_4 [358]. Tutte queste osservazioni suggeriscono che nel nostro modello sperimentale, la qualità degli ovociti provenienti da ovaie di tipo Lo possa essere influenzata negativamente da fenomeni di atresia più o meno precoci, anche se non individuabili con le normali tecniche istologiche.

D'altra parte, in un precedente lavoro, abbiamo dimostrato che i liquidi dei follicoli antrali medi appartenenti alle ovaie Lo possiedono anche maggior concentrazioni dell'ormone della crescita (GH) rispetto a quelli dello ovaie Hi. Questa sovra-espressione potrebbe essere considerata un tentativo di recupero dell'ambiente follicolare, già compromesso dai fenomeni di atresia [413].

Sebbene ad oggi non siano ancora stati chiariti i meccanismi attraverso i quali E_2 e P_4 intervengono nell'invecchiamento del gamete femminile, le alterazioni di questi ormoni in relazione ai fenomeni di atresia sia nel bovino [62] che nella donna [561, 562] depongono a favore di un loro

diretto coinvolgimento in tutti quei fenomeni che portano alla diminuzione della competenza dell'ovocita in seguito all'invecchiamento cronologico dell'ovaio.

In conclusione, attraverso l'analisi del quadro morfologico e funzionale della gonade e del gamete femminile e la valutazione di parametri endocrinologici riconosciuti quali marcatori di un precoce declino riproduttivo, i nostri studi hanno caratterizzato l'insorgenza di un prematuro invecchiamento ovarico nella popolazione di bovine da latte ad alta produzione. Lo studio dei meccanismi biologici alla base del declino dell'efficienza riproduttiva nel bovino, fenomeno di portata mondiale e in costante crescita, rappresenta un obiettivo primario per i paesi a zootecnia avanzata. Inoltre, le nostre ricerche individuano in questa specie, fisiologicamente e filogeneticamente più vicina alla specie umana rispetto a quella murina, un solido modello in biomedicina per lo studio dell'infertilità femminile.

BIBLIOGRAFIA

1. Hutt KJ, Albertini DF. An oocentric view of folliculogenesis and embryogenesis. *Reprod Biomed Online* 2007; 14: 758-764.
2. Russe I. Oogenesis in cattle and sheep. *Bibl Anat* 1983; 24: 77-92.
3. Picton H, Briggs D, Gosden R. The molecular basis of oocyte growth and development. *Mol Cell Endocrinol* 1998; 145: 27-37.
4. Tripathi A, Kumar KV, Chaube SK. Meiotic cell cycle arrest in mammalian oocytes. *J Cell Physiol* 2010; 223: 592-600.
5. Mehlmann LM. Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction* 2005; 130: 791-799.
6. Sirard MA. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. *Theriogenology* 2001; 55: 1241-1254.
7. Trounson A, Anderiesz C, Jones G. Maturation of human oocytes in vitro and their developmental competence. *Reproduction* 2001; 121: 51-75.
8. Motta PM, Nottola SA, Makabe S, Heyn R. Mitochondrial morphology in human fetal and adult female germ cells. *Hum Reprod* 2000; 15 Suppl 2: 129-147.
9. Calarco PG. Polarization of mitochondria in the unfertilized mouse oocyte. *Dev Genet* 1995; 16: 36-43.
10. Fair T, Hulshof SC, Hyttel P, Greve T, Boland M. Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. *Anat Embryol (Berl)* 1997; 195: 327-336.
11. Pangas SA, Rajkovic A. Transcriptional regulation of early oogenesis: in search of masters. *Hum Reprod Update* 2006; 12: 65-76.
12. Song JL, Wessel GM. How to make an egg: transcriptional regulation in oocytes. *Differentiation* 2005; 73: 1-17.
13. Fair T. Mammalian oocyte development: checkpoints for competence. *Reprod Fertil Dev* 2010; 22: 13-20.
14. Picton HM, Harris SE, Muruvi W, Chambers EL. The in vitro growth and maturation of follicles. *Reproduction* 2008; 136: 703-715.
15. Fair T, Hyttel P. Oocyte growth in cattle-ultrastructure, transcription and developmental competence. In: P.M: M (ed.) *Microscopy of Reproduction and Development: A dynamic Approach*. Rome: Antonio Delfino; 1997: 109-118.
16. Lonergan P, Monaghan P, Rizos D, Boland MP, Gordon I. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. *Mol Reprod Dev* 1994; 37: 48-53.

17. Maddox-Hyttel P, Bjerregaard B, Laurincik J. Meiosis and embryo technology: renaissance of the nucleolus. *Reprod Fertil Dev* 2005; 17: 3-14.
18. Pavlok A, Lucas-Hahn A, Niemann H. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *Mol Reprod Dev* 1992; 31: 63-67.
19. Driancourt MA, Reynaud K, Cortvrindt R, Smitz J. Roles of KIT and KIT LIGAND in ovarian function. *Rev Reprod* 2000; 5: 143-152.
20. Elvin JA, Yan C, Matzuk MM. Oocyte-expressed TGF-beta superfamily members in female fertility. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 159: 1-5.
21. Gilchrist RB, Ritter LJ, Armstrong DT. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. *Anim Reprod Sci* 2004; 82-83: 431-446.
22. Knight PG, Glister C. TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction* 2006; 132: 191-206.
23. Flaws JA, Hirshfield AN, Hewitt JA, Babus JK, Furth PA. Effect of bcl-2 on the primordial follicle endowment in the mouse ovary. *Biol Reprod* 2001; 64: 1153-1159.
24. Braw-Tal R, Yossefi S. Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. *J Reprod Fertil* 1997; 109: 165-171.
25. Lee WS, Otsuka F, Moore RK, Shimasaki S. Effect of bone morphogenetic protein-7 on folliculogenesis and ovulation in the rat. *Biol Reprod* 2001; 65: 994-999.
26. Adashi EY. Intraovarian regulation: the IGF-I example. *Reprod Fertil Dev* 1992; 4: 497-504.
27. Monniaux D, Pisselet C. Control of proliferation and differentiation of ovine granulosa cells by insulin-like growth factor-I and follicle-stimulating hormone in vitro. *Biol Reprod* 1992; 46: 109-119.
28. Hsu CJ, Holmes SD, Hammond JM. Ovarian epidermal growth factor-like activity. Concentrations in porcine follicular fluid during follicular enlargement. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 147: 242-247.
29. Elvin JA, Clark AT, Wang P, Wolfman NM, Matzuk MM. Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary. *Mol Endocrinol* 1999; 13: 1035-1048.
30. Eppig JJ. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction* 2001; 122: 829-838.
31. Hayashi M, McGee EA, Min G, Klein C, Rose UM, van Duin M, Hsueh AJ. Recombinant growth differentiation factor-9 (GDF-9) enhances growth and differentiation of cultured early ovarian follicles. *Endocrinology* 1999; 140: 1236-1244.
32. McGrath SA, Esquela AF, Lee SJ. Oocyte-specific expression of growth/differentiation factor-9. *Mol Endocrinol* 1995; 9: 131-136.

33. Vitt UA, Mazerbourg S, Klein C, Hsueh AJ. Bone morphogenetic protein receptor type II is a receptor for growth differentiation factor-9. *Biol Reprod* 2002; 67: 473-480.
34. Greenwald G, Terranova P. *Physiology of reproduction*. New York: E. Knobil and J.D. Neill, Raven Press; 1988.
35. Bao B, Garverick HA. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. *J Anim Sci* 1998; 76: 1903-1921.
36. Presl J, Pospisil J, Figarova V, Krabec Z. Stage-dependent changes in binding of iodinated FSH during ovarian follicle maturation in rats. *Endocrinol Exp* 1974; 8: 291-298.
37. Tisdall DJ, Watanabe K, Hudson NL, Smith P, McNatty KP. FSH receptor gene expression during ovarian follicle development in sheep. *J Mol Endocrinol* 1995; 15: 273-281.
38. Xu Z, Garverick HA, Smith GW, Smith MF, Hamilton SA, Youngquist RS. Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. *Biol Reprod* 1995; 53: 951-957.
39. Driancourt MA, Thatcher WW, Terqui M, Andrieu D. Dynamics of ovarian follicular development in cattle during the estrous cycle, early pregnancy and in response to PMSG. *Domest Anim Endocrinol* 1991; 8: 209-221.
40. Eppig JJ. Intercommunication between mammalian oocytes and companion somatic cells. *Bioessays* 1991; 13: 569-574.
41. Fair T, Hyttel P, Greve T. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Mol Reprod Dev* 1995; 42: 437-442.
42. Eppig JJ. Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. *Reprod Fertil Dev* 1996; 8: 485-489.
43. Eppig JJ, Schroeder AC. Capacity of mouse oocytes from preantral follicles to undergo embryogenesis and development to live young after growth, maturation, and fertilization in vitro. *Biol Reprod* 1989; 41: 268-276.
44. Fair T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Anim Reprod Sci* 2003; 78: 203-216.
45. Burger HG, Dudley EC, Robertson DM, Dennerstein L. Hormonal changes in the menopause transition. *Recent Prog Horm Res* 2002; 57: 257-275.
46. Lund KJ. Menopause and the menopausal transition. *Med Clin North Am* 2008; 92: 1253-1271, xii.
47. Nejat EJ, Chervenak JL. The continuum of ovarian aging and clinicopathologies associated with the menopausal transition. *Maturitas* 2010; 66: 187-190.

48. Mihm M, Gangooly S, Muttukrishna S. The normal menstrual cycle in women. *Anim Reprod Sci* 2010.
49. Baerwald AR, Adams GP, Pierson RA. Characterization of ovarian follicular wave dynamics in women. *Biol Reprod* 2003; 69: 1023-1031.
50. Forde N, Beltman ME, Lonergan P, Diskin M, Roche JF, Crowe MA. Oestrous cycles in *Bos taurus* cattle. *Anim Reprod Sci* 2010.
51. Ginther OJ, Wiltbank MC, Fricke PM, Gibbons JR, Kot K. Selection of the dominant follicle in cattle. *Biol Reprod* 1996; 55: 1187-1194.
52. Adams GP, Matteri RL, Kastelic JP, Ko JC, Ginther OJ. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J Reprod Fertil* 1992; 94: 177-188.
53. Messinis IE, Messini CI, Dafopoulos K. The role of gonadotropins in the follicular phase. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1205: 5-11.
54. Woodruff TK, Shea LD. A new hypothesis regarding ovarian follicle development: ovarian rigidity as a regulator of selection and health. *J Assist Reprod Genet* 2010.
55. Adams GP, Pierson RA. Bovine model for study of ovarian follicular dynamics in humans. *Theriogenology* 1995; 43: 113-120.
56. Adams GP, Jaiswal R, Singh J, Malhi P. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology* 2008; 69: 72-80.
57. Aerts JM, Bols PE. Ovarian Follicular Dynamics: A Review with Emphasis on the Bovine Species. Part I: Folliculogenesis and Pre-antral Follicle Development. *Reprod Domest Anim* 2010; 45: 171-179.
58. McGee EA, Hsueh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev* 2000; 21: 200-214.
59. Depalo R, Nappi L, Loverro G, Bettocchi S, Caruso ML, Valentini AM, Selvaggi L. Evidence of apoptosis in human primordial and primary follicles. *Hum Reprod* 2003; 18: 2678-2682.
60. Krysko DV, Diez-Fraile A, Criel G, Svistunov AA, Vandenameele P, D'Herde K. Life and death of female gametes during oogenesis and folliculogenesis. *Apoptosis* 2008; 13: 1065-1087.
61. Markstrom E, Svensson E, Shao R, Svanberg B, Billig H. Survival factors regulating ovarian apoptosis -- dependence on follicle differentiation. *Reproduction* 2002; 123: 23-30.
62. Rodgers RJ, Irving-Rodgers HF. Morphological classification of bovine ovarian follicles. *Reproduction* 2010; 139: 309-318.
63. Irving-Rodgers HF, van Wezel IL, Mussard ML, Kinder JE, Rodgers RJ. Atresia revisited: two basic patterns of atresia of bovine antral follicles. *Reproduction* 2001; 122: 761-775.
64. Quirk SM, Cowan RG, Harman RM, Hu CL, Porter DA. Ovarian follicular growth and atresia: the relationship between cell proliferation and survival. *J Anim Sci* 2004; 82 E-Suppl: E40-52.

65. Craig J, Orisaka M, Wang H, Orisaka S, Thompson W, Zhu C, Kotsuji F, Tsang BK. Gonadotropin and intra-ovarian signals regulating follicle development and atresia: the delicate balance between life and death. *Front Biosci* 2007; 12: 3628-3639.
66. Jiang JY, Cheung CK, Wang Y, Tsang BK. Regulation of cell death and cell survival gene expression during ovarian follicular development and atresia. *Front Biosci* 2003; 8: d222-237.
67. Hsueh AJ, Billig H, Tsafirri A. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocr Rev* 1994; 15: 707-724.
68. Morita Y, Perez GI, Maravei DV, Tilly KI, Tilly JL. Targeted expression of Bcl-2 in mouse oocytes inhibits ovarian follicle atresia and prevents spontaneous and chemotherapy-induced oocyte apoptosis in vitro. *Mol Endocrinol* 1999; 13: 841-850.
69. Pru JK, Tilly JL. Programmed cell death in the ovary: insights and future prospects using genetic technologies. *Mol Endocrinol* 2001; 15: 845-853.
70. Tingen C, Kim A, Woodruff TK. The primordial pool of follicles and nest breakdown in mammalian ovaries. *Mol Hum Reprod* 2009; 15: 795-803.
71. Erickson BH. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. *J Anim Sci* 1966; 25: 800-805.
72. Hussein MR. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. *Hum Reprod Update* 2005; 11: 162-177.
73. Adhikari D, Liu K. Molecular mechanisms underlying the activation of mammalian primordial follicles. *Endocr Rev* 2009; 30: 438-464.
74. Fortune JE, Cushman RA, Wahl CM, Kito S. The primordial to primary follicle transition. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 163: 53-60.
75. Hirshfield AN. Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol* 1991; 124: 43-101.
76. Reddy P, Zheng W, Liu K. Mechanisms maintaining the dormancy and survival of mammalian primordial follicles. *Trends Endocrinol Metab* 2009; 21: 96-103.
77. Broekmans FJ, Knauff EA, te Velde ER, Macklon NS, Fauser BC. Female reproductive ageing: current knowledge and future trends. *Trends Endocrinol Metab* 2007; 18: 58-65.
78. Faddy MJ, Gosden RG. A model conforming the decline in follicle numbers to the age of menopause in women. *Hum Reprod* 1996; 11: 1484-1486.
79. Hirshfield AN. Relationship between the supply of primordial follicles and the onset of follicular growth in rats. *Biol Reprod* 1994; 50: 421-428.
80. Broekmans FJ, Soules MR, Fauser BC. Ovarian aging: mechanisms and clinical consequences. *Endocr Rev* 2009; 30: 465-493.
81. Coccia ME, Rizzello F. Ovarian reserve. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1127: 27-30.

82. Richardson SJ, Nelson JF. Follicular depletion during the menopausal transition. *Ann N Y Acad Sci* 1990; 592: 13-20; discussion 44-51.
83. Carnevale EM. The mare model for follicular maturation and reproductive aging in the woman. *Theriogenology* 2008; 69: 23-30.
84. Ginther OJ, Gastal MO, Gastal EL, Jacob JC, Siddiqui MA, Beg MA. Effects of age on follicle and hormone dynamics during the oestrous cycle in mares. *Reprod Fertil Dev* 2008; 20: 955-963.
85. Brussow KP, Ratky J, Torner H, Egerszegi I, Schneider F, Solti L, Tuchscherer A. Follicular and oocyte development in gilts of different age. *Acta Vet Hung* 2002; 50: 101-110.
86. Anzalone CR, Hong LS, Lu JK, LaPolt PS. Influences of age and ovarian follicular reserve on estrous cycle patterns, ovulation, and hormone secretion in the Long-Evans rat. *Biol Reprod* 2001; 64: 1056-1062.
87. Niikura Y, Niikura T, Tilly JL. Aged mouse ovaries possess rare premeiotic germ cells that can generate oocytes following transplantation into a young host environment. *Aging (Albany NY)* 2009; 1: 971-978.
88. Nichols SM, Bavister BD, Brenner CA, Didier PJ, Harrison RM, Kubisch HM. Ovarian senescence in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Hum Reprod* 2005; 20: 79-83.
89. Tatone C, Amicarelli F, Carbone MC, Monteleone P, Caserta D, Marci R, Artini PG, Piomboni P, Focarelli R. Cellular and molecular aspects of ovarian follicle ageing. *Hum Reprod Update* 2008; 14: 131-142.
90. Swanton A, Child T. Reproduction and ovarian ageing. *J Br Menopause Soc* 2005; 11: 126-131.
91. Broekmans FJ, Faddy MJ, Scheffer G, te Velde ER. Antral follicle counts are related to age at natural fertility loss and age at menopause. *Menopause* 2004; 11: 607-614.
92. Malhi PS, Adams GP, Mapletoft RJ, Singh J. Oocyte developmental competence in a bovine model of reproductive aging. *Reproduction* 2007; 134: 233-239.
93. Malhi PS, Adams GP, Mapletoft RJ, Singh J. Superovulatory response in a bovine model of reproductive aging. *Anim Reprod Sci* 2008; 109: 100-109.
94. Armstrong DT. Effects of maternal age on oocyte developmental competence. *Theriogenology* 2001; 55: 1303-1322.
95. Spira A. The decline of fecundity with age. *Maturitas* 1988; Suppl 1: 15-22.
96. Wood JW. Fecundity and natural fertility in humans. *Oxf Rev Reprod Biol* 1989; 11: 61-109.
97. Nyboe Andersen A, Goossens V, Bhattacharya S, Ferraretti AP, Kupka MS, de Mouzon J, Nygren KG. Assisted reproductive technology and intrauterine inseminations in Europe, 2005: results

- generated from European registers by ESHRE: ESHRE. The European IVF Monitoring Programme (EIM), for the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). *Hum Reprod* 2009; 24: 1267-1287.
98. Templeton A, Morris JK, Parslow W. Factors that affect outcome of in-vitro fertilisation treatment. *Lancet* 1996; 348: 1402-1406.
 99. Treloar AE, Boynton RE, Behn BG, Brown BW. Variation of the human menstrual cycle through reproductive life. *Int J Fertil* 1967; 12: 77-126.
 100. Santoro N, Isaac B, Neal-Perry G, Adel T, Weingart L, Nussbaum A, Thakur S, Jinnai H, Khosla N, Barad D. Impaired folliculogenesis and ovulation in older reproductive aged women. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 5502-5509.
 101. van Zonneveld P, Scheffer GJ, Broekmans FJ, Blankenstein MA, de Jong FH, Looman CW, Habbema JD, te Velde ER. Do cycle disturbances explain the age-related decline of female fertility? Cycle characteristics of women aged over 40 years compared with a reference population of young women. *Hum Reprod* 2003; 18: 495-501.
 102. Klein NA, Houmard BS, Hansen KR, Woodruff TK, Sluss PM, Bremner WJ, Soules MR. Age-related analysis of inhibin A, inhibin B, and activin a relative to the intercycle monotropic follicle-stimulating hormone rise in normal ovulatory women. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 2977-2981.
 103. Schwartz D, Mayaux MJ. Female fecundity as a function of age: results of artificial insemination in 2193 nulliparous women with azoospermic husbands. *Federation CECOS. N Engl J Med* 1982; 306: 404-406.
 104. van Noord-Zaadstra BM, Looman CW, Alsbach H, Habbema JD, te Velde ER, Karbaat J. Delaying childbearing: effect of age on fecundity and outcome of pregnancy. *Bmj* 1991; 302: 1361-1365.
 105. O'Connor KA, Holman DJ, Wood JW. Declining fecundity and ovarian ageing in natural fertility populations. *Maturitas* 1998; 30: 127-136.
 106. Faddy MJ, Gosden RG, Gougeon A, Richardson SJ, Nelson JF. Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause. *Hum Reprod* 1992; 7: 1342-1346.
 107. Tan SL, Royston P, Campbell S, Jacobs HS, Betts J, Mason B, Edwards RG. Cumulative conception and livebirth rates after in-vitro fertilisation. *Lancet* 1992; 339: 1390-1394.
 108. Erickson BH, Reynolds RA, Murphree RL. Ovarian characteristics and reproductive performance of the aged cow. *Biol Reprod* 1976; 15: 555-560.
 109. Klein NA, Battaglia DE, Fujimoto VY, Davis GS, Bremner WJ, Soules MR. Reproductive aging: accelerated ovarian follicular

- development associated with a monotropic follicle-stimulating hormone rise in normal older women. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 1038-1045.
110. Malhi PS, Adams GP, Singh J. Bovine model for the study of reproductive aging in women: follicular, luteal, and endocrine characteristics. *Biol Reprod* 2005; 73: 45-53.
 111. Malhi PS, Adams GP, Pierson RA, Singh J. Bovine model of reproductive aging: response to ovarian synchronization and superstimulation. *Theriogenology* 2006; 66: 1257-1266.
 112. Longcope C. Endocrine function of the postmenopausal ovary. *J Soc Gynecol Investig* 2001; 8: S67-68.
 113. Nicosia SV. The aging ovary. *Med Clin North Am* 1987; 71: 1-9.
 114. Jones KP, Walker LC, Anderson D, Lacreuse A, Robson SL, Hawkes K. Depletion of ovarian follicles with age in chimpanzees: similarities to humans. *Biol Reprod* 2007; 77: 247-251.
 115. Tilly JL. Commuting the death sentence: how oocytes strive to survive. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 838-848.
 116. Morita Y, Tilly JL. Oocyte apoptosis: like sand through an hourglass. *Dev Biol* 1999; 213: 1-17.
 117. Fujino Y, Ozaki K, Yamamasu S, Ito F, Matsuoka I, Hayashi E, Nakamura H, Ogita S, Sato E, Inoue M. DNA fragmentation of oocytes in aged mice. *Hum Reprod* 1996; 11: 1480-1483.
 118. Perez GI, Tilly JL. Cumulus cells are required for the increased apoptotic potential in oocytes of aged mice. *Hum Reprod* 1997; 12: 2781-2783.
 119. Lintern-Moore S, Peters H, Moore GP, Faber M. Follicular development in the infant human ovary. *J Reprod Fertil* 1974; 39: 53-64.
 120. Peters H, Byskov AG, Himelstein-Braw R, Faber M. Follicular growth: the basic event in the mouse and human ovary. *J Reprod Fertil* 1975; 45: 559-566.
 121. Peters H, Himelstein-Braw R, Faber M. The normal development of the ovary in childhood. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1976; 82: 617-630.
 122. Luciano AM, Modina S, Vassena R, Milanese E, Lauria A, Gandolfi F. Role of intracellular cyclic adenosine 3',5'-monophosphate concentration and oocyte-cumulus cells communications on the acquisition of the developmental competence during in vitro maturation of bovine oocyte. *Biol Reprod* 2004; 70: 465-472.
 123. Atef A, Francois P, Christian V, Marc-Andre S. The potential role of gap junction communication between cumulus cells and bovine oocytes during in vitro maturation. *Mol Reprod Dev* 2005; 71: 358-367.
 124. Kidder GM, Mhawi AA. Gap junctions and ovarian folliculogenesis. *Reproduction* 2002; 123: 613-620.

125. Perez GI, Jurisicova A, Matikainen T, Moriyama T, Kim MR, Takai Y, Pru JK, Kolesnick RN, Tilly JL. A central role for ceramide in the age-related acceleration of apoptosis in the female germline. *Faseb J* 2005; 19: 860-862.
126. de Bruin JP, Dorland M, Spek ER, Posthuma G, van Haaften M, Looman CW, te Velde ER. Age-related changes in the ultrastructure of the resting follicle pool in human ovaries. *Biol Reprod* 2004; 70: 419-424.
127. de Bruin JP, Dorland M, Spek ER, Posthuma G, van Haaften M, Looman CW, te Velde ER. Ultrastructure of the resting ovarian follicle pool in healthy young women. *Biol Reprod* 2002; 66: 1151-1160.
128. Redmer DA, Reynolds LP. Angiogenesis in the ovary. *Rev Reprod* 1996; 1: 182-192.
129. Ng EH, Chan CC, Yeung WS, Ho PC. Effect of age on ovarian stromal flow measured by three-dimensional ultrasound with power Doppler in Chinese women with proven fertility. *Hum Reprod* 2004; 19: 2132-2137.
130. Eppig JJ, O'Brien M. In vitro maturation and fertilization of oocytes isolated from aged mice: a strategy to rescue valuable genetic resources. *J Assist Reprod Genet* 1995; 12: 269-273.
131. Cukurcam S, Betzendahl I, Michel G, Vogt E, Hegele-Hartung C, Lindenthal B, Eichenlaub-Ritter U. Influence of follicular fluid meiosis-activating sterol on aneuploidy rate and precocious chromatid segregation in aged mouse oocytes. *Hum Reprod* 2007; 22: 815-828.
132. Seifer DB, Gardiner AC, Ferreira KA, Peluso JJ. Apoptosis as a function of ovarian reserve in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1996; 66: 593-598.
133. Pellicer A, Mari M, de los Santos MJ, Simon C, Remohi J, Tarin JJ. Effects of aging on the human ovary: the secretion of immunoreactive alpha-inhibin and progesterone. *Fertil Steril* 1994; 61: 663-668.
134. Seifer DB, Gardiner AC, Lambert-Messerlian G, Schneyer AL. Differential secretion of dimeric inhibin in cultured luteinized granulosa cells as a function of ovarian reserve. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 736-739.
135. Seifer DB, DeJesus V, Hubbard K. Mitochondrial deletions in luteinized granulosa cells as a function of age in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2002; 78: 1046-1048.
136. Tatone C, Carbone MC, Falone S, Aimola P, Giardinelli A, Caserta D, Marci R, Pandolfi A, Ragnelli AM, Amicarelli F. Age-dependent changes in the expression of superoxide dismutases and catalase are associated with ultrastructural modifications in human granulosa cells. *Mol Hum Reprod* 2006; 12: 655-660.

137. Zeleznik AJ. Follicle selection in primates: "many are called but few are chosen". *Biol Reprod* 2001; 65: 655-659.
138. Gauden ME. Maternal age effect: the enigma of Down syndrome and other trisomic conditions. *Mutat Res* 1992; 296: 69-88.
139. Augustin HG. Vascular Morphogenesis in the Female Reproductive System. In: Augustin HG, Iruela-Arispe ML, Rogers PAW, Smithe SK (eds.), *Cardiovascular Molecular Morphogenesis*, vol. XII; 2001: 333.
140. Bhal PS, Pugh ND, Chui DK, Gregory L, Walker SM, Shaw RW. The use of transvaginal power Doppler ultrasonography to evaluate the relationship between perifollicular vascularity and outcome in in-vitro fertilization treatment cycles. *Hum Reprod* 1999; 14: 939-945.
141. Bhal PS, Pugh ND, Gregory L, O'Brien S, Shaw RW. Perifollicular vascularity as a potential variable affecting outcome in stimulated intrauterine insemination treatment cycles: a study using transvaginal power Doppler. *Hum Reprod* 2001; 16: 1682-1689.
142. Huey S, Abuhamad A, Barroso G, Hsu MI, Kolm P, Mayer J, Oehninger S. Perifollicular blood flow Doppler indices, but not follicular pO₂, pCO₂, or pH, predict oocyte developmental competence in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1999; 72: 707-712.
143. Martelli A, Bernabo N, Berardinelli P, Russo V, Rinaldi C, Di Giacinto O, Mauro A, Barboni B. Vascular supply as a discriminating factor for pig preantral follicle selection. *Reproduction* 2009; 137: 45-58.
144. Macchiarelli G, Jiang JY, Nottola SA, Sato E. Morphological patterns of angiogenesis in ovarian follicle capillary networks. A scanning electron microscopy study of corrosion cast. *Microsc Res Tech* 2006; 69: 459-468.
145. Siddiqui MA, Almamun M, Ginther OJ. Blood flow in the wall of the preovulatory follicle and its relationship to pregnancy establishment in heifers. *Anim Reprod Sci* 2009; 113: 287-292.
146. Siddiqui MA, Gastal EL, Gastal MO, Almamun M, Beg MA, Ginther OJ. Relationship of vascular perfusion of the wall of the preovulatory follicle to in vitro fertilisation and embryo development in heifers. *Reproduction* 2009; 137: 689-697.
147. Monteleone P, Giovanni Artini P, Simi G, Casarosa E, Cela V, Genazzani AR. Follicular fluid VEGF levels directly correlate with perifollicular blood flow in normoresponder patients undergoing IVF. *J Assist Reprod Genet* 2008; 25: 183-186.
148. Grazul-Bilska AT, Navanukraw C, Johnson ML, Arnold DA, Reynolds LP, Redmer DA. Expression of endothelial nitric oxide synthase in the ovine ovary throughout the estrous cycle. *Reproduction* 2006; 132: 579-587.
149. Grazul-Bilska AT, Navanukraw C, Johnson ML, Vonnahme KA, Ford SP, Reynolds LP, Redmer DA. Vascularity and expression of

- angiogenic factors in bovine dominant follicles of the first follicular wave. *J Anim Sci* 2007; 85: 1914-1922.
150. Reynolds LP, Grazul-Bilska AT, Redmer DA. Angiogenesis in the female reproductive organs: pathological implications. *Int J Exp Pathol* 2002; 83: 151-163.
 151. Acosta TJ, Miyamoto A. Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. *Anim Reprod Sci* 2004; 82-83: 127-140.
 152. Beg MA, Ginther OJ. Follicle selection in cattle and horses: role of intrafollicular factors. *Reproduction* 2006; 132: 365-377.
 153. Fortune JE, Rivera GM, Yang MY. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Anim Reprod Sci* 2004; 82-83: 109-126.
 154. Yang MY, Fortune JE. Vascular endothelial growth factor stimulates the primary to secondary follicle transition in bovine follicles in vitro. *Mol Reprod Dev* 2007; 74: 1095-1104.
 155. Van Blerkom J. The influence of intrinsic and extrinsic factors on the developmental potential and chromosomal normality of the human oocyte. *J Soc Gynecol Investig* 1996; 3: 3-11.
 156. Van Blerkom J, Antczak M, Schrader R. The developmental potential of the human oocyte is related to the dissolved oxygen content of follicular fluid: association with vascular endothelial growth factor levels and perifollicular blood flow characteristics. *Hum Reprod* 1997; 12: 1047-1055.
 157. Costello MF, Shrestha SM, Sjoblom P, McNally G, Bennett MJ, Steigrad SJ, Hughes GJ. Power doppler ultrasound assessment of the relationship between age and ovarian perifollicular blood flow in women undergoing in vitro fertilization treatment. *J Assist Reprod Genet* 2006; 23: 359-365.
 158. Friedman CI, Danforth DR, Herbosa-Encarnacion C, Arbogast L, Alak BM, Seifer DB. Follicular fluid vascular endothelial growth factor concentrations are elevated in women of advanced reproductive age undergoing ovulation induction. *Fertil Steril* 1997; 68: 607-612.
 159. Klein NA, Battaglia DE, Woodruff TK, Padmanabhan V, Giudice LC, Bremner WJ, Soules MR. Ovarian follicular concentrations of activin, follistatin, inhibin, insulin-like growth factor I (IGF-I), IGF-II, IGF-binding protein-2 (IGFBP-2), IGFBP-3, and vascular endothelial growth factor in spontaneous menstrual cycles of normal women of advanced reproductive age. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 4520-4525.
 160. Artini PG, Monti M, Cristello F, Matteucci C, Bruno S, Valentino V, Genazzani AR. Vascular endothelial growth factor in females of reproductive age. *Gynecol Endocrinol* 2003; 17: 477-492.
 161. Bell EL, Emerling BM, Chandel NS. Mitochondrial regulation of oxygen sensing. *Mitochondrion* 2005; 5: 322-332.

162. Chandel NS, Budinger GR. The cellular basis for diverse responses to oxygen. *Free Radic Biol Med* 2007; 42: 165-174.
163. Lam PM, Haines C. Vascular endothelial growth factor plays more than an angiogenic role in the female reproductive system. *Fertil Steril* 2005; 84: 1775-1778.
164. Wang GL, Jiang BH, Semenza GL. Effect of altered redox states on expression and DNA-binding activity of hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 212: 550-556.
165. Artini PG, Fasciani A, Monti M, Luisi S, D'Ambrogio G, Genazzani AR. Changes in vascular endothelial growth factor levels and the risk of ovarian hyperstimulation syndrome in women enrolled in an in vitro fertilization program. *Fertil Steril* 1998; 70: 560-564.
166. Oliveira BF, Nogueira-Machado JA, Chaves MM. The role of oxidative stress in the aging process. *ScientificWorldJournal* 2010; 10: 1121-1128.
167. Poyton RO, Ball KA, Castello PR. Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. *Trends Endocrinol Metab* 2009; 20: 332-340.
168. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 44-84.
169. Ruder EH, Hartman TJ, Blumberg J, Goldman MB. Oxidative stress and antioxidants: exposure and impact on female fertility. *Hum Reprod Update* 2008; 14: 345-357.
170. Rice-Evans CA, Gopinathan V. Oxygen toxicity, free radicals and antioxidants in human disease: biochemical implications in atherosclerosis and the problems of premature neonates. *Essays Biochem* 1995; 29: 39-63.
171. Halliwell B. Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. *Br J Exp Pathol* 1989; 70: 737-757.
172. Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol* 2005; 3: 28.
173. Guerin P, El Mouatassim S, Menezo Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update* 2001; 7: 175-189.
174. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 7915-7922.
175. Thompson JG, Lane M, Gilchrist RB. Metabolism of the bovine cumulus-oocyte complex and influence on subsequent developmental competence. *Soc Reprod Fertil Suppl* 2007; 64: 179-190.
176. Agarwal A, Gupta S, Sekhon L, Shah R. Redox considerations in female reproductive function and assisted reproduction: from

- molecular mechanisms to health implications. *Antioxid Redox Signal* 2008; 10: 1375-1403.
177. Ruder EH, Hartman TJ, Goldman MB. Impact of oxidative stress on female fertility. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2009; 21: 219-222.
 178. Acevedo CG, Carrasco G, Burotto M, Rojas S, Bravo I. Ethanol inhibits L-arginine uptake and enhances NO formation in human placenta. *Life Sci* 2001; 68: 2893-2903.
 179. Duru NK, Morshedi M, Schuffner A, Oehninger S. Semen treatment with progesterone and/or acetyl-L-carnitine does not improve sperm motility or membrane damage after cryopreservation-thawing. *Fertil Steril* 2000; 74: 715-720.
 180. Jozwik M, Wolczynski S, Jozwik M, Szamatowicz M. Oxidative stress markers in preovulatory follicular fluid in humans. *Mol Hum Reprod* 1999; 5: 409-413.
 181. Sharma RK, Agarwal A. Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology* 1996; 48: 835-850.
 182. Shen H, Ong C. Detection of oxidative DNA damage in human sperm and its association with sperm function and male infertility. *Free Radic Biol Med* 2000; 28: 529-536.
 183. Sikka SC. Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. *Curr Med Chem* 2001; 8: 851-862.
 184. Vural P, Akgul C, Yildirim A, Canbaz M. Antioxidant defence in recurrent abortion. *Clin Chim Acta* 2000; 295: 169-177.
 185. Walsh SW, Vaughan JE, Wang Y, Roberts LJ, 2nd. Placental isoprostane is significantly increased in preeclampsia. *Faseb J* 2000; 14: 1289-1296.
 186. Miquel J, Economos AC, Fleming J, Johnson JE, Jr. Mitochondrial role in cell aging. *Exp Gerontol* 1980; 15: 575-591.
 187. Hipkiss AR. Mitochondrial dysfunction, proteotoxicity, and aging: causes or effects, and the possible impact of NAD⁺-controlled protein glycation. *Adv Clin Chem* 2010; 50: 123-150.
 188. Shigenaga MK, Hagen TM, Ames BN. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 10771-10778.
 189. Tarin JJ. Potential effects of age-associated oxidative stress on mammalian oocytes/embryos. *Mol Hum Reprod* 1996; 2: 717-724.
 190. Wei YH, Lu CY, Wei CY, Ma YS, Lee HC. Oxidative stress in human aging and mitochondrial disease--consequences of defective mitochondrial respiration and impaired antioxidant enzyme system. *Chin J Physiol* 2001; 44: 1-11.
 191. Wei YH, Ma YS, Lee HC, Lee CF, Lu CY. Mitochondrial theory of aging matures--roles of mtDNA mutation and oxidative stress in human aging. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei)* 2001; 64: 259-270.
 192. Bulteau AL, Szweda LI, Friguet B. Mitochondrial protein oxidation and degradation in response to oxidative stress and aging. *Exp Gerontol* 2006; 41: 653-657.

193. Wei YH, Wu SB, Ma YS, Lee HC. Respiratory function decline and DNA mutation in mitochondria, oxidative stress and altered gene expression during aging. *Chang Gung Med J* 2009; 32: 113-132.
194. Liu CY, Lee CF, Wei YH. Role of reactive oxygen species-elicited apoptosis in the pathophysiology of mitochondrial and neurodegenerative diseases associated with mitochondrial DNA mutations. *J Formos Med Assoc* 2009; 108: 599-611.
195. Wu YT, Wu SB, Lee WY, Wei YH. Mitochondrial respiratory dysfunction-elicited oxidative stress and posttranslational protein modification in mitochondrial diseases. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1201: 147-156.
196. Lee HC, Wei YH. Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and apoptosis in aging. *Exp Biol Med (Maywood)* 2007; 232: 592-606.
197. Taanman JW. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1410: 103-123.
198. Tarin JJ. Aetiology of age-associated aneuploidy: a mechanism based on the 'free radical theory of ageing'. *Hum Reprod* 1995; 10: 1563-1565.
199. Rashidi A, Shanley D. Evolution of the menopause: life histories and mechanisms. *Menopause Int* 2009; 15: 26-30.
200. Tarin JJ, Perez-Albala S, Cano A. Oral antioxidants counteract the negative effects of female aging on oocyte quantity and quality in the mouse. *Mol Reprod Dev* 2002; 61: 385-397.
201. Tarin JJ, Perez-Albala S, Pertusa JF, Cano A. Oral administration of pharmacological doses of vitamins C and E reduces reproductive fitness and impairs the ovarian and uterine functions of female mice. *Theriogenology* 2002; 57: 1539-1550.
202. Zhang X, Wu XQ, Lu S, Guo YL, Ma X. Deficit of mitochondria-derived ATP during oxidative stress impairs mouse MII oocyte spindles. *Cell Res* 2006; 16: 841-850.
203. Carbone MC, Tatone C, Delle Monache S, Marci R, Caserta D, Colonna R, Amicarelli F. Antioxidant enzymatic defences in human follicular fluid: characterization and age-dependent changes. *Mol Hum Reprod* 2003; 9: 639-643.
204. Moffatt O, Drury S, Tomlinson M, Afnan M, Sakkas D. The apoptotic profile of human cumulus cells changes with patient age and after exposure to sperm but not in relation to oocyte maturity. *Fertil Steril* 2002; 77: 1006-1011.
205. Van Blerkom J. Mitochondria in human oogenesis and preimplantation embryogenesis: engines of metabolism, ionic regulation and developmental competence. *Reproduction* 2004; 128: 269-280.
206. Amicarelli F, Ragnelli AM, Aimola P, Bonfigli A, Colafarina S, Di Ilio C, Miranda M. Age-dependent ultrastructural alterations and

- biochemical response of rat skeletal muscle after hypoxic or hyperoxic treatments. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1453: 105-114.
207. Meister A. Selective modification of glutathione metabolism. *Science* 1983; 220: 472-477.
208. Luberda Z. The role of glutathione in mammalian gametes. *Reprod Biol* 2005; 5: 5-17.
209. Samiec PS, Drews-Botsch C, Flagg EW, Kurtz JC, Sternberg P, Jr., Reed RL, Jones DP. Glutathione in human plasma: decline in association with aging, age-related macular degeneration, and diabetes. *Free Radic Biol Med* 1998; 24: 699-704.
210. Rebrin I, Sohal RS. Pro-oxidant shift in glutathione redox state during aging. *Adv Drug Deliv Rev* 2008; 60: 1545-1552.
211. Ballatori N, Krance SM, Notenboom S, Shi S, Tieu K, Hammond CL. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biol Chem* 2009; 390: 191-214.
212. Viveros MP, Arranz L, Hernanz A, Miquel J, De la Fuente M. A model of premature aging in mice based on altered stress-related behavioral response and immunosenescence. *Neuroimmunomodulation* 2007; 14: 157-162.
213. Sethna SS, Holleschau AM, Rathbun WB. Activity of glutathione synthesis enzymes in human lens related to age. *Curr Eye Res* 1982; 2: 735-742.
214. Sastre J, Martin JA, Gomez-Cabrera MC, Pereda J, Borrás C, Pallardo FV, Vina J. Age-associated oxidative damage leads to absence of gamma-cystathionase in over 50% of rat lenses: relevance in cataractogenesis. *Free Radic Biol Med* 2005; 38: 575-582.
215. Holleschau AM, Rathbun WB. The effects of age on glutathione peroxidase and glutathione reductase activities in lenses of Old World simians and prosimians. *Curr Eye Res* 1994; 13: 331-336.
216. Katakura K, Kishida K, Hirano H. Changes in rat lens proteins and glutathione reductase activity with advancing age. *Int J Vitam Nutr Res* 2004; 74: 329-333.
217. Zuelke KA, Jones DP, Perreault SD. Glutathione oxidation is associated with altered microtubule function and disrupted fertilization in mature hamster oocytes. *Biol Reprod* 1997; 57: 1413-1419.
218. Yamauchi N, Nagai T. Male pronuclear formation in denuded porcine oocytes after in vitro maturation in the presence of cysteamine. *Biol Reprod* 1999; 61: 828-833.
219. de Matos DG, Furnus CC. The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine in vitro maturation on embryo development effect of beta-mercaptoethanol, cysteine and cystine. *Theriogenology* 2000; 53: 761-771.
220. de Matos DG, Herrera C, Cortvrintdt R, Smitz J, Van Soom A, Nogueira D, Pasqualini RS. Cysteamine supplementation during in

- vitro maturation and embryo culture: a useful tool for increasing the efficiency of bovine in vitro embryo production. *Mol Reprod Dev* 2002; 62: 203-209.
221. Whitaker BD, Knight JW. Exogenous gamma-glutamyl cycle compounds supplemented to in vitro maturation medium influence in vitro fertilization, culture, and viability parameters of porcine oocytes and embryos. *Theriogenology* 2004; 62: 311-322.
 222. Luciano AM, Goudet G, Perazzoli F, Lahuec C, Gerard N. Glutathione content and glutathione peroxidase expression in in vivo and in vitro matured equine oocytes. *Mol Reprod Dev* 2006; 73: 658-666.
 223. Furnus CC, de Matos DG, Picco S, Garcia PP, Inda AM, Mattioli G, Errecalde AL. Metabolic requirements associated with GSH synthesis during in vitro maturation of cattle oocytes. *Anim Reprod Sci* 2008; 109: 88-99.
 224. Funahashi H, Cantley TC, Stumpf TT, Terlouw SL, Day BN. In vitro development of in vitro-matured porcine oocytes following chemical activation or in vitro fertilization. *Biol Reprod* 1994; 50: 1072-1077.
 225. Furnus CC, de Matos DG, Moses DF. Cumulus expansion during in vitro maturation of bovine oocytes: relationship with intracellular glutathione level and its role on subsequent embryo development. *Mol Reprod Dev* 1998; 51: 76-83.
 226. Goto Y, Noda Y, Mori T, Nakano M. Increased generation of reactive oxygen species in embryos cultured in vitro. *Free Radic Biol Med* 1993; 15: 69-75.
 227. Bannai S. Transport of cystine and cysteine in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 1984; 779: 289-306.
 228. Issels RD, Nagele A, Eckert KG, Wilmanns W. Promotion of cystine uptake and its utilization for glutathione biosynthesis induced by cysteamine and N-acetylcysteine. *Biochem Pharmacol* 1988; 37: 881-888.
 229. Meister A, Tate SS. Glutathione and related gamma-glutamyl compounds: biosynthesis and utilization. *Annu Rev Biochem* 1976; 45: 559-604.
 230. Caamano JN, Ryoo ZY, Thomas JA, Youngs CR. beta-mercaptoethanol enhances blastocyst formation rate of bovine in vitro-matured/in vitro-fertilized embryos. *Biol Reprod* 1996; 55: 1179-1184.
 231. de Matos DG, Furnus CC, Moses DF, Baldassarre H. Effect of cysteamine on glutathione level and developmental capacity of bovine oocyte matured in vitro. *Mol Reprod Dev* 1995; 42: 432-436.
 232. de Matos DG, Furnus CC, Moses DF, Martinez AG, Matkovic M. Stimulation of glutathione synthesis of in vitro matured bovine oocytes and its effect on embryo development and freezability. *Mol Reprod Dev* 1996; 45: 451-457.

233. 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.
234. Curnow EC, Ryan J, Saunders D, Hayes ES. Bovine in vitro oocyte maturation as a model for manipulation of the gamma-glutamyl cycle and intraoocyte glutathione. *Reprod Fertil Dev* 2008; 20: 579-588.
235. Luciano AM, Lodde V, Beretta MS, Colleoni S, Lauria A, Modena S. Developmental capability of denuded bovine oocyte in a Co-culture system with intact cumulus-oocyte complexes: Role of cumulus cells, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate, and glutathione. *Mol Reprod Dev* 2005; 71: 389-397.
236. Deleuze S, Goudet G. Cysteamine Supplementation of In vitro Maturation Media: A Review. *Reprod Domest Anim* 2010; 45: e476-e482.
237. Espey MG, Miranda KM, Feelisch M, Fukuto J, Grisham MB, Vitek MP, Wink DA. Mechanisms of cell death governed by the balance between nitrosative and oxidative stress. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 899: 209-221.
238. Goligorsky MS, Budzikowski AS, Tsukahara H, Noiri E. Cooperation between endothelin and nitric oxide in promoting endothelial cell migration and angiogenesis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1999; 26: 269-271.
239. Sessa WC. Molecular control of blood flow and angiogenesis: role of nitric oxide. *J Thromb Haemost* 2009; 7 Suppl 1: 35-37.
240. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *Faseb J* 1992; 6: 3051-3064.
241. Schindler H, Bogdan C. NO as a signaling molecule: effects on kinases. *Int Immunopharmacol* 2001; 1: 1443-1455.
242. Van Voorhis BJ, Moore K, Strijbos PJ, Nelson S, Baylis SA, Grzybicki D, Weiner CP. Expression and localization of inducible and endothelial nitric oxide synthase in the rat ovary. Effects of gonadotropin stimulation in vivo. *J Clin Invest* 1995; 96: 2719-2726.
243. Dave S, Farrance DP, Whitehead SA. Evidence that nitric oxide inhibits steroidogenesis in cultured rat granulosa cells. *Clin Sci (Lond)* 1997; 92: 277-284.
244. Rosselli M, Keller PJ, Dubey RK. Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. *Hum Reprod Update* 1998; 4: 3-24.
245. Van Voorhis BJ, Dunn MS, Snyder GD, Weiner CP. Nitric oxide: an autocrine regulator of human granulosa-luteal cell steroidogenesis. *Endocrinology* 1994; 135: 1799-1806.
246. Grasselli F, Ponderato N, Basini G, Tamanini C. Nitric oxide synthase expression and nitric oxide/cyclic GMP pathway in swine granulosa cells. *Domest Anim Endocrinol* 2001; 20: 241-252.

247. Masuda M, Kubota T, Karnada S, Aso T. Nitric oxide inhibits steroidogenesis in cultured porcine granulosa cells. *Mol Hum Reprod* 1997; 3: 285-292.
248. Matsumi H, Yano T, Osuga Y, Kugu K, Tang X, Xu JP, Yano N, Kurashima Y, Ogura T, Tsutsumi O, Koji T, Esumi H, Taketani Y. Regulation of nitric oxide synthase to promote cytotaxis in ovarian follicular development. *Biol Reprod* 2000; 63: 141-146.
249. Basini G, Baratta M, Ponderato N, Bussolati S, Tamanini C. Is nitric oxide an autocrine modulator of bovine granulosa cell function? *Reprod Fertil Dev* 1998; 10: 471-478.
250. Basini G, Grasselli F, Ponderato N, Bussolati S, Tamanini C. Lipid hydroperoxide and cGMP are not involved in nitric oxide inhibition of steroidogenesis in bovine granulosa cells. *Reprod Fertil Dev* 2000; 12: 289-295.
251. Murad F. Regulation of cytosolic guanylyl cyclase by nitric oxide: the NO-cyclic GMP signal transduction system. *Adv Pharmacol* 1994; 26: 19-33.
252. Walford G, Loscalzo J. Nitric oxide in vascular biology. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 2112-2118.
253. Bush PA, Gonzalez NE, Ignarro LJ. Biosynthesis of nitric oxide and citrulline from L-arginine by constitutive nitric oxide synthase present in rabbit corpus cavernosum. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 186: 308-314.
254. Stuehr DJ. Enzymes of the L-arginine to nitric oxide pathway. *J Nutr* 2004; 134: 2748S-2751S; discussion 2765S-2767S.
255. Palmer RM, Moncada S. A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 158: 348-352.
256. Dixit VD, Parvizi N. Nitric oxide and the control of reproduction. *Anim Reprod Sci* 2001; 65: 1-16.
257. Mehta JL, Chen LY, Kone BC, Mehta P, Turner P. Identification of constitutive and inducible forms of nitric oxide synthase in human platelets. *J Lab Clin Med* 1995; 125: 370-377.
258. Suschek C, Rothe H, Fehsel K, Enczmann J, Kolb-Bachofen V. Induction of a macrophage-like nitric oxide synthase in cultured rat aortic endothelial cells. IL-1 beta-mediated induction regulated by tumor necrosis factor-alpha and IFN-gamma. *J Immunol* 1993; 151: 3283-3291.
259. Andrew PJ, Mayer B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res* 1999; 43: 521-531.
260. Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR, Snyder SH. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* 1991; 351: 714-718.
261. Stuehr DJ, Griffith OW. Mammalian nitric oxide synthases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 1992; 65: 287-346.

262. White KA, Marletta MA. Nitric oxide synthase is a cytochrome P-450 type hemoprotein. *Biochemistry* 1992; 31: 6627-6631.
263. Wang Y, Goligorsky MS, Lin M, Wilcox JN, Marsden PA. A novel, testis-specific mRNA transcript encoding an NH₂-terminal truncated nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 1997; 272: 11392-11401.
264. Wang Y, Marsden PA. Nitric oxide synthases: gene structure and regulation. *Adv Pharmacol* 1995; 34: 71-90.
265. Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* 1990; 347: 768-770.
266. Bredt DS, Snyder SH. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87: 682-685.
267. Hall AV, Antoniou H, Wang Y, Cheung AH, Arbus AM, Olson SL, Lu WC, Kau CL, Marsden PA. Structural organization of the human neuronal nitric oxide synthase gene (NOS1). *J Biol Chem* 1994; 269: 33082-33090.
268. Springall DR, Riveros-Moreno V, Buttery L, Suburo A, Bishop AE, Merrett M, Moncada S, Polak JM. Immunological detection of nitric oxide synthase(s) in human tissues using heterologous antibodies suggesting different isoforms. *Histochemistry* 1992; 98: 259-266.
269. Nakane M, Schmidt HH, Pollock JS, Forstermann U, Murad F. Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. *FEBS Lett* 1993; 316: 175-180.
270. Venema RC, Nishida K, Alexander RW, Harrison DG, Murphy TJ. Organization of the bovine gene encoding the endothelial nitric oxide synthase. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1218: 413-420.
271. Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM, Tsui LC, Schappert KT. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem* 1993; 268: 17478-17488.
272. Robinson LJ, Weremowicz S, Morton CC, Michel T. Isolation and chromosomal localization of the human endothelial nitric oxide synthase (NOS3) gene. *Genomics* 1994; 19: 350-357.
273. Stuehr DJ, Cho HJ, Kwon NS, Weise MF, Nathan CF. Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 7773-7777.
274. Chartrain NA, Geller DA, Koty PP, Sitrin NF, Nussler AK, Hoffman EP, Billiar TR, Hutchinson NI, Mudgett JS. Molecular cloning, structure, and chromosomal localization of the human inducible nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem* 1994; 269: 6765-6772.
275. Jablonka-Shariff A, Olson LM. Hormonal regulation of nitric oxide synthases and their cell-specific expression during follicular development in the rat ovary. *Endocrinology* 1997; 138: 460-468.

276. Mitchell LM, Kennedy CR, Hartshorne GM. Expression of nitric oxide synthase and effect of substrate manipulation of the nitric oxide pathway in mouse ovarian follicles. *Hum Reprod* 2004; 19: 30-40.
277. Kim H, Moon C, Ahn M, Lee Y, Kim H, Kim S, Ha T, Jee Y, Shin T. Expression of nitric oxide synthase isoforms in the porcine ovary during follicular development. *J Vet Sci* 2005; 6: 97-101.
278. Pires PR, Santos NP, Adona PR, Natori MM, Schwarz KR, de Bem TH, Leal CL. Endothelial and inducible nitric oxide synthases in oocytes of cattle. *Anim Reprod Sci* 2009; 116: 233-243.
279. Nakamura Y, Yamagata Y, Sugino N, Takayama H, Kato H. Nitric oxide inhibits oocyte meiotic maturation. *Biol Reprod* 2002; 67: 1588-1592.
280. Sengoku K, Takuma N, Horikawa M, Tsuchiya K, Komori H, Sharifa D, Tamate K, Ishikawa M. Requirement of nitric oxide for murine oocyte maturation, embryo development, and trophoblast outgrowth in vitro. *Mol Reprod Dev* 2001; 58: 262-268.
281. Kuo RC, Baxter GT, Thompson SH, Stricker SA, Patton C, Bonaventura J, Epel D. NO is necessary and sufficient for egg activation at fertilization. *Nature* 2000; 406: 633-636.
282. Petr J, Rajmon R, Chmelikova E, Tomanek M, Lanska V, Pribanova M, Jilek F. Nitric-oxide-dependent activation of pig oocytes: the role of the cGMP-signalling pathway. *Zygote* 2006; 14: 9-16.
283. Pallares P, Garcia-Fernandez RA, Criado LM, Letelier CA, Esteban D, Fernandez-Toro JM, Flores JM, Gonzalez-Bulnes A. Disruption of the endothelial nitric oxide synthase gene affects ovulation, fertilization and early embryo survival in a knockout mouse model. *Reproduction* 2008; 136: 573-579.
284. Salvemini D. Regulation of cyclooxygenase enzymes by nitric oxide. *Cell Mol Life Sci* 1997; 53: 576-582.
285. Zackrisson U, Mikuni M, Wallin A, Delbro D, Hedin L, Brannstrom M. Cell-specific localization of nitric oxide synthases (NOS) in the rat ovary during follicular development, ovulation and luteal formation. *Hum Reprod* 1996; 11: 2667-2673.
286. Nakamura Y, Kashida S, Nakata M, Takiguchi S, Yamagata Y, Takayama H, Sugino N, Kato H. Changes in nitric oxide synthase activity in the ovary of gonadotropin treated rats: the role of nitric oxide during ovulation. *Endocr J* 1999; 46: 529-538.
287. Hefler LA, Gregg AR. Inducible and endothelial nitric oxide synthase: genetic background affects ovulation in mice. *Fertil Steril* 2002; 77: 147-151.
288. Jablonka-Shariff A, Olson LM. The role of nitric oxide in oocyte meiotic maturation and ovulation: meiotic abnormalities of endothelial nitric oxide synthase knock-out mouse oocytes. *Endocrinology* 1998; 139: 2944-2954.

289. Bu S, Xia G, Tao Y, Lei L, Zhou B. Dual effects of nitric oxide on meiotic maturation of mouse cumulus cell-enclosed oocytes in vitro. *Mol Cell Endocrinol* 2003; 207: 21-30.
290. Tao Y, Xie H, Hong H, Chen X, Jang J, Xia G. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on porcine oocyte meiotic maturation. *Zygote* 2005; 13: 1-9.
291. Petr J, Rajmon R, Lanska V, Sedmikova M, Jilek F. Nitric oxide-dependent activation of pig oocytes: role of calcium. *Mol Cell Endocrinol* 2005; 242: 16-22.
292. Schwarz KR, Pires PR, Adona PR, Camara de Bem TH, Leal CL. Influence of nitric oxide during maturation on bovine oocyte meiosis and embryo development in vitro. *Reprod Fertil Dev* 2008; 20: 529-536.
293. Gross SS, Wolin MS. Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. *Annu Rev Physiol* 1995; 57: 737-769.
294. Bilodeau-Goeseels S. Effects of manipulating the nitric oxide/cyclic GMP pathway on bovine oocyte meiotic resumption in vitro. *Theriogenology* 2007; 68: 693-701.
295. Bu S, Xie H, Tao Y, Wang J, Xia G. Nitric oxide influences the maturation of cumulus cell-enclosed mouse oocytes cultured in spontaneous maturation medium and hypoxanthine-supplemented medium through different signaling pathways. *Mol Cell Endocrinol* 2004; 223: 85-93.
296. Miao YL, Kikuchi K, Sun QY, Schatten H. Oocyte aging: cellular and molecular changes, developmental potential and reversal possibility. *Hum Reprod Update* 2009; 15: 573-585.
297. Hamatani T, Falco G, Carter MG, Akutsu H, Stagg CA, Sharov AA, Dudekula DB, VanBuren V, Ko MS. Age-associated alteration of gene expression patterns in mouse oocytes. *Hum Mol Genet* 2004; 13: 2263-2278.
298. Steuerwald NM, Bermudez MG, Wells D, Munne S, Cohen J. Maternal age-related differential global expression profiles observed in human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2007; 14: 700-708.
299. Dumollard R, Duchen M, Carroll J. The role of mitochondrial function in the oocyte and embryo. *Curr Top Dev Biol* 2007; 77: 21-49.
300. Van Blerkom J, Sinclair J, Davis P. Mitochondrial transfer between oocytes: potential applications of mitochondrial donation and the issue of heteroplasmy. *Hum Reprod* 1998; 13: 2857-2868.
301. Wilding M, Dale B, Marino M, di Matteo L, Alviggi C, Pisaturo ML, Lombardi L, De Placido G. Mitochondrial aggregation patterns and activity in human oocytes and preimplantation embryos. *Hum Reprod* 2001; 16: 909-917.

302. Keefe DL, Niven-Fairchild T, Powell S, Buradagunta S. Mitochondrial deoxyribonucleic acid deletions in oocytes and reproductive aging in women. *Fertil Steril* 1995; 64: 577-583.
303. Eichenlaub-Ritter U, Vogt E, Yin H, Gosden R. Spindles, mitochondria and redox potential in ageing oocytes. *Reprod Biomed Online* 2004; 8: 45-58.
304. Eichenlaub-Ritter U, Wieczorek M, Luke S, Seidel T. Age related changes in mitochondrial function and new approaches to study redox regulation in mammalian oocytes in response to age or maturation conditions. *Mitochondrion* 2010.
305. Tarin JJ, Perez-Albala S, Cano A. Cellular and morphological traits of oocytes retrieved from aging mice after exogenous ovarian stimulation. *Biol Reprod* 2001; 65: 141-150.
306. Takeuchi T, Neri QV, Katagiri Y, Rosenwaks Z, Palermo GD. Effect of treating induced mitochondrial damage on embryonic development and epigenesis. *Biol Reprod* 2005; 72: 584-592.
307. Pellestor F, Anahory T, Hamamah S. Effect of maternal age on the frequency of cytogenetic abnormalities in human oocytes. *Cytogenet Genome Res* 2005; 111: 206-212.
308. Kuliev A, Cieslak J, Verlinsky Y. Frequency and distribution of chromosome abnormalities in human oocytes. *Cytogenet Genome Res* 2005; 111: 193-198.
309. Malmanche N, Maia A, Sunkel CE. The spindle assembly checkpoint: preventing chromosome mis-segregation during mitosis and meiosis. *FEBS Lett* 2006; 580: 2888-2895.
310. Homer HA. Mad2 and spindle assembly checkpoint function during meiosis I in mammalian oocytes. *Histol Histopathol* 2006; 21: 873-886.
311. Hodges CA, Revenkova E, Jessberger R, Hassold TJ, Hunt PA. SMC1beta-deficient female mice provide evidence that cohesins are a missing link in age-related nondisjunction. *Nat Genet* 2005; 37: 1351-1355.
312. Steuerwald N, Cohen J, Herrera RJ, Sandalinas M, Brenner CA. Association between spindle assembly checkpoint expression and maternal age in human oocytes. *Mol Hum Reprod* 2001; 7: 49-55.
313. Domingues TS, Rocha AM, Serafini PC. Tests for ovarian reserve: reliability and utility. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2010; 22: 271-276.
314. Jost A, Vigier B, Prepin J, Perchellet JP. Studies on sex differentiation in mammals. *Recent Prog Horm Res* 1973; 29: 1-41.
315. Josso N, Clemente N. Transduction pathway of anti-Mullerian hormone, a sex-specific member of the TGF-beta family. *Trends Endocrinol Metab* 2003; 14: 91-97.
316. Teixeira J, Maheswaran S, Donahoe PK. Mullerian inhibiting substance: an instructive developmental hormone with diagnostic and possible therapeutic applications. *Endocr Rev* 2001; 22: 657-674.

317. Rajpert-De Meyts E, Jorgensen N, Graem N, Muller J, Cate RL, Skakkebaek NE. Expression of anti-Mullerian hormone during normal and pathological gonadal development: association with differentiation of Sertoli and granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 3836-3844.
318. Weenen C, Laven JS, Von Bergh AR, Cranfield M, Groome NP, Visser JA, Kramer P, Fauser BC, Themmen AP. Anti-Mullerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. *Mol Hum Reprod* 2004; 10: 77-83.
319. Monniaux D, Clemente N, Touze JL, Belville C, Rico C, Bontoux M, Picard JY, Fabre S. Intrafollicular steroids and anti-mullerian hormone during normal and cystic ovarian follicular development in the cow. *Biol Reprod* 2008; 79: 387-396.
320. Takahashi M, Hayashi M, Manganaro TF, Donahoe PK. The ontogeny of mullerian inhibiting substance in granulosa cells of the bovine ovarian follicle. *Biol Reprod* 1986; 35: 447-453.
321. Vigier B, Tran D, Legeai L, Bezard J, Josso N. Origin of anti-Mullerian hormone in bovine freemartin fetuses. *J Reprod Fertil* 1984; 70: 473-479.
322. Bezard J, Vigier B, Tran D, Mauleon P, Josso N. Immunocytochemical study of anti-Mullerian hormone in sheep ovarian follicles during fetal and post-natal development. *J Reprod Fertil* 1987; 80: 509-516.
323. Hirobe S, He WW, Gustafson ML, MacLaughlin DT, Donahoe PK. Mullerian inhibiting substance gene expression in the cycling rat ovary correlates with recruited or graafian follicle selection. *Biol Reprod* 1994; 50: 1238-1243.
324. Hirobe S, He WW, Lee MM, Donahoe PK. Mullerian inhibiting substance messenger ribonucleic acid expression in granulosa and Sertoli cells coincides with their mitotic activity. *Endocrinology* 1992; 131: 854-862.
325. Ueno S, Takahashi M, Manganaro TF, Ragin RC, Donahoe PK. Cellular localization of mullerian inhibiting substance in the developing rat ovary. *Endocrinology* 1989; 124: 1000-1006.
326. Dutertre M, Gouedard L, Xavier F, Long WQ, di Clemente N, Picard JY, Rey R. Ovarian granulosa cell tumors express a functional membrane receptor for anti-Mullerian hormone in transgenic mice. *Endocrinology* 2001; 142: 4040-4046.
327. Salmon NA, Handyside AH, Joyce IM. Oocyte regulation of anti-Mullerian hormone expression in granulosa cells during ovarian follicle development in mice. *Dev Biol* 2004; 266: 201-208.
328. Johnson PA, Kent TR, Urick ME, Giles JR. Expression and regulation of anti-mullerian hormone in an oviparous species, the hen. *Biol Reprod* 2008; 78: 13-19.

329. Baarends WM, Uilenbroek JT, Kramer P, Hoogerbrugge JW, van Leeuwen EC, Themmen AP, Grootegoed JA. Anti-mullerian hormone and anti-mullerian hormone type II receptor messenger ribonucleic acid expression in rat ovaries during postnatal development, the estrous cycle, and gonadotropin-induced follicle growth. *Endocrinology* 1995; 136: 4951-4962.
330. Andersen CY, Byskov AG. Estradiol and regulation of anti-Mullerian hormone, inhibin-A, and inhibin-B secretion: analysis of small antral and preovulatory human follicles' fluid. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 4064-4069.
331. Fanchin R, Louafi N, Mendez Lozano DH, Frydman N, Frydman R, Taieb J. Per-follicle measurements indicate that anti-mullerian hormone secretion is modulated by the extent of follicular development and luteinization and may reflect qualitatively the ovarian follicular status. *Fertil Steril* 2005; 84: 167-173.
332. Seifer DB, MacLaughlin DT, Penzias AS, Behrman HR, Asmundson L, Donahoe PK, Haning RV, Jr., Flynn SD. Gonadotropin-releasing hormone agonist-induced differences in granulosa cell cycle kinetics are associated with alterations in follicular fluid mullerian-inhibiting substance and androgen content. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 76: 711-714.
333. Kevenaar ME, Meerasahib MF, Kramer P, van de Lang-Born BM, de Jong FH, Groome NP, Themmen AP, Visser JA. Serum anti-mullerian hormone levels reflect the size of the primordial follicle pool in mice. *Endocrinology* 2006; 147: 3228-3234.
334. van Rooij IA, Tonkelaar I, Broekmans FJ, Looman CW, Scheffer GJ, de Jong FH, Themmen AP, te Velde ER. Anti-mullerian hormone is a promising predictor for the occurrence of the menopausal transition. *Menopause* 2004; 11: 601-606.
335. van Rooij IA, Broekmans FJ, Scheffer GJ, Looman CW, Habbema JD, de Jong FH, Fauser BJ, Themmen AP, te Velde ER. Serum antimullerian hormone levels best reflect the reproductive decline with age in normal women with proven fertility: a longitudinal study. *Fertil Steril* 2005; 83: 979-987.
336. de Vet A, Laven JS, de Jong FH, Themmen AP, Fauser BC. Antimullerian hormone serum levels: a putative marker for ovarian aging. *Fertil Steril* 2002; 77: 357-362.
337. Sowers MR, Eyvazzadeh AD, McConnell D, Yosef M, Jannausch ML, Zhang D, Harlow S, Randolph JF, Jr. Anti-mullerian hormone and inhibin B in the definition of ovarian aging and the menopause transition. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93: 3478-3483.
338. van Rooij IA, Broekmans FJ, te Velde ER, Fauser BC, Bancsi LF, de Jong FH, Themmen AP. Serum anti-Mullerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. *Hum Reprod* 2002; 17: 3065-3071.

339. van Disseldorp J, Broekmans FJ, Peeters PH, Fauser BC, van der Schouw YT. The association between vascular function-related genes and age at natural menopause. *Menopause* 2008; 15: 511-516.
340. Rico C, Fabre S, Medigue C, di Clemente N, Clement F, Bontoux M, Touze JL, Dupont M, Briant E, Remy B, Beckers JF, Monniaux D. Anti-mullerian hormone is an endocrine marker of ovarian gonadotropin-responsive follicles and can help to predict superovulatory responses in the cow. *Biol Reprod* 2009; 80: 50-59.
341. Vale W, Rivier C, Hsueh A, Campen C, Meunier H, Bicsak T, Vaughan J, Corrigan A, Bardin W, Sawchenko P, et al. Chemical and biological characterization of the inhibin family of protein hormones. *Recent Prog Horm Res* 1988; 44: 1-34.
342. Weiss J, Crowley WF, Jr., Halvorson LM, Jameson JL. Perfusion of rat pituitary cells with gonadotropin-releasing hormone, activin, and inhibin reveals distinct effects on gonadotropin gene expression and secretion. *Endocrinology* 1993; 132: 2307-2311.
343. Groome NP, Illingworth PJ, O'Brien M, Pai R, Rodger FE, Mather JP, McNeilly AS. Measurement of dimeric inhibin B throughout the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 1401-1405.
344. Roberts VJ, Barth S, el-Roeiy A, Yen SS. Expression of inhibin/activin subunits and follistatin messenger ribonucleic acids and proteins in ovarian follicles and the corpus luteum during the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77: 1402-1410.
345. Klein NA, Illingworth PJ, Groome NP, McNeilly AS, Battaglia DE, Soules MR. Decreased inhibin B secretion is associated with the monotropic FSH rise in older, ovulatory women: a study of serum and follicular fluid levels of dimeric inhibin A and B in spontaneous menstrual cycles. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 2742-2745.
346. Danforth DR, Arbogast LK, Mroueh J, Kim MH, Kennard EA, Seifer DB, Friedman CI. Dimeric inhibin: a direct marker of ovarian aging. *Fertil Steril* 1998; 70: 119-123.
347. Lee SJ, Lenton EA, Sexton L, Cooke ID. The effect of age on the cyclical patterns of plasma LH, FSH, oestradiol and progesterone in women with regular menstrual cycles. *Hum Reprod* 1988; 3: 851-855.
348. Lenton EA, King H, Thomas EJ, Smith SK, McLachlan RI, MacNeil S, Cooke ID. The endocrine environment of the human oocyte. *J Reprod Fertil* 1988; 82: 827-841.
349. MacNaughton J, Banah M, McCloud P, Hee J, Burger H. Age related changes in follicle stimulating hormone, luteinizing hormone, oestradiol and immunoreactive inhibin in women of reproductive age. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1992; 36: 339-345.

350. Reyes FI, Winter JS, Faiman C. Pituitary-ovarian relationships preceding the menopause. I. A cross-sectional study of serum follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, prolactin, estradiol, and progesterone levels. *Am J Obstet Gynecol* 1977; 129: 557-564.
351. Lenton EA, de Kretser DM, Woodward AJ, Robertson DM. Inhibin concentrations throughout the menstrual cycles of normal, infertile, and older women compared with those during spontaneous conception cycles. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 73: 1180-1190.
352. Sherman BM, West JH, Korenman SG. The menopausal transition: analysis of LH, FSH, estradiol, and progesterone concentrations during menstrual cycles of older women. *J Clin Endocrinol Metab* 1976; 42: 629-636.
353. Rothman MS, Carlson NE, Xu M, Wang C, Swerdloff R, Lee P, Goh VH, Ridgway EC, Wierman ME. Reexamination of Testosterone; Dihydrotestosterone; Estradiol and Estrone Levels across the Menstrual Cycle and in Postmenopausal Women Measured by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Steroids* 2010.
354. Kim YK, Wasser SK, Fujimoto VY, Klein NA, Moore DE, Soules MR. Utility of follicle stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), oestradiol and FSH:LH ratio in predicting reproductive age in normal women. *Hum Reprod* 1997; 12: 1152-1155.
355. Musey VC, Collins DC, Musey PI, Martino-Saltzman D, Preedy JR. Age-related changes in the female hormonal environment during reproductive life. *Am J Obstet Gynecol* 1987; 157: 312-317.
356. Santoro N, Brown JR, Adel T, Skurnick JH. Characterization of reproductive hormonal dynamics in the perimenopause. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 1495-1501.
357. de Koning CH, McDonnell J, Themmen AP, de Jong FH, Homburg R, Lambalk CB. The endocrine and follicular growth dynamics throughout the menstrual cycle in women with consistently or variably elevated early follicular phase FSH compared with controls. *Hum Reprod* 2008; 23: 1416-1423.
358. Price CA, Carriere PD, Bhatia B, Groome NP. Comparison of hormonal and histological changes during follicular growth, as measured by ultrasonography, in cattle. *J Reprod Fertil* 1995; 103: 63-68.
359. Grimes RW, Ireland JJ. Relationship of macroscopic appearance of the surface of bovine ovarian follicles concentrations of steroids in follicular fluid, and maturation of oocytes in vitro. *Biol Reprod* 1986; 35: 725-732.
360. Grimes RW, Matton P, Ireland JJ. A comparison of histological and non-histological indices of atresia and follicular function. *Biol Reprod* 1987; 37: 82-88.

361. Ireland JJ, Roche JF. Development of nonovulatory antral follicles in heifers: changes in steroids in follicular fluid and receptors for gonadotropins. *Endocrinology* 1983; 112: 150-156.
362. Jolly PD, Tisdall DJ, Heath DA, Lun S, McNatty KP. Apoptosis in bovine granulosa cells in relation to steroid synthesis, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response to follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone, and follicular atresia. *Biol Reprod* 1994; 51: 934-944.
363. McNatty KP, Heath DA, Henderson KM, Lun S, Hurst PR, Ellis LM, Montgomery GW, Morrison L, Thurley DC. Some aspects of thecal and granulosa cell function during follicular development in the bovine ovary. *J Reprod Fertil* 1984; 72: 39-53.
364. Coulam CB, Adamson SC, Annegers JF. Incidence of premature ovarian failure. *Obstet Gynecol* 1986; 67: 604-606.
365. Woad KJ, Watkins WJ, Prendergast D, Shelling AN. The genetic basis of premature ovarian failure. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2006; 46: 242-244.
366. Nelson LM. Clinical practice. Primary ovarian insufficiency. *N Engl J Med* 2009; 360: 606-614.
367. Lambalk CB, De Koning CH, Braat DD. The endocrinology of dizygotic twinning in the human. *Mol Cell Endocrinol* 1998; 145: 97-102.
368. Martin NG, Healey SC, Pangan TS, Heath AC, Turner G. Do mothers of dizygotic twins have earlier menopause? A role for fragile X? *Am J Med Genet* 1997; 69: 114-116.
369. Turner G, Robinson H, Wake S, Martin N. Dizygous twinning and premature menopause in fragile X syndrome. *Lancet* 1994; 344: 1500.
370. Wyshak G. Twinning rates among women at the end of their reproductive span and their relation to age at menopause. *Am J Epidemiol* 1975; 102: 170-178.
371. Freeman SB, Yang Q, Allran K, Taft LF, Sherman SL. Women with a reduced ovarian complement may have an increased risk for a child with Down syndrome. *Am J Hum Genet* 2000; 66: 1680-1683.
372. van Montfrans JM, Dorland M, Oosterhuis GJ, van Vugt JM, Rekers-Mombarg LT, Lambalk CB. Increased concentrations of follicle-stimulating hormone in mothers of children with Down's syndrome. *Lancet* 1999; 353: 1853-1854.
373. van Montfrans JM, van Hooff MH, Martens F, Lambalk CB. Basal FSH, estradiol and inhibin B concentrations in women with a previous Down's syndrome affected pregnancy. *Hum Reprod* 2002; 17: 44-47.
374. Trout SW, Seifer DB. Do women with unexplained recurrent pregnancy loss have higher day 3 serum FSH and estradiol values? *Fertil Steril* 2000; 74: 335-337.

375. Dorland M, van Kooij RJ, te Velde ER. General ageing and ovarian ageing. *Maturitas* 1998; 30: 113-118.
376. Bunday S. Clinical and genetic features of ataxia-telangiectasia. *Int J Radiat Biol* 1994; 66: S23-29.
377. Carr J, Hollins S. Menopause in women with learning disabilities. *J Intellect Disabil Res* 1995; 39 (Pt 2): 137-139.
378. Epstein CJ, Martin GM, Schultz AL, Motulsky AG. Werner's syndrome a review of its symptomatology, natural history, pathologic features, genetics and relationship to the natural aging process. *Medicine (Baltimore)* 1966; 45: 177-221.
379. Martin GM, Oshima J. Lessons from human progeroid syndromes. *Nature* 2000; 408: 263-266.
380. Cooper GS, Baird DD, Weinberg CR, Ephross SA, Sandler DP. Age at menopause and childbearing patterns in relation to mortality. *Am J Epidemiol* 2000; 151: 620-623.
381. Cooper GS, Sandler DP. Age at natural menopause and mortality. *Ann Epidemiol* 1998; 8: 229-235.
382. Snowdon DA. Early natural menopause and the duration of postmenopausal life. Findings from a mathematical model of life expectancy. *J Am Geriatr Soc* 1990; 38: 402-408.
383. Fassnacht W, Mempel A, Strowitzki T, Vogt PH. Premature ovarian failure (POF) syndrome: towards the molecular clinical analysis of its genetic complexity. *Curr Med Chem* 2006; 13: 1397-1410.
384. Simpson JL. Genetic and phenotypic heterogeneity in ovarian failure: overview of selected candidate genes. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1135: 146-154.
385. Welt CK, Smith PC, Taylor AE. Evidence of early ovarian aging in fragile X premutation carriers. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 4569-4574.
386. Starup J, Sele V. Premature ovarian failure. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1973; 52: 259-268.
387. Haidar MA, Baracat EC, Simoes MJ, Focchi GR, Evencio Neto J, de Lima GR. Premature ovarian failure: morphological and ultrastructural aspects. *Sao Paulo Med J* 1994; 112: 534-538.
388. Lucy MC. Fertility in high-producing dairy cows: reasons for decline and corrective strategies for sustainable improvement. *Soc Reprod Fertil Suppl* 2007; 64: 237-254.
389. Berry DP, Buckley F, Dillon P, Evans RD, Rath M, Veerkamp RF. Genetic relationships among body condition score, body weight, milk yield, and fertility in dairy cows. *J Dairy Sci* 2003; 86: 2193-2204.
390. Royal MD, Pryce JE, Woolliams JA, Flint AP. The genetic relationship between commencement of luteal activity and calving interval, body condition score, production, and linear type traits in Holstein-Friesian dairy cattle. *J Dairy Sci* 2002; 85: 3071-3080.

391. Lucy MC. Mechanisms linking nutrition and reproduction in postpartum cows. *Reprod Suppl* 2003; 61: 415-427.
392. Chagas LM, Bass JJ, Blache D, Burke CR, Kay JK, Lindsay DR, Lucy MC, Martin GB, Meier S, Rhodes FM, Roche JR, Thatcher WW, Webb R. Invited review: New perspectives on the roles of nutrition and metabolic priorities in the subfertility of high-producing dairy cows. *J Dairy Sci* 2007; 90: 4022-4032.
393. Roche JF. The effect of nutritional management of the dairy cow on reproductive efficiency. *Anim Reprod Sci* 2006; 96: 282-296.
394. Thatcher WW, Bilby TR, Bartolome JA, Silvestre F, Staples CR, Santos JE. Strategies for improving fertility in the modern dairy cow. *Theriogenology* 2006; 65: 30-44.
395. Lucy MC. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? *J Dairy Sci* 2001; 84: 1277-1293.
396. Krisher RL. The effect of oocyte quality on development. *Journal of Animal Science* 2004; 82: E14-E23.
397. Webb R, Garnsworthy PC, Campbell BK, Hunter MG. Intra-ovarian regulation of follicular development and oocyte competence in farm animals. *Theriogenology* 2007; 68 Suppl 1: S22-29.
398. Block E. A quantitative morphological investigation of the follicular system in newborn female infants. *Acta Anat (Basel)* 1953; 17: 201-206.
399. Forabosco A, Sforza C, De Pol A, Vizzotto L, Marzona L, Ferrario VF. Morphometric study of the human neonatal ovary. *Anat Rec* 1991; 231: 201-208.
400. Gougeon A, Ecochard R, Thalabard JC. Age-related changes of the population of human ovarian follicles: increase in the disappearance rate of non-growing and early-growing follicles in aging women. *Biol Reprod* 1994; 50: 653-663.
401. Richardson SJ, Senikas V, Nelson JF. Follicular depletion during the menopausal transition: evidence for accelerated loss and ultimate exhaustion. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 65: 1231-1237.
402. Lass A, Silye R, Abrams DC, Krausz T, Hovatta O, Margara R, Winston RM. Follicular density in ovarian biopsy of infertile women: a novel method to assess ovarian reserve. *Hum Reprod* 1997; 12: 1028-1031.
403. Chang MY, Chiang CH, Hsieh TT, Soong YK, Hsu KH. Use of the antral follicle count to predict the outcome of assisted reproductive technologies. *Fertil Steril* 1998; 69: 505-510.
404. Scheffer GJ, Broekmans FJ, Dorland M, Habbema JD, Looman CW, te Velde ER. Antral follicle counts by transvaginal ultrasonography are related to age in women with proven natural fertility. *Fertil Steril* 1999; 72: 845-851.
405. Huang FJ, Chang SY, Tsai MY, Kung FT, Wu JF, Chang HW. Determination of the efficiency of controlled ovarian hyperstimulation in the gonadotropin-releasing hormone agonist-

- suppression cycle using the initial follicle count during gonadotropin stimulation. *J Assist Reprod Genet* 2001; 18: 91-96.
406. Beckers NG, Macklon NS, Eijkemans MJ, Fauser BC. Women with regular menstrual cycles and a poor response to ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization exhibit follicular phase characteristics suggestive of ovarian aging. *Fertil Steril* 2002; 78: 291-297.
407. Oliveira JF, Neves JP, Moraes JC, Goncalves PB, Bahr JM, Hernandez AG, Costa LF. Follicular development and steroid concentrations in cows with different levels of fertility raised under nutritional stress. *Anim Reprod Sci* 2002; 73: 1-10.
408. Cushman RA, DeSouza JC, Hedgpeth VS, Britt JH. Superovulatory response of one ovary is related to the micro- and macroscopic population of follicles in the contralateral ovary of the Cow. *Biol Reprod* 1999; 60: 349-354.
409. Taneja M, Bols PE, Van de Velde A, Ju JC, Schreiber D, Tripp MW, Levine H, Echelard Y, Riesen J, Yang X. Developmental competence of juvenile calf oocytes in vitro and in vivo: influence of donor animal variation and repeated gonadotropin stimulation. *Biol Reprod* 2000; 62: 206-213.
410. Singh J, Dominguez M, Jaiswal R, Adams GP. A simple ultrasound test to predict the superstimulatory response in cattle. *Theriogenology* 2004; 62: 227-243.
411. Ireland JJ, Zielak-Steciwo AE, Jimenez-Krassel F, Folger J, Bettgowda A, Scheetz D, Walsh S, Mossa F, Knight PG, Smith GW, Lonergan P, Evans AC. Variation in the Ovarian Reserve Is Linked to Alterations in Intrafollicular Estradiol Production and Ovarian Biomarkers of Follicular Differentiation and Oocyte Quality in Cattle. *Biol Reprod* 2009.
412. Gandolfi F, Luciano AM, Modina S, Ponzini A, Pocar P, Armstrong DT, Lauria A. The in vitro developmental competence of bovine oocytes can be related to the morphology of the ovary. *Theriogenology* 1997; 48: 1153-1160.
413. Modina S, Borromeo V, Luciano AM, Lodde V, Franciosi F, Secchi C. Relationship between growth hormone concentrations in bovine oocytes and follicular fluid and oocyte developmental competence. *Eur J Histochem* 2007; 51: 173-180.
414. Tilly JL. Ovarian follicle counts--not as simple as 1, 2, 3. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1: 11.
415. Ireland JL, Scheetz D, Jimenez-Krassel F, Themmen AP, Ward F, Lonergan P, Smith GW, Perez GI, Evans AC, Ireland JJ. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. *Biol Reprod* 2008; 79: 1219-1225.
416. Lussier JG, Matton P, Dufour JJ. Growth rates of follicles in the ovary of the cow. *J Reprod Fertil* 1987; 81: 301-307.

417. Yang MY, Rajamahendran R. Morphological and biochemical identification of apoptosis in small, medium, and large bovine follicles and the effects of follicle-stimulating hormone and insulin-like growth factor-I on spontaneous apoptosis in cultured bovine granulosa cells. *Biol Reprod* 2000; 62: 1209-1217.
418. Abramoff MD, Magelhaes PJ, Ram SJ. Image Processing with ImageJ. In, vol. 11; 2004: 36-42.
419. Blondin P, Sirard MA. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Mol Reprod Dev* 1995; 41: 54-62.
420. de Loos F, van Vliet C, van Maurik P, Kruip TA. Morphology of immature bovine oocytes. *Gamete Res* 1989; 24: 197-204.
421. Hawk HW, Wall RJ. Improved yields of bovine blastocysts from in vitro produced oocytes .2. media and co-culture cells. *Theriogenology* 1994; 41: 1585-1594.
422. Hazelger NL, Hill DJ. Relationship of morphology and follicular fluid environment of bovine oocytes to their developmental potential in vitro. *Theriogenology* 1995; 43: 509-522.
423. Baker MA, Cerniglia GJ, Zaman A. Microtiter plate assay for the measurement of glutathione and glutathione disulfide in large numbers of biological samples. *Anal Biochem* 1990; 190: 360-365.
424. de Matos DG, Nogueira D, Cortvrint R, Herrera C, Adriaenssens T, Pasqualini RS, Smits J. Capacity of adult and prepubertal mouse oocytes to undergo embryo development in the presence of cysteamine. *Mol Reprod Dev* 2003; 64: 214-218.
425. Goud AP, Goud PT, Diamond MP, Abu-Soud HM. Nitric oxide delays oocyte aging. *Biochemistry* 2005; 44: 11361-11368.
426. Viana KS, Caldas-Bussiere MC, Matta SG, Faes MR, de Carvalho CS, Quirino CR. Effect of sodium nitroprusside, a nitric oxide donor, on the in vitro maturation of bovine oocytes. *Anim Reprod Sci* 2007; 102: 217-227.
427. Bavister BD, Boatman DE, Leibfried L, Loose M, Vernon MW. Fertilization and cleavage of rhesus monkey oocytes in vitro. *Biol Reprod* 1983; 28: 983-999.
428. Parrish JJ, Susko-Parrish J, Winer MA, First NL. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biology of Reproduction* 1988; 38: 1171-1180.
429. Tervit HR, Whittingham DG, Rowson LE. Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. *J Reprod Fertil* 1972; 30: 493-497.
430. Luciano AM, Pocar P, Milanese E, Modena S, Rieger D, Lauria A, Gandolfi F. Effect of different levels of intracellular cAMP on the in vitro maturation of cattle oocytes and their subsequent development following in vitro fertilization. *Mol Reprod Dev* 1999; 54: 86-91.
431. Vandaele L, Mateusen B, Maes DG, de Kruif A, Van Soom A. Temporal detection of caspase-3 and -7 in bovine in vitro produced

- embryos of different developmental capacity. *Reproduction* 2007; 133: 709-718.
432. Takeuchi T, Ergun B, Huang TH, Rosenwaks Z, Palermo GD. A reliable technique of nuclear transplantation for immature mammalian oocytes. *Hum Reprod* 1999; 14: 1312-1317.
433. Lundsteen C, Lind AM. A test of a climate room for preparation of chromosome slides. *Clin Genet* 1985; 28: 260-262.
434. Fulka H. Distribution of mitochondria in reconstructed mouse oocytes. *Reproduction* 2004; 127: 195-200.
435. Franciosi F, Perazzoli F, Lodde V, Modena SC, Luciano AM. Developmental competence of gametes reconstructed by germinal vesicle transplantation from fresh and cryopreserved bovine oocytes. *Fertil Steril* 2010; 93: 229-238.
436. Kuzmina TI, Alm H, Denisenko V, Tuchscherer A, Kanitz W, Torner H. Effect of recombinant bovine somatotropin (rbST) on cytoplasmic maturation of bovine oocytes and their developmental competence in vitro. *J Reprod Dev* 2007; 53: 309-316.
437. Torner H, Brussow KP, Alm H, Ratky J, Pohland R, Tuchscherer A, Kanitz W. Mitochondrial aggregation patterns and activity in porcine oocytes and apoptosis in surrounding cumulus cells depends on the stage of pre-ovulatory maturation. *Theriogenology* 2004; 61: 1675-1689.
438. Valentini L, Iorga AI, De Santis T, Ambruosi B, Reynaud K, Chastant-Maillard S, Guaricci AC, Caira M, Dell'Aquila ME. Mitochondrial distribution patterns in canine oocytes as related to the reproductive cycle stage. *Anim Reprod Sci* 2009; 117: 166-177.
439. Pendergrass W, Wolf N, Poot M. Efficacy of MitoTracker Green and CMXrosamine to measure changes in mitochondrial membrane potentials in living cells and tissues. *Cytometry A* 2004; 61: 162-169.
440. Yeh J, Kim B, Peresie J, Liang YJ, Arroyo A. Serum and ovarian Mullerian inhibiting substance, and their decline in reproductive aging. *Fertil Steril* 2007; 87: 1227-1230.
441. Dobson H, Smith R, Royal M, Knight C, Sheldon I. The high-producing dairy cow and its reproductive performance. *Reprod Domest Anim* 2007; 42 Suppl 2: 17-23.
442. Giacobbe M, Mendes Pinto-Neto A, Simoes Costa-Paiva LH, Martinez EZ. The usefulness of ovarian volume, antral follicle count and age as predictors of menopausal status. *Climacteric* 2004; 7: 255-260.
443. Giacobbe M, Pinto-Neto AM, Costa-Paiva LH, Martinez EZ. Ovarian volume, age, and menopausal status. *Menopause* 2004; 11: 180-185.
444. Laszczynska M, Brodowska A, Starczewski A, Masiuk M, Brodowski J. Human postmenopausal ovary--hormonally inactive

- fibrous connective tissue or more? *Histol Histopathol* 2008; 23: 219-226.
445. Massin N, Gougeon A, Meduri G, Thibaud E, Laborde K, Matuchansky C, Constancis E, Vacher-Lavenu MC, Paniel B, Zorn JR, Misrahi M, Kuttenn F, Touraine P. Significance of ovarian histology in the management of patients presenting a premature ovarian failure. *Hum Reprod* 2004; 19: 2555-2560.
446. Massin N, Meduri G, Bachelot A, Misrahi M, Kuttenn F, Touraine P. Evaluation of different markers of the ovarian reserve in patients presenting with premature ovarian failure. *Mol Cell Endocrinol* 2008; 282: 95-100.
447. Clement PB. Histology of the ovary. *Am J Surg Pathol* 1987; 11: 277-303.
448. Kozik W. [Arterial vasculature of ovaries in women of various ages in light of anatomic, radiologic and microangiographic examinations]. *Ann Acad Med Stetin* 2000; 46: 25-34.
449. Focchi GR, Simoes Mde J, Baracat EC, de Lima GR, Evencio Neto J. Ultrastructural aspects of the remodeling process of the Corpus albicans in the recent postmenopausal period. *Sao Paulo Med J* 1996; 114: 1173-1176.
450. Makabe S, Motta PM, Naguro T, Vizza E, Perrone G, Zichella L. Microanatomy of the female reproductive organs in postmenopause by scanning electron microscopy. *Climacteric* 1998; 1: 63-71.
451. Vinatier D, Dufour P, Subtil D. Apoptosis: a programmed cell death involved in ovarian and uterine physiology. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1996; 67: 85-102.
452. Amsterdam A, Sasson R, Keren-Tal I, Aharoni D, Dantes A, Rimon E, Land A, Cohen T, Dor Y, Hirsh L. Alternative pathways of ovarian apoptosis: death for life. *Biochem Pharmacol* 2003; 66: 1355-1362.
453. Vaskivuo TE, Tapanainen JS. Apoptosis in the human ovary. *Reprod Biomed Online* 2003; 6: 24-35.
454. Rolaki A, Drakakis P, Millingos S, Loutradis D, Makrigiannakis A. Novel trends in follicular development, atresia and corpus luteum regression: a role for apoptosis. *Reprod Biomed Online* 2005; 11: 93-103.
455. Delgado-Rosas F, Gaytan M, Morales C, Gomez R, Gaytan F. Superficial ovarian cortex vascularization is inversely related to the follicle reserve in normal cycling ovaries and is increased in polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 2009; 24: 1142-1151.
456. Shimada T, Morita T, Nagai K, Sato F, Mori H, Campbell GR. Morphological changes in spiral artery of the mammalian ovary with age. *Horm Res* 1993; 39 Suppl 1: 9-15.
457. Geva E, Jaffe RB. Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology and pathology. *Fertil Steril* 2000; 74: 429-438.

458. Fortune JE. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Anim Reprod Sci* 2003; 78: 135-163.
459. Reddy P, Liu L, Adhikari D, Jagarlamudi K, Rajareddy S, Shen Y, Du C, Tang W, Hamalainen T, Peng SL, Lan ZJ, Cooney AJ, Huhtaniemi I, Liu K. Oocyte-specific deletion of Pten causes premature activation of the primordial follicle pool. *Science* 2008; 319: 611-613.
460. Mtango NR, Potireddy S, Latham KE. Oocyte quality and maternal control of development. *Int Rev Cell Mol Biol* 2008; 268: 223-290.
461. Mermillod P, Dalbies-Tran R, Uzbekova S, Thelie A, Traverso JM, Perreau C, Papillier P, Monget P. Factors affecting oocyte quality: who is driving the follicle? *Reprod Domest Anim* 2008; 43 Suppl 2: 393-400.
462. Jiang JY, Macchiarelli G, Tsang BK, Sato E. Capillary angiogenesis and degeneration in bovine ovarian antral follicles. *Reproduction* 2003; 125: 211-223.
463. Chui DK, Pugh ND, Walker SM, Gregory L, Shaw RW. Follicular vascularity--the predictive value of transvaginal power Doppler ultrasonography in an in-vitro fertilization programme: a preliminary study. *Hum Reprod* 1997; 12: 191-196.
464. Van Blerkom J. Intrafollicular influences on human oocyte developmental competence: perifollicular vascularity, oocyte metabolism and mitochondrial function. *Hum Reprod* 2000; 15 Suppl 2: 173-188.
465. Nargund G, Bourne T, Doyle P, Parsons J, Cheng W, Campbell S, Collins W. Associations between ultrasound indices of follicular blood flow, oocyte recovery and preimplantation embryo quality. *Hum Reprod* 1996; 11: 109-113.
466. Van Blerkom J. Epigenetic influences on oocyte developmental competence: perifollicular vascularity and intrafollicular oxygen. *J Assist Reprod Genet* 1998; 15: 226-234.
467. Acosta TJ. Studies of follicular vascularity associated with follicle selection and ovulation in cattle. *J Reprod Dev* 2007; 53: 39-44.
468. Leese HJ. What does an embryo need? *Hum Fertil (Camb)* 2003; 6: 180-185.
469. Johnson MH, Nasr-Esfahani MH. Radical solutions and cultural problems: could free oxygen radicals be responsible for the impaired development of preimplantation mammalian embryos in vitro? *Bioessays* 1994; 16: 31-38.
470. Perreault SD, Barbee RR, Slott VL. Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocytes. *Dev Biol* 1988; 125: 181-186.
471. Zuelke KA, Jeffay SC, Zucker RM, Perreault SD. Glutathione (GSH) concentrations vary with the cell cycle in maturing hamster

- oocytes, zygotes, and pre-implantation stage embryos. *Mol Reprod Dev* 2003; 64: 106-112.
472. Abeydeera LR, Wang WH, Cantley TC, Prather RS, Day BN. Glutathione content and embryo development after in vitro fertilisation of pig oocytes matured in the presence of a thiol compound and various concentrations of cysteine. *Zygote* 1999; 7: 203-210.
473. Gardiner CS, Reed DJ. Status of glutathione during oxidant-induced oxidative stress in the preimplantation mouse embryo. *Biol Reprod* 1994; 51: 1307-1314.
474. Tarin JJ, Gomez-Piquer V, Pertusa JF, Hermenegildo C, Cano A. Association of female aging with decreased parthenogenetic activation, raised MPF, and MAPKs activities and reduced levels of glutathione S-transferases activity and thiols in mouse oocytes. *Mol Reprod Dev* 2004; 69: 402-410.
475. Morado SA, Cetica PD, Beconi MT, Dalvit GC. Reactive oxygen species in bovine oocyte maturation in vitro. *Reprod Fertil Dev* 2009; 21: 608-614.
476. Thaler CD, Epel D. Nitric oxide in oocyte maturation, ovulation, fertilization, cleavage and implantation: a little dab'll do ya. *Curr Pharm Des* 2003; 9: 399-409.
477. Beretta MS, Luciano AM, Borromeo V, Lauria A, Modina S. Expression and localization of prolactin and endothelial nitric oxide synthase in the bovine follicle: a morpho-functional study. In: XXVIth Congress of the European Association of Veterinary Anatomist; 2006; Messina (Italy). 55.
478. Yamagata Y, Nakamura Y, Sugino N, Harada A, Takayama H, Kashida S, Kato H. Alterations in nitrate/nitrite and nitric oxide synthase in preovulatory follicles in gonadotropin-primed immature rat. *Endocr J* 2002; 49: 219-226.
479. Tao Y, Fu Z, Zhang M, Xia G, Yang J, Xie H. Immunohistochemical localization of inducible and endothelial nitric oxide synthase in porcine ovaries and effects of NO on antrum formation and oocyte meiotic maturation. *Mol Cell Endocrinol* 2004; 222: 93-103.
480. Nishikimi A, Matsukawa T, Hoshino K, Ikeda S, Kira Y, Sato EF, Inoue M, Yamada M. Localization of nitric oxide synthase activity in unfertilized oocytes and fertilized embryos during preimplantation development in mice. *Reproduction* 2001; 122: 957-963.
481. Al-Gubory KH, Ceballos-Picot I, Nicole A, Bolifraud P, Germain G, Michaud M, Mayeur C, Blachier F. Changes in activities of superoxide dismutase, nitric oxide synthase, glutathione-dependent enzymes and the incidence of apoptosis in sheep corpus luteum during the estrous cycle. *Theriogenology* 2005; 1725: 348-357.
482. Takesue K, Tabata S, Sato F, Hattori MA. Expression of nitric oxide synthase-3 in porcine oocytes obtained at different follicular development. *J Reprod Dev* 2003; 49: 135-140.

483. Takesue K, Hattori MA, Nishida N, Kato Y, Fujihara N. Expression of endothelial nitric oxide synthase gene in cultured porcine granulosa cells after FSH stimulation. *J Mol Endocrinol* 2001; 26: 259-265.
484. Chatterjee S, Gangula PR, Dong YL, Yallampalli C. Immunocytochemical localization of nitric oxide synthase-III in reproductive organs of female rats during the oestrous cycle. *Histochem J* 1996; 28: 715-723.
485. Tesfaye D, Kadanga A, Rings F, Bauch K, Jennen D, Nganvongpanit K, Holker M, Tholen E, Ponsuksili S, Wimmers K, Montag M, Gilles M, Kirfel G, Herzog V, Schellander K. The effect of nitric oxide inhibition and temporal expression patterns of the mRNA and protein products of nitric oxide synthase genes during in vitro development of bovine pre-implantation embryos. *Reprod Domest Anim* 2006; 41: 501-509.
486. Pinto CR, Paccamonti DL, Eilts BE, Venugopal CS, Short CR, Gentry LR, Thompson DL, Jr., Godke RA. Concentrations of nitric oxide in equine preovulatory follicles before and after administration of human chorionic gonadotropin. *Theriogenology* 2003; 60: 819-827.
487. Mitsube K, Mikuni M, Matousek M, Brannstrom M. Effects of a nitric oxide donor and nitric oxide synthase inhibitors on luteinizing hormone-induced ovulation in the ex-vivo perfused rat ovary. *Hum Reprod* 1999; 14: 2537-2543.
488. Huo LJ, Liang CG, Yu LZ, Zhong ZS, Yang ZM, Fan HY, Chen DY, Sun QY. Inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide regulates germinal vesicle breakdown and first polar body emission in the mouse oocyte. *Reproduction* 2005; 129: 403-409.
489. Matta SG, Caldas-Bussiere MC, Viana KS, Faes MR, Paes de Carvalho CS, Dias BL, Quirino CR. Effect of inhibition of synthesis of inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide by aminoguanidine on the in vitro maturation of oocyte-cumulus complexes of cattle. *Anim Reprod Sci* 2009; 111: 189-201.
490. Goud PT, Goud AP, Diamond MP, Gonik B, Abu-Soud HM. Nitric oxide extends the oocyte temporal window for optimal fertilization. *Free Radic Biol Med* 2008; 45: 453-459.
491. Tranguch S, Steuerwald N, Huet-Hudson YM. Nitric oxide synthase production and nitric oxide regulation of preimplantation embryo development. *Biol Reprod* 2003; 68: 1538-1544.
492. Schwarz KR, Pires PR, de Bem TH, Adona PR, Leal CL. Consequences of nitric oxide synthase inhibition during bovine oocyte maturation on meiosis and embryo development. *Reprod Domest Anim* 2010; 45: 75-80.
493. Faes MR, Caldas-Bussiere MC, Viana KS, Dias BL, Costa FR, Escocard RM. Nitric oxide regulates steroid synthesis by bovine

- antral granulosa cells in a chemically defined medium. *Anim Reprod Sci* 2009; 110: 222-236.
494. Motta AB, Estevez A, Tognetti T, Gimeno MA, Franchi AM. Dual effects of nitric oxide in functional and regressing rat corpus luteum. *Mol Hum Reprod* 2001; 7: 43-47.
495. Petr J, Rajmon R, Rozinek J, Sedmikova M, Jeseta M, Chmelikova E, Svestkova D, Jilek F. Activation of pig oocytes using nitric oxide donors. *Mol Reprod Dev* 2005; 71: 115-122.
496. Li J, Billiar TR. The role of nitric oxide in apoptosis. *Semin Perinatol* 2000; 24: 46-50.
497. Warzych E, Peippo J, Szydlowski M, Lechniak D. Supplements to in vitro maturation media affect the production of bovine blastocysts and their apoptotic index but not the proportions of matured and apoptotic oocytes. *Anim Reprod Sci* 2007; 97: 334-343.
498. Warzych E, Wrenzycki C, Peippo J, Lechniak D. Maturation medium supplements affect transcript level of apoptosis and cell survival related genes in bovine blastocysts produced in vitro. *Mol Reprod Dev* 2007; 74: 280-289.
499. Anguita B, Vandaele L, Mateusen B, Maes D, Van Soom A. Developmental competence of bovine oocytes is not related to apoptosis incidence in oocytes, cumulus cells and blastocysts. *Theriogenology* 2007; 67: 537-549.
500. Butler AR, Flitney FW, Williams DL. NO, nitrosonium ions, nitroxide ions, nitrosothiols and iron-nitrosyls in biology: a chemist's perspective. *Trends Pharmacol Sci* 1995; 16: 18-22.
501. Stamler JS. Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell* 1994; 78: 931-936.
502. Oyawoye OA, Abdel-Gadir A, Garner A, Leonard AJ, Perrett C, Hardiman P. The interaction between follicular fluid total antioxidant capacity, infertility and early reproductive outcomes during in vitro fertilization. *Redox Rep* 2009; 14: 205-213.
503. Tamura H, Takasaki A, Miwa I, Taniguchi K, Maekawa R, Asada H, Taketani T, Matsuoka A, Yamagata Y, Shimamura K, Morioka H, Ishikawa H, Reiter RJ, Sugino N. Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. *J Pineal Res* 2008; 44: 280-287.
504. Chiang T, Duncan FE, Schindler K, Schultz RM, Lampson MA. Evidence that weakened centromere cohesion is a leading cause of age-related aneuploidy in oocytes. *Curr Biol* 2010; 20: 1522-1528.
505. Miyamoto K, Sato EF, Kasahara E, Jikumaru M, Hiramoto K, Tabata H, Katsuragi M, Odo S, Utsumi K, Inoue M. Effect of oxidative stress during repeated ovulation on the structure and functions of the ovary, oocytes, and their mitochondria. *Free Radic Biol Med* 2010; 49: 674-681.

506. Hassold T, Hall H, Hunt P. The origin of human aneuploidy: where we have been, where we are going. *Hum Mol Genet* 2007; 16 Spec No. 2: R203-208.
507. Hassold T, Hunt P. Maternal age and chromosomally abnormal pregnancies: what we know and what we wish we knew. *Curr Opin Pediatr* 2009; 21: 703-708.
508. Pacchierotti F, Adler ID, Eichenlaub-Ritter U, Mailhes JB. Gender effects on the incidence of aneuploidy in mammalian germ cells. *Environ Res* 2007; 104: 46-69.
509. Nicodemo D, Pauciullo A, Cosenza G, Peretti V, Perucatti A, Di Meo GP, Ramunno L, Iannuzzi L, Rubes J, Di Bernardino D. Frequency of aneuploidy in in vitro-matured MII oocytes and corresponding first polar bodies in two dairy cattle (*Bos taurus*) breeds as determined by dual-color fluorescent in situ hybridization. *Theriogenology* 2010; 73: 523-529.
510. Lechniak D, Switonski M. Aneuploidy in bovine oocytes matured in vitro. *Chromosome Res* 1998; 6: 504-506.
511. Lechniak D, Switonski M, Sosnowski M. The incidence of bovine diploid oocytes matured in vitro. *Theriogenology* 1996; 46: 267-277.
512. Vozdova M, Machatkova M, Kubikova S, Zudova D, Jokesova E, Rubes J. Frequency of aneuploidy in pig oocytes matured in vitro and of the corresponding first polar bodies detected by fluorescent in situ hybridization. *Theriogenology* 2001; 56: 771-776.
513. McGaughey RW, Polge C. Cytogenetic analysis of pig oocytes matured in vitro. *J Exp Zool* 1971; 176: 383-395.
514. Sosnowski J, Waroczyk M, Switonski M. Chromosome abnormalities in secondary pig oocytes matured in vitro. *Theriogenology* 2003; 60: 571-581.
515. Nichols SM, Gierbolini L, Gonzalez-Martinez JA, Bavister BD. Effects of in vitro maturation and age on oocyte quality in the rhesus macaque *Macaca mulatta*. *Fertil Steril* 2010; 93: 1591-1600.
516. Hassold T, Hunt P. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat Rev Genet* 2001; 2: 280-291.
517. Jones KT. Meiosis in oocytes: predisposition to aneuploidy and its increased incidence with age. *Hum Reprod Update* 2008; 14: 143-158.
518. Pan H, Ma P, Zhu W, Schultz RM. Age-associated increase in aneuploidy and changes in gene expression in mouse eggs. *Dev Biol* 2008; 316: 397-407.
519. Duncan FE, Chiang T, Schultz RM, Lampson MA. Evidence that a defective spindle assembly checkpoint is not the primary cause of maternal age-associated aneuploidy in mouse eggs. *Biol Reprod* 2009; 81: 768-776.
520. Liu L, Keefe DL. Defective cohesin is associated with age-dependent misaligned chromosomes in oocytes. *Reprod Biomed Online* 2008; 16: 103-112.

521. Liu L, Keefe DL. Nuclear origin of aging-associated meiotic defects in senescence-accelerated mice. *Biol Reprod* 2004; 71: 1724-1729.
522. Cui LB, Huang XY, Sun FZ. Transfer of germinal vesicle to ooplasm of young mice could not rescue ageing-associated chromosome misalignment in meiosis of oocytes from aged mice. *Hum Reprod* 2005; 20: 1624-1631.
523. Ramalho-Santos J, Varum S, Amaral S, Mota PC, Sousa AP, Amaral A. Mitochondrial functionality in reproduction: from gonads and gametes to embryos and embryonic stem cells. *Hum Reprod Update* 2009; 15: 553-572.
524. Wang Q, Ratchford AM, Chi MM, Schoeller E, Frolova A, Schedl T, Moley KH. Maternal diabetes causes mitochondrial dysfunction and meiotic defects in murine oocytes. *Mol Endocrinol* 2009; 23: 1603-1612.
525. Seo AY, Joseph AM, Dutta D, Hwang JC, Aris JP, Leeuwenburgh C. New insights into the role of mitochondria in aging: mitochondrial dynamics and more. *J Cell Sci* 2010; 123: 2533-2542.
526. Dumollard R, Carroll J, Duchon MR, Campbell K, Swann K. Mitochondrial function and redox state in mammalian embryos. *Semin Cell Dev Biol* 2009; 20: 346-353.
527. Wassarman PM, Josefowicz WJ. Oocyte development in the mouse: an ultrastructural comparison of oocytes isolated at various stages of growth and meiotic competence. *J Morphol* 1978; 156: 209-235.
528. Liu S, Li Y, Gao X, Yan JH, Chen ZJ. Changes in the distribution of mitochondria before and after in vitro maturation of human oocytes and the effect of in vitro maturation on mitochondria distribution. *Fertil Steril* 2010; 93: 1550-1555.
529. Yu Y, Dumollard R, Rossbach A, Lai FA, Swann K. Redistribution of mitochondria leads to bursts of ATP production during spontaneous mouse oocyte maturation. *J Cell Physiol* 2010; 224: 672-680.
530. Nishi Y, Takeshita T, Sato K, Araki T. Change of the mitochondrial distribution in mouse ooplasm during in vitro maturation. *J Nippon Med Sch* 2003; 70: 408-415.
531. Dumollard R, Duchon M, Sardet C. Calcium signals and mitochondria at fertilisation. *Semin Cell Dev Biol* 2006; 17: 314-323.
532. Nagai S, Mabuchi T, Hirata S, Shoda T, Kasai T, Yokota S, Shitara H, Yonekawa H, Hoshi K. Correlation of abnormal mitochondrial distribution in mouse oocytes with reduced developmental competence. *Tohoku J Exp Med* 2006; 210: 137-144.
533. Stojkovic M, Machado SA, Stojkovic P, Zakhartchenko V, Hutzler P, Goncalves PB, Wolf E. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and

- developmental capacity after in vitro fertilization and culture. *Biol Reprod* 2001; 64: 904-909.
534. Reynier P, May-Panloup P, Chretien MF, Morgan CJ, Jean M, Savagner F, Barriere P, Malthiery Y. Mitochondrial DNA content affects the fertilizability of human oocytes. *Mol Hum Reprod* 2001; 7: 425-429.
535. Sundstrom P, Nilsson BO, Liedholm P, Larsson E. Ultrastructure of maturing human oocytes. *Ann N Y Acad Sci* 1985; 442: 324-331.
536. Van Blerkom J, Davis PW, Lee J. ATP content of human oocytes and developmental potential and outcome after in-vitro fertilization and embryo transfer. *Hum Reprod* 1995; 10: 415-424.
537. Wilding M, De Placido G, De Matteo L, Marino M, Alviggi C, Dale B. Chaotic mosaicism in human preimplantation embryos is correlated with a low mitochondrial membrane potential. *Fertil Steril* 2003; 79: 340-346.
538. Barritt JA, Brenner CA, Cohen J, Matt DW. Mitochondrial DNA rearrangements in human oocytes and embryos. *Mol Hum Reprod* 1999; 5: 927-933.
539. Wilding M, Carotenuto R, Infante V, Dale B, Marino M, Di Matteo L, Campanella C. Confocal microscopy analysis of the activity of mitochondria contained within the 'mitochondrial cloud' during oogenesis in *Xenopus laevis*. *Zygote* 2001; 9: 347-352.
540. Bartmann AK, Romao GS, Ramos Eda S, Ferriani RA. Why do older women have poor implantation rates? A possible role of the mitochondria. *J Assist Reprod Genet* 2004; 21: 79-83.
541. Minamikawa T, Sriratana A, Williams DA, Bowser DN, Hill JS, Nagley P. Chloromethyl-X-rosamine (MitoTracker Red) photosensitises mitochondria and induces apoptosis in intact human cells. *J Cell Sci* 1999; 112 (Pt 14): 2419-2430.
542. Palermo GD, Takeuchi T, Rosenwaks Z. Technical approaches to correction of oocyte aneuploidy. *Hum Reprod* 2002; 17: 2165-2173.
543. Thouas GA, Trounson AO, Jones GM. Effect of female age on mouse oocyte developmental competence following mitochondrial injury. *Biol Reprod* 2005; 73: 366-373.
544. Kulinsky VI, Kolesnichenko LS. Mitochondrial glutathione. *Biochemistry (Mosc)* 2007; 72: 698-701.
545. Beretta MS, Modena S, Aru M, Pirani S, Lodde V, Lauria A, Luciano AM. Bovine oocyte developmental deficiency and ovarian morphology: role of glutathione (GSH) and gap junctions. In: 5° Congresso, Associazione Italiana Morfologi Veterinari; 2005; Napoli, Italy. 152.
546. Van Blerkom J, Davis P, Thalhammer V. Regulation of mitochondrial polarity in mouse and human oocytes: the influence of cumulus derived nitric oxide. *Mol Hum Reprod* 2008; 14: 431-444.

547. Yamamoto T, Iwata H, Goto H, Shiratuki S, Tanaka H, Monji Y, Kuwayama T. Effect of maternal age on the developmental competence and progression of nuclear maturation in bovine oocytes. *Mol Reprod Dev* 2010; 77: 595-604.
548. Bender K, Walsh S, Evans AC, Fair T, Brennan L. Metabolite concentrations in follicular fluid may explain differences in fertility between heifers and lactating cows. *Reproduction* 2010; 139: 1047-1055.
549. Fortune JE. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol Reprod* 1994; 50: 225-232.
550. Leroy JL, Vanholder T, Delanghe JR, Opsomer G, Van Soom A, Bols PE, de Kruif A. Metabolite and ionic composition of follicular fluid from different-sized follicles and their relationship to serum concentrations in dairy cows. *Anim Reprod Sci* 2004; 80: 201-211.
551. Meduri G, Massin N, Guibourdenche J, Bachelot A, Fiori O, Kuttenn F, Misrahi M, Touraine P. Serum anti-Mullerian hormone expression in women with premature ovarian failure. *Hum Reprod* 2007; 22: 117-123.
552. Franchimont P, Hazeel-Hagelstein MT, Hazout A, Frydman R, Schatz B, Demerle F. Correlation between follicular fluid content and the results of in vitro fertilization and embryo transfer. I. Sex steroids. *Fertil Steril* 1989; 52: 1006-1011.
553. Botero-Ruiz W, Laufer N, DeCherney AH, Polan ML, Haseltine FP, Behrman HR. The relationship between follicular fluid steroid concentration and successful fertilization of human oocytes in vitro. *Fertil Steril* 1984; 41: 820-826.
554. Rom E, Reich R, Laufer N, Lewin A, Rabinowitz R, Pevsner B, Lancet M, Shenker JG, Miskin R, Adelman-Grill BC, et al. Follicular fluid contents as predictors of success of in-vitro fertilization-embryo transfer. *Hum Reprod* 1987; 2: 505-510.
555. Itskovitz J, Rubattu S, Rosenwaks Z, Liu HC, Sealey JE. Relationship of follicular fluid prorenin to oocyte maturation, steroid levels, and outcome of in vitro fertilization. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 72: 165-171.
556. Andersen CY. Characteristics of human follicular fluid associated with successful conception after in vitro fertilization. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77: 1227-1234.
557. Mendoza C, Ruiz-Requena E, Ortega E, Cremades N, Martinez F, Bernabeu R, Greco E, Tesarik J. Follicular fluid markers of oocyte developmental potential. *Hum Reprod* 2002; 17: 1017-1022.
558. Fanchin R, Mendez Lozano DH, Frydman N, Gougeon A, di Clemente N, Frydman R, Taieb J. Anti-Mullerian hormone concentrations in the follicular fluid of the preovulatory follicle are predictive of the implantation potential of the ensuing embryo obtained by in vitro fertilization. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 1796-1802.

559. Takahashi C, Fujito A, Kazuka M, Sugiyama R, Ito H, Isaka K. Anti-Mullerian hormone substance from follicular fluid is positively associated with success in oocyte fertilization during in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2008; 89: 586-591.
560. Ireland JJ, Roche JF. Development of antral follicles in cattle after prostaglandin-induced luteolysis: changes in serum hormones, steroids in follicular fluid, and gonadotropin receptors. *Endocrinology* 1982; 111: 2077-2086.
561. Lamb JD, Zamah AM, Shen S, McCulloch C, Cedars MI, Rosen MP. Follicular fluid steroid hormone levels are associated with fertilization outcome after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2010; 94: 952-957.
562. Tesarik J, Mendoza C. Direct non-genomic effects of follicular steroids on maturing human oocytes: oestrogen versus androgen antagonism. *Hum Reprod Update* 1997; 3: 95-100.

ELENCO DELLE PUBBLICAZIONI RIGUARDANTI LE RICERCHE SVOLTE NELL'AMBITO DEL TRIENNIO DEL DOTTORATO

Pubblicazioni in estenso (peer reviewed)

1. Tessaro I, Luciano AM, Franciosi F, Lodde V, Corbani D, Modena SC. Endothelial nitric oxide synthase/nitric oxide system is involved in the defective quality of bovine oocytes from low medium antral follicle count ovary. *Journal of Animal Science* (submitted).
2. Lazzari G, Colleoni S, Lagutina I, Crotti G, Turini P, Tessaro I, Brunetti D, Duchi R, Galli C. Short-term and long-term effects of embryo culture in the surrogate sheep oviduct versus in vitro culture for different domestic species. *Theriogenology* 2010; 73: 748-757.
3. Lodde V, Modena SC, Franciosi F, Zuccari E, Tessaro I, Luciano AM. Localization of DNA methyltransferase-1 during oocyte differentiation, in vitro maturation and early embryonic development in cow. *Eur J Histochem* 2009; 53: 199-207.
4. Colleoni S, Bottani E, Tessaro I, Mari G, Merlo B, Romagnoli N, Spadari A, Galli C, Lazzari G. Isolation, growth and differentiation of equine mesenchymal stem cells: effect of donor, source, amount of tissue and supplementation with basic fibroblast growth factor. *Vet Res Commun* 2009.
5. Lazzari G, Tessaro I, Crotti G, Galli C, Hoffmann S, Bremer S, Pellizzer C. Development of an in vitro test battery for assessing chemical effects on bovine germ cells under the ReProTect umbrella. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008; 233: 360-370.

6. Lagutina I, Lazzari G, Duchi R, Turini P, Tessaro I, Brunetti D, Colleoni S, Crotti G, Galli C. Comparative aspects of somatic cell nuclear transfer with conventional and zona-free method in cattle, horse, pig and sheep. *Theriogenology* 2007; 67: 90-98.

Comunicazioni a congressi

1. Tessaro I, Franciosi F, Corbani D, Lodde V, Luciano AM, Modena S. Ovarian environment and reproductive failure in high yielding dairy cows. In: XXVIII Congress of European Association of Veterinary Anatomists; 2010; Paris, France. 328-329.
2. Dilda F, Pisani LF, Restelli L, Rahman MM, Modena S, Tessaro I, Sartorelli P, Lecchi C, Cecilian F. Acute phase protein expression in non-pathologic bovine forestomach mucosae. In: VII Congresso Nazionale AIPVet; 2010; Castelsardo (SS) - Italy. 20.
3. Tessaro I, Franciosi F, Lodde V, Corbani D, Luciano AM, Lauria A, Modena S. Role of eNOS in acquisition of oocyte developmental competence in low antral follicle count bovine ovaries. In: XXXIII Congress of the Italian Society of Histochemistry; 2009; Roma (IT). 31.
4. Tessaro I, Dell'Aere S, Franciosi F, Lodde V, Luciano AM, Corbani D, Lauria A, Modena S. Factors involved in early mammalian aging in dairy cow. In: 7° Congresso, Associazione Italiana Morfologi Veterinari; 2009; Perugia (IT). 58.
5. Lodde V, Franciosi F, Modena SC, Tessaro I, Zuccari E, Lauria A, Luciano AM. Dynamic of DNA methyltransferase-1 during bovine oocyte differentiation and early embryonic development. In: 44° Simposio

Internazionale della Società Italiana per il Progresso della Zootecnia.; 2009; Milano.

6. Lodde V, Franciosi F, Modena S, Tessaro I, Luciano AM. Role of Gap Junction-Mediated Communications as Regulators of Large-Scale Chromatin Remodeling During Final Differentiation of Bovine Oocyte. In: 42° Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction; 2009; Pittsburgh, Pennsylvania (USA). 281.
7. Franciosi F, Lodde V, Modena S, Tessaro I, Luciano AM. Role of Intercellular Coupling on Chromatin Changes Transcriptional Activity and Meiotic Competence Acquisition During Bovine Oocyte Growth In Vitro. In: 42° Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction; 2009; Pittsburgh, Pennsylvania (USA). 282.
8. Franciosi F, Lodde V, Modena S, Tessaro I, Carnevali A, Lauria A, Luciano AM. Chromatin changes and meiotic competence acquisition during oocyte growth in vitro. In: 7° Congresso, Associazione Italiana Morfologi Veterinari; 2009; Perugia (IT). 57.
9. Lodde V, Modena S, Franciosi F, Tessaro I, Luciano AM. Large-scale chromatin remodeling and DNA methylation in immature bovine oocyte during the later phase of growth and differentiation. In: XIII International Congress of Histochemistry and Cytochemistry; 2008; Gdansk, Poland. S117.

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare innanzitutto la Prof.ssa Modina e il Prof. Luciano, per la disponibilità e la passione con cui mi hanno accompagnato durante questo percorso e per la pazienza che mi hanno dimostrato nella stesura di questo lavoro. Li ringrazio soprattutto per essere stati cari maestri.

Ringrazio poi la Dott.ssa Valentina Lodde, la Dott.ssa Federica Franciosi, il Dott. Davide Corbani ed Elisa Zuccari, compagni di avventura ed amici insostituibili. Ringrazio Luca Cerri e tutto il personale della Sezione di Anatomia ed Istologia Veterinaria, per l'aiuto e per le ore passate insieme.

Desidero ringraziare il Dottor Pietro Parma, la Dottoressa Lisa De Lorenzi e tutto il laboratorio di Citogenetica del Dipartimento di Scienze Animali, per il fondamentale e stimolante contributo nello studio del cariotipo, per la grandissima disponibilità e l'accoglienza.

Un ringraziamento speciale ai miei genitori e a mio fratello, per la pazienza, la comprensione e il sostegno costante e agli amici che mi hanno sempre incoraggiato e sostenuto.

Infine, ringrazio Marco. Non so come fai a sopportarmi, ma, proprio per questo, ti ringrazio e spero che continuerai a farlo!