



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI

“FEDERICO II”

FACOLTÀ DI SCIENZE MM.FF.NN.

Tesi di Dottorato di Ricerca in

Tecnologie Innovative per Materiali, Sensori ed Imaging

ciclo XIX.

**Nuove strategie per la selezione di spermatozoi
per la fecondazione *in vitro*: ruolo delle
variazioni redox di proteine spermatiche di
superficie nell'interazione con l'epitelio
tubarico**

Il coordinatore

Prof. Ruggero Vaglio

Il candidato

Marianna Castaldo

ANNO ACCADEMICO 2005/2006

1 Premessa

Negli ultimi 30 anni la ricerca, nel campo della Biologia della Riproduzione, ha fornito conoscenze fondamentali per la comprensione dei meccanismi che sono alla base della maturazione dei gameti, fecondazione e sviluppo embrionale. Tali conoscenze hanno dato i presupposti per la messa a punto delle biotecnologie che oggi vengono applicate nella procreazione medicalmente assistita (PMA). Infatti, dalla nascita di Louise Brown nel 1978, la prima bambina concepita con fecondazione extracorporea, ad oggi l'aumentare dell'infertilità dovuta a cause sia maschili che femminili ha fornito un'impulso notevole nello sviluppo di tali biotecnologie sia in campo umano che zootecnico.

Oggi vengono ripercorsi *in vitro*, con una discreta efficienza, meccanismi complessi quali la maturazione dei gameti, la fecondazione e lo sviluppo embrionale. E' chiaro, comunque, che le tecniche di PMA *in vitro* non possono che mimare con una minore efficienza quello che avviene *in vivo* e che la loro efficienza potrà essere migliorata solo con l'acquisizione di conoscenze di base e la possibilità di affinare parallelamente le relative biotecnologie.

Attualmente un aspetto cruciale per le biotecnologie riproduttive è rappresentato dalla selezione dei gameti ed in particolare degli spermatozoi. Le attuali conoscenze di base ci indicano che *in vivo* all'interno dell'apparato riproduttivo femminile viene operata una drammatica

selezione degli spermatozoi eiaculati che limita il numero degli spermatozoi presenti contemporaneamente nel sito di fecondazione a solo poche decine.

Questa riduzione è causata da diversi “checkpoints” all’interno dell’apparato riproduttivo femminile che operano tramite l’interazione col muco cervicale, l’interazione con l’epitelio tubarico, l’attraversamento del cumulo ooforo e l’interazione con la zona pellucida. In questa maniera, solo un numero limitatissimo di spermatozoi idonei alla fecondazione e a supportare lo sviluppo embrionale è in grado di raggiungere l’ampolla, sito naturale della fecondazione.

Fra questi “checkpoints”, l’interazione tra l’epitelio oviduttale e gli spermatozoi rappresenta un momento chiave della selezione e risalita degli spermatozoi nel tratto riproduttivo femminile. Numerosi studi hanno dimostrato che in vivo: 1) solo una subpopolazione di spermatozoi eiaculati è in grado di aderire alle cellule epiteliali che rivestono il lume dell’istmo, il tratto più basso dell’ovidutto (Smith and Yanagimachi, 1990); 2) tale adesione prolunga la vita degli spermatozoi (Smith and Yanagimachi, 1990) ritardando la capacitazione fino a quando segnali periovulatori ne inducono il rilascio (Smith and Yanagimachi, 1991).

Inoltre, è stato dimostrato che l’adesione *in vitro* degli spermatozoi all’ovidutto seleziona spermatozoi: 1) provenienti da subpopolazioni di alta qualità pre-esistenti nell’eiaculato (Hunter et al., 1980); 2) caratterizzati da acrosoma intatto (Gualtieri and Talevi, 2000); 3) non capacitati (Smith and

Yanagimachi, 1991; Thomas et al., 1995; Gualtieri et al., 2005); 4) con basso contenuto di calcio libero interno e ridotta fosforilazione delle tirosine delle proteine di membrana (Petrunkina et al., 2001; Petrunkina et al., 2003; Gualtieri et al., 2005); 5) morfologia superiore (Thomas et al., 1994); 6) normale struttura cromatinica (Ellington et al., 1998); 7) maggiore competenza a legare la zona pellucida e alla fecondazione (Gualtieri and Talevi, 2003; Talevi and Gualtieri, 2004).

La fine selezione degli spermatozoi che avviene all'interno dell'apparato riproduttivo femminile può essere solo parzialmente mimata nelle tecniche di PMA, dove gli spermatozoi dotati di buona morfologia e motilità vengono selezionati tramite due metodiche: la tecnica dello "swim-up" e la centrifugazione in gradiente di Percoll.

Spermatozoi così selezionati vengono oggi impiegati per le due procedure comunemente utilizzate per ottenere embrioni umani *in vitro*: la Fecondazione *In Vitro* con Trasferimento in utero degli Embrioni (FIVET), e l'Iniezione Intracitoplasmatica dello Spermatozoo (ICSI).

Esiste, comunque, una differenza fondamentale tra le due tecniche. Nella FIVET, gli ovociti ottenuti mediante aspirazione dai follicoli precedentemente stimolati con una terapia ormonale, vengono fatti interagire con una popolazione di spermatozoi selezionati tramite "swim-up" o Percoll. In questo caso, gli spermatozoi saranno ulteriormente selezionati dall'interazione con la zona pellucida. L'embrione così

generato, viene poi trasferito in utero allo stadio di otto blastomeri, dopo circa 48 ore.

Questo ulteriore meccanismo di selezione viene “bypassato” nell’ICSI, tecnica che prima della legge sulla fecondazione *in vitro* in Italia, veniva applicata solo nei casi di severa oligoastenospermia, mentre oggi, a causa della limitazione della legge che vieta la fecondazione di più di 3 ovociti, è di fatto l’unica tecnica utilizzata in Italia. Il vantaggio di questa procedura consiste nell’ottenere una percentuale molto alta di fecondazione perchè lo spermatozoo, scelto direttamente all’osservazione microscopica dall’embriologo clinico in base alle sue caratteristiche di motilità e morfologia, è microiniettato direttamente all’interno dell’ ovocita. Lo svantaggio è che, non essendoci nell’ICSI l’interazione con la zona pellucida, viene a mancare l’ultimo gradino fisiologico nella selezione degli spermatozoi. Di fatto, difetti funzionali e/o genetici negli spermatozoi iniettati nel citoplasma dell’ovocita possono causare arresti dello sviluppo embrionale dopo lo stadio di 4 blastomeri e cioè dopo l’attivazione del genoma paterno.

Questo problema ha sempre suscitato una certa apprensione nel mondo scientifico che a più riprese si è mobilitato per la ricerca di parametri più fisiologici nella selezione degli spermatozoi da utilizzare nell’ICSI. Infatti, parametri quali la morfologia e la motilità, come si è visto, non sono sufficienti per selezionare spermatozoi con elevata capacità

nel supporto allo sviluppo embrionale. A sostegno di questa ipotesi è stato riportato in letteratura che, anche se in bassa percentuale, spermatozoi recuperati secondo le attuali tecniche di selezione *in vitro* possono presentare segnali apoptotici e/o frammentazioni del DNA ed essere causa di alterazioni dello sviluppo embrionale (Asch et al., 1996; Jurisicova et al., 1996), aborto precoce (Carrell et al., 2003a; Carrell et al., 2003b) aumentato rischio di cancro infantile (Ji et al., 1997; Aitken et al., 2003; Aitken and Baker, 2004). Tali incidenze risultano mediamente più elevate nei nati mediante ICSI rispetto a quelli da FIVET.

Da qui nasce l'esigenza di approfondire le conoscenze relative alla selezione fisiologica degli spermatozoi durante l'attraversamento delle vie riproduttive femminili. Per comprendere i meccanismi alla base della selezione spermatica, si potrebbero recuperare gli spermatozoi dalle vie riproduttive femminili *in vivo*, ma tale procedura risulta complicata; a tale scopo si fa uso, quindi, in laboratorio, di modelli sperimentali contemplanti l'uso di colture *in vitro* che mimano ciò che avviene *in vivo*.

Nel nostro laboratorio sono state allestite colture *in vitro* di monostrati di cellule oviduttali bovine che ci hanno permesso di studiare in dettaglio questo tipo di interazione. I risultati ottenuti negli ultimi anni mostrano che solo una sub-popolazione, che costituisce circa il 30% di tutto l'eiaculato, ha capacità di legarsi ai monostrati oviduttali *in vitro*.

Inoltre, nel nostro laboratorio, per la prima volta, è stato possibile recuperare la sub-popolazione spermatica selezionata dall'adesione all'epitelio tubarico *in vitro* inducendo il rilascio sincronizzato degli spermatozoi adesi. Infatti, utilizzando glicoconiugati solfati come l'eparina, il fucoidano e il destran solfato, (molecole note in letteratura per la loro azione capacitativa sugli spermatozoi bovini), è stato possibile rilasciare in maniera sincrona spermatozoi adesi con acrosoma integro e motilità progressiva rettilinea.

E' stato, inoltre, dimostrato in maniera inequivocabile che il rilascio degli spermatozoi da parte delle cellule tubariche è dovuto a modificazioni della superficie spermatica, presumibilmente indotte da un processo di capacitazione, e non da un cambiamento nell'affinità da parte delle cellule epiteliali.

L'interazione spermatozoo-ovidutto è di tipo superficiale, ossia coinvolge la porzione rostrale della testa dello spermatozoo e la superficie apicale delle cellule epiteliali oviduttali (Gualtieri and Talevi, 2000).

Durante il mio lavoro di tesi, uno dei primi approcci sperimentali per la comprensione delle molecole e dei meccanismi coinvolti nell'interazione spermatozoo-ovidutto è stato quello di studiare il pattern proteico di superficie sia delle cellule tubariche, ponendo due condizioni di legame spermatico estreme (massima e minima affinità per gli

spermatozoi), sia delle subpopolazioni spermatiche selezionate allo scopo di restringere il campo di quelle implicate nell'interazione a poche proteine.

Per quanto riguarda la natura dei segnali implicati nel meccanismo di rilascio degli spermatozoi adesi alle cellule oviduttali, studi condotti dal nostro gruppo di ricerca hanno mostrato che l'eparina e il fucoidano sono potenti inibitori dell'adesione e che la loro azione è esercitata sugli spermatozoi attraverso meccanismi capacitativi. L'insieme dei dati evidenzia, inoltre, che l'eparina ed altri glicconiugati solfati sono potenti induttori del rilascio degli spermatozoi adesi alle cellule tubariche.

Studi condotti durante il periodo della mia tesi di dottorato, utilizzando il sistema di selezione spermatica *in vitro*, hanno permesso di individuare delle nuove molecole segnale, gli antiossidanti tiolici (D e DL-Penicillamina, β -Mercaptoetanolo, Cisteina), capaci di rilasciare gli spermatozoi selezionati e immagazzinati mediante adesione transitoria all'epitelio tubarico. In base ai risultati ottenuti è stato ipotizzato che proteine di superficie dello spermatozoo responsabili dell'adesione all'epitelio tubarico siano attivate-disattivate in modo redox e cioè in base al loro stato disolfuri-sulfidrilici da queste molecole che sono normalmente rappresentate e raggiungono la loro concentrazione massima nel fluido oviduttale al momento dell'ovulazione (Lapointe and Bilodeau *et al.*, 2003).

Tale ipotesi è stata saggiata mediante l'utilizzo di probes in grado di legare i gruppi sulfidrilici per identificare possibili differenze dello stato

redox delle molecole di superficie negli spermatozoi eiaculati (popolazione totale), selezionati (Released, Adesi) e non (Unbound) dal legame con le cellule tubariche.

2 INTRODUZIONE

2.1 *Infertilità e fecondazione assistita*

La condizione d'infertilità è definita dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), come l'incapacità di concepire dopo due anni di rapporti intenzionalmente fecondi.

Negli ultimi anni, si stima che l'infertilità colpisce circa 80 milioni di persone nel mondo e che almeno una coppia su dieci soffre di infertilità primaria (senza figli) o secondaria (con figli).

Le cause dell'infertilità sono riconducibili sia a disfunzioni e patologie dell'apparato riproduttivo maschile o femminile, amplificate nel caso in cui siano presenti in ambedue i partners, sia a fattori ambientali (Jouannet et al., 2001) e stili di vita sociale che condizionano la salute riproduttiva agendo a differenti livelli (ESHRE Workshop Group 2001; ESHRE Workshop Group 2005). Il declino della concentrazione spermatica, osservato nella popolazione maschile mondiale, è stato messo in relazione alla aumentata emissione nell'ambiente di sostanze inquinanti, quali xenoestrogeni e metalli pesanti (Figa-Talamanca et al., 2001; Rozati et al., 2002).

Nei paesi industrializzati, inoltre, le mutate condizioni sociali ed il relativo benessere spingono le nuove coppie ad intraprendere un percorso riproduttivo in età progressivamente più avanzata. Infatti, mentre da un punto di vista biologico, il periodo di maggiore fertilità nella donna è

intorno ai 20 anni, il percorso formativo e il consolidamento della carriera, porta spesso le donne a intraprendere la ricerca di una gravidanza intorno ai 33-35 anni, età in cui il potenziale riproduttivo è già in netto declino (ESHRE Workshop Group 2001). Pertanto, anche in assenza di specifiche disfunzioni riproduttive, il solo spostamento temporale della ricerca della gravidanza è spesso sufficiente ad amplificare quelle cause di subfertilità che possono già essere presenti all'interno di una coppia.

La ricerca di base nell'ambito della biologia della riproduzione ha portato ad una migliore comprensione dei meccanismi coinvolti nella produzione dei gameti, fecondazione e sviluppo embrionale, permettendo di replicarli *in vitro*.

I primi successi nella fecondazione *in vitro* nei mammiferi risalgono al 1959 quando Chang inseminò *in vitro* ovociti di coniglio e trasferì gli embrioni così ottenuti in madri surrogate di razza diversa ottenendo nati a termine (Chang, 1959). Per quanto riguarda l'uomo, le prime rare evidenze di avvenuta fecondazione, ed avvio della segmentazione, furono ottenute da Edwards e Jones nel 1966 (Edwards et al., 1966). Negli anni successivi, Edwards e Steptoe riuscirono a consolidare i risultati, ottenendo fecondazione e sviluppo fino allo stadio di blastocisti (Edwards et al., 1969; Steptoe et al., 1971).

Nel 1978, con la nascita di Louise Brown (Steptoe and Edwards, 1978), la ricerca scientifica valica il confine dei laboratori di ricerca e si

affaccia per la prima volta in ambito clinico, dando l'avvio alle tecnologie della riproduzione assistita.

Attualmente, la fecondazione *in vitro* ha una diffusione mondiale e la sua applicazione ha permesso la nascita di più di un milione di bambini sani, grazie ai rapidi avanzamenti in campo biomedico e alla continua relazione con la ricerca indirizzata al miglioramento di tali metodiche, alla valutazione della loro sicurezza e alla possibilità di effetti avversi sulla prole.

Negli ultimi venti anni, la ricerca biologica nel campo della riproduzione umana ed animale ha portato allo sviluppo di biotecnologie che hanno permesso di superare numerose cause di infertilità.

Oggi, le più diffuse tecniche di fecondazione assistita prevedono un percorso comune che inizia con la stimolazione della crescita follicolare multipla, mediante somministrazione di FSH, permettendo il recupero di un numero maggiore di ovociti. Tale procedura amplifica la possibilità di ottenere ovociti competenti alla fecondazione e ad un corretto sviluppo embrionale. Dopo il recupero, gli ovociti vengono incubati in appropriati terreni di coltura, in attesa di essere inseminati.

Contemporaneamente, il seme del partner viene selezionato e capacitato *in vitro*, mediante metodiche che differiscono a seconda della motilità e concentrazione spermatica nell'eiaculato. Nel caso di elevata concentrazione e grado di motilità viene preferenzialmente eseguita la

metodica del “swim up”, in cui vengono recuperati gli spermatozoi dotati di migliore motilità (Mahadevan and Baker, 1984). Nel caso di liquidi seminali che presentano ridotta concentrazione e/o motilità, o anche elevata percentuale di difetti morfologici, viene di solito preferita la tecnica di selezione mediante centrifugazione su gradienti di densità (Henkel and Schill, 2003). Tali tecniche permettono di selezionare una frazione spermatica di elevata qualità da un punto di vista di motilità, morfologia e integrità del DNA (Henkel and Schill, 2003; Younglai et al., 2001; Gualtieri et al., 2005).

Nella fecondazione *in vitro* seguita da trasferimento dell’embrione (FIVET), gli ovociti vengono inseminati con il seme del partner, dopo selezione e capacitazione *in vitro* degli spermatozoi. Fino al 1993, i casi di infertilità maschile medio-severa erano scarsamente o per nulla trattabili mediante la tecnica FIVET, in quanto si rischiava un fallimento totale o parziale della fecondazione. Le coppie in cui il partner presentava tali difetti erano costrette a rinunciare alla possibilità di concepire *in vitro* o potevano decidere di ricorrere ad inseminazione con seme eterologo (oggi non più possibile per le limitazioni imposte della legge 40).

Lo sviluppo della tecnica di iniezione intracitoplasmatica dello spermatozoo (ICSI) (Palermo et al., 1992), in cui un singolo spermatozoo motile e normomorfo viene iniettato direttamente nel citoplasma

dell'ovocita, ha permesso ad individui con difetti più o meno pronunciati nell'eiaculato di poter concepire figli propri.

2.2 *Cenni sulla struttura dello spermatozoo dei mammiferi*

Grazie all'impiego di tecniche di microscopia ottica in contrasto di fase, interferenziale e in fluorescenza e a quelle di microscopia elettronica a trasmissione e a scansione, la morfologia dello spermatozoo dei mammiferi è stata ampiamente descritta.

Questi lavori hanno permesso di individuare, nello spermatozoo, aree morfologicamente distinte per funzione e morfologia.

Fondamentalmente, si possono individuare due parti: la testa e la coda. Se si analizzano le differenze morfologiche degli spermatozoi nelle diverse specie, si evidenzia che queste sono soprattutto legate alla forma e alle dimensioni della testa, mentre la coda presenta in genere una forma ed una struttura comune. La testa dello spermatozoo nel topo, nel ratto e nel criceto, ha un aspetto falciforme, negli spermatozoi di bovino si presenta ovoidale, molto appiattita e larga 4 μm .

La testa dello spermatozoo consiste di un nucleo aploide e di una vescicola, l'acrosoma, contenente enzimi che, come si vedrà più avanti, consentono il trasferimento del nucleo spermatico nell'ovocita al momento della fecondazione.

La maggior parte del citoplasma dello spermatozoo viene eliminata durante la sua maturazione, lasciando solo alcuni organuli che sono stati modificati per svolgere la funzione di rifornimento energetico per la propulsione dello spermatozoo. Il nucleo è molto piccolo se paragonato a

quello delle altre cellule; durante la maturazione dello spermatozoo, esso assume una forma molto allungata ed il DNA diventa molto compatto grazie alla sua complessazione con le protamine che hanno la stessa funzione degli istoni nelle cellule somatiche. Il nucleo è sovrastato dall'acrosoma, una struttura a cappuccio situata nella parte più anteriore della testa; il cappuccio acrosomiale origina dal complesso del Golgi e contiene glicoproteine, enzimi proteolitici, glicosidasi e glicosiltrasferasi che digeriscono proteine e zuccheri complessi. Esso, pertanto, può essere considerato un lisosoma modificato. Questi enzimi, accumulati nell'acrosoma, servono a lisare il rivestimento esterno che avvolge l'ovocita, la zona pellucida (ZP), dopo il contatto ed il riconoscimento specifico. L'insieme di acrosoma e nucleo costituisce la testa dello spermatozoo, mentre la coda è l'organo locomotore dello spermatozoo, grazie al quale esso è capace di coprire lunghe distanze.

La coda è suddivisa in tre distinti segmenti: il segmento intermedio, il segmento principale, il segmento terminale. Le principali strutture del flagello sono: l'assonema, la guaina mitocondriale, la guaina fibrosa. I differenti elementi del flagello sono coinvolti nel generare l'onda che determina la forza per il movimento e propagare tale onda dalla base fino all'estremità del flagello. La contrattilità dell'assonema è assicurata dalla scissione dell'ATP prodotto dai numerosi mitocondri della guaina localizzata a livello del segmento intermedio.

2.3 Capacitazione

Chang (1951) e Austin (1951) furono i primi a dimostrare che gli spermatozoi sono incapaci di fecondare gli ovociti se non soggiornano nelle vie genitali femminili per un certo periodo; essi, con il termine “capacitazione”, definirono l'insieme delle trasformazioni cui queste cellule devono essere sottoposte per diventare capaci di fecondare. Le trasformazioni a carico degli spermatozoi avvengono nell'intervallo che intercorre tra l'eiaculazione ed il momento in cui essi raggiungono e legano la zona pellucida dell'ovocita (de Lamirande et al., 1997).

Diverse specie sono state utilizzate per lo studio della capacitazione *in vivo* e *in vitro*: criceti (Smith et al., 1987), topi (Demott and Suarez, 1992), conigli (Suarez et al., 1983), ovini, bovini e suini (Hunter, 1988), non ultimo l'uomo (Zinamen et al., 1989; Zhu et al., 1992; Bielfeld et al., 1991).

Tra i cambiamenti che avvengono negli spermatozoi durante la capacitazione, quelli più evidenti prevedono: aumento della permeabilità al Ca^{2+} e conseguente incremento della sua concentrazione intracellulare; fosforilazione dei residui di tirosina; modificazioni nella composizione lipidica della membrana plasmatica; lenta rimozione o riorganizzazione degli antigeni di superficie che avevano ricoperto lo spermatozoo durante il suo passaggio attraverso l'epididimo; smascheramento dei recettori responsabili della interazione con la zona pellucida.

Alcuni studi suggeriscono che la modulazione del Ca^{2+} in spermatozoi eiaculati avviene grazie all'attivazione in contemporanea di un sistema di antiporto $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ e una ATPasi del Ca^{2+} . Entrambi i sistemi potrebbero essere coinvolti nell'influsso di ioni Ca^{2+} associato alla capacitazione. Infatti, un innalzamento di tale ione potrebbe dipendere da un'inversione del sistema di antiporto o da un'inibizione dell'ATPasi del Ca^{2+} ; in ogni caso non ci sono ancora dirette evidenze di un loro coinvolgimento in questo processo (de Lamirande et al., 1997).

Il calcio potrebbe anche interagire con i fosfolipidi di membrana modificandone lo stato fisico e conseguentemente modificando la permeabilità della membrana plasmatica stessa (Holt, 1995).

In spermatozoi sottoposti a condizioni capacitanti (McNutt et al., 1992; Roldan et al., 1992; Chian et al., 1995; Mahmoud et al., 1996; Lefebvre and Suarez, 1996) sono stati descritti dei cambiamenti nel contenuto di fosfolipidi di membrana ed, inoltre, la perdita di colesterolo con conseguente aumento della fluidità e della permeabilità della stessa (Visconti et al., 1999). Si pensa che un basso rapporto colesterolo/fosfolipidi favorisca la reazione acrosomiale (Hoshi et al., 1990).

Studi *in vitro* hanno evidenziato che l'albumina, presente nei mezzi di coltura designati per la capacitazione, agisce da accettatore del colesterolo sottraendolo alla membrana plasmatica dello spermatozoo (Langlais et al.,

1985; Iborra et al., 2000; Gadella and Jovin, 1996). L'efflusso di colesterolo sembra in grado di attivare sistemi di traduzione del segnale che portano all'attivazione di una adenilato ciclasi spermio-specifica con conseguente aumento dei livelli intracellulari di cAMP ed attivazione della proteina chinasi A implicata nella fosforilazione di proteine coinvolte nei processi capacitativi.

Sembra che l'albumina, oltre a provocare l'efflusso di colesterolo, sia implicata anche nella fosforilazione in tirosina dipendente dal bicarbonato (Flesch et al., 1999; Visconti et al., 1995; Emiliozzi et al., 1997; Oshiro et al., 1999).

Numerosi lavori hanno evidenziato un ruolo chiave del bicarbonato nel processo che porta alla fosforilazione in tirosina delle proteine nello spermatozoo: la concentrazione del bicarbonato nella porzione caudale dell'epididimo è molto bassa (< 1 mM), mentre nel tratto riproduttivo femminile gli spermatozoi devono confrontarsi con livelli di bicarbonato molto più alti (> 15 mM), indicando un possibile ruolo del bicarbonato nella capacitazione *in vivo* (Harrison et al., 1996). I livelli di bicarbonato intracellulare degli spermatozoi sono modulati da canali anionici scambiatori $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ inseriti nella membrana plasmatica (Parkkila et al., 1993; Ain et al., 1999) e $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (Jensen et al., 1999). Inoltre, anche la CO_2 diffondendo attraverso la membrana plasmatica dello spermatozoo può contribuire alla modulazione dei livelli intracellulari di HCO_3^- (Harrison et

al., 1996). Infatti, l'anidrasi carbonica, presente nella testa dello spermatozoo, è in grado di convertire la CO₂ diffusa in anioni bicarbonato (Parkkila et al., 1991). Il bicarbonato sembra essere in grado di attivare direttamente l'adenilato ciclasi spermio-specifica portando all'aumento del cAMP (Okamura and Sugida, 1983; Visconti et al., 1995). I livelli accresciuti di cAMP attivano la protein chinasi A cAMP-dipendente (PKA) innescando una serie di fosforilazioni di proteine bersaglio che sono direttamente implicate nei processi capacitativi (Kalab et al., 1998). Ciò potrebbe spiegare l'effetto di vari agenti routinariamente utilizzati nella IVF, quali la caffeina (inibitore delle fosfodiesterasi), sulla induzione della capacitazione spermatica (Yanagimachi, 1994).

La fosforilazione di proteine spermatiche che avviene durante la capacitazione è correlata al raggiungimento di una maggiore affinità di legame alla ZP (Pukazhenti et al., 1998), all'innescamento della reazione acrosomiale (Benoff, 1998) e allo sviluppo di un pattern iperattivo di motilità (Nassar et al., 1999).

Molti antigeni di membrana sono riorganizzati durante la capacitazione degli spermatozoi, ma il loro legame funzionale a questo processo è stato valutato in pochi casi. Per esempio, una correlazione è stata stabilita tra l'espressione, durante la capacitazione di spermatozoi umani e di criceto, di molecole di adesione cellulare, quali la fibronectina (Hoshi et al., 1994) e la laminina (Fusi et al., 1992), e la conseguente capacità di

penetrare ovociti di criceto denudati della zona pellucida (zona-free). Anche la localizzazione di altri fattori del plasma seminale o del fluido epididimale, adsorbiti sulla superficie spermatica, viene ad essere modificata durante la capacitazione degli spermatozoi. Sembra che sia proprio tale redistribuzione a determinare un'iperattivazione della motilità spermatica durante la capacitazione (Yanagimachi,1994).

Il sito di tale processo è probabilmente la parte più bassa dell'ovidutto, l'istmo, dove gli spermatozoi interagiscono sia con il fluido oviduttale che con le cellule epiteliali che rivestono il lume di tale organo.

2.4 Reazione acrosomiale

Nei mammiferi, la reazione acrosomiale segue la capacitazione ed è di cruciale importanza affinché lo spermatozoo possa divenire capace di fecondare l'ovocita. La capacità di intraprendere la reazione acrosomiale, in risposta a stimoli artificiali o al contatto con la zona pellucida dell'ovocita, è considerata un "endpoint" del processo capacitativo.

La reazione acrosomiale prevede un insieme di cambiamenti riguardanti la membrana acrosomiale esterna e la membrana plasmatica dello spermatozoo; infatti, durante questo processo, queste due membrane tendono a fondersi in alcune regioni, favorendo la formazione di pori che consentono il rilascio del contenuto acrosomiale all'esterno.

Differenti ipotesi sono state fatte per caratterizzare la sequenza temporale dei meccanismi fisiologici alla base della reazione acrosomiale.

In alcune specie, soprattutto nei mammiferi, la regione rostrale della testa dello spermatozoo sembra essere principalmente implicata nella reazione: la fusione delle membrane e il conseguente rilascio di enzimi idrolitici, permetterebbero allo spermatozoo di penetrare la zona pellucida e di esporre nuove molecole interessate nel legame secondario con la zona pellucida e nel legame e fusione con la membrana plasmatica dell'ovocita.

Nella maggior parte dei mammiferi, la reazione acrosomiale viene innescata dal contatto e riconoscimento molecolare tra la membrana

plasmatica dello spermatozoo e la glicoproteina ZP3 della zona pellucida dell'ovocita (Bleil and Wassarman, 1983; Dunbar B.S., 1980).

Ma è noto che in alcune specie, come il coniglio ed il criceto, la reazione acrosomiale precede il legame dello spermatozoo alla zona pellucida dell'ovocita, anche se comunque avviene sempre in prossimità della stessa (Suzuky and Yanagimachi, 1983).

2.5 *Struttura dell'ovidutto*

L'ovidutto si estende dalle immediate vicinanze dell'ovaio fino all'utero con il quale prende direttamente contatto tramite la giunzione utero-tubarica. Esso è una struttura altamente specializzata che prende origine, durante l'embriogenesi, dalla porzione craniale del primitivo dotto di Müller.

L'ovidutto ha la forma di un condotto allungato ed è anatomicamente diviso in 4 distinte regioni:

l'infundibolo

l'ampolla

l'istmo

la giunzione utero-tubarica

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

La fecondazione avviene nell'ampolla che si estende dall'infundibolo fino alla giunzione istmo ampollare. Il lume dell'ampolla è più ampio di quello dell'istmo e diminuisce di calibro procedendo dall'infundibolo verso la giunzione istmo ampollare.

L'istmo si estende fino alla giunzione utero tubarica e si apre direttamente nella cavità uterina.

La parete del tratto istmico consiste di uno spesso strato di muscolatura liscia che circonda uno stretto lume di circa 0.4 mm.

L'epitelio oviduttale è costituito da cellule colonnari che possono essere distinte in 2 categorie fondamentali: ciliate e secernenti.

Le prime sono più numerose nella fimbria e nell'ampolla, mentre le secernenti non ciliate predominano nell'istmo. Entrambi i tipi cellulari subiscono cambiamenti nella struttura e funzione sotto l'influenza di ormoni secreti dall'ovaio durante il ciclo estrale (Jansen RPS 1984).

2.6 Ruolo dell'ovidutto nell'immagazzinamento degli spermatozoi nei mammiferi.

In vivo, in molte specie di mammifero si assiste ad una drammatica riduzione del numero di spermatozoi dopo l'eiaculazione in vagina. Infatti, molti rimangono intrappolati all'interno del coagulo che si forma in vagina, e solo quelli dotati di rapida motilità progressiva sono capaci di attraversare il canale cervicale, l'utero e giungere, quindi, alla giunzione utero tubarica, che, a causa del suo stretto diametro, rappresenta un'ulteriore barriera naturale per l'ascesa degli spermatozoi nell'ovidutto. L'ultimo step di selezione è rappresentato dalla zona pellucida che permetterà di far penetrare nell'ovocita un unico spermatozoo, quello più competente alla fecondazione. (Fig.1 a,b,c).

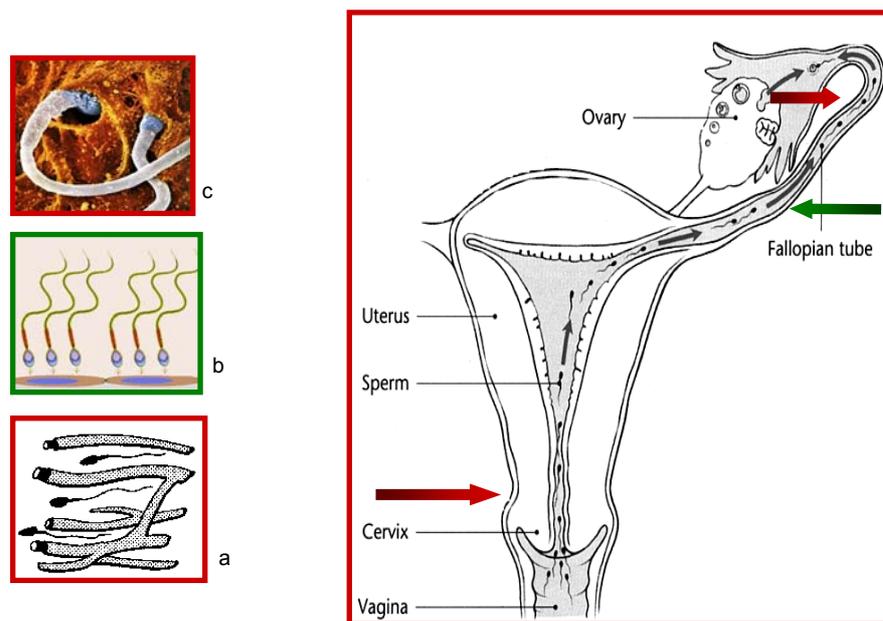


Fig.1: Selezione spermatica nel tratto riproduttivo femminile

La notevole riduzione del numero degli spermatozoi implica una forte selezione negativa nel tratto riproduttivo femminile. D'altra parte altri meccanismi devono assicurare che un numero adeguato di spermatozoi si renda disponibile nel sito di fecondazione al momento del rilascio dell'ovocita dal follicolo.

Uno di questi meccanismi implica, probabilmente, la presenza di sostanze chemiotattiche nell'ovidutto in fase ovulatoria; infatti, è stato osservato che nell'uomo, il trasporto passivo degli spermatozoi nelle tube di Falloppio non è simmetrico, ma influenzato dall'ovaio in cui si è sviluppato il follicolo dominante; è stato osservato che gli spermatozoi si dirigono preferibilmente verso il sito che contiene l'ovocita e da ciò è stato suggerito che lo stesso complesso cumulo-ooforo-ovocita (COC) o, più verosimilmente, fattori rilasciati allo scoppio del follicolo dominante, possano svolgere una funzione chemiotattica, attirando gli spermatozoi presso il sito della fecondazione (Harper, 1994).

A tale riguardo, studi recenti nell'uomo durante cicli di fecondazione assistita hanno dimostrato che solo i fluidi follicolari associati agli ovociti competenti alla fecondazione ed allo sviluppo embrionale sono dotati di una azione chemiotattica; anche se è difficile ricondurre ad una situazione fisiologica e cioè a cicli di ovulazione spontanea i risultati degli studi effettuati in condizioni di induzione della crescita follicolare multipla, è ragionevole supporre che la produzione di sostanze chemiotattiche

avvenga naturalmente solo nel follicolo dominante (Ralt et al., 1991). Tuttavia, non sono state ancora identificate le molecole a specifica azione chemiottatica.

La situazione diventa più complessa se si prendono in esame le specie di mammifero in cui è presente un ciclo estrale. Infatti, l'intervallo che intercorre tra l'inizio dell'estro e l'ovulazione può variare da ore ad un paio di giorni, secondo la specie considerata, e gli spermatozoi devono essere trattenuti all'interno dell'ovidutto, mantenere la loro capacità fecondante ed essere resi disponibili per la fecondazione al momento dell'ovulazione (Pollard et al., 1991).

Nei bovini il periodo che intercorre tra l'inizio dell'estro e l'ovulazione è di circa 30 ore: è stato visto che occorrono circa 8 ore perché nell'ovidutto si raccolga una quantità di spermatozoi, ovvero una riserva spermatica, sufficiente ad assicurare una elevata percentuale di fecondazione. Gli spermatozoi destinati a fecondare, quindi, devono trascorrere circa 22 ore nell'ovidutto (Pollard et al., 1991). Poiché spermatozoi in solo mezzo di coltura mantengono la viabilità e la motilità per periodi più brevi, devono esistere meccanismi all'interno dell'ovidutto che preservano la capacità fecondante degli spermatozoi fino all'ovulazione (Pollard et al., 1991).

È stato proposto che la riserva spermatica descritta nel bovino (Hunter and Wilmut, 1984), pecora (Hunter and Nichol, 1983), maiale

(Hunter, 1981; Hunter 1984), criceto (Battaglia et al., 1979; Smith et al., 1987), coniglio (Harper, 1973; Overstreet et al., 1978), porcellino d'india (Yanagimachi et al., 1976), topo (Zamboni, 1972; Suarez, 1987) e nell'uomo (Mansour et al., 1993; Williams et al., 1993; Thomas et al., 1994; Hunter, 1995; Pacey et al., 1995; Kunz et al., 1996; Baillie et al., 1997) sia limitata alla regione istmica dell'ovidutto e che giochi un ruolo fondamentale nell'assicurare la presenza di spermatozoi atti a supportare la fecondazione e lo sviluppo embrionale al tempo dell'ovulazione (Fig.2) (Harper, 1973; Hunter and Wilmut, 1984; Hunter, 1984; Smith et al., 1987; Suarez, 1987; Hunter et al., 1991).



Fig.2: *Riserva spermatica nella porzione istmica dell'ovidutto*

Diversi meccanismi possono essere responsabili dell'immagazzinamento degli spermatozoi in questa regione dell'ovidutto: (1) costrizione del lume oviduttale nella regione istmica (Suarez, 1987); (2) una più bassa

temperatura nella parte prossimale dell'istmo (Hunter et al., 1986); (3) la presenza di muco o di particolari prodotti secreti dalle cellule della mucosa dell'istmo (Suarez and Lefebvre, 1997). Le secrezioni presenti nel fluido oviduttale potrebbero avere un ruolo fondamentale, anche se le vedute dei diversi gruppi di lavoro appaiono a volte diametralmente opposte. Infatti, nei bovini, è stato riportato che il fluido oviduttale e specifiche glicoproteine secrete dalle cellule epiteliali della mucosa oviduttale durante la fase follicolare del ciclo estrale, come l'oviduttina, sono in grado di mantenere efficacemente la viabilità e la motilità degli spermatozoi (Abe et al., 1995). Tuttavia l'incubazione degli spermatozoi in solo fluido oviduttale istmico in fase periovulatoria, ne decresce la motilità e causa un aumento della quota di spermatozoi che subiscono la reazione acrosomiale e, quindi non più disponibili per la fecondazione.

Altri autori hanno dimostrato che gli spermatozoi, durante il loro soggiorno nell'ovidutto, non nuotano liberamente, ma si legano alla superficie apicale delle cellule che ne rivestono il lume (Hunter, Flechon and Flechon, 1991); quindi il legame degli spermatozoi all'epitelio oviduttale è probabilmente il più importante fattore coinvolto nella formazione della riserva spermatica (Bader, 1982; Suarez, 1987; Hunter et al., 1987).

In vivo gli spermatozoi si legano tramite la porzione rostrale della testa, così come osservato tramite transilluminazione di espianti di ovidutto

nel topo (Suarez, 1987) e nel criceto (Katz et al., 1980). Micrografie elettroniche a scansione degli spermatozoi di suino, bovino ed equino, mostrano il legame all'epitelio oviduttale tramite la regione acrosomiale (Fig.3) (Bader, 1982; Hunter et al., 1987; Hunter et al., 1991).

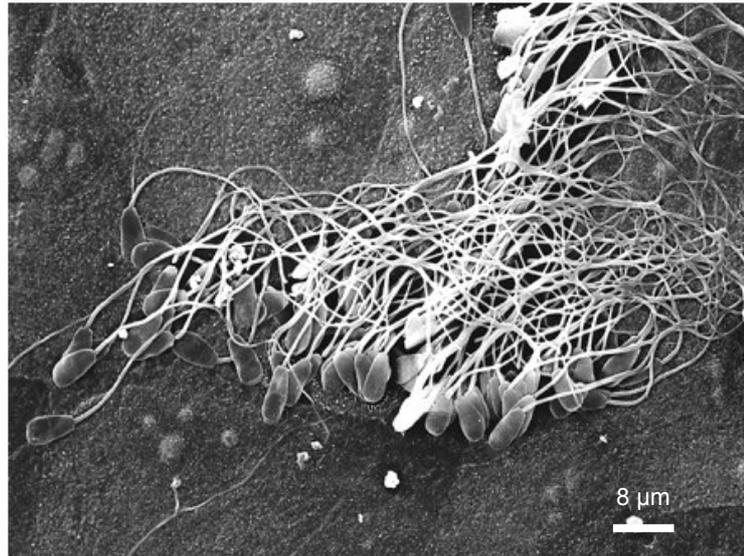


Fig.3: *Micrografia elettronica a scansione di spermatozoi bovini adesi a cellule tubariche bovine*

È stato dimostrato che associazioni strette avvengono anche tra spermatozoi umani e cellule oviduttale omologhe *in vivo* (Williams et al., 1993).

Queste associazioni insieme con l'abbondante muco viscoso presente nell'istmo al tempo dell'ovulazione che intrappola gli spermatozoi, potrebbero essere responsabili dell'immagazzinamento degli spermatozoi nelle tube (Donnez et al., 1985; Jansen, 1995). La combinazione di questi

due fattori nella formazione della riserva per la fecondazione è stata riportata anche in altre specie (Suarez et al., 1997).

È anche probabile che i glicoconiugati del lume oviduttale siano coinvolti nella creazione di tale riserva poiché mediano l'adesione e aumentano la sopravvivenza degli spermatozoi (Williams et al., 1993). Nelle tube umane, i glicoconiugati delle OEC differiscono tra cellule ciliate che hanno residui di acido sialico e cellule secernenti con residui di fucosio (Jansen et al., 1995). Questi residui di fucosio sono distribuiti uniformemente sull'intera tuba umana mentre i residui di galattosio sono stati trovati solamente nell'istmo, suggerendo che questi residui istmici svolgono un ruolo specifico nel sito di deposito degli spermatozoi (Williams et al., 1993).

Osservazioni ulteriori *in vitro*, hanno mostrato che l'interazione preserva efficacemente la motilità degli spermatozoi nel tempo. Alcuni esperimenti effettuati sui criceti e sui bovini hanno evidenziato che la diretta interazione tra spermatozoi e vescicole preparate dalle membrane apicali delle cellule oviduttali, era sufficiente a mantenere la motilità *in vitro* in maniera analoga a ciò che accade *in vivo*; inoltre l'effetto delle vescicole di membrana sulla motilità era tessuto-specifico e relativo al particolare stato ormonale delle cellule oviduttali al momento del prelievo: solo quelle prelevate in periodo preovulatorio permettevano un mantenimento della motilità (Smith et al., 1998).

L'adesione degli spermatozoi all'ovidutto potrebbe avere molteplici funzioni:

1. potrebbe prevenire fecondazioni polispermiche, permettendo solo a pochi spermatozoi, al tempo opportuno, di raggiungere l'ovocita. In un esperimento effettuato sul maiale, il numero di spermatozoi è stato artificialmente incrementato nel sito di fecondazione, attraverso (a) inseminazione chirurgica, direttamente nell'ovidutto (Polge et al., 1970; Hunter, 1973), (b) tagliando l'ovidutto per bypassare la riserva (Hunter and Leglise, 1971), (c) somministrando progesterone (Day and Polge, 1968). In questo caso si osservava un incremento della polispermia (Nagai and Moor, 1990; Hunter, 1991).
2. potrebbe mantenere la capacità fecondante degli spermatozoi tra l'inizio dell'estro e l'ovulazione. La motilità e la fertilità degli spermatozoi bovini è mantenuta più a lungo *in vitro* se questi vengono incubati con epitelio oviduttale se comparati con altri tipi di epitelio o in solo mezzo di coltura (Pollard et al., 1991; Chian and Sirard, 1995);

La capacitazione e la iperattivazione potrebbero essere regolate all'interno dell'istmo (Hunter and Hall, 1974; Suarez et al., 1998; Ellington et al., 1993). Se gli spermatozoi che vengono immagazzinati nella porzione istimica della tuba, grazie all'adesione alle cellule epiteliali, hanno un ruolo

nella fecondazione, allora devono esistere dei segnali periovulatori in grado di determinare il loro rilascio in modo che essi possano raggiungere il sito naturale della fecondazione, l'ampolla.

In diverse specie la capacità degli spermatozoi di aderire all'epitelio sembra essere in relazione con il loro stato capacitativo: gli spermatozoi di toro e criceto capacitati legano le cellule epiteliali oviduttali in quantità minore rispetto ai non capacitati (Smith et al., 1998).

La capacitazione spermatica è una condizione necessaria alla fecondazione (Chang, 1951; Ellington et al., 1993) ed è costituita da una serie di cambiamenti della membrana plasmatica che permettono agli spermatozoi di andare incontro a reazione acrosomiale quando esposti ad un induttore fisiologico della reazione acrosomiale, come una glicoproteina che compone la ZP (Bleil et al., 1980; Bleil and Wasserman et al., 1983). Questa serie di cambiamenti consiste nella rimozione, addizione e/o alterazione dei componenti della membrana plasmatica spermatica. Una parte di questi cambiamenti avviene nell'ovidutto (Yanagimachi et al., 1994) e potrebbe essere responsabile del rilascio degli spermatozoi.

In conclusione, è ragionevole pensare che la tuba possa immagazzinare gli spermatozoi e mantenerne la capacità fecondante grazie all'adesione e che la capacitazione possa modulare questo evento, anche se a tutt'oggi il segnale fisiologico che collega l'ovulazione e il rilascio degli spermatozoi resta sconosciuto (Smith et al., , 1998).

2.7 Funzioni *in vitro* dell'ovidotto

Studi effettuati *in vivo* hanno dimostrato che solo un numero limitatissimo di spermatozoi raggiunge la parte alta dell'ovidotto, l'ampolla, sede naturale della fecondazione (Katz et al., 1989).

Per comprendere i meccanismi alla base della selezione spermatica è vantaggioso ricorrere all'utilizzo di modelli sperimentali che cercano di mimare ciò che avviene *in vivo*. A tale riguardo, in letteratura sono stati condotti numerosi studi in cui l'interazione spermatozoo-ovidotto è stata analizzata allestendo colture *in vitro* di monostrati di cellule oviduttali.

Vari gruppi di ricerca si sono interessati ai fattori rilasciati dall'ovidotto stesso (Yanagimachi et al., 1976; Suarez, 1987; Ralt et al., 1991; Abe et al., 1993; Ijaz et al., 1994; Grippo et al., 1995), ed alle interazioni che vengono ad instaurarsi tra spermatozoi e cellule oviduttali (Smith and Yanagimachi, 1990; Pollard et al., 1991; Smith and Nothnick, 1997; Dobrinski et al., 1997).

Sia le secrezioni che il diretto contatto cellula-cellula sembrano essere capaci di influenzare il mantenimento della motilità e della viabilità degli spermatozoi.

La motilità, nel tempo, degli spermatozoi legati ai monostrati oviduttali, viene mantenuta se paragonata a quella di spermatozoi incubati in solo mezzo di coltura, evidenziando in maniera inequivocabile che l'adesione degli spermatozoi ai monostrati, sia istimici che ampollari,

preserva la motilità nelle diverse specie di mammiferi (Gualtieri and Talevi, 2000).

L'aumento della viabilità spermatica, in presenza di cellule epiteliali oviduttali, *in vitro* è stato riportato in diverse specie incluso il coniglio (Li J et al., 1990), il bovino (Pollard et al., 1991; Ellington et al., 1991), la pecora (Gutierrez et al., 1993), il cavallo (Ellington et al., 1993; Thomas et al., 1994) e l'uomo (Kervancioglu et al., 1994; Thomas et al., 1994; Bongso et al., 1994).

I meccanismi che mantengono la viabilità spermatica non sono ancora conosciuti. In alcuni casi i mezzi condizionati sono in grado di mantenere la viabilità spermatica *in vitro*, suggerendo che i prodotti secreti dalle cellule potrebbero essere coinvolti (Ijaz et al., 1994; Abe et al., 1995).

Dati a favore del ruolo fondamentale del contatto diretto tra gli spermatozoi e la membrana plasmatica apicale delle cellule oviduttali nel mantenimento della viabilità spermatica derivano dagli eleganti esperimenti condotti con preparazioni di vescicole della membrana apicale delle cellule oviduttali che dimostrano, inoltre, che questo effetto appare essere tessuto specifico e correlato con lo stato riproduttivo (Smith and Nothnich, 1997).

Nei bovini, gli spermatozoi che legano le cellule oviduttali presentano acrosoma integro per tutta la durata dell'interazione; al momento del rilascio intervengono cambiamenti a livello della membrana plasmatica, associati con la capacitazione; gli spermatozoi rilasciati

mantengono l'acrosoma integro. Poiché, dopo la capacitazione e la reazione acrosomiale, la vita dello spermatozoo è estremamente breve, solo gli spermatozoi che presentano il loro acrosoma intatto in stretta vicinanza dell'ovocita sono capaci di fecondare (Gualtieri and Talevi, 2000).

In vitro il rilascio avviene in modo lento e progressivo, per cui gli spermatozoi, inizialmente rilasciati motili e con acrosoma intatto, perdono nel tempo la loro motilità e subiscono reazione acrosomiale (Gualtieri and Talevi, 2000).

Come evidenziato, vari studi condotti in diverse specie indicano che il rilascio degli spermatozoi adesi alle cellule oviduttali è dovuto a cambiamenti della membrana dello spermatozoo probabilmente rientranti nel processo della capacitazione.

Tuttavia, fino a poco tempo fa non era stato mai trovato un induttore del rilascio spermatico né naturale né artificiale.

Il gruppo di ricerca con il quale ho svolto la mia tesi è stato il primo a saggiare l'abilità di agenti capacitanti, routinariamente impiegati nella fecondazione *in vitro* nei bovini (Parrish et al., 1985; Parrish et al., 1988; Parrish et al., 1989), di influenzare l'adesione spermatica.

I risultati hanno mostrato che glicoconiugati solfati quali l'eparina, il fucoidano e altri, ma non le loro controparti non solfate, a concentrazione μM o nM , sono sia potenti inibitori dell'adesione che induttori del rilascio di spermatozoi adesi a cellule oviduttali *in vitro* (Talevi and Gualtieri,

2001). La solfatazione di tali molecole è essenziale sia per la loro attività capacitativa che per la loro attività di rilascio. Inoltre, recentemente è stato dimostrato che il rilascio indotto dall'eparina degli spermatozoi adesi è accompagnato da un incremento del calcio libero intracellulare e da un aumento della fosforilazione delle tirosine proteiche dello spermatozoo, due eventi ben conosciuti della capacitazione (Gualtieri et al., 2005).

L'incremento della frequenza del battito flagellare degli spermatozoi adesi, riscontrata al momento dell'aggiunta delle molecole solfate, indica che esistono recettori sulla superficie dello spermatozoo che sono in grado di trasdurre il legame in aumento della motilità. È interessante notare che l'eparina, molecola fondamentale per la capacitazione *in vitro* nei bovini, è presente nel fluido oviduttale e la sua concentrazione risulta massima nel periodo periovulatorio.

Questi dati suggeriscono che l'eparina potrebbe quindi rappresentare almeno nei bovini il segnale naturale periovulatorio che rilascia gli spermatozoi immagazzinati nella tuba grazie all'adesione e li rende disponibili per la fecondazione (Talevi and Gualtieri, 2001).

L'iperattivazione indotta in seguito all'aggiunta dei glicoconiugati potrebbe determinare il rilascio meccanico dello spermatozoo oppure, un'ipotesi alternativa accreditata è che i glicoconiugati inducono un rimodellamento della superficie spermatica, causando la perdita o la

modificazione delle molecole coinvolte nel legame spermatozoo-ovidutto (Talevi and Gualtieri, 2001).

Per caratterizzare le molecole coinvolte nell'adesione degli spermatozoi con le OEC sono stati effettuati esperimenti di inibizione dell'adesione. Nel criceto, si è fatto uso di carboidrati per il pretrattamento degli spermatozoi. Tra i diversi carboidrati utilizzati, solo la fetuina, ed in particolare i suoi residui ripetuti di acido sialico, erano capaci di inibire il legame (De Mott et al., 1995).

Per quanto riguarda i bovini, il fucosio potrebbe essere un residuo carboidratico implicato nell'adesione in quanto è capace di inibire l'adesione *in vitro* (Lefebvre et al., 1997).

Negli equini (Dobrinski et al., 1996), il riconoscimento di glicoconiugati, con residui di galattosio esposti sulle cellule epiteliali oviduttali, da parte di proteine che legano il galattosio situate sulla membrana plasmatica periacrosomiale degli spermatozoi, potrebbe mediare il legame degli spermatozoi alle cellule *in vitro*.

Sulla base degli studi di inibizione dell'adesione condotti con i carboidrati, si suppone che il particolare carboidrato implicato nell'adesione spermatozoo-cellula oviduttale vari a seconda della specie. Secondo l'ipotesi corrente più accreditata, i determinanti carboidratici implicati nell'adesione in una determinata specie potrebbero essere riconosciuti da una molecola lectino-simile presente sulla superficie dello spermatozoo. Il

rilascio degli spermatozoi potrebbe essere causato da una perdita o modificazione di tale lectina durante la capacitazione causando la perdita di affinità per la mucosa oviduttale (Suarez et al., 1998).

Studi recenti condotti durante il periodo della mia tesi, utilizzando il sistema di selezione spermatica *in vitro*, hanno permesso di individuare delle nuove molecole segnale, gli antiossidanti tiolici (D e DL-Penicillamina, β -Mercaptoetanolo, Cisteina), capaci di rilasciare gli spermatozoi selezionati e immagazzinati mediante adesione transitoria all'epitelio tubarico. In base ai risultati ottenuti è stato ipotizzato che proteine di superficie dello spermatozoo responsabili dell'adesione all'epitelio tubarico siano attivate-disattivate in modo redox e cioè in base al loro stato disolfuri-sulfidrili da queste molecole che sono normalmente rappresentate e raggiungono la loro concentrazione massima nel fluido oviduttale al momento dell'ovulazione.

2.8 Adesione spermatozoi-cellule oviduttali e selezione di subpopolazioni spermatiche

L'adesione degli spermatozoi alla superficie delle cellule tubariche garantisce il prolungamento della vitalità e motilità spermatica in attesa di un segnale periovulatorio che permette il rilascio spermatico e la migrazione verso il sito di fecondazione.

Tuttavia, dati in specie differenti suggeriscono che, l'adesione spermatozoo-cellule oviduttali possa avere una duplice valenza e cioè che sia anche in grado di selezionare particolari subpopolazioni spermatiche preesistenti nell'eiaculato qualitativamente migliori. Infatti, diversi studi in differenti specie hanno dimostrato che l'adesione all'ovidutto seleziona spermatozoi caratterizzati da acrosoma integro (bovino: Gualtieri and Talevi, 2000), stato non capacitato (equino: Thomas et al., 1995; bovino: Lefebvre and Suarez 1996; maiale: Fazeli et al., 1999), basso contenuto di calcio libero intracellulare e bassa fosforilazione delle tirosine delle proteine di membrana (maiale: Petrunkina et al., 2001, 2003; bovino: Gualtieri et al., 2005), morfologia superiore (equino: Thomas et al., 1994), struttura cromatinica normale (umano: Ellington et al., 1998).

Questi risultati, nel loro insieme, suggeriscono quindi che gli spermatozoi selezionati dall'adesione all'ovidutto costituiscano una subpopolazione di elevato valore da destinare alla fecondazione.

Tuttavia, non essendo fino adesso disponibile un metodo per rilasciare gli spermatozoi adesi alle cellule oviduttali in nessuna delle specie studiate al proposito, non si è mai potuta saggiare la caratteristica funzionale più importante degli spermatozoi selezionati dall'adesione e cioè la loro capacità di supportare la fecondazione e lo sviluppo embrionale.

Come descritto precedentemente, il gruppo in cui ho svolto la mia tesi di dottorato è stato il primo ad identificare delle sostanze capaci di rilasciare in modo sincrono ed in uno stato altamente vitale gli spermatozoi immagazzinati grazie all'adesione alle cellule oviduttali (Talevi and Gualtieri, 2001).

Grazie a tali risultati, lavori successivi nei bovini hanno permesso di evidenziare che la subpopolazione selezionata ha una capacità superiore di adesione alla zona pellucida e di fecondazione sia rispetto alla subpopolazione spermatica che non è in grado di aderire alle cellule oviduttali che rispetto all'eiaculato di partenza (Gualtieri and Talevi, 2003).

In ultimo, dati preliminari del mio gruppo di ricerca indicano che gli spermatozoi selezionati hanno anche una migliore competenza nel supportare lo sviluppo embrionale. Infatti, una percentuale significativamente più elevata di zigoti fecondati con gli spermatozoi selezionati dall'adesione alla tuba riesce a superare lo stadio critico dello sviluppo embrionale preimpianto nei bovini e cioè il passaggio dallo stadio di 8 a quello di 16 blastomeri e ad arrivare all'ultimo stadio di sviluppo

preimpianto, lo stadio di blastocisti. Inoltre, se si va a confrontare il numero di cellule delle blastocisti sviluppatesi a partire da zigoti prodotti con spermatozoi selezionati rispetto a quelli ottenuti con spermatozoi non selezionati, si evidenzia che le blastocisti del primo gruppo sono composte da un numero di cellule significativamente più elevato rispetto a quelle del secondo gruppo. E' da sottolineare che il numero di cellule di cui è composta una blastocisti è direttamente in relazione con la sua capacità di impianto e quindi di indurre gravidanze a termine.

Questi dati presentano un notevole interesse in quanto in letteratura la ben nota diversa potenzialità di un gruppo di embrioni a portare ad una gravidanza a termine è sempre stata messa in relazione alla qualità degli ovociti in termini di competenza allo sviluppo embrionale, mentre ben poco è noto sul contributo paterno alla qualità dello sviluppo embrionale.

Solo recentemente con l'avvento della iniezione intracitoplasmatica dello spermatozoo (ICSI) tra le tecniche di fecondazione assistita, tecnica in cui un singolo spermatozoo dell'eiaculato viene scelto dall'embriologo ed iniettato direttamente nel citoplasma dell'ovocita, si sta iniziando a realizzare che anche la qualità dello spermatozoo incide sulle potenzialità di sviluppo e quindi di gravidanza dello zigote prodotto. Queste osservazioni hanno contribuito a riaccendere l'interesse dei ricercatori sui processi naturali di selezione spermatica che hanno luogo nel tratto riproduttivo femminile per cercare di poterli almeno parzialmente riprodurre nelle

tecniche di fecondazione assistita umana che sono ormai sempre più in uso a causa del continuo aumento dell'infertilità sia maschile che femminile per cause sociali ed ambientali.

2.9 Molecole di rilascio: antiossidanti tiolici

Il rilascio degli spermatozoi dalle cellule tubariche è dovuto a dei cambiamenti a livello della superficie spermatica, che ne causano una perdita di affinità verso l'epitelio tubarico e che, con ogni probabilità, rientrano in un meccanismo di capacitazione, processo per cui lo spermatozoo diventa competente a fecondare l'uovo. Tale rilascio è indotto da segnali periovulatori, per lo più ignoti.

Per quanto riguarda la specie bovina, recenti studi hanno mostrato che diversi antiossidanti tiolici sono fisiologicamente presenti nel fluido oviduttale (Lapointe and Bilodeau *et al.*, 2003); essi presentano una concentrazione massima prima dell'ovulazione e cioè quando gli spermatozoi adesi alla tuba vengono rilasciati.

La presenza di antiossidanti nella tuba di Falloppio è nota in diverse specie ed è stato ampiamente dimostrato il loro ruolo nel promuovere la fecondazione e lo sviluppo embrionale (Guerin *et al.*, 2000; Fujii *et al.*, 2005). Come conseguenza, gli antiossidanti vengono anche usati per supplementare i mezzi di coltura per lo sviluppo embrionale *in vitro* (Luvoni *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 1999; Guerin *et al.*, 2001).

Tuttavia, gli antiossidanti esercitano i loro effetti anche sugli spermatozoi influenzandone l'attività funzionale nel tratto riproduttivo femminile. Specie di ossigeno reattive (ROS), a basse concentrazioni, hanno funzioni fisiologiche innescando la fosforilazione delle tirosine, la

capacitazione e la reazione acrosomiale; mentre, ad alte concentrazioni possono causare una serie di danni che comprendono la perossidazione dei lipidi di membrana, l'ossidazione dei sulfidrilici di membrana, la riduzione della motilità e la frammentazione del DNA (Baker and Aitken., 2005; O'flaherty et al., 2006).

Nel bovino, i maggiori antiossidanti trovati nel fluido oviduttale sono rappresentati da catalasi, superossido dismutasi, glutatione per ossidasi e glutatione ridotto (GSH) (Harvey et al., 1995; Lapointe and Bilodeau., 2003). E' utile menzionare che, gli antiossidanti come catalasi e GSH raggiungono la loro massima concentrazione nell'ovidutto bovino verso la fine dell'estro (Lapointe and Bilodeau., 2003), cioè quando gli spermatozoi selezionati attraverso l'adesione all'ovidutto sono rilasciati per migrare verso il sito di fecondazione.

Dunque, si potrebbe ipotizzare che queste molecole agiscano come induttori fisiologici del rilascio spermatico *in vitro*.

3 Scopo della ricerca

Negli ultimi anni, la ricerca nel campo della biologia della riproduzione ha fornito elementi utili per lo sviluppo di tecniche di fecondazione assistita, che hanno permesso di mimare *in vitro*, in maniera sempre più efficiente, i complessi meccanismi alla base della fecondazione e sviluppo embrionale. Il risultato di tale avanzamento biotecnologico si evidenzia dall'aumento delle percentuali di gravidanze a termine, per ciclo di trattamento, che sono passate da un iniziale 8% registrato negli anni '80 all'attuale 35%.

Ad ogni modo, si ritiene che tale percentuale possa ulteriormente aumentare attraverso una migliore comprensione degli eventi biologici alla base della maturazione dei gameti ed al loro transito all'interno dell'apparato riproduttivo che permetterà, in un prossimo futuro, di migliorare le tecniche di fecondazione *in vitro* e nel contempo di aumentare le percentuali di gravidanze a termine, avvicinandole sempre di più a quelle naturali.

E' noto che l'interazione degli spermatozoi con l'epitelio tubarico mantiene la vitalità e la motilità, favorendo la selezione di spermatozoi con migliore potere fecondante (Abe et al., 1995).

La ricerca effettuata durante il Dottorato è stata finalizzata allo studio dei meccanismi e delle molecole coinvolte nella selezione spermatica da parte dell'epitelio tubarico.

Il primo approccio sperimentale è stato quello di identificare differenze nel pattern proteico di superficie sia delle cellule tubariche in due condizioni

di legame spermatico estreme (massima e minima affinità per gli spermatozoi), sia delle subpopolazioni spermatiche selezionate. Le possibili differenze nel pattern proteico di superficie, sono state indagate mediante la marcatura con un probe (Sulfo-NHS-Biotina) in grado di legare il gruppo amminico delle proteine di superficie della membrana plasmatica.

In questa maniera le molecole di superficie possono essere facilmente identificate all'interno del pool proteico dopo elettroforesi e trasferimento su filtro di nitrocellulosa con streptoavidina perossidasi.

I risultati indicano che le due condizioni di coltura presentano lo stesso pattern proteico di superficie e, dunque, inducono a pensare che la differente affinità dei monostrati nel legare gli spermatozoi non è dovuta ad un cambiamento nel pattern proteico, ma molto probabilmente ad un cambiamento del meccanismo di selezione spermatica del monostrato post-confluente che, per tale motivo, lega un minor numero di spermatozoi.

Per quanto riguarda le subpopolazioni spermatiche selezionate, non si osservano differenze significative nel pattern proteico di superficie e, dunque, i risultati ottenuti sono tali da non ritenere opportuno il prosieguo degli esperimenti in questa direzione.

Sebbene la selezione degli spermatozoi attraverso l'adesione transiente all'epitelio oviduttale sia uno step fondamentale per il successo della fecondazione, si hanno poche informazioni sulla natura delle molecole coinvolte nell'adesione e rilascio.

I glicoconjugati solfati costituiscono il primo esempio di un segnale fisiologico del rilascio spermatico in tutte la specie ad oggi esaminate al

proposito. Tuttavia, è chiaro che il microambiente oviduttale ha una composizione molecolare estremamente complessa e che varia in modo ciclico. In teoria, qualsiasi molecola presente nell'ovidutto, la cui concentrazione diventa massima nel periodo periovulatorio, è potenzialmente candidata come segnale di rilascio spermatico.

Per quanto riguarda la specie bovina, recenti studi (Lapointe and Bilodeau et al., 2003) hanno mostrato che diversi antiossidanti enzimatici e non sono espressi nel fluido oviduttale e che alcuni di essi presentano una concentrazione massima prima dell'ovulazione e cioè quando gli spermatozoi adesi alla tuba vengono rilasciati *in vivo*.

La presenza di antiossidanti nella tuba di Falloppio è nota in diverse specie ed il loro ruolo è stato generalmente attribuito alla promozione della fecondazione e dello sviluppo embrionale pre-impianto (Guerin et al., 2001; Fujii et al., 2005). Numerosi lavori hanno, infatti, dimostrato che l'aggiunta di antiossidanti durante la coltura embrionale *in vitro* promuove lo sviluppo stesso (Luvoni et al., 1996; Kim et al., 1999; Guerin et al., 2001). E' tuttavia da sottolineare che gli antiossidanti esercitano una azione benefica anche sugli spermatozoi e che per contro la presenza di specie reattive d'ossigeno nell'eiaculato danneggiano la funzionalità spermatica.

Nel mio lavoro di tesi è stata indagata la possibilità che antiossidanti di diversa natura possano avere un ruolo nel rilascio di spermatozoi adesi all'epitelio tubarico *in vitro*.

I risultati hanno evidenziato che antiossidanti tiolici riducenti mediano il rilascio spermatico *in vitro* e che la loro azione è correlata alla

modulazione dello stato disolfuri-sulfidrilici della superficie dello spermatozoo.

Dunque, alla luce dei risultati ottenuti, viene ipotizzato che proteine di superficie dello spermatozoo responsabili dell'adesione spermatica all'ovidotto possano essere modulate in modo redox in base al loro stato disolfuri-sulfidrilici.

Per confermare tale ipotesi, l'approccio sperimentale è stato quello di ricercare possibili differenze dello stato redox delle molecole di superficie negli spermatozoi eiaculati (popolazione totale), selezionati (Released, Adesi) e non (Unbound) dal legame con le cellule tubariche attraverso la marcatura delle proteine di superficie mediante molecole (3-(N-Maleimidylpropionyl) biocitina e Iodoacetamide fluorescina) in grado di legare i gruppi sulfidrilici.

In questa maniera le molecole di superficie possono essere facilmente identificate mediante microscopia a fluorescenza (nel caso della Iodoacetamide fluorescina) o all'interno del pool proteico (nel caso di 3-(N-Maleimidylpropionyl) biocitina) dopo elettroforesi e trasferimento su filtro di nitrocellulosa con streptoavidina perossidasi.

In conclusione, la comprensione dei meccanismi e delle molecole coinvolte nella selezione spermatica da parte dell'epitelio tubarico getterebbe le basi per la realizzazione, tramite microtecnologia, di un supporto sintetico in grado di selezionare spermatozoi fisiologicamente idonei a supportare la fecondazione e sviluppo embrionale.

La realizzazione di questo biomateriale permetterebbe di risolvere le problematiche connesse alla selezione spermatica evidenziate nelle attuali procedure di fecondazione *in vitro*. Infatti, la realizzazione di biofilms ricchi di molecole capaci di selezionare gli spermatozoi permetterebbe il recupero su basi più fisiologiche degli spermatozoi da utilizzare per l'ICSI aumentando notevolmente la percentuale di sviluppo degli embrioni *in vitro* e di conseguenza l'efficienza delle tecniche di fecondazione *in vitro*.

4 MATERIALI E METODI

4.1 *Prelievo degli ovidutti e recupero delle cellule oviduttali*

Per questo lavoro vengono utilizzati ovidutti bovini prelevati da animali allevati in Campania ed avviati alla macellazione.

Gli ovidutti vengono prelevati direttamente dal corpo dell'animale durante la sua macellazione; subito dopo il prelievo, vengono trasferiti in contenitori sterili contenenti soluzione fisiologica (9g NaCl/litro in BDW) supplementata con Penicillina 100U/ml, streptomina 100 µg/ml e trasportati in laboratorio, ad una temperatura di 4°C.

Gli ovidutti, vengono ripuliti dal tessuto connettivo; la porzione fimbrica e la porzione di congiunzione utero-tubarica vengono rimosse e si procede a lavaggi estensivi in soluzione fisiologica. Successivamente, viene eseguito un lavaggio del lume della tuba con soluzione fisiologica; le tube sono poi immerse rapidamente in alcool etilico 80% tenendo chiuse le due estremità con pinzette sterili; vengono poi effettuati tre lavaggi in soluzione fisiologica e le tube vengono trasferite in coppia in medium 199 addizionato con gentamicina 50 µg/ml, fungizone 1 µg /ml e hepes 20mM.

I nostri esperimenti vengono compiuti su monostrati formati a partire dall'intero ovidutto.

Le cellule epiteliali oviduttali vengono isolate meccanicamente comprimendo gli ovidutti. La sospensione cellulare viene centrifugata due

volte per 8 minuti a 80g in provette da 15 ml in medium 199 addizionato con gentamicina 50 µg/ml e fungizone 1 µg /ml. Il pellet risultante viene inoculato in medium 199 supplementato con gentamicina 50 µg/ml, FCS 10%, fungizone 1 µg/ml in un rapporto volume pellet/volume mezzo 1:100.

4.2 Allestimento delle colture primarie

Le cellule oviduttali recuperate dalle singole tube (Fig.4), prima di essere utilizzate per allestire la coltura, vengono esaminate per la vitalità mediante osservazione del battito ciliare e test del trypan blu (colorante sopravvitali): un'aliquota di sospensione cellulare viene trattata con trypan blu 0.2% in medium 199 e letta immediatamente al microscopio a contrasto di fase.



Fig. 4: Ovidotto bovino ripulito dal connettivo in cui si distinguono istmo, ampolla e fimbria

Per la coltura delle cellule possono essere usati diversi substrati: piastre in plastica da 6 cm (area di crescita 28 cm²), piastre da 10 cm (area di crescita 78 cm²), fiasche (area di crescita 25 cm²) e supporti multiwell da

4 pozzetti (area di crescita 2 cm²). Per i nostri esperimenti le colture primarie vengono allestite in capsule da 10 cm di diametro e supporti .

Le cellule ottenute dal prelievo vengono inoculate in capsule Petri con medium 199 supplementato con gentamicina 50 µg/ml, FCS 10%, fungizone 1 µg/ml.

La crescita cellulare viene costantemente seguita al microscopio invertito a contrasto di fase.

Dopo 48 h di coltura, una parte delle cellule viene congelata, mentre alle restanti, ogni 48 ore, vengono eseguiti cambi del mezzo per sostituzione fin quando l'area di piastratura non è sufficiente. A tal punto si procede alla rimozione totale delle cellule ancora in sospensione ed alla successiva coltura fin quando non viene raggiunta la confluenza (Fig.5).

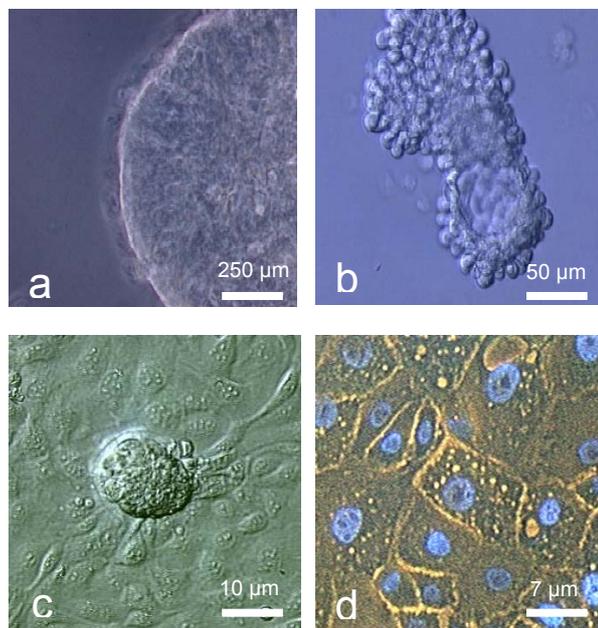


Fig. 5: *a) Cellula epiteliale oviduttale ciliata; b) BOEC (bovine epithelial oviductal cell) a 24 ore di coltura cavitate; c) BOEC in piastratura; d) monostrato oviduttale dopo 5 giorni di coltura con i nuclei colorati con l'Hoechst.*

4.3 Crio-conservazione delle cellule oviduttali

Le sospensioni cellulari (BOEC, *bovine epithelial oviductal cell*) derivanti dal prelievo e non utilizzate per allestire colture primarie vengono congelate: le cellule vengono recuperate, centrifugate due volte per 8 minuti a 80g in provette da 15 ml in medium 199 addizionato con gentamicina 50 µg/ml e fungizone 1 µg /ml. Il pellet risultante viene risospeso lentamente in una soluzione congelante (medium 199 + gentamicina 50 µg/ml, FCS 50% e DMSO 10%) considerando un rapporto volume pellet/volume mezzo di 1:10. Tale soluzione viene utilizzata per prevenire la formazione di cristalli di ghiaccio all'interno delle cellule che potrebbero alterare l'integrità cellulare.

Le cellule vengono aliquotate in tubi nunc (500-1000 µl ognuna) e sottoposte ad un ciclo di congelamento che prevede un passaggio a 4°C per 20 minuti, uno sui vapori di azoto (10 cm sul pelo d'azoto, -150°C) per 30 minuti ed immersione completa in azoto liquido (-196 °C).

4.4 Scongelamento ed allestimento di colture secondarie

Le cellule vengono scongelate tenendo le provette nunc per 5 minuti a 39°C. La sospensione cellulare viene centrifugata due volte per 8 minuti a 80g in provette da 15 ml in medium 199 addizionato con gentamicina 50 µg/ml e fungizone 1 µg /ml.

Eliminato il surnatante, il pellet viene risospeso in 1 ml di medium 199 addizionato con gentamicina 50 µg/ml, fungizone 1 µg /ml, FCS 10%.

Dopo aver valutato la vitalità delle cellule con il test del trypan blu, vengono allestite delle colture secondarie incubando le cellule nello stesso mezzo in cui vengono risospese in un rapporto volume pellet/volume mezzo 1:100 in piastre da 10 cm di diametro e in supporti multiwell da 4 pozzetti sul cui fondo vengono posti dei vetrini gelatinati (gelatina al 2%) in medium 199, supplementato con gentamicina 50 µg/ml, fungizone 1µg/ml, FCS 10%.

Ogni 48 ore il mezzo di coltura viene sostituito con mezzo fresco. Le cellule raggiungono la confluenza dopo 7-10 giorni ed i monostrati vengono utilizzati entro entro 24-48 ore.

In ogni esperimento, i monostrati provenienti da un singolo animale vengono lavati tre volte con sperm-TALP e lasciati in questo mezzo fino all'aggiunta di spermatozoi (1-3 h).

4.5 Preparazione della sospensione spermatica

Il seme utilizzato negli esperimenti è acquistato presso la Semen Italy (Modena). Il seme proviene da tori donatori di provata fertilità congelato in sottili tubi di cloruro di polivinile: le “paillettes” (0.5 ml; circa 40×10^6 spermatozoi per paillettes), che offrono un vantaggioso rapporto superficie-volume consentendo un rapido ed omogeneo congelamento.

Le “paillettes”, conservate in azoto liquido a -196°C , vengono scongelate in acqua alla temperatura di 39°C per 3 minuti.

Al fine di separare gli spermatozoi dal mezzo crioprotettivo, il seme viene stratificato su un gradiente discontinuo di Percoll ((90-40%) con o senza Hoechst 33342 ($10 \mu\text{g/ml}$) e centrifugato per 30 minuti a 180g. Il pellet viene lavato due volte in 2 ml di sperm-TALP BSA free mediante centrifugazione a 180 g per 5 minuti e risospeso in 200 μl dello stesso mezzo.

In fine, sugli spermatozoi viene valutata la percentuale di motilità in camera di Makler, la concentrazione assoluta in camera Bürker e la vitalità con l'Eosina test.

4.6 Saggio di adesione spermatica dei monostrati a confluenza e post-confluenza

Monostrati di cellule epiteliali oviduttali a confluenza e dopo 14 giorni dalla confluenza, provenienti da colture secondarie e presenti in capsule Petri da 10 cm di diametro con 10 ml di sperm-TALP, vengono impiegati per il saggio di adesione spermatica.

La sospensione spermatica recuperata dopo centrifugazione su Percoll e marcato con Hoechst 33342 viene addizionata ai monostrati, nelle due condizioni, ad una concentrazione di $2-5 \times 10^6$ spermatozoi motili/ml.

Dopo un'ora di incubazione a 39°C e al 5% di CO₂, gli spermatozoi non adesi al monostrato vengono completamente rimossi mediante cambi sequenziali con sperm-TALP fresco.

Mediante osservazioni in microscopia ottica e a fluorescenza (invertito con obiettivo 20X), sia sui monostrati a confluenza che post-confluenza viene valutata la media di spermatozoi legati per campo.

4.7 Localizzazione delle proteine di superficie delle cellule oviduttali e spermatiche

L'interazione spermatozoo-ovidutto è di tipo superficiale, ossia coinvolge la porzione rostrale della testa dello spermatozoo e la superficie apicale delle cellule epiteliali oviduttali (Gualtieri and Talevi, 2000).

Allo scopo di identificare le molecole coinvolte in questo tipo di interazione viene utilizzato un derivato della biotina, il Sulfo-NHS-Biotina.

Poiché questa molecola si dissolve rapidamente in soluzioni polari e contiene gruppi solfonati, essa non può penetrare la membrana cellulare, per cui, finché la cellula rimane intatta, solamente le ammine primarie esposte sulla superficie saranno biotinilate.

Le proteine marcate con i derivati della biotina, vengono rivelate mediante il sistema avidina-biotina.

4.7.1 Trattamento dei monostrati a confluenza e post-confluenza

4.7.1.1 Marcatura ed estrazione

La biotinilazione viene eseguita sia sui monostrati a confluenza che post-confluenza, allo scopo di individuare possibili differenze nel pattern proteico di superficie nelle due condizioni di coltura, responsabili della diversa affinità di legame per gli spermatozoi.

I monostrati vengono lasciati per 15-20 minuti a 39°C e 5% di CO₂ in medium 199 addizionato con gentamicina 50 µg/ml e fungizone 1 µg/ml. Successivamente, vengono lavati con PBS freddo supplementato con 0.5 mM MgCl₂ e 1 mM CaCl₂ per poi eseguire una biotinilazione delle proteine apicali di superficie con Sulfo-NHS-Biotina 1 mg/ml in PBS supplementato con 0.5 mM MgCl₂ e 1 mM CaCl₂ per 30 minuti a 4°C.

Al termine dell'incubazione, vengono effettuati lavaggi dei monostrati con PBS freddo supplementato con 0.5 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂ e 100 mM glicina. Successivamente, viene eseguito uno scraped dei monostrati in tampone RIPA (0.15 M NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 1mM EDTA, 50 mM Tris, 0.5% deossicolato di sodio) con inibitori delle proteasi.

Le cellule provenienti dallo scraped dei monostrati vengono trattate per l'estrazione delle proteine di membrana Triton solubili: le cellule vengono solubilizzate per 30 minuti in tampone RIPA con inibitori delle

proteasi e sonicate a 100 Watt per 10 secondi; queste operazioni vengono eseguite a 4°C.

Successivamente, le cellule vengono centrifugate a 13000 g per 20 minuti a 4°C.

Il surnatante (sospensione proteica) viene recuperato e viene determinata la concentrazione proteica mediante spettrofotometria con il metodo BCA (Pierce, Rockford, IL).

4.7.1.2 Elettroforesi monodimensionale su gel di poliacrilammide in SDS-page

Le componenti della miscela proteica vengono separate mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide in SDS-page ed elettrotrasferite per l'identificazione delle componenti proteiche della superficie apicale delle cellule epiteliali oviduttali dei monostrati a confluenza e post-confluenza.

I campioni proteici vengono risospesi direttamente nel tampone di carico (Tris-HCl 60 mM, pH 6.8; glicerolo 25%; SDS 2%; β -mercaptoetanolo 14.4 mM; blu di bromofenolo 0.1%), vortexati, denaturati a 100°C per 3 minuti, centrifugati a 12000 g per 5 minuti.

L'analisi elettroforetica viene condotta essenzialmente con il metodo descritto da Laemmli (Laemmli U.K., 1970) utilizzando mini gel (10 x 8 x 0,1 cm) di poliacrilammide a 7.5% e 10%. La corsa elettroforetica viene effettuata ad amperaggio costante (23 mA/gel) in tampone di corsa (Tris 25 mM; glicina 192 mM, SDS 0,1%; pH 8.3).

Come markers del peso molecolare vengono utilizzate miscele di proteine standard con intervallo di pesi molecolari da 29 a 205 kDa (BIO-RAD).

Generalmente, vengono caricati due gels allo stesso modo: un gel viene destinato per la colorazione argentica che mette in evidenza tutte le proteine di membrana e permette di valutare se tutti i campioni vengono caricati alla stessa concentrazione; l'altro, viene impiegato per il

trasferimento su filtro di nitrocellulosa per la successiva rivelazione delle sole proteine di superficie precedentemente marcate con la Sulfo-NHS-Biotina.

4.7.1.3 Western-blotting ed identificazione delle proteine di superficie

Le componenti proteiche presenti nei gel vengono trasferite su filtro di nitrocellulosa mediante elettroblotting (BIO-RAD Transblot System) in tampone di trasferimento (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanolo 13.5 %; pH 8.3-8.5). Il trasferimento viene condotto a 4 °C ad amperaggio costante di 200 mA, over-night.

Il filtro di nitrocellulosa viene poi equilibrato in tampone TTBS (Tris 10 mM, NaCl 150 mM e 0,1% Tween-20; pH 7.3-7.5) e successivamente incubato, over-night a 4°C in agitazione, in una soluzione dello stesso tampone contenente proteine del latte al 5% per saturare eventuali siti aspecifici di legame.

Dopo tre lavaggi da 10 minuti in TTBS il filtro viene incubato per 30 minuti a temperatura ambiente con Avidina-Biotina coniugati alla perossidasi (ABC, Pierce). Al termine dell'incubazione, vengono eseguiti tre lavaggi da 10 minuti in TTBS.

Come cromogeno del sistema di rivelazione viene utilizzato il 3-amino-9-etilcarbazolo (AEC; Sigma A6926): il filtro viene ricoperto con la soluzione AEC a cui è stato aggiunto perossido di idrogeno 30% in rapporto 1:2000. L'incubazione viene eseguita al buio fino a completa rivelazione delle bande proteiche; la reazione viene, poi, bloccata immergendo il filtro in acqua di fonte.

Successivamente, vengono valutate possibili differenze nel pattern proteico di superficie delle cellule nelle due condizioni di coltura.

4.7.2 Trattamento degli spermatozoi

4.7.2.1 Recupero degli unbound e dei released:

I monostrati a confluenza delle cellule epiteliali tubariche, provenienti da colture primarie e secondarie e presenti in capsule Petri da 10 cm di diametro con 10 ml di sperm-TALP BSA free, vengono inseminati a $2-5 \times 10^6$ spermatozoi motili/ml per la selezione di due subpopolazioni spermatiche (unbound e released).

Dopo 30 minuti di incubazione a 39°C e al 5% di CO₂, gli spermatozoi non adesi (Unbound) al monostrato vengono recuperati e su di essi viene valutata la percentuale di motilità e vitalità.

Sia agli spermatozoi rimasti legati ai monostrati (che si trovano in 10 ml di sperm-TALP BSA free) che agli unbound viene aggiunto eparina 100 µg/ml. Dopo 15 minuti di incubazione, i Released vengono recuperati e su di essi valutata la percentuale di motilità e vitalità.

Gli unbound e i released vengono centrifugati separatamente in sperm-TALP BSA free a 180g per 10 minuti; gli spermatozoi vengono risospesi in un piccolo volume di sperm-TALP BSA free.

4.7.2.2 *Marcatura ed estrazione*

La marcatura con Sulfo-NHS-Biotina delle proteine di superficie viene eseguita su spermatozoi totali (scongelati e lavati in Sperm-TALP BSA free) e su spermatozoi selezionati (Released) e non (Unbound) dall'adesione all'epitelio tubarico *in vitro*, allo scopo di evidenziare possibili differenze nel pattern proteico di superficie nelle due subpopolazioni e rispetto alla popolazione totale.

Le tre popolazioni spermatiche (Totali, Unbound e Released) vengono lavate separatamente due volte in sperm-TALP contenente PVA 0.5 mg/ml per 10 minuti a 180g. In seguito alla determinazione della percentuale di motilità e alla concentrazione assoluta, vengono incubati con Sulfo-NHS-Biotina 1 mg/ml per 10 minuti, a 39°C e 5% di CO₂.

Al termine dell'incubazione, la reazione di biotilazione viene bloccata mediante l'aggiunta di Tris base 1 M (pH 7.4) fino a raggiungere una concentrazione finale del Tris base di 50 mM. Successivamente, gli spermatozoi vengono centrifugati tre volte a 600g per 10 minuti in Tris base 50 mM (pH 7.4) con inibitori delle proteasi (Sigma P2714).

Gli spermatozoi vengono trattati per l'estrazione delle proteine di membrana Triton solubili: gli spermatozoi vengono risospesi in tampone di solubilizzazione (50 mM Tris, pH 7.4; 1 mM EDTA; 0.2% Triton X-100; inibitori delle proteasi), solubilizzati su ghiaccio per 30 minuti e centrifugati a 13000 g a 4°C per 5 minuti. Il surnatante (sospensione proteica) viene

recuperato e viene determinata la concentrazione proteica mediante spettrofotometria con il metodo BCA (Pierce, Rockford, IL).

4.7.2.3 Elettroforesi monodimensionale su gel di poliacrilammide in SDS-page

I campioni proteici, derivanti dalle tre popolazioni spermatiche (totali, unbound e released), vengono risospesi direttamente nel tampone di carico (Tris-HCl 60 mM, pH 6.8; glicerolo 25%; SDS 2%; β -mercaptoetanol 14.4 mM; blu di bromofenolo 0.1%), vortexati, denaturati a 100°C per 3 minuti, centrifugati a 12000 g per 5 minuti.

L'analisi elettroforetica viene condotta essenzialmente con il metodo descritto da Laemmli (Laemmli U.K., 1970) utilizzando mini gel (10 x 8 x 0,1 cm) di poliacrilammide al 10%. La corsa elettroforetica viene effettuata ad amperaggio costante (23 mA/gel) in tampone di corsa (Tris 25 mM; glicina 192 mM, SDS 0,1%; pH 8.3).

Come markers del peso molecolare vengono utilizzate miscele di proteine standard con intervallo di pesi molecolari da 29 a 205 kDa (BIO-RAD).

Generalmente, vengono caricati due gels allo stesso modo: un gel viene destinato per la colorazione argentina che mette in evidenza tutte le proteine di membrana e permette di valutare se tutti i campioni vengono caricati alla stessa concentrazione; l'altro, viene impiegato per il trasferimento su filtro di nitrocellulosa per la successiva rivelazione delle sole proteine di superficie precedentemente marcate con la Sulfo-NHS-Biotina.

Western-blotting ed identificazione delle proteine di superficie

Le componenti proteiche presenti nei gel vengono trasferite su filtro di nitrocellulosa mediante elettroblotting (BIO-RAD Transblot System) in tampone di trasferimento (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanolo 13.5 %; pH 8.3-8.5). Il trasferimento viene condotto a 4 °C ad amperaggio costante di 200 mA, over-night.

Il filtro di nitrocellulosa viene poi equilibrato in tampone TTBS (Tris 10 mM, NaCl 150 mM e 0,1% Tween-20; pH 7.3-7.5) e successivamente incubato, over-night a 4°C in agitazione, in una soluzione dello stesso tampone contenente proteine del latte al 5% per saturare eventuali siti aspecifici di legame.

Dopo tre lavaggi da 10 minuti in TTBS, il filtro viene incubato per 30 minuti a temperatura ambiente con Avidina-Biotina coniugati alla perossidasi (ABC, Pierce). Al termine dell'incubazione, vengono eseguiti tre lavaggi da 10 minuti in TTBS.

Come cromogeno del sistema di rivelazione viene utilizzato il 3-amino-9-etilcarbazolo (AEC; Sigma A6926): il filtro viene ricoperto con la soluzione AEC a cui è stato aggiunto perossido di idrogeno 30% in rapporto 1:2000. L'incubazione viene eseguita al buio fino a completa rivelazione delle bande proteiche; la reazione viene, poi, bloccata immergendo il filtro in acqua di fonte.

4.7.2.4 *Elettroforesi bidimensionale (2D) su gel di poliacrilammide*

I campioni proteici derivanti dalle tre popolazioni spermatiche (totali, unbound e released), previa precipitazione in acetone-metanolo, vengono risospesi direttamente nel tampone di denaturazione e reidratazione delle strips, REID (8 M urea, 4% CHAPS, 1% DTT, q.b di blu di bromofelolo; Amersham) a cui vengono aggiunte le anfoline con intervallo di pH 3-10 (stesso intervallo di pH delle strips); la quantità delle anfoline viene calcolata in base al carico proteico del campione (es: 2µl di anfoline per 45-60µg di proteine).

Ciascun campione viene stratificato in un alloggiamento (strip holder) su cui viene posta la parte geletinata della strip (lunghezza 7 cm ed intervallo di pH 3-10) ricoperta, a sua volta, da uno strato di olio per evitare l'evaporazione del campione.

Il programma di focalizzazione isoelettrica delle strips per la separazione delle proteine in prima dimensione (in base alla carica elettrica) prevedeva:

Reidratazione over-night

200 V 30 min step-n-hold (costante)

3500 V 30 min gradiente

3500 V 30 min step-n-hold

8000 V 60 min gradiente

8000 V 1h e 40 min step-n-hold

Al termine della focalizzazione, le strips vengono lavate in acqua distillata e riequilibrate in un primo tampone per 5 minuti (6 M urea, 0.2% SDS, 30% glicerolo, 0.25 M tris pH 6.8, 2% DTT) ed in un secondo per 12 minuti (6 M urea, 0.2% SDS, 30% glicerolo, 0.25 M tris pH 6.8, 2.5% Iodoacetammide, q.b blue di bromofenolo).

Successivamente, le strips vengono sottoposte alla seconda dimensione utilizzando mini gel (10 x 8 x 0,1 cm) con gradiente di poliacrilammide 9-16%. La corsa elettroforetica viene effettuata ad amperaggio costante (27 mA/gel) in tampone di corsa (Tris 25 mM; glicina 192 mM, SDS 0,1%; pH 8.3).

4.7.2.5 Western-blotting ed identificazione delle proteine di superficie in 2D

Le componenti proteiche presenti nei gel vengono trasferite su filtro di nitrocellulosa mediante elettroblotting (BIO-RAD Transblot System) in tampone di trasferimento (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanolo 13.5 %; pH 8.3-8.5). Il trasferimento viene condotto a 4 °C ad amperaggio costante di 200 mA, over-night.

Il filtro di nitrocellulosa viene poi lavato in acqua distillata ed equilibrato in tampone TBS (Tris 10 mM e NaCl 150 mM; pH 7.3-7.5) e successivamente incubato, 1 h a 4°C in agitazione, in TBS milk 3% per saturare eventuali siti aspecifici di legame.

Dopo tre lavaggi da 10 minuti in TTBS (Tris 10 mM e NaCl 150 mM; pH 7.3-7.5, 0.1% Tween-20), il filtro viene incubato per 1 h a temperatura ambiente con Avidina-POD 1:5000 in TTBS milk 1%. Successivamente, vengono effettuati 3 lavaggi da 10 minuti del filtro in TTBS e sviluppo in chemiluminescenza (ECL) usando il Kit Biorad.

4.8 Effetto dei tioli sul rilascio spermatico

Piano di lavoro:

I monostrati di cellule coltivate su vetrini gelatinati, in supporto multiwell da 4 pozzetti in 750 μ l di sperm-TALP, vengono inseminati con la sospensione spermatica, recuperata dopo centrifugazione su gradini di Percoll, ad una concentrazione di $2-3 \times 10^6$ /pozzetto ed incubati per 1 ora a 39°C e al 5% di CO₂.

Dopo la rimozione degli spermatozoi non adesi, i pozzetti con gli spermatozoi adesi vengono lavati estensivamente con sperm-TALP. Il pozzetto controllo viene lasciato in questo mezzo, mentre i pozzetti sperimentali vengono trattati con differenti concentrazioni di molecole da testare, per 30 minuti.

Al termine del trattamento, i monostrati cresciuti su vetrini gelatinati ed inseminati con spermatozoi marcati con Hoechst, vengono fissati in glutaraldeide 2,5% in PBS, per 1 ora a 20-25 °C; successivamente, vengono lavati estensivamente e montati con lo stesso tampone su vetrino con le cellule rivolte verso l'alto.

Per ogni pozzetto, vengono acquisiti campi di 0.286mm² al microscopio Zeiss Axioplan dotato di contrasto di fase, fluorescenza ed ottica di Nomarsky, mediante una camera Optronix ed un software KS 300.

Il numero degli spermatozoi adesi viene determinato analizzando dieci campi da 0.286mm² per pozzetto.

Esperimento 1: Effetto degli antiossidanti tiolici

Questo esperimento è stato progettato per studiare l'effetto degli antiossidanti tiolici D- e DL penicillamina, beta mercaptoetanolo e cisteina sul rilascio degli spermatozoi adesi ai monostrati oviduttali.

I monostrati con gli spermatozoi adesi vengono incubati per 30 minuti con solo sperm-TALP (controllo per il rilascio spermatico) o con agenti tiolici riducenti alle concentrazioni di 0.1 e 1 mM in sperm-TALP.

Alla fine del trattamento, i pozzetti vengono lavati estensivamente con sperm-TALP, fissati e analizzati come descritto precedentemente.

Esperimento 2: Pre-trattamento con penicillamina delle cellule tubariche e degli spermatozoi

Questo esperimento è stato realizzato per capire se l'effetto del rilascio spermatico della penicillamina viene esteso agli spermatozoi o alle cellule oviduttali.

Gli spermatozoi recuperati dalla centrifugazione su Percoll vengono divisi in due aliquote che sono, poi, preincubate per 30 minuti con penicillamina 100 μ M, o solo sperm-TALP (controllo).

Successivamente, il seme viene lavato in sperm-TALP mediante centrifugazione a 200g per 10 minuti ed, in fine, inseminato alla concentrazione di 2×10^6 spermatozoi motili/pozzetto in un volume finale di 500 μ l.

Alcuni monostrati vengono trattati allo stesso modo ed estensivamente lavati per rimuovere completamente la penicillamina.

La concentrazione finale della penicillamina nei pozzetti inseminati con spermatozoi pre-trattati era 2 μ M.

Pozzetti di controllo paralleli contenenti penicillamina 2 μ M, o solo sperm-TALP (controllo), oltre ai monostrati pre-trattati, vengono inseminati con aliquote spermatiche pre-trattate in solo sperm-TALP alla stessa concentrazione di spermatozoi motili.

Gli spermatozoi non adesi vengono rimossi 1 ora dopo l'inseminazione ed i monostrati vengono fissati per l'analisi quantitativa.

Esperimento 3: Effetto dei tioli non permeanti

Questo esperimento è stato allestito per studiare l'effetto degli antiossidanti tiolici permeanti e non permeanti sul rilascio spermatico.

I monostrati con gli spermatozoi adesi vengono incubati per 30 minuti con penicillamina 0.1 mM, ditioneitololo o glutatione ridotto (GSH) 0.1-1 mM, o solo sperm-TALP (controllo).

Alla fine del trattamento, le co-culture vengono trattate come descritto sopra per l'analisi quantitativa.

Esperimento 4: Effetto del glutatione ossidato

Questo esperimento è stato realizzato per capire se anche il glutatione ossidato (GSSG) ha effetti sul rilascio degli spermatozoi adesi come il GSH.

I monostrati con gli spermatozoi adesi vengono incubati per 30 minuti con penicillamina 0.1 mM, GSH o GSSG a 0.1-1 mM, o solo sperm-TALP (controllo).

Alla fine del trattamento, le co-culture vengono trattate come sopra descritto per l'analisi quantitativa.

Esperimento 5: Effetto degli antiossidanti non tiolici

Questo esperimento è stato progettato per studiare l'effetto degli antiossidanti non tiolici sul rilascio degli spermatozoi adesi ai monostrati oviduttali.

Le co-culture vengono trattate per 30 minuti con penicillamina 0.1 mM (controllo per il rilascio), o con i seguenti antiossidanti: dimetil tiourea 1 mM, trolox 0.5 mM, superossido dismutasi 2500U/ml, catalasi 120U/ml.

I pozzetti, successivamente, vengono lavati per sostituzione per la rimozione degli spermatozoi non adesi e fissati per l'analisi quantitativa.

4.9 Localizzazione e caratterizzazione dei siti sulfidrilici sulla superficie spermatica

Questo esperimento è stato condotto per studiare i pattern di distribuzione dei sulfidrilici sulla superficie spermatica sia da un punto di vista citochimica (marcatura con IAF) che biochimico (marcatura con MPB).

Le subpopolazioni sulle quali viene analizzata la distribuzione dei sulfidrilici di superficie della membrana plasmatica sono: spermatozoi della sospensione iniziale, spermatozoi non legati (Unbound), spermatozoi adesi dopo 1 ora di co-coltura con le cellule tubariche, spermatozoi rilasciati (Released) con penicillamina 0.1 mM dopo 30 minuti di incubazione.

4.9.1 Marcatura con IAF

Esperimento 6:

Aliquote da 100 μ l di sospensione spermatica o subpopolazioni in sperm-TALP vengono incubate con IAF 4 μ M per 15 minuti al buio a temperatura ambiente.

Trascorso tale tempo, il seme viene diluito in 10 ml di sperm-TALP, centrifugato per 10 minuti a 180g; il pellet viene risospeso in mezzo fresco e viene effettuata una osservazione *in vivo* al microscopio a fluorescenza.

I monostrati cresciuti su vetrini gelatinati con gli spermatozoi adesi vengono marcati con IAF come mensionato sopra, lavati estensivamente con sperm-TALP, montati con mezzo fresco su un vetrino con le cellule rivolte verso l'alto ed osservate in vivo al microscopio a fluorescenza.

Vengono acquisiti dieci-venti campi (dipende dalla concentrazione spermatica) per immagini, alternativamente, a contrasto di fase ed in fluorescenza.

I patterns di marcatura vengono espressi come percentuali attraverso l'analisi di almeno 500 spermatozoi per ogni condizione.

4.9.2 Marcatura con MPB ed estrazione proteica

Esperimento 7:

- Marcatura degli spermatozoi totali:

Gli spermatozoi vengono scongelati e diluiti 1:10 in sperm-TALP BSA free, pH 7.3. Successivamente, viene eseguita una centrifuga della sospensione spermatica su Percoll 20% in sperm-TALP BSA (~ 4 ml di sospensione spermatica su 1 ml di Percoll 20%) a 600g per 10 minuti.

In seguito alla determinazione della percentuale di motilità, vitalità e concentrazione assoluta, gli spermatozoi vengono incubati con 3-(N-Maleimidylpropionyl) biocitina 1 mM per 30 minuti, a 39°C e 5% di CO₂.

Al termine dell'incubazione, la reazione di biotinilazione viene bloccata diluendo 10 volte la sospensione spermatica con sperm-TALP BSA free. Successivamente, gli spermatozoi vengono centrifugati a 600g per 10 minuti su 1 ml di Percoll 20% in sperm-TALP BSA free. Il pellet viene recuperato mediante aspirazione dal fondo della provetta e lavato per 10 minuti a 600g in 5 ml di Tris 50 mM, pH 7.4, con inibitori delle proteasi.

Gli spermatozoi vengono trattati per l'estrazione delle proteine di membrana Triton solubili: vengono risospesi in tampone di solubilizzazione (50 mM Tris, pH 7.4; 1 mM EDTA; 0.2% Triton X-100; inibitori delle proteasi), solubilizzati su ghiaccio per 30 minuti e centrifugati a 13000 g a 4°C per 5 minuti per poi recuperare il surnatante (sospensione proteica).

- Recupero e marcatura degli spermatozoi unbound e released:

Per recuperare le subpopolazioni degli spermatozoi “unbound” e “released” vengono usati 2 monostrati a confluenza delle cellule epiteliali tubariche, provenienti da colture primarie e secondarie, presenti in capsule Petri da 10 cm di diametro con 10 ml di sperm-TALP BSA free. I monostrati vengono inseminati a $2-5 \times 10^6$ spermatozoi motili/ml e dopo 30 minuti di incubazione a 39°C e al 5% di CO₂, gli spermatozoi non adesi (unbound) al monostrato vengono recuperati e centrifugati su Percoll 20% in sperm-TALP BSA free a 600g per 10 minuti.

Il pellet viene risospeso in un piccolo volume di sperm-TALP BSA free, trattato per la marcatura delle proteine di superficie e per l'estrazione delle proteine di membrana Triton solubili.

Gli spermatozoi rimasti legati ai monostrati (che si trovano in 10 ml di sperm-TALP BSA free) vengono fatti rilasciare con D-penicillamina 80µM (Sigma P4875). Dopo 30 minuti di incubazione, anche i released vengono recuperati, centrifugati su Percoll 20% e risospesi in un piccolo volume di sperm-TALP BSA free per poi essere trattati per la marcatura delle proteine di superficie e l'estrazione delle proteine di membrana Triton solubili.

- Marcatura e recupero degli spermatozoi adesi:

Per marcare le subpopolazioni degli spermatozoi “adesi” vengono usati 2 monostrati a confluenza delle cellule epiteliali tubariche, provenienti da colture primarie e secondarie, presenti in capsule Petri da 10 cm di

diametro con 10 ml di sperm-TALP BSA free. I monostrati vengono inseminati a $2-5 \times 10^6$ spermatozoi motili/ml e dopo 30 minuti di incubazione a 39°C e al 5% di CO₂, gli unbound vengono rimossi mediante lavaggi estensivi dei monostrati con sperm-TALP BSA free.

Gli spermatozoi rimasti legati ai monostrati (che si trovano in 10 ml di sperm-TALP BSA free) vengono trattati per la marcatura delle proteine di superficie. Al termine dell'incubazione, la reazione di biotinilazione viene bloccata mediante lavaggi estensivi dei monostrati con sperm-TALP BSA free.

Successivamente, gli spermatozoi adesi vengono fatti rilasciare con D-penicillamina 80µM; dopo 30 minuti di incubazione, vengono centrifugati su Percoll 20% a 600g per 10 minuti. Il pellet viene risospeso in un piccolo volume di sperm-TALP BSA free e gli spermatozoi vengono trattati per l'estrazione delle proteine di membrana Triton solubili.

Sulle sospensioni proteiche, degli spermatozoi totali e selezionati e non dall'adesione all'epitelio tubarico, viene determinata la concentrazione mediante spettrofotometria con il metodo BCA (Pierce, Rockford, IL).

4.9.2.1 Elettroforesi monodimensionale su gel di poliacrilammide in SDS-page

I campioni proteici, derivanti dagli spermatozoi totali, unbound, released ed adesi, vengono risospesi direttamente nel tampone di carico (Tris-HCl 60 mM, pH 6.8; glicerolo 25%; SDS 2%; blu di bromofenolo 0.1%), vortexati, incubati per 30 minuti a temperatura ambiente, denaturati a 100°C per 5 minuti e centrifugati a 12000 g per 5 minuti.

L'analisi elettroforetica viene condotta essenzialmente con il metodo descritto da Laemmli (Laemmli U.K., 1970) utilizzando mini gel (10 x 8 x 0,1 cm) di poliacrilammide al 10%. La corsa elettroforetica viene effettuata ad amperaggio costante (23 mA/gel) in tampone di corsa (Tris 25 mM; glicina 192 mM, SDS 0,1%; pH 8.3).

Come markers del peso molecolare vengono utilizzate miscele di proteine standard con intervallo di pesi molecolari da 7 a 200 kDa (BIO-RAD) e miscele di proteine pre-colorate standard con intervallo di pesi molecolari da 10 a 250 kDa (BIO-RAD).

Generalmente, vengono caricati due gels allo stesso modo: un gel viene destinato per la colorazione argentina che mette in evidenza tutte le proteine di membrana e permette di valutare se tutti i campioni vengono caricati alla stessa concentrazione; l'altro, viene impiegato per il trasferimento su filtro di nitrocellulosa per la successiva rivelazione delle

sole proteine di superficie che espongono i gruppi SH precedentemente marcati con il 3-(N-Maleimidylpropionyl) biocitina.

4.9.2.2 Western-blotting ed identificazione delle proteine di superficie.

Le componenti proteiche presenti nei gel vengono trasferite su filtro di nitrocellulosa mediante elettroblotting (BIO-RAD Transblot System) in tampone di trasferimento (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanolo 13.5 %; pH 8.3-8.5). Il trasferimento viene condotto a 4 °C ad amperaggio costante di 200 mA, over-night.

Il filtro di nitrocellulosa viene poi equilibrato in tampone TBS (Tris 10 mM e NaCl 150 mM; pH 7.3-7.5) e successivamente incubato, per 1 ora a temperatura ambiente in agitazione, in una soluzione 1% BSA in TBS per saturare eventuali siti aspecifici di legame.

Dopo tre lavaggi da 10 minuti in una soluzione 0,1% BSA in TTBS (Tris 10 mM e NaCl 150 mM; pH 7.3-7.5, 0.05 % Tween-20), il filtro viene incubato per 30 minuti a temperatura ambiente con Avidina-Biotina coniugati alla perossidasi (ABC, Pierce). Successivamente, vengono eseguiti tre lavaggi da 10 minuti in una soluzione 0,1% BSA in TTBS.

Come cromogeno del sistema di rivelazione viene utilizzato il 3-amino-9-etilcarbazolo (AEC; Sigma A6926): il filtro viene ricoperto con la soluzione AEC a cui è stato aggiunto perossido di idrogeno 30% in rapporto 1:2000. L'incubazione viene eseguita al buio fino a completa rivelazione delle bande proteiche; la reazione viene, poi, bloccata immergendo il filtro in acqua di fonte.

4.9.3 *Analisi statistica*

I dati sono presentati come la media \pm SD. Nel complesso le analisi sono state fatte mediante il modello ANOVA (SAS/STAT User's Guide 1988 Released 6.03 edn. Cary, NC: Statistical Analysis System Institute) seguito dal test di bontà Tukey e sono state comparate le coppie previste con quelle significative rilevate.

La sequenza dei dati dall'esperimento 1 e 3-6 sono state modificate dalla trasformazione dei dati normalizzati attraverso l'arcoseno.

5 RISULTATI

5.1 *Allestimento di monostrati oviduttali*

Le cellule oviduttali totali, prelevate meccanicamente dall'ovidutto e trasferite in piastre Petri da 10 cm di diametro con medium 199 supplementato con gentamicina 50 µg/ml, FCS 10%, fungizone 1 µg/ml, raggiungono la confluenza in circa 7 giorni.

Negli esperimenti, oltre alle colture primarie, vengono usate anche colture secondarie provenienti dallo scongelamento di cellule congelate allo stadio di BOEC (*bovine epithelial oviductal cell*) dopo 48 ore di coltura; queste ultime raggiungono la confluenza in tempi più rapidi rispetto ai monostrati ottenuti da cellule non congelate e conservano, se pure ridotte, le caratteristiche delle cellule non congelate.

5.2 Osservazioni del saggio di adesione spermatico ai monostrati a confluenza e post-confluenza

I monostrati delle cellule epiteliali oviduttali a confluenza e dopo 14 giorni dalla confluenza, vengono inseminati a $2-5 \times 10^6$ spermatozoi motili/ml.

Dopo un'ora di incubazione a 39°C e al 5% di CO₂, gli spermatozoi non adesi ai monostrati vengono completamente rimossi mediante cambi sequenziali con sperm-TALP fresco e sulle piastre viene valutata la media degli spermatozoi legati ai monostrati a confluenza e post-confluenza mediante microscopia a fluorescenza con obiettivo 20X.

Le osservazioni (Fig.6) mettono in evidenza che i monostrati a confluenza legano un numero di spermatozoi (426 sperm/campo) nettamente superiore rispetto ai monostrati post-confluenti (87 sperm/campo).

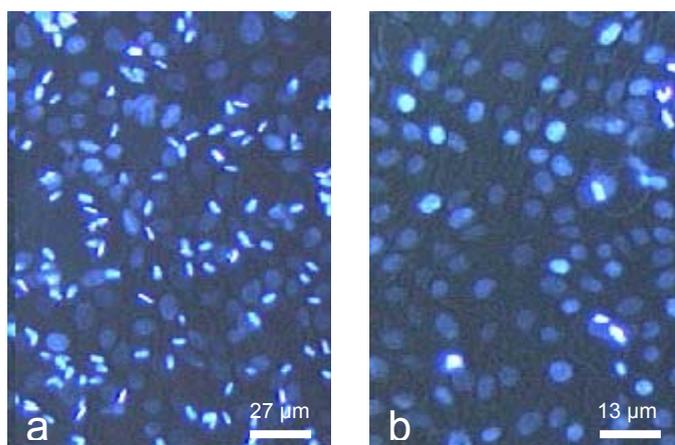


Fig. 6: Legame degli spermatozoi alle cellule oviduttali **a)** dopo 2 giorni e **b)** dopo 14 giorni dalla confluenza

5.3 *Confronto tra le componenti proteiche di superficie delle cellule a confluenza e post-confluenza*

L'analisi delle proteine di membrana delle due condizioni di coltura mediante colorazione argintica del gel, mostra che entrambe hanno lo stesso pattern proteico.

L'analisi dei blots mostra che non ci sono evidenti differenze nel pattern proteico di superficie nelle due condizioni di coltura; infatti, in entrambi i casi sono presenti delle bande proteiche poco intense con peso molecolare di circa 45 kDa, 55 kDa, 66 kDa e una più intensa intorno a 116 kDa (Fig.7).

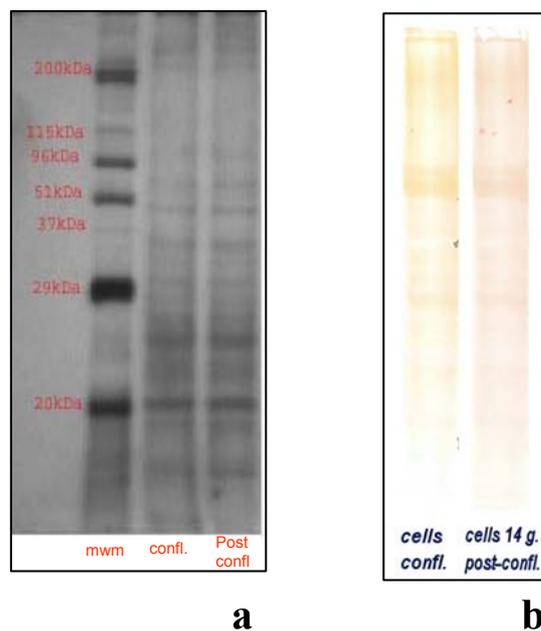


Fig.7: *a) Pattern proteico di membrana e b) di superficie delle cellule a confluenza e post-confluenza*

5.4 Recupero delle subpopolazioni spermatiche adese e non adese ai monostri oviduttali

Gli spermatozoi provenienti dalla centrifugazione su gradini di Percoll e dal successivo lavaggio in sperm-TALP BSA free vengono impiegati per la selezione delle subpopolazioni spermatiche degli unbound e dei released.

A tale scopo, si procede all'inseminazione dei monostrati a confluenza di cellule tubariche totali in piastre Petri da 10 cm di diametro con $2-5 \times 10^6$ spermatozoi motili/ml.

Dopo 30 minuti di interazione, mediante cambi del mezzo per sostituzione, si procede alla rimozione totale degli spermatozoi non legati ai monostrati, "unbound", che vengono posti in una provetta conica da 15 ml.

Agli spermatozoi rimasti legati alle cellule nella piastra viene aggiunto eparina 100 $\mu\text{g/ml}$ in modo da ottenere il rilascio. Per omogeneità delle condizioni sperimentali, l'eparina viene altresì aggiunto alla frazione di unbound (Fig.8).

I risultati hanno mostrato che, dopo 30 minuti di adesione, circa il 50% della popolazione motile inseminata aderisce al monostrato, mentre il restante 50% va a costituire la popolazione degli unbound.

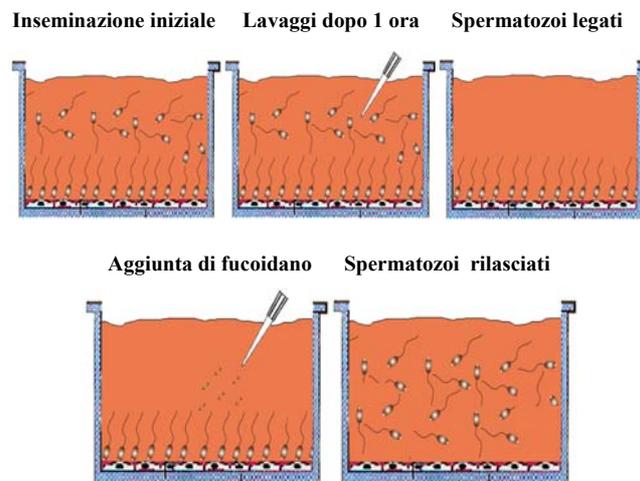


Fig.8: *Recupero delle subpopolazioni adese e non adese ai monostrati oviduttali*

5.5 Analisi delle componenti proteiche di superficie nelle subpopolazioni degli unbound e dei released

L'analisi delle proteine di membrana delle due subpopolazioni spermatiche (Unbound e Released) mediante colorazione argentina del gel, mostra che entrambe hanno lo stesso pattern proteico (Fig.9).

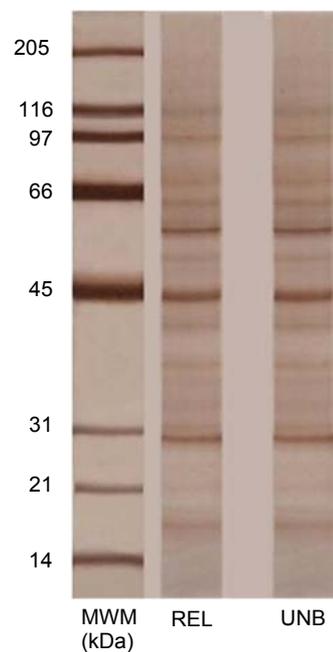


Fig.9: Confronto tra il pattern proteico di membrana degli spermatozoi rilasciati (REL) e non adesi (Unbound).

L'analisi dei blots mostra che non ci sono differenze significative nelle due subpopolazioni spermatiche; infatti, esse presentano una uguale distribuzione di bande proteiche in un range compreso tra 20 e 200 kDa.

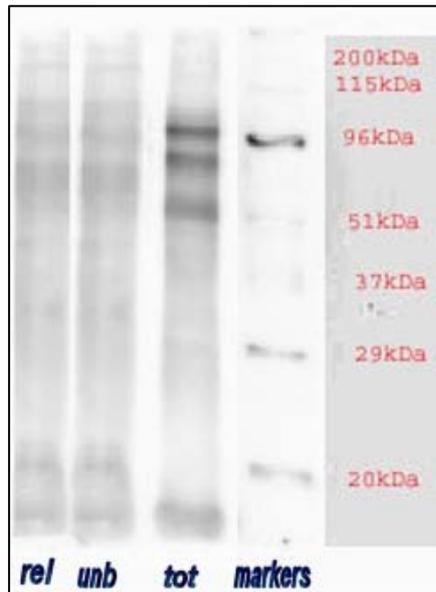


Fig.10: Confronto tra il pattern proteico di superficie degli spermatozoi rilasciati (REL) e non adesi (Unbound) mediante FCI.

Questi risultati sono confermati dall'analisi elettroforetica bidimensionale che, rispetto alla monodimensionale, mostra una distribuzione delle proteine non solo in base al peso molecolare, ma anche alla carica elettrica (Fig.11 e 12).

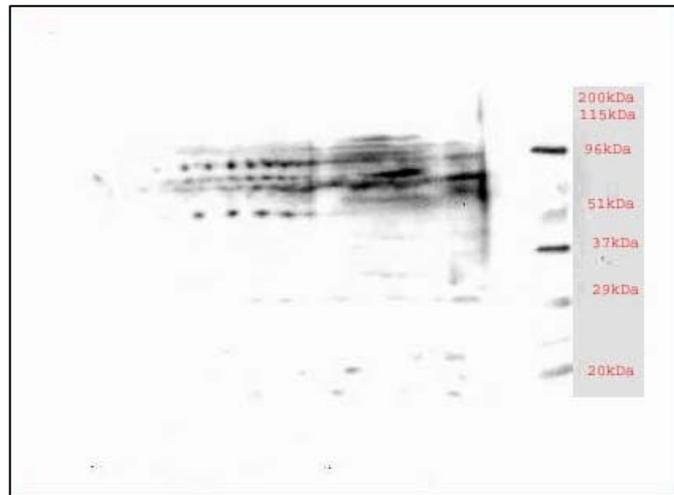


Fig.11: Pattern proteico di superficie in 2D degli spermatozoi rilasciati rivelato mediante ECL

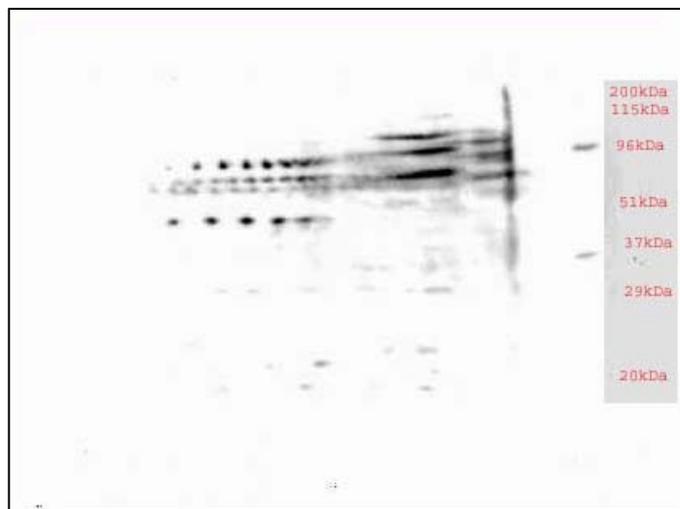


Fig.12: Pattern proteico di superficie in 2D degli spermatozoi non adesi rivelato mediante ECL

5.6 Valutazione dell'effetto dei tioli sul rilascio spermatico

Esperimento 1: Effetto degli antiossidanti tiolici

La prima serie di esperimenti è stata progettata per studiare l'effetto degli antiossidanti tiolici D-penicillamina, DL-penicillamina, beta mercaptoetanolo e cisteina sul rilascio degli spermatozoi adesi ai monostrati oviduttali.

I risultati hanno evidenziato che tutti gli agenti, sia a 0.1 mM che a 1 mM, sono capaci di indurre un rilascio significativo degli spermatozoi adesi se paragonati al controllo (Fig. 13).

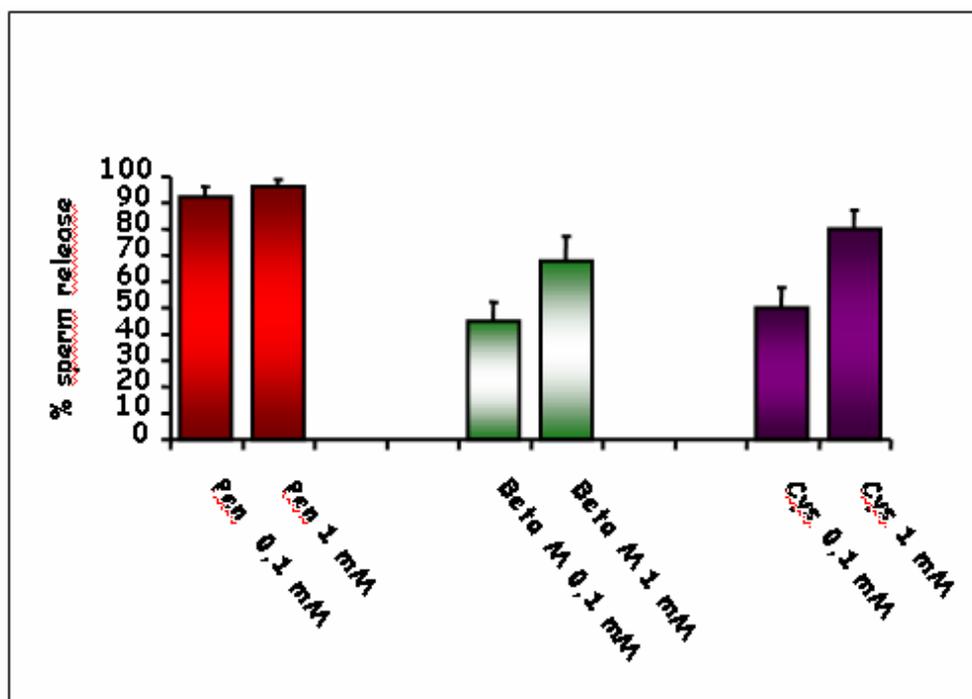


Fig.13: Effetto degli antiossidanti tiolici D-penicillamina, DL-penicillamina, beta mercaptoetanolo e cisteina sul rilascio degli spermatozoi adesi ai monostrati oviduttali. I dati sono espressi come percentuale di spermatozoi rilasciati rispetto al controllo.

Per quanto riguarda l'efficacia dei tioli testati, D- e DL- penicillamina hanno lo stesso effetto e sono i più potenti agenti di rilascio spermatico tra quelli testati. Infatti, la loro attività è massima a 0.1 mM (90% di spermatozoi rilasciati) ed è stato osservato un leggero incremento non significativo se il composto tiolico viene usato alla concentrazione di 1 mM.

Inoltre, la cisteina ha un effetto maggiore del beta mercaptoetanolo; tuttavia, entrambi i composti definiscono una percentuale di spermatozoi rilasciati maggiore se usati alla concentrazione di 1 mM.

Esperimento 2: Pre-trattamento con penicillamina delle cellule tubariche e degli spermatozoi

I risultati dell'esperimento 1 precisano che gli agenti tiolici riducenti sono potenti induttori del rilascio spermatico. Tuttavia, l'effetto del rilascio spermatico potrebbe essere esercitato direttamente sugli spermatozoi e/o sulle cellule oviduttali.

Nell'esperimento 2, gli spermatozoi o le cellule oviduttali vengono pre-trattate per 30 minuti con penicillamina 100 μ M e, dopo lavaggi, vengono co-incubati con le controparti cellulari.

In questo esperimento vengono fatti due controlli, il primo per il pre-trattamento delle cellule oviduttali, in solo sperm-TALP, e il secondo per il pre-trattamento spermatico con penicillamina 2 μ M, cioè la concentrazione residua presente nel pozzetto in seminato con spermatozoi protrattati.

L'analisi quantitativa dell'adesione spermatica (Fig.14) dimostra chiaramente che i monostrati pre-trattati non hanno effetto sull'adesione spermatica; mentre, spermatozoi pre-trattati inducono una riduzione dell'adesione spermatica paragonabile a quella osservata nell'esperimento 1.

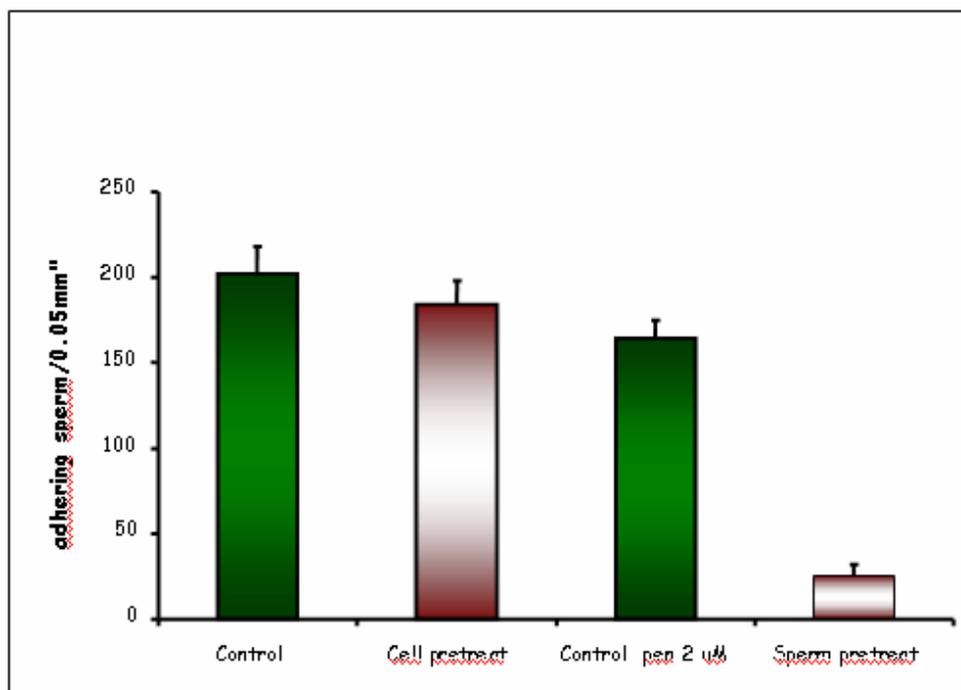


Fig.14: Effetto del pre-trattamento degli spermatozoi e del monostrato oviduttale con penicillamina 0.1 mM sull'adesione spermatica.

Esperimento 3: Effetto dei tioli non permeanti

Agenti tiolici riducenti usati nei precedenti esperimenti erano tutti permeanti. Lo scopo dell'esperimento 3 era di capire se l'azione del rilascio dei tioli sugli spermatozoi era esercitata sulle molecole intracellulari o di

superficie. A questo punto, gli spermatozoi adesi sono stati trattati con agenti tiolici riducenti permeanti e non permeanti.

I dati indicano (Fig.15) che il tiolo permeante DTT ha un effetto di rilascio quantitativamente simile alla penicillamina e, ancora più interessante, anche il tiolo non permeante GSH induce un significativo rilascio spermatico.

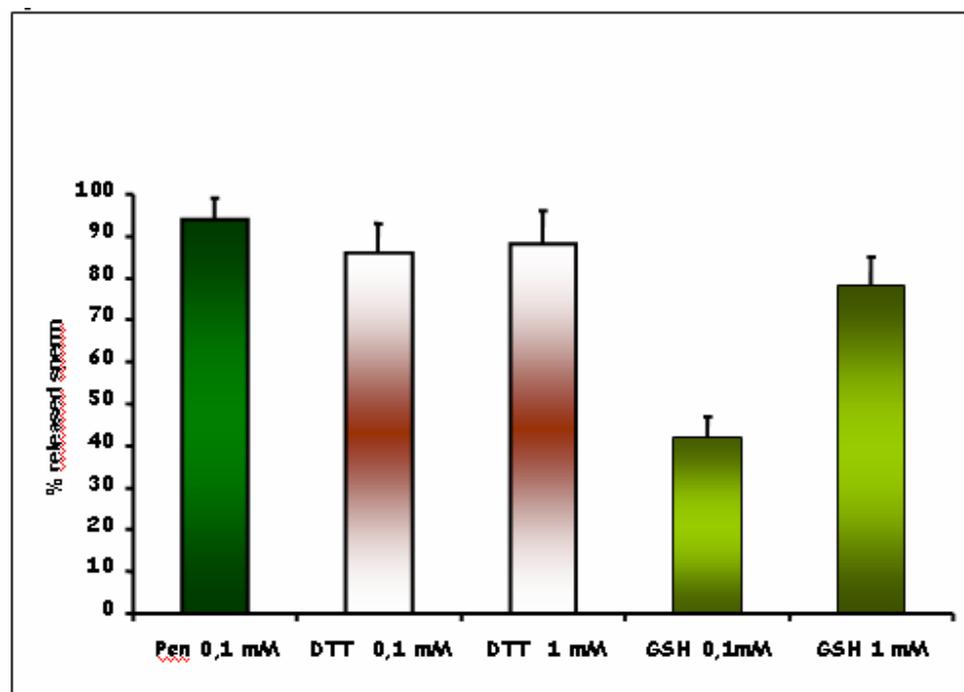


Fig.15: Effetto dei tioli permeanti (penicillamina e ditiotreitolo) e non permeanti (GSH) sul rilascio degli spermatozoi adesi ai monostrati oviduttali. I dati sono espressi come percentuale di spermatozoi rilasciati rispetto al controllo.

Esperimento 4: Effetto del glutazione ridotto

Negli esperimenti precedenti, è stato dimostrato che sia i tioli permeanti che non permeanti hanno la capacità di indurre il rilascio degli spermatozoi adesi all'epitelio tubarico in vitro.

Per capire se l'azione dei tioli era dovuta alla loro condizione ridotta, nell'esperimento 4, il glutazione ossidato (GSSG) ed il glutazione ridotto (GSH) sono stati testati per la loro capacità nel rilascio degli spermatozoi adesi.

A tale scopo, mostrati con spermatozoi adesi sono stati incubati con penicillamina 0.1 mM, GSH o GSSG a 0.1-1 mM, o in solo sperm-TALP.

I dati indicano (Fig.16) che il GSSG a 1 mM non è stato mai capace di rilasciare gli spermatozoi indicando che lo stato ridotto dei tioli è un prerequisito necessario per la loro azione sul rilascio spermatico.

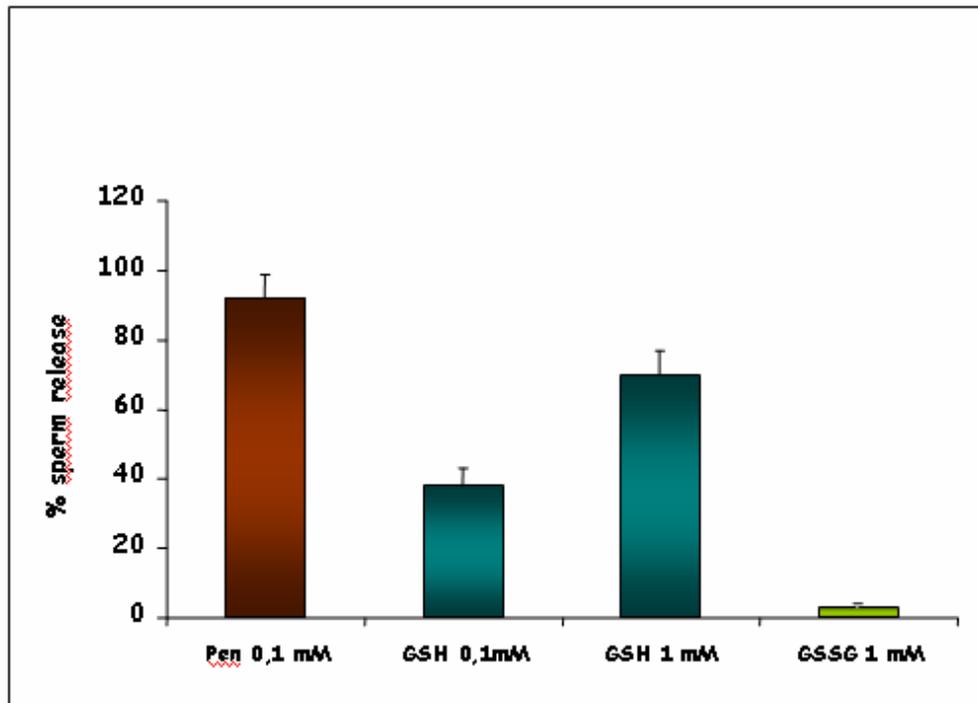


Fig.16: Effetto del glutatione ossidato (GSSG) e ridotto (GSH) sul rilascio degli spermatozoi adesi ai monostrati oviduttali. I dati sono espressi come percentuale di spermatozoi rilasciati rispetto al controllo.

Esperimento 5: Effetto degli antiossidanti non tiolici

Lo scopo dell'esperimento 5 era di capire se anche gli antiossidanti non tiolici erano capaci di indurre il rilascio degli spermatozoi adesi all'epitelio tubarico in vitro.

A tale scopo, le co-culture sono state trattate con i seguenti antiossidanti enzimatici e non enzimatici: dimetil tiourea 1 mM, trolox 0.5 mM, superossido dismutasi 2500U/ml, catalasi 120U/ml.

Parallelamente i pozzetti sono stati trattati con penicillamina 0.1 mM come controllo per il rilascio spermatico.

I dati dimostrano (Fig.17) che solo la catalasi ha un leggero ma non significativo effetto sul rilascio spermatico.

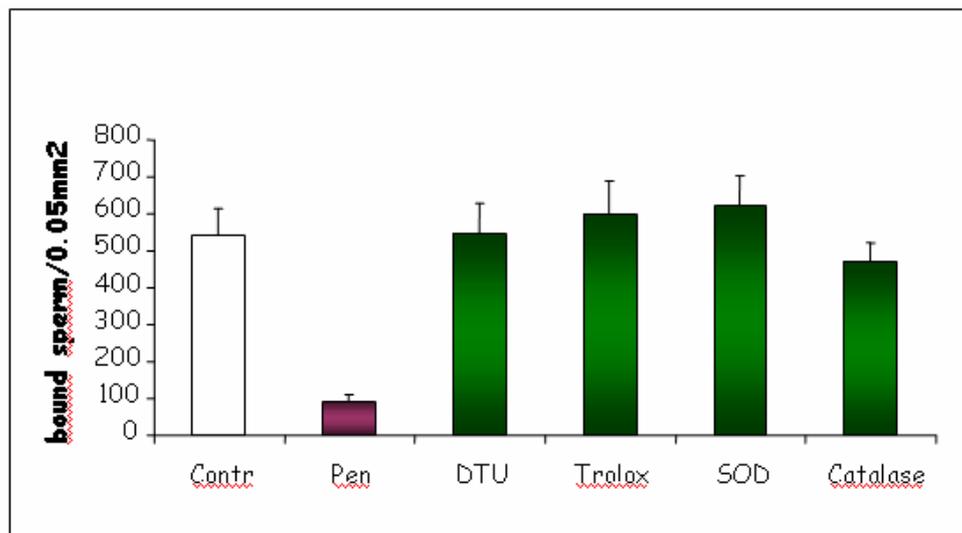


Fig.17: Effetto degli antiossidanti non tiolici dimetil tiourea (DTU), trolox, superossido dismutasi (SOD) e catalasi sul rilascio degli spermatozoi adesi ai monostrati oviduttali. I dati sono espressi come percentuale di spermatozoi rilasciati rispetto al controllo.

Analisi della localizzazione e caratterizzazione dei siti sulfidrilici a livello della superficie spermatica

Lo studio dei patterns di distribuzione dei sulfidrilici sulla superficie spermatica nella sospensione iniziale, nelle subpopolazioni dei non adesi, negli adesi dopo 1 ora di co-coltura e dei rilasciati dopo 30 minuti di trattamento con penicillamina 0.1 mM è stato condotto mediante marcatura *in vivo* con IAF. Dopo il trattamento, gli spermatozoi sono stati lavati con sperm-TALP fresco ed osservati al microscopio a fluorescenza.

Gli spermatozoi sottoposti al trattamento per la localizzazione dei sulfidrilici di superficie esibiscono quattro patterns di marcatura (Fig.18): totale assenza di marcatura (UNL); marcatura omogenea della testa, marcatura del tratto intermedio e parte della coda (H); marcatura della regione post-acrosomiale e della coda (PA); marcatura della porzione terminale o di tutta la coda (T).

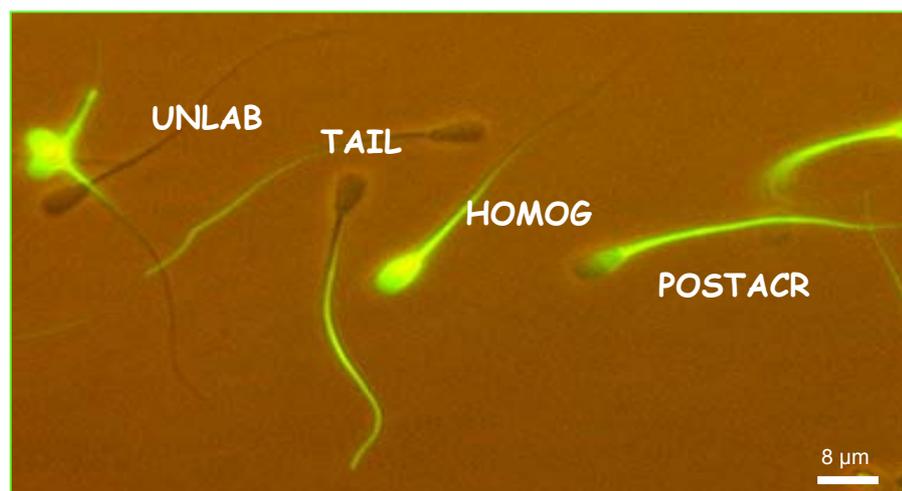


Fig.18: Marcatura IAF *in vivo* dei sulfidrilici di superficie spermatica. La micrografia mostra i quattro patterns osservati nella popolazione spermatica iniziale. UNL, assenza di marcatura; H, marcatura omogenea della testa, tratto intermedio e parte della coda; PA, marcatura della regione post-acrosomiale; T, marcatura della porzione terminale o di tutta la coda.

Come si evince dal grafico (Fig.19), circa il 55% degli spermatozoi della sospensione iniziale non è marcato; un'elevata percentuale di spermatozoi adesi (85%) dopo 1 ora di co-coltura non è marcata (Fig.20), dimostrando che l'adesione seleziona spermatozoi privi di sulfidrilici di superficie; al contrario, la maggior parte (circa 82%) degli spermatozoi non legati (unbound) si presenta marcata; infine, la percentuale di spermatozoi marcati aumenta dopo il rilascio mediante antiossidanti tiolici, anche se non significativamente (adesi $16 \pm 3\%$ e released $28 \pm 4\%$).

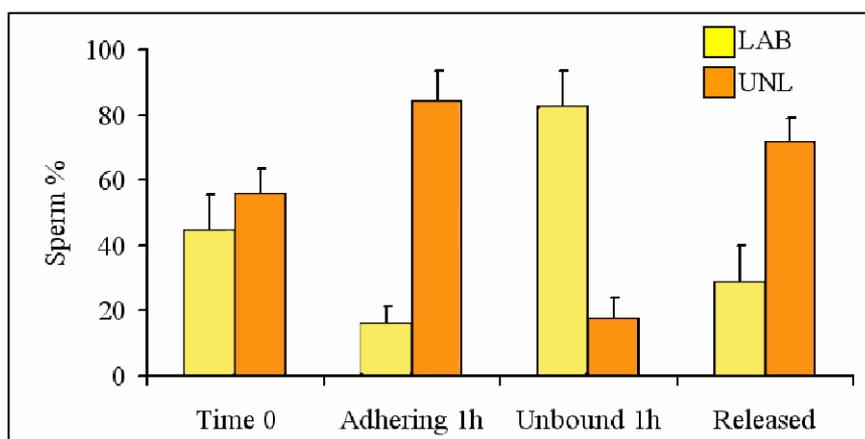


Fig 19: Percentuale di spermatozoi marcati e non marcati nella sospensione iniziale e nelle subpopolazioni spermatiche degli adesi, non adesi e rilasciati.

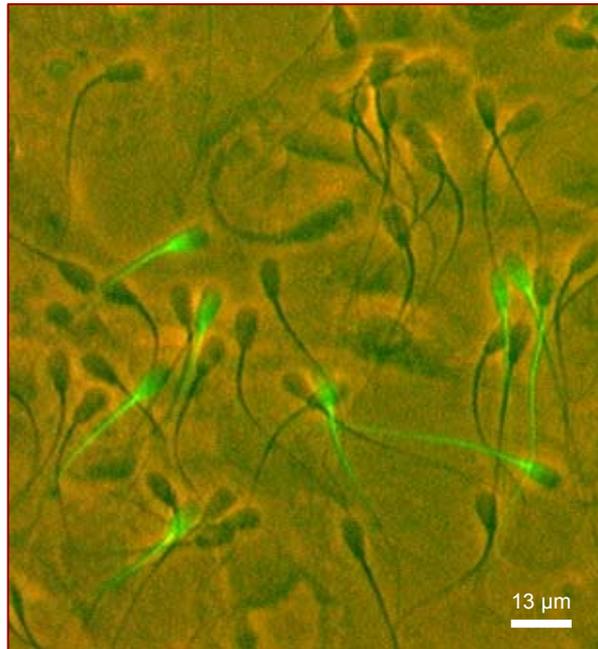


Fig.20: *Micrografia luce-fluorescenza della marcatura IAF dei sulfidrilici di superficie negli spermatozoi adesi ai monostrati oviduttali ad 1 ora dalla co-coltura. I pochi spermatozoi marcati hanno un pattern PA o T.*

Un dato interessante del pattern di distribuzione nelle 4 popolazioni esaminate (Fig.21) è che, gli spermatozoi adesi marcati espongono sulfidrilici di superficie solo a livello della regione post-acrosomiale (si veda anche Fig.8 lavoro); mentre dopo il rilascio una quota di spermatozoi presenta un pattern di marcatura omogeneo.

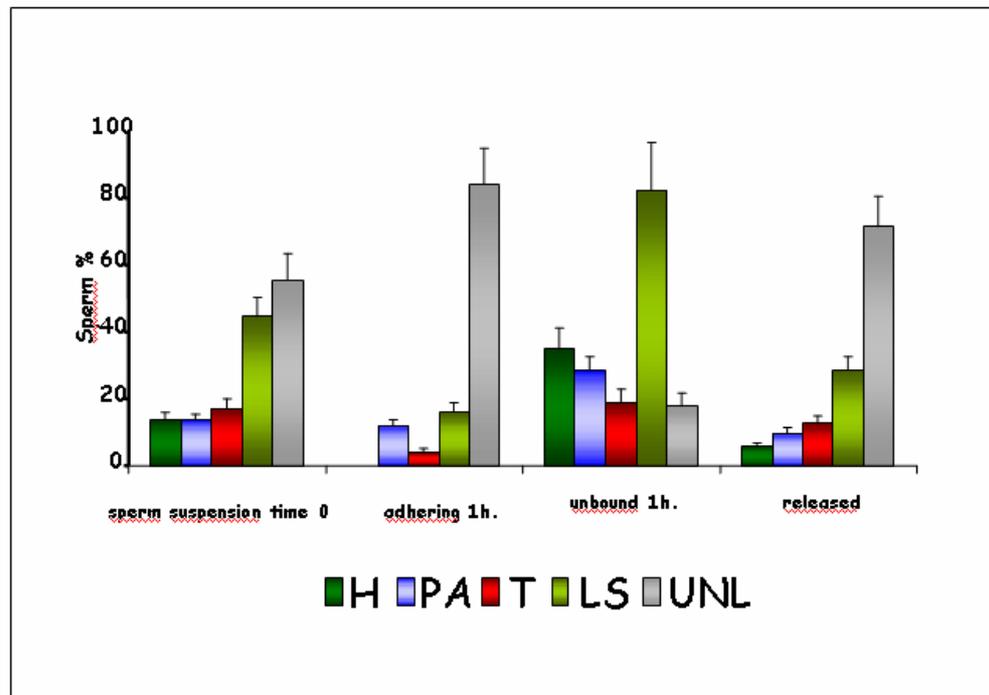


Fig.21: Patterns IAF dei sulfidri di superficie spermatica nella sospensione iniziale e nelle subpopolazioni spermatiche degli adesi, non adesi e rilasciati.

Per identificare le proteine di superficie dello spermatozoo che espongono sulfidri quando, adesi a monostrati oviduttali, vengono rilasciati mediante addizione di tioli, viene impiegata una marcatura con un reattivo non permeante specifico per sulfidri, il 3-(N-Maleimidylpropionyl) Biocitina, seguita da un'analisi biochimica.

Gli esperimenti sono stati condotti sulle stesse subpopolazioni spermatiche: su cui è stata eseguita la marcatura con IAF.

Per raggiungere lo scopo prefissato, sono stati preparati due gels, uno per la colorazione argintica che mette in evidenza le proteine di membrana di ciascuna popolazione spermatica e l'altro destinato al Western Blotting per l'analisi delle proteine di superficie.

La colorazione del gel con Argintica (Fig.22) mette in evidenza che tutti i campioni hanno lo stesso pattern.

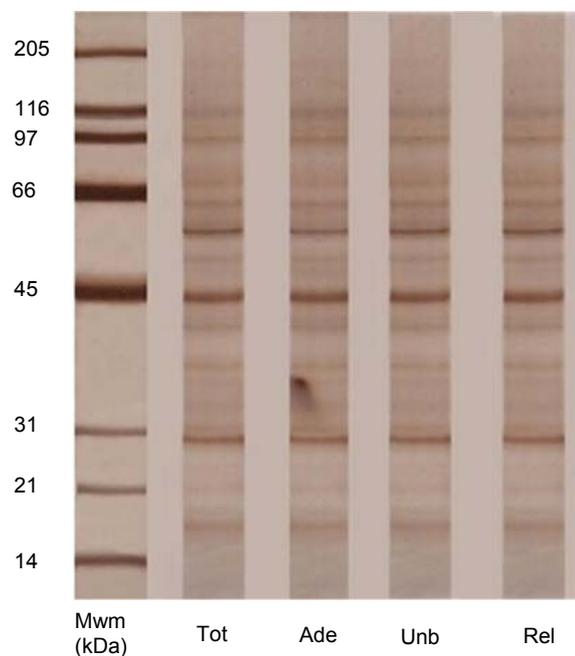


Fig.22: *Confronto tra il pattern proteico di membrana negli spermatozoi della sospensione iniziale e nelle subpopolazioni degli adesi, non adesi e rilasciati.*

Dall'analisi dei blots (Fig.23) risultano essere particolarmente interessanti le lanes corrispondenti agli Adesi e ai Released.

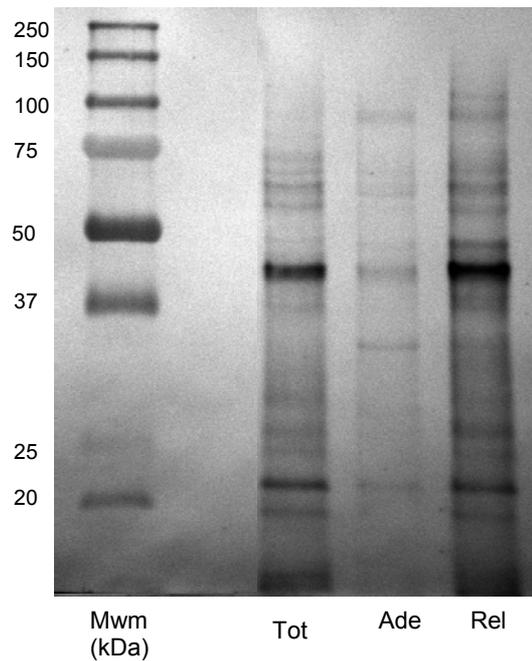


Fig.23: *Confronto tra il pattern di marcatura dei sulfidrilici negli spermatozoi della sospensione iniziale e nelle subpopolazioni degli adesi e dei rilasciati.*

Come si può notare, il pattern proteico di marcatura dei sulfidrilici aumenta dopo il rilascio indotto da penicillamina; infatti, mentre la popolazione degli Adesi presenta poche bande visibili sul filtro per altro scarsamente marcate, le bande sono in numero maggiore e particolarmente marcate nei Realeased.

Inoltre, alcune proteine di peso molecolare corrispondenti a 90, 73, 66, 59, 45 e 23 KDa sono leggermente visibili e quindi presentano sulfidrilici già a livello della subpopolazione di spermatozoi adesi, ma la loro intensità

risulta marcatamente aumentata dopo rilascio indotto da tioli. Altre proteine, di 20, 31 e 120 KDa, sono visibili unicamente dopo rilascio.

In generale, quindi, tutte queste proteine vengono ridotte durante il rilascio indotto da tioli; una sola proteina di circa 35 KDa mostra, invece, un andamento inverso risultando ridotta negli adesi e ossidata dopo rilascio. Questo può essere spiegato se si considera che le reazioni di ossidoriduzione sono reversibili, per cui durante alcuni processi cellulari, ed in particolare ad esempio durante la capacitazione in spermatozoi umani, alcune proteine vengono ridotte mentre altre risultano ossidate.

6 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I principali risultati che sono stati ottenuti durante il lavoro di tesi sono stati la dimostrazione che agenti riducenti tiolici permeanti e non permeanti sono in grado di rilasciare gli spermatozoi aderenti all'epitelio tubarico in vitro attraverso la modulazione redox di proteine esposte sulla superficie degli spermatozoi. Questa è la prima evidenza che questa particolare classe di antiossidanti, la cui presenza nel fluido oviduttale è stata riportata in differenti specie (31,26,32,33) possa rappresentare un segnale fisiologico che induce il rilascio di spermatozoi precedentemente selezionati dall'epitelio tubarico. Inoltre la dimostrazione che il GSH, un tiolo impermeante (34) fisiologicamente presente nel fluido oviduttale bovino e la cui concentrazione picca all'ovulazione (26) è in grado di indurre il rilascio degli spermatozoi, indica che il rilascio procede attraverso una riduzione dei disolfidi di superficie in sulfidrili.

Durante il mio lavoro di tesi, il primo approccio sperimentali per lo studio delle molecole e dei meccanismi coinvolti nell'interazione spermatozoo-ovidutto è stato quello di studiare il pattern proteico di superficie delle cellule tubariche coltivate in monostrati in due condizioni di coltura differenti, poiché inizialmente era stato ipotizzato che l'incapacità di alcune cellule di legare gli spermatozoi e l'incapacità di alcuni spermatozoi di legarsi all'epitelio tubarico era da attribuirsi all'assenza, in entrambi i tipi cellulari, di una o più proteine responsabili

direttamente o indirettamente del legame. A questo scopo sono state analizzate le proteine di superficie delle cellule oviduttali la cui confluenza era raggiunta in 7 giorni e che rappresentano lo stadio di coltura in cui si ha il massimo legame e mostrati a post confluenza a 14 giorni stadio in cui il legame con gli spermatozoi si riduce al minimo. Inoltre l'analisi delle proteine di superficie è stato condotto sia delle subpopolazioni spermatiche selezionate (Released) e non (Unbound) dall'adesione all'epitelio tubarico allo scopo di restringere il campo alle sole proteine implicate nell'interazione.

Sia sulle cellule tubariche (a confluenza e post-confluenza) che sulle subpopolazioni spermatiche (released ed unbound) è stata eseguita una analisi delle componenti proteiche di membrana poiché inizialmente era stato ipotizzato che l'incapacità di alcune cellule di legare gli spermatozoi e l'incapacità di alcuni spermatozoi di legarsi all'epitelio tubarico era da attribuirsi all'assenza, in entrambi i tipi cellulari, di una o più proteine responsabili direttamente o indirettamente del legame.

Seguendo tale ragionamento, l'epitelio con ridotta affinità di legame per gli spermatozoi e la subpopolazione degli unbound dovevano deficiare di proteine invece presenti nelle controparti con alta affinità di legame; tale ipotesi è stata smentita attraverso l'analisi dei gels trattati per la colorazione argintina che mette in evidenza le proteine di membrana, infatti dall'analisi si evince che sia i mostrati nelle due condizioni di coltura che le due

subpopolazioni spermatiche presentano lo stesso pattern proteico di membrana.

Per quanto riguarda l'analisi delle proteine di superficie, le cellule tubariche a confluenza e post-confluenza presentano lo stesso pattern proteico; dunque, i risultati ottenuti inducono a pensare che la differente affinità dei monostrati, nelle due condizioni di coltura, nel legare gli spermatozoi non è dovuta ad un cambiamento nel pattern proteico di superficie, ma molto probabilmente ad un cambiamento del meccanismo di selezione spermatica del monostrato post-confluente che, per tale motivo, lega un minor numero di spermatozoi.

Anche l'analisi del pattern proteico di superficie delle subpopolazioni degli spermatozoi "released" ed "unbound" non ha prodotto risultati significativi, per cui si può ipotizzare che la subpopolazione degli unbound potrebbe non essere "pronta" per interagire con le cellule dell'ovidutto a causa di una particolare conformazione delle proteine implicate in questo meccanismo.

Tale ipotesi è stata confermata successivamente con l'utilizzo di antiossidanti tiolici che ha messo in evidenza che l'adesione ed il rilascio degli spermatozoi all'epitelio tubarico è influenzato dallo stato redox di proteine di superficie implicate direttamente o indirettamente nel legame.

I principali risultati hanno dimostrato che gli antiossidanti tiolici permeanti ed impermeanti sono capaci di indurre il rilascio degli

spermatozoi adesi all'epitelio tubarico *in vitro*. Questa è la prima evidenza che questa particolare classe di antiossidanti, la cui presenza nel fluido oviduttale è stata riportata in differenti specie (Gardiner et al., 1998; Lapointe and Bilodeau, 2003; Breque et al., 2003; Salme net al., 2005), possa rappresentare un segnale fisiologico che induce il distacco degli spermatozoi selezionati ed immagazzinati almeno nella specie bovina.

Dal momento che il pre-trattamento con antiossidanti tiolici degli spermatozoi e non dei monostrati oviduttali ha ridotto notevolmente l'adesione cellula-cellula, la loro azione è espressa direttamente sugli spermatozoi.

Inoltre, il GSH, un tiolo impermeante (Meister and Anderson, 1983) presente fisiologicamente nel fluido oviduttale bovino, la cui concentrazione picca all'ovulazione (Lapointe and Bilodeau, 2003), è anch'esso capace di indurre il rilascio spermatico, indicando così che il rilascio spermatico indotto da tioli può procedere attraverso la riduzione dei disolfuri di superficie spermatica in sulfidrili.

La mancanza di effetto di dimetilurea, trolox, superossido dismutasi e catalasi sul rilascio spermatico, indica che questo processo richiede la riduzione dei disolfuri di superficie spermatica, mentre altri antiossidanti non tiolici enzimatici e non enzimatici, presenti fisiologicamente nel fluido oviduttale (Lapointe and Bilodeau, 2003; Guerin et al., 2001), possono

contribuire a mantenere un corretto bilancio tra ossidanti ed antiossidanti per proteggere i gameti e gli embrioni.

Sebbene la capacitazione sia considerato un processo ossidativo, nell'uomo è stato associato ad un marcato incremento tempo dipendente dei gruppi sulfidrilici sulla membrana spermatica esposti nello spazio extracellulare (de Lamirande and Gagnon, 2003).

Per quanto riguarda gli spermatozoi bovini, è stato dimostrato che la crioconservazione induce una capacitazione prematura (Cormier et al., 1997) che è accompagnata anche da un incremento marcato di sulfidrili di proteine di superficie che può essere prevenuto sia da GSH che da GSSG (Chatterjee et al., 2001).

Comunque, sotto le condizioni sperimentali usate, il trattamento delle co-culture con GSSG non ha indotto il rilascio degli spermatozoi adesi confermando ancora l'ipotesi che il GSH agisce attraverso la riduzione dei disolfuri di superficie spermatica a sulfidrili.

Per capire se il rilascio spermatico indotto dai tioli era dovuto alla riduzione dei disolfuri di superficie spermatica a sulfidrili, la sospensione spermatica iniziale, le subpopolazioni di spermatozoi adesi e non adesi, così come gli spermatozoi rilasciati da penicillamina sono stati trattati con il reagente impermeante che marca i gruppi sulfidrilici, iodoacetamide fluorescinata. I risultati dimostrano che la sospensione spermatica iniziale è composta sia da spermatozoi privi di sulfidrili di superficie sia da quelli che

espongono sulfidrilici a livello di differenti domini di superficie (Chatterjee et al., 2001).

Particolarmente interessante è stato notare che, l'adesione all'epitelio tubarico seleziona pochi spermatozoi non marcati dalla sospensione iniziale e sugli spermatozoi adesi non sono stati mai evidenziati sulfidrilici sulla regione rostrale degli spermatozoi, cioè la regione coinvolta nel legame con l'epitelio tubarico (Gualtieri and Talevi, 2000).

La subpopolazione spermatica non capace di aderire è composta principalmente da spermatozoi che espongono sulfidrilici mentre la percentuale di spermatozoi marcati dopo rilascio indotto da tioli, aumenta sebbene non significativamente paragonata agli spermatozoi adesi.

In generale, i risultati dimostrano che 1) l'adesione seleziona spermatozoi che non espongono sulfidrilici sulla loro superficie, 2) gli spermatozoi adesi sono mantenuti in questa condizione mentre 3) il rilascio indotto da tioli procede attraverso la riduzione dei disolfuri di superficie spermatica.

La mancanza dell'incremento di marcatura IAF nella maggior parte degli spermatozoi rilasciati può indicare che solo alcune o poche proteine di superficie spermatica sono responsabili per la modulazione redox dell'adesione transiente spermatozoo-ovidutto; tale ipotesi è stata confermata mediante metodi biochimici che hanno permesso di restringere

il campo delle proteine implicate nel legame a quelle che subiscono una riduzione in seguito all'induzione del rilascio.

Recentemente, è emerso che modificazioni redox reversibili possono essere responsabili di meccanismi fisiologici per la modulazione post-transizionale delle funzioni proteiche. Infatti, l'ossidazione-solfidril-disolfuri gioca un ruolo chiave nella regolazione redox dei segnali cellulari e nell'espressione genica (Barford, 2004).

Anche se l'attenzione è stata focalizzata principalmente sulla regolazione redox di molecole intracellulari, alcuni lavori indicano che i tioli di superficie sono implicati anche nella modulazione delle proteine di adesione (Gallina et al., 2002; Essex, 2004).

Perciò, la modulazione redox del rilascio spermatico dall'epitelio tubarico può essere indotta dalla riduzione di specifiche proteine di superficie spermatica direttamente o indirettamente coinvolte nell'adesione.

Dati in letteratura individuano, come responsabili dell'interazione spermatozoo-ovidutto nella specie bovina, una classe di proteine (Heparin-Binding Proteins) secrete dalle vescichette seminali che si associano alla membrana plasmatica degli spermatozoi epididimali dopo l'eiaculazione (Desnoyers and Manjunath, 1992; Muller et al., 1998). La PDC-109 è la principale rappresentante di questa classe di proteine e sembra essere implicata nell'abilitazione degli spermatozoi a legare l'epitelio oviduttale

favorendo la formazione della riserva spermatica nell'ovidutto bovino (Suarez, 2002).

La PDC-109 ha una elevata affinità di legame per l'eparina (Manjunath and Sairam, 1987) tanto che, se gli spermatozoi eiaculati vengono pre-trattati con questa molecola prima di inseminare monostrati oviduttali *in vitro*, essa viene gradualmente rimossa dalla membrana plasmatica dagli spermatozoi che perdono la capacità di adesione (Gwathmey et al., 2003).

Da quanto detto si evince che, l'eparina è in grado di regolare l'adesione ed il rilascio spermatico nell'ovidutto modulando la presenza/assenza della PDC-109 sulla superficie spermatica. Tale affermazione viene confermata considerando che l'eparina è una delle molecole presenti nel fluido oviduttale che picca al momento dell'ovulazione, cioè quando gli spermatozoi immagazzinati nella regione istmica dell'ovidutto si rilasciano per dirigersi verso l'ampolla, sito naturale della fecondazione.

Dal momento che anche gli antiossidanti tiolici hanno lo stesso andamento dell'eparina, si può ipotizzare che il meccanismo proposto di adesione e rilascio, in relazione allo stato redox delle proteine di superficie spermatica, non sia alternativo a quello eparina-dipendente, ma insieme concorrano per assicurare la selezione degli spermatozoi "migliori" per la fecondazione e lo sviluppo embrionale.

Abe H, Numazowa C, Abe M, Onoderam M, Katsumi A. Immunocytochemical localization of oviduct-specific glycoproteins in the oviductal epithelium from cows at follicular and luteal phase. *Cell Tissue Res* 1993; 274: 41-47.

Abe H, Sendai Y, Satho T, Hoshi H. Bovine oviduct-specific glycoprotein: a potent factor for maintenance of viability and motility of bovine spermatozoa *in vitro*. *Mol Reprod Dev* 1995; 42: 226-232.

Aitken L, Gallagher R, Madronio C. Principles of recruitment and retention in clinical trials. *Int J Nurs Pract.* 2003 Dec;9(6):338-46. Review.

Aitken RJ, Baker MA. Oxidative stress and male reproductive biology. *Reprod Fertil Dev.* 2004;16(5):581-8.

Asch HL, Head K, Dong Y, Natoli F, Winston JS, Connolly JL, Asch BB. Widespread loss of gelsolin in breast cancers of humans, mice, and rats. *Cancer Res.* 1996 Nov 1;56(21):4841-5.

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

Baillie HS, Pacey AA, Warren MA, Scudamore IW, Barrat CLR. Greater numbers of human spermatozoa associate with endosalpingeal cells derived from the isthmus compared with those from the ampolla. *Hum Reprod* 1997; 12: 1985-1992.

Baker MA, Aitken RJ. Reactive oxygen species in spermatozoa: methods for monitoring and significance for the origins of genetic disease and infertility. *Reprod Biol Endocrinol* 2005; 3: 67-76.

Barford D. The role of cysteine residues as redox-sensitive regulatory switches. *Curr Opin Struct Biol* 2004; 14:679-686.

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

Benoff S. Voltage dependent calcium channels in mammalian spermatozoa. *Front Biosci.* 1998 Dec 1;3:D1220-40. Review.

Bielfeld P., Jeyendran R.S., Zanaveld L.J.D., 1991. Human spermatozoa do not undergo the acrosome reaction during storage in the cervix. *Int J Fertil*, 36: 302-306.

Bleil JD, Wassarman PM. Mammalian sperm egg interaction: identification of glycoprotein in mouse egg zonae pellucidae possessing receptor activity for sperm. *Cell* 1980; 20: 873-882.

Bleil JD, Wassarman PM. Sperm-egg interactions in the mouse: sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein. *Dev Biol* 1983; 95: 317-324.

Bleil JD, Wassarman PM. Sperm-egg interactions in the mouse: sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein. *Dev Biol.* 1983 Feb;95(2):317-24.

Bongso A, Fong, CY, Ng SC., et al. 1994 Human embryonic behavior in a sequential human oviduct-endometrial coculture system. *Fertil Steril.* 61:976–978.

Breque C, Surai P, Brillard JP. Roles of antioxidants on prolonged storage of avian spermatozoa in vivo and in vitro. *Mol Reprod Dev.* 2003;66:314-323.

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

Chang MC. Fertilization capacity of spermatozoa deposited in the fallopian tubes. *Nature* 1951; 168: 997-998.

Chatterjee S., de Lamirande E., Gagnon C. Cryopreservation alters membrane sulfhydryl status of bull spermatozoa: prevention by oxidized glutathione. *Mol. Reprod. Dev.* 2001; 60:498-506.

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

Chian RC, Sirard MA. Fertilizing ability of bovine spermatozoa cocultured with oviduct epithelial cells. *Biol Reprod* 1995; 52: 156-162.

Cormier N., Sirard M.A., Bailey J.L. Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. *J.Androl.* 1997; 18:461-468.

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

de Lamirande E and Gagnon C. Redox control of changes in protein sulfhydryl levels during human sperm capacitation. *Free Radic Biol Med.* 2003;35:1271-1285.

de Lamirande E., Leclerc P., Gagnon C. Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction. *Mol. Hum. Reprod.* 1997; 3:175-194.

De Mott RP, Lefebvre R, Suarez SS. Carbohydrate mediate the adherence of hamster sperm to oviductal epithelium. *Biol Reprod* 1995; 52: 1395-11403.

Demott R.P. and Suarez S.S., 1992. Hyperactivated sperm progress in the mouse oviduct. *Biol Reprod*, 46: 779-785.

Desnoyers L and Manjunath P. Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipids. *J Biol Chem* 1992; 267: 10149-10155.

Dobrinski I, Igotz GG, Thomas PGA, Ball BA. Role of carbohydrates in the attachment of equine spermatozoa to uterine tubal (oviductal) epithelial cells *in vitro*. *Am J Vet Res* 1996; 57: 1635-1639.

Dobrinski I, Smith TT, Suarez SS, Ball BA. Membrane contact with oviductal epithelium modulates the intracellular calcium concentration of equine spermatozoa *in vitro*. Biol Reprod 1997; 56: 861-869.

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

Dunbar. Characterization of porcine zona pellucida antigens. Biol Reprod. 1980;22(4):941-54.

Edwards RG, Bavister BD, Steptoe PC (1969). Early stages of human fertilization *in vitro* of human oocytes matured *in vitro*. Nature 221: 632–635.

Edwards RG, Donahue RP, Baramki TA, Jones HW Jr (1966). Preliminary attempts to fertilize human oocytes matured *in vitro*. Am J Obstet Gynecol 96: 192-200.

Ellington JE, Ball BA, Blue BJ, Wilker CE. Capacitation-like membrane changes and prolonged viability *in vitro* of equine spermatozoa cultured with uterine tube epithelial cells. Am J Vet Res 1993; 54: 1505-1510.

Ellington JE, Ball BA, Yang X. Binding of stallion spermatozoa to the equine zona pellucida after cocultura with oviductal epithelial cells. *J. Reprod Fertil* 1993; 98: 203-208.

Ellington JE, Evenson DP, Fleming JE, Brisbois RS, Hiss GA, Broder SJ, et al. (1998). Coculture of human sperm with bovine oviduct epithelial cells decreases sperm chromatin structural changes seen during culture in media alone. *Fertil Steril* 69:643–649.

Ellington JE, Padilla AW, Vrendenburgh WL, Dougherty EP, Foote RH. Behavior of bull spermatozoa in bovine uterine tube epithelial cell cocultura: an *in vitro* model for study the cell interactions of reproduction. *Theriogenology* 1991; 35: 977-989. *Endocr. Rev.*; 5: 525-551.

Emiliozzi C, Fenichel P. Protein tyrosine phosphorylation is associated with capacitation of human sperm *in vitro* but is not sufficient for its completion. *Biol Reprod.* 1997 Mar;56(3):674-9.

ESHRE Capri Workshop Group (2001). Social determinants of human reproduction *Hum Repr* 16: 1518-1526.

ESHRE Capri Workshop Group (2005). Fertility and ageing. *Hum Repr Update* 11: 261-276.

Essex DW. The role of thiols and disulfides in platelet function. *Antioxid Redox Signal*. 2004; 6:736-746.

Fazeli A, Duncan AE, Watson PF, Holt WV. Sperm-oviduct interaction: induction of capacitation and preferential binding of uncapacitated spermatozoa to oviductal epithelial cells in porcine species. *Biol Reprod*. 1999;60:879-886.

Figa-Talamanca I, Traina ME, Urbani E (2001). Occupational exposures to metals, solvents and pesticides: recent evidence on male reproductive effects and biological markers. *Occup Med (Lond)* 51:174-188.

Flesch FM, Colenbrander B, van Golde LM, Gadella BM. Capacitation induces tyrosine phosphorylation of proteins in the boar sperm plasma membrane. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 Sep 7;262(3):787-92.

Fujii J, Iuchi Y, Okada F. Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system. *Reprod Biol Endocrinol*. 2005;3: 43-53.

Fusi FM, Lorenzetti I, Vignali M, Bronson RA. Sperm surface proteins after capacitation. Expression of vitronectin on the spermatozoan head and laminin on the sperm tail. *J Androl* 1992; Nov-Dec;13(6):488-97.

Gadella TW Jr, Jovin TM. Oligomerization of epidermal growth factor receptors on A431 cells studied by time-resolved fluorescence imaging microscopy. A stereochemical model for tyrosine kinase receptor activation. *J Cell Biol.* 1995 Jun;129(6):1543-58.

Gallina A, Hanley TM, Mandel R, Trahey M, Broder CC, Viglianti GA, Ryser HJ. Inhibitors of protein-disulfide isomerase prevent cleavage of disulfide bonds in receptor-bound glycoprotein 120 and prevent HIV-1 entry. *J Biol Chem.*2002;277:50579-50588.

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

Grippio AA, Way AL, Killian GJ. Effect of bovine ampullary and isthmic oviductal fluid on motility, acrosoma reaction and fertility of bull spermatozoa. *J. Reprod Fert* 1995; 105: 57-64.

Gualtieri R and Talevi R Selection of highly fertilization-competent bovine spermatozoa through adhesion to the Fallopian tube epithelium in vitro. *Reproduction* 2003; 125: 251-258.

Gualtieri R and Talevi R. *In vitro*-cultured bovine oviductal cells bind acrosome-intact sperm and retain this ability upon sperm release. *Biology of reproduction* 2000; 62: 1754-1762.

Gualtieri R, Boni R, Tosti E, Zagami M, Talevi R. Intracellular calcium and protein tyrosine phosphorylation during the release of bovine sperm adhering to the fallopian tube epithelium in vitro. *Reproduction* 2005;129:51-60.

Gualtieri R, Castaldo M and Talevi R (2005). Male infertility: Insights from basic research. In: *Human Reproduction, 12th World Congress, Venice, March 10-13*. Genazzani, Schenker, Artini, Simoncini eds. vol. 1, pp. 588-593.

Guerin P, El Moutassim 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.

Gutierrez A, Garde J, Garcia-Artiga C, Vazquez I. Ram spermatozoa cocultured with epithelial cell monolayers: an *in vitro* model for the study of capacitation and the acrosome reaction. *Mol Reprod* 1993; 36: 338-345.

Gwathmey Tan Ya M, Ignatz George G., Suarez Susan S. PDC-109 (BSP-A1/A2) promotes bull sperm binding to oviductal epithelium in vitro and may be involved in forming the oviductal sperm reservoir. *Biology of Reproduction* 2003; 69: 809-815.

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

Harper MJK. Stimulation of sperm movement from the isthmus to the site of fertilization in the rabbit oviduct. *Biol Reprod* 1973; 8: 369-377.

Harrison RA, Ashworth PJ, Miller NG. Bicarbonate/CO₂, an effector of capacitation, induces a rapid and reversible change in the lipid architecture of boar sperm plasma membranes. *Mol Reprod Dev.* 1996 Nov;45(3):378-91.

Harvey MB, Arcellana-Panlilio MY, Zhang X, Schultz GA, Watson AJ.

Expression of genes encoding antioxidant enzymes in preimplantation mouse and cow embryos and primary bovine oviduct cultures employed for embryo coculture. *Biol Reprod* 1995;53: 532-540.

Henkel RR, Schill WB (2003). Sperm preparation for ART. *Reprod Biol*

Endocrinol 14: 108-130.

Holt W.V. The sperm plasma membrane. In Fénichell P. and Parinaud J.

(eds). *Human sperm acrosome reaction*; 1995, 236: 1-16.

Hoshi K, Aita T, Yanagida K, Yoshimatsu N, Sato A. Variation in the

cholesterol/phospholipid ratio in human spermatozoa and its relationship with capacitation. *Hum Reprod* 1990; Jan;5(1):71-4.

Hoshi K, Katayose H, Yanagida K, Kimura Y, Sato A. The relationship

between acridine orange fluorescence of sperm nuclei and the fertilizing ability of human sperm. *Fertil Steril.* 1996 Oct;66(4):634-9.

Hunter et al. Norepinephrine uptake in canine saphenous veins in the

presence and absence of halothane. *Anesth Analg.* 1986;65(4):360-4.

Hunter HRF, Hall JP. Capacitation of boar spermatozoa: the influence of post-coital separation of the uterus and Fallopian tubes. *Anat Rec* 1974; 180: 597-604.

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

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

Hunter RH, Nichol R, Crabtree SM.. Transport of spermatozoa in the ewe: timing of the establishment of a functional population in the oviduct. *Reprod Nutr Dev.* 1980;20:1869-1875.

Hunter RH. Low incidence of fertilisation in superovulated cows: a physiological explanation. *Vet Rec.* 1988 Oct 22;123(17):443.

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

Hunter RHF, Flechon B, Flecon JF. Distribution, morphology and epithelial interaction of bovine spermatozoa in the oviduct before and after ovulation: a scanning electron microscope study. *Tissue & Cell* 1991; 23: 641-656.

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

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

Hunter RHF, Wilmut L. Sperm transport in the cow: periovulatory redistribution of viable cells within the oviduct. *Reprod Nutr Dev* 1984; 24:597-608.

Hunter RHF. Human sperm reservoirs and fallopian tube function: a role for the intramural portion? *Acta Obstet Gynecol Scand* 1995; 74: 667-681.

Hunter RHF. Oviduct function in pigs, with particular reference to pathological condition of polyspermy. *Mol Reprod Dev* 1991; 29: 385-391.

Hunter RHF. Polyspermic fertilization in pigs after tubal deposition of excessive numbers of spermatozoa. *J. Exp Zool* 1973; 183: 57-64.

Hunter RHF. Preovulatory arrest and periovulatory redistribution of competent spermatozoa in the isthmus of the pig oviduct. *J. Reprod Fertil* 1984; 72: 203-211.

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

Iborra A, Companyo M, Martinez P, Morros A. Cholesterol efflux promotes acrosome reaction in goat spermatozoa. *Biol Reprod.* 2000 Feb;62(2):378-83.

Ijaz A, Lambert RD, Sirard MA. *In vitro* cocultured bovine granulosa and oviductal cells secrete sperm motility-maintaining factor(s). Mol Reprod Dev 1994; 37: 54-60.

Jansen RPS. Ultrastructure and histochemistry of acid mucus glycoproteins in the estrous mammal oviduct. Microsc Res Tech 1995; 32: 29-49.

Ji BT, Shu XO, Linet MS, Zheng W, Wacholder S, Gao YT, Ying DM, Jin F. Paternal cigarette smoking and the risk of childhood cancer among offspring of nonsmoking mothers. J Natl Cancer Inst. 1997 Feb 5;89(3):238-44.

Jouannet P, Wang C, Eustache F, Kold-Jensen T, Auger J. Semen quality and male reproductive health: the controversy about human sperm concentration decline. APMIS. 2001 May;109(5):333-44. Review.

Juriscova A, Casper RF, MacLusky NJ, Mills GB, Librach CL. HLA-G expression during preimplantation human embryo development. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Jan 9;93(1):161-5.

Kalab P, Peknicova J, Geussova G, Moos J. Regulation of protein tyrosine phosphorylation in boar sperm through a cAMP-dependent pathway. *Mol Reprod Dev.* 1998 Nov;51(3):304-14.

Katz DF, Drobnis EZ, Overstreet JW. Factors regulating mammalian sperm migration through the female reproductive tract and oocyte vestmens. *Gamete Res* 1989; 22 (4): 443-469.

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

Kervancioglu M.E, Djahanbankhch O, Aitken RJ. Epithelial cell coculture and the induction of sperm capacitation. *Fertil Steril* 1994; 61: 1103-1108.

Kim IH, Van Langendonck A, Van Soom A, Vanroose G, Casi AL, Hendriksen PJ, Bevers MM. Effect of exogenous glutathione on the in vitro fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology* 1999;52:537-547.

Kunz G., Beil D., Deininger H. et al. The dynamics of rapid sperm transport throught the female genital tract: evidence from vaginal

sonography of uterine peristalsis and hysterosalpingoscintigraphy. Hum Reprod 1996; 11: 627-632.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970 Aug 15;227(5259):680-5.

Lapointe J and Bilodeau JF. Antioxidant defenses are modulated in the cow oviduct during the estrous cycle. Biol Reprod. 2003;68: 1157-1164.

Lapointe J, Bilodeau JF. Antioxidant defenses are modulated in the cow oviduct during the estrous cycle. Biol Reprod. 2003 Apr;68(4):1157-64.

Lefebvre R and Suarez SS. Effect of capacitation on bull sperm binding to homologous oviductal epithelium. Biol Reprod 1996; 54: 575-582.

Lefebvre R, Lo MC, Suarez SS. Bovine sperm binding to oviductal epithelium involves fucose recognition. Biol Reprod 1997; 56: 1198-1204.

Lefebvre R, Lo MC, Suarez SS. Bovine sperm binding to oviductal epithelium involves fucose recognition. Biol Reprod. 1997 May; 56(5):1198-204

Li J, Carney E, Chen Y-Q, Yang X, Foote RH. Rabbit oviduct epithelial cell culture as a possible model for capacitating sperm. *Theriogenology* 1990; 30: 274.

Luvoni GC, Keskinetepe L, Brackett BG. Improvement in bovine embryo production in vitro by glutathione-containing culture media. *Mol Reprod Dev.* 1996;43:437-443.

Mahadevan M, Baker G (1984). Assessment and preparation of semen for *in vitro* fertilization. In: *Clinical In Vitro Fertilization* Edited by: Wood C, Trounson A. Springer-Verlag, Berlin;:83-97.

Mahmoud AM, Comhaire FH, Vereecken A, Verhoeven G, Abdel-Rahim DE, Abdel-Hafez KM. Inhibin and steroid response to testicular stimulation with pure FSH (Metrodin) in infertile men with unilateral cryptorchidism. *Andrologia.* 1996 Mar-Apr;28(2):103-8.

Manjunath P and Sairam MR. Purification and biochemical characterization of three major acidic proteins (BSP-A1, BSP-A2 and A-3) from bovine seminal plasma. *Biochem J* 1987; 241: 685-692.

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

McNutt T, Rogowski L, Vasilatos-Younken R, Killian G. Adsorption of oviductal fluid proteins by the bovine sperm membrane during *in vitro* capacitation. *Mol Reprod Dev.* 1992 Nov;33(3):313-23.

Meister A and Anderson ME. Glutathione. *Annu Rev Biochem.* 1983; 52:711-760.

Muller P, Erlemann KR, Muller K, Calvete JJ, Topfer-Petersen E, Marienfeld K, Harmann A. Biochemical characterization of the bovine seminal plasma protein PDC-109 with phospholipids vesicles. *Eur Biophys J* 1998; 27: 33-41.

Nagai T, Moor RM. Effect of oviduct cells on the incident of polyspermy in pig eggs fertilized *in vitro*. *Mol Reprod Dev* 1990; 26: 377-382.

Nassar A, Mahony M, Morshedi M, Lin MH, Srisombut C, Oehninger S. Modulation of sperm tail protein tyrosine phosphorylation by

pentoxifylline and its correlation with hyperactivated motility. *Fertil Steril*. 1999 May;71(5):919-23.

O'flaherty C, de Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species modulate independent protein phosphorylation pathways during human sperm capacitation. *Free Radic Biol Med* 2006;40:1045-1055.

Okamura N, Sugita Y. Activation of spermatozoan adenylate cyclase by a low molecular weight factor in porcine seminal plasma. *J Biol Chem*. 1983 Nov 10;258(21):13056-62.

Oshiro G, Owens JC, Shellman Y, Sclafani RA, Li JJ. Cell cycle control of Cdc7p kinase activity through regulation of Dbf4p stability. *Mol Cell Biol*. 1999 Jul;19(7):4888-96.

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

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

Pacey AA, Hill CJ, Scudamore IW, Warren MA, Barrat CL, Cooke ID.

The interaction *in vitro* of human spermatozoa with epithelial cells from the human uterine (fallopian) tube. Hum Reprod 1995a; 10: 360-366.

Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC (1992).

Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. Lancet 340:17-18.

Parkkila S, Kaunisto K, Kellokumpu S, Rajaniemi H.

A high activity carbonic anhydrase isoenzyme (CA II) is present in mammalian spermatozoa. Histochemistry. 1991;95(5):477-82.

Parkkila S, Rajaniemi H, Kellokumpu S.

Polarized expression of a band 3-related protein in mammalian sperm cells. Biol Reprod. 1993 Aug;49(2):326-31.

Parrish JJ, Susko-Parrish JL, First NL.

Effect of heparin and chondroitin sulfate on the acrosoma reaction and fertility of bovine sperm *in vitro*. Theriogenology 1985; 24: 537-549.

Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Handrow RR, Sims MM, First NI. Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid. Biol Reprod 1989; 40:1020–1025.

Parrish JJ, Susko-Parrish, Handrow RR, Ax RL, First L. Effect of sulphated glycoconjugates on capacitation and the acrosoma reaction of bovine and hamster spermatozoa. Gamete Res 1989; 24: 403-413.

Parrish JJ, Susko-Parrish, Winer MA, First L. Capacitation of bovine sperm by heparin. Biol Reprod 1988; 38:1171-1180.

Petrunkina AM, Friedrich J, Drommer W, Bicker G, Waberski D and Topfer-Petersen E Kinetic characterization of the changes in protein tyrosine phosphorylation of membranes, cytosolic Ca²⁺ concentration and viability in boar sperm populations selected by binding to oviductal epithelial cells. Reproduction 2001; 122: 469-480.

Petrunkina AM, Simon K, Gunzel-Apel AR, Topfer-Petersen E. Regulation of capacitation of canine spermatozoa during co-culture with heterologous oviductal epithelial cells. Reproduction in Domestic Animals 2003;38: 455-463.

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

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

Pukazhenti BS, Long JA, Wildt DE, Ottinger MA, Armstrong DL, Howard J. Regulation of sperm function by protein tyrosine phosphorylation in diverse wild felid species. *J Androl.* 1998 Nov-Dec;19(6):675-85.

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

Roldan ER, Gomendio M, Vitullo AD. The evolution of eutherian spermatozoa and underlying selective forces: female selection and sperm competition. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 1992 Nov;67(4):551-93. Review.

Rozati R, Reddy PP, Reddanna P, Mujtaba R. (2002). Role of environmental estrogens in the deterioration of male factor fertility. *Fertil Steril.* 78:1187-1194.

Salmen JJ, Skufca F, Matt A, Gushansky G, Mason A, Gardiner CS.

Role of glutathione in reproductive tract secretions on mouse preimplantation embryo development. *Biol Reprod.* 2005; 73:308-314.

SAS/STAT User's Guide 1988 Released 6.03 edn. Cary, NC: Statistical Analysis System Institute.

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

Smith TT, Nothnich WB. Role of direct contact between spermatozoa and oviductal epithelial cells in maintaining rabbit sperm viability. *Biol Reprod* 1997; 56: 83-89.

Smith TT, Yanagimachi R. Attachment and release of spermatozoa from the caudal isthmus of the hamster oviduct. *J Reprod Fertil* 1991; 91:567-573.

Smith TT, Yanagimachi R. The viability of hamster spermatozoa stored in the isthmus of the oviduct: the importance of sperm-epithelium contact for sperm survival. *Biol Reprod* 1990; 42: 450-457.

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

Step toe PC, Edwards RG (1978). Birth after the reimplantation of a human embryo. Lancet 2: 366.

Step toe PC, Edwards RG, Purdy JM. (1971). Human blastocysts grown in culture. Nature 229: 132–133.

Suarez S.S., Katz J.F., Overstret N., 1983. Movement characteristics and acrosomal status of rabbit spermatozoa recovered at the site and time of fertilization. Biol Reprod, 29: 1127-1287.

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

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

Suarez SS. Formation of a reservoir of sperm in the oviduct. *Reprod Domest Anim* 2002; 37: 140-143.

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

Suzuki F, Yanagimachi R. Freeze-fracture observations of ovulated hamster oocytes with their cumulus cells. *Cell Tissue Res.* 1983;231(2):265-74.

Talevi R and Gualtieri R In vivo vs in vitro fertilization. *European Journal of Obstetrics and Gynecology* 2004; 115 Suppl 1: S68-71.

Talevi R and Gualtieri R. Sulfated glycoconjugates are powerful modulators of bovine sperm adhesion and release from the oviductal epithelium in vitro. *Biol Reprod* 2001;64: 491–498.

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

Thomas PGA, Ball BA and Brinsko SP Changes associated with induced capacitation influence the interaction between equine spermatozoa and oviduct epithelial cells monolayers. *Biology of Reproduction Monographs* 1995;1:697-705.

Visconti PE, Bailey JL, Moore GD, Pan D, Olds-Clarke P, Kopf GS. Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development*. 1995 Apr;121(4):1129-37.

Visconti PE, Ning X, Fornes MW, Alvarez JG, Stein P, Connors SA, Kopf GS. Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm: cholesterol release signals an increase in protein tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *Dev Biol*. 1999 Oct 15;214(2):429-43.

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

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

Yanagimachi R. Mammalian spermatozoa. In: Knobil E., Nail J.D., eds. *The physiology of reproduction*, 2nd ed. New York: Raven Press Ltd, 1994; 189-317.

Yanagimachi R. and Mahi C.A. The sperm acrosome reaction and fertilization in the guinea pig: a study *in vitro*. *J Reprod Fertil*, 1976; 46: 49-54.

Younglai EV, Holt D, Brown P, Jurisicova A, Casper RF (2001). Sperm swim-up techniques and DNA fragmentation. *Hum Reprod*. 16:1950-3.

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

Zhu J.J., Barrat C.R.L. Cooke I.D. Effect of human cervical mucus on human sperm motion and hyperactivation *in vitro*. Hum Reprod 1992; 7: 1402-1406.

Zinamen M., Drobnis E.Z., Morales P. The physiology of sperm recovered from the human uterine cervix: acrosomal status and response to inducers of the acrosome reaction. Biol Reprod 1989; 41:790-797.