



# **UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELL'AQUILA**

**DIPARTIMENTO DI MEDICINA CLINICA, SANITÀ PUBBLICA, SCIENZE DELLA  
VITA E DELL'AMBIENTE**

Dottorato di Ricerca in **MEDICINA CLINICA E SANITÀ PUBBLICA**

Curriculum: Nutraceutica

XXII ciclo

Titolo della tesi

**USO DELLE ACIL-L-CARNITINE IN UN MODELLO ANIMALE DI SINDROME  
DELL'OVAIO POLICISTICO**

SSD: BIO/10

Dottoranda

Martina Placidi

Coordinatore del corso

Prof. Claudio Ferri

Tutor

Prof.ssa Maria Penco

Co-tutor

Prof.ssa Anna Maria D'Alessandro

A.A. 2018/2019

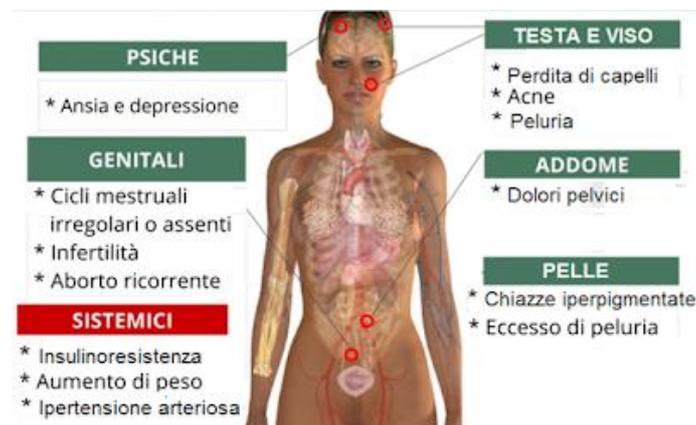
# Sommario

<b>1. SINDROME DELL’OVAIO POLICISTICO .....</b>	<b>1</b>
1.1 CAUSE E FATTORI DI RISCHIO .....	1
1.2 DIAGNOSI .....	2
1.3 FENOTIPO.....	4
1.4 CONDIZIONI DI SALUTE ASSOCIATE .....	5
1.4.1. Complicazioni metaboliche, obesità e rischio cardiovascolare.....	5
1.4.2. Funzioni neurologiche e psicologiche.....	6
1.4.3. Cancro.....	6
1.4.4. Infertilità .....	6
1.5. STRESS OSSIDATIVO NELLA PCOS.....	7
1.6. ALTERAZIONI METABOLICHE NELLA PCOS.....	12
1.7. APPROCCIO TERAPEUTICO .....	16
<b>2. LE CARNITINE.....</b>	<b>17</b>
2.1. BIOSINTESI ENDOGENA DELLA CARNITINA .....	22
2.2. ASSORBIMENTO DALLA DIETA E RIASSORBIMENTO RENALE DELLA CARNITINA .....	24
2.3. FUNZIONI DELLE CARNITINE .....	25
2.3.1. Ruolo delle carnitine nell’ossidazione degli acidi grassi.....	26
2.3.2. Carnitine come antiossidanti .....	29
<b>3. IL RUOLO DELLE CARNITINE NELL’INFERTILITÀ FEMMINILE.....</b>	<b>33</b>
3.1. RUOLO DELLA B-OSSIDAZIONE NELLO SVILUPPO OVOCITARIO E DELL’EMBRIONE PRECOCE.....	33
3.2. STUDI IN VITRO ED IN VIVO .....	36
3.2.1. Studi in vitro e di riproduzione assistita .....	36
3.2.2. Studi su modelli murini .....	37
3.3. POSSIBILI MECCANISMI D’AZIONE DELL’L-CARNITINA .....	38
3.3.1. Effetti diretti .....	38
3.3.2. Effetti indiretti .....	40
<b>4. GLI AGE ED IL LORO RUOLO NELLA RIPRODUZIONE FEMMINILE.....</b>	<b>42</b>
4.1. RAGE .....	43
4.2. FATTORI CHE INDUCONO LA PRODUZIONE DI AGE.....	45
4.3. CORRELAZIONE TRA AGE E ASPETTI DELLA PCOS .....	45
4.3.1. AGE e insulino-resistenza .....	45
4.3.2. AGE e obesità.....	46
4.3.3. AGE e infiammazione.....	47
4.3.4. Sistema AGE-RAGE sierico ed ovarico nella PCOS.....	48
4.4. DISFUNZIONE OVARICA COLLEGATA AGLI AGE .....	48
<b>PARTE 1 .....</b>	<b>51</b>
<b>5. SCOPO DELLA TESI.....</b>	<b>51</b>
<b>6. MATERIALI E METODI .....</b>	<b>53</b>
6.1. ANIMALI .....	53
6.2. DETERMINAZIONE DEL CICLO ESTRALE .....	53
6.3. INDUZIONE DELLA SUPEROVULAZIONE E RACCOLTA OVOCITI .....	53
6.4. COLORAZIONE CON EMATOSSILINA-EOSINA, CONTA E CLASSIFICAZIONE DEI FOLLICOLI.....	54
6.5. COLORAZIONE TRICROMICA DI HEIDENHAIN .....	54
6.6. IMMUNOFLUORESCENZA .....	54
6.7. IMMUNOISTOCHEMICA .....	55
6.8. WESTERN BLOT ANALISI.....	55
6.9. ANALISI DELLA DISTRIBUZIONE DEL DNA E DELLA CONFIGURAZIONE DEL FUSO DI OVOCITI MII MATURATI IN VIVO....	56
6.10. ANALISI STATISTICA .....	57
<b>7. RISULTATI .....</b>	<b>58</b>
7.1. ANALISI DEL FENOTIPO PCOS NEL TOPO DHEA.....	58

7.2. IL DHEA INDUCE DISFUNZIONI OVULATORIE DURANTE LA SUPEROVULAZIONE E INFLUENZA NEGATIVAMENTE LA QUALITÀ OVOCITARIA .....	62
7.3. LE OVAIE DI TOPI DHEA PRESENTANO STRESS GLICATIVO .....	63
7.4. IL NETWORK DI SIRT1 CHE REGOLA LA FISIOLOGIA MITOCONDRIALE È ALTERATO NELLE OVAIE DHEA .....	65
7.5. L'AMPK E L'AUTOFAGIA AUMENTANO NELLE OVAIE DEI TOPI DHEA .....	67
<b>8. DISCUSSIONE.....</b>	<b>69</b>
<b>PARTE 2 .....</b>	<b>72</b>
<b>9 SCOPO DELLA TESI.....</b>	<b>72</b>
<b>10 MATERIALI E METODI .....</b>	<b>73</b>
10.1. RACCOLTA DEGLI OVOCITI E MATURAZIONE IN VITRO (IVM) .....	73
10.2. IMMUNOFLUORESCENZA .....	73
10.3. ANALISI STATISTICA .....	74
<b>11 RISULTATI.....</b>	<b>75</b>
11.1. EFFETTI DELLA COMBINAZIONE DI L-CARNITINA E ACETIL-L-CARNITINA SULLA MATURAZIONE IN VITRO DEGLI OVOCITI DOPO ESPOSIZIONE A STRESS OSSIDATIVO MODERATO.....	75
11.2. EFFETTI DELLA COMBINAZIONE DI L-CARNITINA E ACETIL-L-CARNITINA SULLA QUALITÀ DEGLI OVOCITI MATURATI IN VITRO DOPO ESPOSIZIONE A STRESS OSSIDATIVO MODERATO.....	76
11.3. EFFETTI DELLA PROPIONIL-L-CARNITINA SULLA MATURAZIONE IN VITRO DEGLI OVOCITI DOPO ESPOSIZIONE A STRESS OSSIDATIVO MODERATO .....	77
11.4. EFFETTO DELLA PROPIONIL-L-CARNITINA SULLA QUALITÀ DEGLI OVOCITI MATURATI IN VITRO DOPO ESPOSIZIONE A STRESS OSSIDATIVO MODERATO .....	78
<b>12 DISCUSSIONE.....</b>	<b>79</b>
<b>PARTE 3 .....</b>	<b>81</b>
<b>13 SCOPO DELLA TESI.....</b>	<b>81</b>
<b>14 MATERIALI E METODI .....</b>	<b>82</b>
14.1. MODELLO MURINO DI PCOS E TRATTAMENTO CON ACIL-L-CARNITINE.....	82
14.2. VALUTAZIONE DELLA FUNZIONALITÀ OVARICA.....	82
14.3. INDUZIONE DELLA SUPEROVULAZIONE.....	82
14.4. CLASSIFICAZIONE DEGLI OVOCITI OVULATI SULLA BASE DELLE CARATTERISTICHE DEL FUSO MEIOTICO E DELL'ASSETTO CROMOSOMI.....	82
14.5. ANALISI MEDIANTE WESTERN BLOT.....	83
14.6. IMMUNOISTOCHEMICA .....	83
14.7. ANALISI STATISTICA .....	83
<b>15 RISULTATI.....</b>	<b>84</b>
15.1. ANALISI DEL CICLO ESTRALE.....	84
15.2. ANALISI DELLA FUNZIONE OVULATORIA.....	84
15.3. ANALISI DELL'EFFETTO SULLA QUALITÀ OVOCITARIA .....	85
15.4. EFFETTO DELLA SOMMINISTRAZIONE DI CARNITINE SU UN MARKER DI STEROIDOGENESI .....	85
15.5. EFFETTO DELLA SOMMINISTRAZIONE DI CARNITINE SULLA FUNZIONALITÀ MITOCONDRIALE .....	86
15.6. EFFETTO DELLA SUPPLEMENTAZIONE DI CARNITINE SULLO STRESS GLICATIVO .....	87
<b>16 DISCUSSIONE.....</b>	<b>90</b>
<b>CONCLUSIONI.....</b>	<b>92</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>93</b>

# 1. SINDROME DELL'OVAIO POLICISTICO

La sindrome dell'ovaio policistico (PCOS) è un comune disordine endocrinologico e riproduttivo che si riscontra nel 6-10% della popolazione femminile (Norman RJ et al, 2007). In generale, è considerata una malattia metabolica multifattoriale caratterizzata da varie manifestazioni cliniche quali iperandrogenismo, ovaie policistiche e disfunzioni ovulatorie, che la rendono la causa più comune di infertilità da anovulazione nelle donne, ma anche da problemi metabolici come obesità, insulino-resistenza, iperinsulinemia e diabete di tipo II, che la associano a complicanze cardiovascolari, neurologiche e psicologiche, come ansia e depressione (Barthelmess EK et al, 2015; Carmina E et al, 2010) (Figura 1).



**Figura 1.** Sintomatologia della PCOS

## 1.1 Cause e fattori di rischio

Nell'ultimo decennio si è discusso molto sull'origine e sulla causa patologica della PCOS: non sono ancora note le cause, ma sembrano essere implicati nell'eziologia sia fattori ambientali che genetici (Franks S et al, 2004; Vink JM et al, 2006). In particolare, le anomalie genetiche sembrerebbero giocare un ruolo chiave nelle complicazioni metaboliche (Barthelmess EK et al, 2015): è stato infatti osservato un alto tasso di iperandrogenismo e di diabete di tipo II nei parenti di I grado di donne con PCOS (Ehrmann DA et al, 2005; Legro RS et al, 1998); mentre nel 2011 Zhao et al, hanno determinato che il polimorfismo a singolo nucleotide (SNP) rs13429458 è significativamente associato al rischio familiare di PCOS. Recentemente, alcuni studi hanno indicato che un difetto nell'azione dell'insulina potrebbe essere la causa primaria

di PCOS (Dunaif A et al, 1996; Svendsen PF et al, 2008). Altri numerosi lavori hanno invece osservato come sia importante il ruolo dello status socio-economico e dello stile di vita malsano, che include il fumo, la cattiva alimentazione, lo scarso esercizio fisico e l'obesità (Thurston RC et al, 2005; Martorell R et al, 2000).

Altri studi, inoltre, hanno suggerito che anche l'origine etnica possa essere associata alla PCOS: ad esempio, in uno studio condotto su donne degli USA vi era una prevalenza dell'8% tra gli afroamericani, del 4.8% tra i caucasici e del 13% tra i messicani-americani, probabilmente dovuta al maggior numero di insulino-resistenza e diabete di tipo II in questa popolazione (Azziz R et al, 2004; Park YW et al, 2003).

## *1.2. Diagnosi*

I criteri diagnostici inclusi nell'NIH Consensus del 1990 definiscono la PCOS come la presenza di iperandrogenismo clinico e/o biochimico e oligomenorrea/anovulazione (Zawadski JF et al, 1992) (Tabella 1). Successivamente, in base ai criteri proposti nel 2003 dal Rotterdam ESHRE (European Society of Human Reproduction and Embriology) e dall'ASRM (American Society of Reproductive Medicine), la diagnosi della sindrome dell'ovaio policistico può essere effettuata se sono presenti almeno 2 dei seguenti criteri (Tabella 1):

- Oligomenorrea e/o anovulazione: l'oligomenorrea indica un'alterazione del ritmo del ciclo mestruale, con una durata maggiore di 36-40 giorni e meno di 9 cicli l'anno; l'anovulazione può comparire anche prima che si instauri l'oligomenorrea ed in circa il 30% dei casi è accompagnata da amenorrea secondaria, ovvero mancanza di ciclo per più di 3 mesi; tuttavia, le donne con PCOS di solito non sono completamente sterili, infatti l'ovulazione si può verificare fino al 32% dei cicli mestruali (Laven JS et al, 2002).
- Segni clinici e/o biochimici di iperandrogenismo: si osservano in circa il 60% delle pazienti e le principali manifestazioni cliniche sono l'irsutismo e l'acne, mentre non si riscontrano segni di virilizzazione gravi quali alopecia temporale, modificazione in senso maschile del timbro della voce e ipertrofia del clitoride (Balen AH et al, 1995; DeUgarte CM et al, 2006).
- Ecostruttura policistica dell'ovaio: è definito policistico l'ovaio che mostra 12 o più follicoli con diametro medio di 2-9mm e/o volume ovarico maggiore di 10ml, una volta esaminato con sonda transvaginale (Balen AH et al, 2003); tuttavia il

solo riscontro ecografico della presenza di microcisti ovariche non è patognomonico della PCOS in quanto queste possono essere presenti anche in altre endocrinopatie (Figura 2).



**Figura 2.** Differenze tra ovaio normale ed ovaio policistico

A sua volta, l'Androgen Excess - PCOS Society (AEPCOS) ha considerato che l'eccesso di androgeni è un evento centrale nella patogenesi e nello sviluppo della PCOS ed ha stabilito che questo criterio deve essere presente e accompagnato da uno degli altri, quali oligomenorrea e/o ovaio policistico (Azziz R et al, 2006) (Tabella 1).

**Tabella 1.** Criteri diagnostici della PCOS

<b>NIH Consensus 1990</b> (all required)	<b>Rotterdam Consensus 2003</b> (two out of three required)	<b>AEPCOS definition 2006</b> (androgen excess and one other criterion)
Clinical and/or biochemical hyperandrogenism	Clinical and/or biochemical hyperandrogenism	Clinical and/or biochemical hyperandrogenism
Oligo/amenorrhea, anovulation	Oligo/amenorrhea, anovulation	Oligo/amenorrhea, anovulation
	Polycystic ovaries appearance on ultrasound	Polycystic ovaries appearance on ultrasound

Exclusion of other androgen excess disorders: NC-CAH, Cushing's syndrome, androgen secreting tumors, hyperprolactinemia, thyroid diseases, drug-induced androgen excess. Other causes for anovulation should also been excluded.

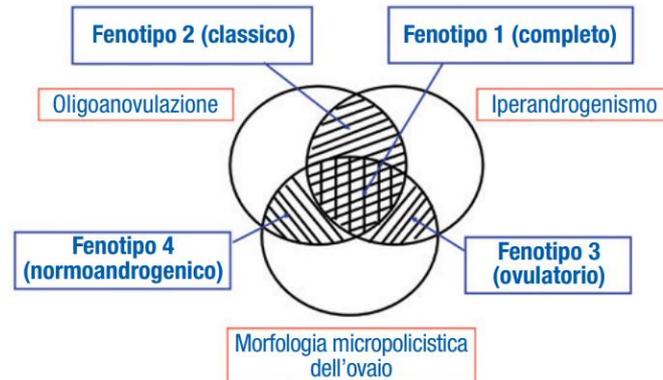
Per effettuare la diagnosi, inoltre, bisogna escludere altri disturbi con manifestazioni simili: esistono dei semplici test che permettono di scartare l'iperprolattinemia, che causa anovulazione, l'iperplasia surrenalica congenita, che causa un'eccessiva produzione di

androgeni, la sindrome di Cushing, che causa tutti e tre i criteri diagnostici ed insulino-resistenza, e la presenza di tumori secernenti androgeni.

Nel caso in cui i criteri non siano completamente soddisfatti, si può parlare di un quadro PCOS-like (Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop, 2003).

### 1.3. Fenotipo

I criteri proposti dal Rotterdam ESHRE hanno permesso di generare 4 fenotipi, utilizzati per diagnosticare la PCOS negli adulti, che seguono uno spettro di specificità decrescente accompagnato dalla diminuzione della gravità clinica (Tabella 2) (Johnson T et al, 2013): fenotipo 1 “Completo”, quando sono presenti tutti e tre i sintomi; fenotipo 2 “Classico”, con oligo-anovulazione e iperandrogenismo; fenotipo 3 “Ovulatorio”, caratterizzato da iperandrogenismo e aspetto micropolicistico dell’ovaio; fenotipo 4 “Normoandrogenico”, in presenza di oligo-anovulazione ed ovaio policistico. Nel complesso queste diverse manifestazioni sono definite fenotipi clinici della PCOS, i quali sono eterogenei anche in termini metabolici (Figura 3).



**Figura 3.** Fenotipi clinici della PCOS

**Tabella 2.** Caratteristiche dei singoli fenotipi clinici della PCOS

Adult Diagnostic Criteria for Polycystic Ovary Syndrome\*

---

1	Phenotype 1 ("Classic PCOS") <sup>†</sup>
	a. Clinical and/or biochemical evidence of hyperandrogenism
	b. Evidence of oligo-anovulation
	c. Ultrasonographic evidence of a polycystic ovary
2	Phenotype 2 (Essential National Institutes of Health Criteria) <sup>†</sup>
	a. Clinical and/or biochemical evidence of hyperandrogenism
	b. Evidence of oligo-anovulation
3	Phenotype 3 ("Ovulatory PCOS") <sup>†</sup>
	a. Clinical and/or biochemical evidence of hyperandrogenism
	b. Ultrasonographic evidence of a polycystic ovary
4	Phenotype 4 (Non-hyperandrogenic PCOS)
	a. Evidence of oligo-anovulation
	b. Ultrasonographic evidence of a polycystic ovary

---

\* Rotterdam criteria; all involve exclusion of other causes of hyperandrogenism and anovulation.

<sup>†</sup> Androgen Excess-PCOS Society recognizes only hyperandrogenic phenotypes.

Questi fenotipi sono ben evidenti dal periodo post-puberale, in quanto durante la pubertà i segni ed i sintomi della PCOS si sovrappongono con quelli dell'adolescenza: vi sono infatti alti tassi di irregolarità mestruale e cicli anovulatori in questo periodo ed inoltre vi è difficoltà nell'interpretazione clinica e biochimica dell'iperandrogenismo a causa dell'acne molto frequente. Di conseguenza, la diagnosi di PCOS nelle adolescenti necessita della presenza di tutti e tre i criteri di Rotterdam e non solo due: oligo/amenorrea da almeno due anni post-menarca o amenorrea primaria a 16 anni, evidenza di ovaio policistico e iperandrogenismo biochimico (Fauser BC et al, 2012).

#### *1.4. Condizioni di salute associate*

Vi sono numerose implicazioni sulla salute associate alla PCOS, molte delle quali costituiscono complicazioni che si sviluppano durante tutta la vita.

##### *1.4.1. Complicazioni metaboliche, obesità e rischio cardiovascolare*

Nel 60-80% delle donne con sindrome dell'ovaio policistico e nel 95% delle donne obese con PCOS si riscontra insulino-resistenza (IR) (DeUgarte CM et al., 2005): nel 2001, Dunaif et al hanno infatti osservato che vi è un difetto nella trasduzione del segnale post-recettoriale dell'insulina, indipendente dall'obesità e dal diabete di tipo 2; inoltre, l'IR

contribuisce all'iperandrogenismo, all'anovulazione ed ai rischi cardiovascolari (Barbieri RL et al, 1983).

Oltre a ciò, le pazienti con PCOS presentano compromessa tolleranza al glucosio, diabete gestazionale e diabete di tipo 2 (Moran LJ et al, 2010) e l'obesità, che aggrava molto i sintomi, è presente in almeno il 30% delle donne affette da PCOS. Complessivamente, tutti questi problemi metabolici aumentano il rischio di complicanze cardiovascolari nelle pazienti: diversi studi, infatti, indicano che l'aumento della gravità dei fenotipi di PCOS è associato ad un elevato rischio di malattie cardiovascolari, sia nelle pazienti obese che in quelle non obese (Zhao X et al, 2010; Dokras A et al, 2011).

#### *1.4.2. Funzioni neurologiche e psicologiche*

Oltre alle manifestazioni endocrinologiche e riproduttive, la PCOS porta anche a conseguenze sulla salute mentale. Vi sono infatti numerosi studi che mostrano la correlazione tra PCOS e ridotta qualità della vita (Coffey S et al, 2006; Barnard L et al, 2007), con l'aumento di ansia, depressione e scarsa autostima (Deeks AA et al, 2011). Ciò non sorprende, dal momento che i principali fenotipi di questa sindrome (obesità, infertilità e irsutismo) sono problemi importanti in grado di causare stress psicologico.

#### *1.4.3. Cancro*

Alcuni studi suggeriscono un aumento del tasso di carcinoma endometriale e della mammella tra le donne con PCOS (Balen A, 2001; Hardiman P et al, 2003): l'anovulazione, infatti, può causare l'aumento della proliferazione tissutale dell'endometrio, con conseguente carcinoma. Altri fattori che aumentano il rischio di tumore di 2-3 volte sono l'obesità, l'insulino-resistenza ed il diabete di tipo 2 associati alla PCOS (Chittenden BG et al, 2009).

#### *1.4.4. Infertilità*

La sindrome dell'ovaio policistico è la causa più comune di irregolarità mestruale che conduce a infertilità: il 30% delle donne sono infatti infertili a causa dell'anovulazione e si stima che il 90% dei casi di anovulazione sia causato dalla PCOS (Balen AB e Rutherford AJ, 2007).

Il processo di oogenesi nelle pazienti affette da PCOS è differente rispetto a quello di una donna fertile: lo strato di cellule tecali produce androgeni per le cellule della granulosa, che verranno convertiti in estradiolo in risposta alla stimolazione indotta dall'ormone luteinizzante (LH) ed ai livelli di insulina (Magoffin DA, 2005; Barbieri RL et al, 1986); questi due fattori sono particolarmente importanti per le donne con PCOS, in quanto il 60-80% di esse mostrano insulino-resistenza, la quale può causare iperinsulinemia a livello ovarico, portando ad un aumento della risposta delle cellule della granulosa all'LH, con conseguente produzione di un surplus di androgeni nel sito (Willis D et al, 1995).

### *1.5. Stress ossidativo nella PCOS*

Molti studi hanno dimostrato che i marcatori ossidativi circolanti sono significativamente più elevati nelle pazienti affette da PCOS rispetto che nelle donne sane, per cui questi possono essere considerati come potenziali induttori di tale patologia (Murri M et al, 2013).

Lo stress ossidativo è definito come lo squilibrio tra la produzione di radicali liberi e la capacità dell'organismo di difendersi dai loro effetti dannosi attraverso le specie antiossidanti, ed è in grado di provocare danni alla membrana plasmatica, al DNA ed agli altri organelli cellulari, inducendo apoptosi.

Le ROS sono una classe di molecole generate negli organismi aerobi attraverso il normale metabolismo dell'ossigeno e quelle principalmente dotate di attività biologica comprendono l'anione superossido ( $O_2^-$ ), il radicale idrossilico (OH.), il perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ), l'idroperossido organico (ROOH), il radicale alcossilico (RO.), il radicale perossilico (ROO.), l'acido ipocloroso (HOCl) ed il perossinitrito (ONOO $^-$ ). Tali ROS agiscono anche come secondi messaggeri nelle cellule di mammifero andando così a regolare specifiche pathways di trasduzione del segnale implicate nell'espressione di geni e nella modificazione post- traduzionale di proteine a loro volta coinvolti nelle funzioni cellulari, nella crescita, nel differenziamento e nei processi di morte (Halliwell B e Gutteridge JM, 1989). Ci sono quindi numerose fonti di ROS quali i mitocondri durante la fosforilazione ossidativa (Seaver LC e Imlay JA, 2004) e le reazioni di detossificazione operate a livello epatico dal sistema del citocromo P-450 (Geiszt et al, 1997), dalle ossidasi presenti nei perossisomi (Dvorakova M et al, 2000), dalle NADPH ossidasi (Cheng G et al, 2001) e dalle xantina ossidasi (Dorsam G et al, 2000); fonti esogene sono invece rappresentate dall'esposizione ad inquinanti ambientali quali il fumo di sigaretta, l'alcol etilico, le radiazioni ionizzanti e le infezioni batteriche, fungine e virali

(Bouayed J e Bohn T, 2010). Tuttavia, nelle cellule, vi sono anche molecole che prevengono l'azione delle ROS donando ad esse un elettrone senza diventare reattive e prendono il nome di antiossidanti; infatti, la produzione cellulare di ROS è sotto il controllo di complessi enzimatici altamente antiossidanti e di sistemi non enzimatici: i principali enzimi antiossidanti comprendono la superossido dismutasi (SOD), la catalasi (CAT), la glutazione perossidasi (GPx), la glutatione-S-reduttasi (GSR), la glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6PD) e l'isocitrato deidrogenasi (ICDH) (Al-Gubory et al, 2010), mentre i principali sistemi antiossidanti non enzimatici sono le vitamine A, C ed E, le quali vengono assunte con la dieta e sono in grado di neutralizzare direttamente le ROS (Johnson LJ et al, 2003).

Le ROS svolgono quindi differenti azioni a livello cellulare:

- Attivazione di fattori di trascrizione redox-sensibili quali p53 ed NF- $\kappa$ B, che a loro volta regolano l'espressione delle citochine pro-infiammatorie, il differenziamento cellulare e l'apoptosi: la PCOS è infatti associata ad un basso grado di infiammazione ed all'aumento delle citochine infiammatorie, il che contribuisce alla patogenesi della sindrome (Amato G et al, 2003; Kelly CC et al, 2001);
- Attivazione delle protein-chinasi, attraverso le quali le cellule rispondono a numerosi segnali extracellulari ed allo stress, portando ad un danno cellulare più esteso, con conseguente morte cellulare per necrosi od apoptosi (Wang X et al, 1998); tra queste, vi è l'attivazione di quelle che operano la fosforilazione dei residui di serina e treonina dei recettori per l'insulina (IRS), il che ne impedisce la normale fosforilazione dei residui di tirosina, provocandone la degradazione (Diamanti-Kandarakis E e Dunaif A, 2012);
- Apertura dei canali ionici, in quanto l'incremento della quantità di ROS provoca il rilascio di ioni  $\text{Ca}^{2+}$  dal reticolo endoplasmatico e la perdita dell'omeostasi intracellulare del  $\text{Ca}^{2+}$ ; inoltre, l'eccessiva concentrazione citosolica del  $\text{Ca}^{2+}$  va a determinare l'instabilità della membrana mitocondriale e, conseguentemente, l'arresto della sintesi di adenosina trifosfato (ATP), portando alla morte delle cellule per necrosi (Akbarali HI, 2014). Nelle donne con PCOS tale disregolazione determina l'arresto dello sviluppo follicolare, con conseguente

disfunzione riproduttiva e mestruale (Agarwal A et al, 2012; Rashidi B et al, 2009);

- Ossidazione delle proteine, in particolar modo a livello delle catene laterali, che porta alla formazione di prodotti carbonilici (Cabiscol E e Ros J, 2006), con conseguente perdita di funzione, e quindi disfunzione, delle proteine (Dalle-Donne et al, 2006): tali prodotti di avanzata ossidazione delle proteine (AOPPs) sono molto più abbondanti nel plasma delle pazienti con PCOS che nelle donne sane (Mohammadi M, 2019);
- Perossidazione lipidica, prevalentemente a livello delle catene laterali degli acidi grassi polinsaturi della membrana plasmatica e della membrana degli organelli: tali acidi grassi reagiscono con l'ossigeno molecolare ( $O_2$ ) portando alla generazione del radicale perossilico ( $ROO\cdot$ ), il quale è in grado di estrarre un ulteriore  $H^+$  da un altro acido grasso, dando luogo ad una reazione continua (Abuja PM e Albertini R, 2001). I marcatori che riflettono il grado di perossidazione lipidica, come ad esempio la malondialdeide (MDA), aumentano notevolmente nelle pazienti con PCOS, come anche la concentrazione di lipidi perossidati (Gonzalez F et al, 2006);
- Ossidazione del DNA, in particolar modo a livello delle basi di guanina in quanto queste presentano un più elevato potenziale di ossidazione rispetto alle basi di citosina, timina ed adenina. Il DNA mitocondriale è comunque quello maggiormente vulnerabile all'azione delle ROS in quanto sia viene attaccato dall' $O_2$  prodotto dalla catena di trasporto degli elettroni, sia è privo della protezione data dagli istoni, sia non presenta alcun meccanismo di riparazione (Cooke MS et al, 2003). Le donne con PCOS mostrano un incremento della rottura del double-strand DNA, il che permette anche la correlazione di tale patologia con l'insorgenza di carcinoma ovarico (Mohammadi M, 2019).

I principali biomarcatori dello stress ossidativo nella PCOS comprendono:

- Malondialdeide (MDA), la quale deriva dalla perossidazione lipidica degli acidi grassi polinsaturi (Davey MW et al, 2005), i cui livelli circolanti aumentano del 47% in donne con PCOS rispetto ai controlli (Murri M et al, 2013), indipendentemente dall'obesità (Kusku NK e Var A, 2009);

- Ossido nitrico (NO), il quale è sintetizzato endogenamente ad opera degli enzimi ossido nitrico sintasi (NOS) a partire da L-arginina, ossigeno e nicotinammide adenina dinucleotide fosfato (NADPH), od anche attraverso la riduzione dei nitrati derivanti dal consumo di vegetali, ed è un'importante molecola di segnalazione cellulare coinvolta in numerosi processi fisiologici e patologici, in quanto la sua eccessiva produzione va ad indurre una risposta immunitaria mediata da fagocitosi ed operata da monociti, macrofagi e linfociti (Bredt DS, 1999). Ratti Wistar trattati con L-arginina, precursore dell'NO, mostravano ovaie policistiche rispetto ai controlli, per cui l'NO presenta un ruolo molto importante nella fisiopatologia della PCOS (Hassani F et al, 2012); inoltre, i livelli di NO e di fibrinogeno sono due marcatori del danno vascolare associati con l'insulino-resistenza nelle donne con PCOS, in quanto è stata dimostrata una significativa correlazione negativa tra NO e livelli di insulina a digiuno (Nacul AP et al, 2007);
- Advanced Glycation End products (AGEs), anche chiamati "glicotossine", sono i prodotti finali di una reazione chimica, chiamata reazione di Maillard, nella quale il gruppo carbonilico dei carboidrati reagisce non enzimaticamente con i lipidi o con il gruppo amminico delle proteine (Bucala R e Cerami A, 1992): essi inducono quindi stress ossidativo, portando ad uno stato infiammatorio ed alla propagazione del danno tissutale; pertanto, la produzione degli AGE ed il risultante stress ossidativo accelerano la reazione di Maillard, determinando l'inizio di un ciclo autocatalitico di reazioni dannose nei tessuti (Thorpe SR e Baynes JW, 1996). Nella PCOS sono presenti elevati livelli di AGE, i quali alterano la biosintesi degli steroidi modificando la funzione degli enzimi coinvolti ed inducendo uno stato infiammatorio ed insulino-resistenza (Garg D e Merhi Z, 2016): l'anormale processo di steroidogenesi che si ha nella PCOS porta all'aumento della sintesi degli androgeni con conseguente follicologenesi anomala (Diamanti-Kandarakis E, 2008). Nelle donne con PCOS sono anche stati osservati sia elevati livelli sierici di AGE e recettori per gli AGE (RAGE), sia una correlazione positiva tra livelli sierici di AGE e testosterone (Diamanti-Kandarakis E et al, 2005): è quindi possibile confermare la correlazione tra AGE ed iperandrogenismo nella PCOS;
- Xantina ossidasi (XO), la quale è un enzima coinvolto nella produzione del radicale anione superossido ( $O_2^-$ ) in quanto catalizza l'ossidazione dell'ipoxantina a xantina e l'ossidazione della xantina ad acido urico, ed

interviene anche nel catabolismo delle purine (Baskol G et al, 2012). Nelle pazienti con PCOS è possibile osservare livelli di xantina ossidasi significativamente più elevati, in contrasto con i livelli di SOD, la cui attività è invece notevolmente ridotta, inducendo uno stato infiammatorio e favorendo il danno cardiovascolare (Isik H et al, 2016);

- Capacità Antiossidante Totale (TAC), definita come la capacità del plasma di eliminare la produzione di radicali liberi, il cui livello è notevolmente più basso nelle donne con PCOS (Fenkci V et al, 2003), sebbene altri studi mostrino come essa possa aumentare in risposta all'incremento dello stress ossidativo (Verit FF e Erel O, 2008);
- Superossido Dismutasi (SOD), la quale è un importante enzima antiossidante in quanto coinvolta nell'eliminazione dell'anione superossido ( $O_2^-$ ), portando alla formazione di perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ) il quale, a sua volta, viene convertito in acqua dall'enzima glutatione perossidasi (GPx) (Droge W, 2002), e la sua azione dipende dalla presenza di cofattori metallici quali rame (Cu), zinco (Zn), ferro (Fe), manganese (Mn) e nichel (Ni) (Barondeau DP et al, 2004). Numerosi studi hanno mostrato che i livelli sierici di SOD sono molto più elevati nelle donne con PCOS rispetto che nelle donne sane (Sabuncu T et al, 2001; Murri M et al, 2013), per cui l'attività della SOD può essere utilizzata come parametro clinico per la quantificazione dello stress ossidativo nelle donne con PCOS;
- Glutatione Perossidasi (GPx), la quale protegge l'organismo dal danno ossidativo riducendo il lipide idroperossido al suo alcol corrispondente e il perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ) ad acqua; tuttavia, nessuno studio ha dimostrato differenze nei suoi livelli in pazienti con PCOS e donne sane (Sabuncu T et al, 2001; Baskol G et al, 2012; Murri M et al, 2013), per cui sono necessari ulteriori studi per esaminare il meccanismo attraverso il quale la GPx funge da difesa antiossidante nella PCOS;
- Glutatione Ridotto (GSH), il quale è un importante antiossidante sintetizzato nel citoplasma in due fasi, ciascuna delle quali richiede ATP: nella prima, la  $\gamma$ -glutamylcisteina sintasi genera  $\gamma$ -glutamylcisteina a partire da glutammato e cisteina; nella seconda, la GSH sintasi genera il GSH, il quale va poi a distribuirsi nel reticolo endoplasmatico, nel nucleo e nei mitocondri, a partire dalla  $\gamma$ -glutamylcisteina e dalla glicina (Mari M et al, 2009). La sua attività antiossidante è dovuta alla capacità redox del gruppo tiolico, il quale si ossida quando il GSH

riduce la molecola target. I livelli di GSH sono nettamente inferiori nelle donne con PCOS rispetto alle donne sane (Murri M et al, 2013; Sabuncu T et al 2001; Dinger Y et al, 2005), per cui l'esaurimento del GSH in tali pazienti va a determinare l'incremento della produzione di ROS (Dinger Y et al, 2005);

- Vitamine C ed E, la cui concentrazione è decisamente inferiore sia nel siero (Kurdoglu Z et al, 2012) che negli eritrociti (Mohan S e Priya V, 2009) delle donne con PCOS rispetto che nelle donne sane.

### *1.6. Alterazioni metaboliche nella PCOS*

Gli studi metabolomici sulla PCOS suggeriscono un anormale metabolismo di carboidrati, lipidi e proteine, con conseguente coinvolgimento delle pathway metaboliche di produzione energetica (Zhao Y et al, 2012; Sun L et al, 2012; Zhao X et al, 2014).

Il micro-ambiente di sviluppo dell'ovocita è rappresentato dal fluido follicolare (FF) e dalle cellule del cumulo (CCs): alcune caratteristiche del fluido follicolare al cui interno l'ovocita è localizzato, giocano un ruolo critico nella determinazione della qualità dell'ovocita stesso e della conseguente capacità di andare incontro a fecondazione e di indurre lo sviluppo embrionale (Revelli A et al, 2009), per cui l'analisi dei prodotti intermedi del metabolismo nel fluido follicolare di donne affette da PCOS non solo fornisce informazioni sui cambiamenti metabolici nella composizione del liquido follicolare, ma riflette inoltre lo stato metabolico delle cellule del cumulo e dell'ovocita, così da permettere anche la scoperta di nuove strategie per il trattamento della PCOS. Le cellule del cumulo, ovvero le cellule specializzate che circondano l'ovocita, svolgono un ruolo vitale nella preparazione dell'ovocita per l'ovulazione, la fecondazione ed il successivo sviluppo, mediante una comunicazione bidirezionale che intercorre tra queste e l'ovocita stesso attraverso le giunzioni gap e coinvolge molecole segnale, amminoacidi, metaboliti essenziali e micro-RNA (Wigglesworth K et al, 2013; Matzuk MM et al, 2002); in aggiunta, le cellule del cumulo sono un importante marcatore biologico del potenziale di sviluppo dell'ovocita (Iager AE et al, 2013), per cui la disfunzione dei mitocondri al loro interno contribuisce alla mancata acquisizione della competenza da parte dell'ovocita e, dunque, ad un limitato successo di gravidanza (Wang Q et al, 2010). I mitocondri giocano quindi un ruolo chiave nel mantenimento dell'omeostasi metabolica e del potenziale redox intracellulare e sono le principali fonti di specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Dumollard et al, 2009), per cui alterazioni della loro funzione o

biogenesi sono spesso associate ad insulino-resistenza ed intolleranza al glucosio (Cheng Z et al, 2010) e sono presenti nei leucociti e nelle cellule endoteliali delle pazienti affette da PCOS, il che le associa all'incremento del rischio di patologie vascolari e diabete mellito di tipo II (Victor V et al, 2011); inoltre, l'insulino-resistenza gioca un ruolo centrale nella patogenesi della PCOS (Arslanian SA et al, 2001) in quanto va a provocare iper-insulinemia ed accelera l'over-produzione di androgeni a livello ovarico (Dunaif A et al, 1992), con l'iper-insulinemia che, a sua volta, contribuisce allo sviluppo di diabete e dislipidemie (Dunaif A, 1997). Inoltre, le pazienti affette da PCOS, presentano anche l'incremento dello stress ossidativo e la riduzione della capacità antiossidante (Fencki V et al, 2003).

Pazienti con fenotipo classico di PCOS mostrano nel fluido follicolare alterazioni dei metaboliti intermedi della glicolisi, della  $\beta$ -ossidazione degli acidi grassi, del catabolismo degli amminoacidi ramificati, del ciclo dell'acido tricarbossilico e del catabolismo del NAD, mentre nelle cellule del cumulo disfunzione mitocondriale, squilibrio del potenziale redox ed incremento dello stress ossidativo, il che provoca l'alterazione dei processi di crescita follicolare e di sviluppo ovocitario, causando in tali donne la riduzione del tasso di gravidanza.

Queste pazienti, rispetto alle donne sane, presentano nel fluido follicolare livelli più bassi di lattato e più elevati di piruvato, il che è dovuto alla riduzione dell'espressione dei geni LDH-A ed LDH-B codificanti per due subunità dell'enzima lattato deidrogenasi (LDH) nelle cellule del cumulo: essendo il piruvato il prodotto finale della glicolisi, tali donne esibiscono, in associazione con la disregolazione dell'espressione dell'enzima LDH, l'incremento dell'attività glicolitica, il che è confermato dall'assenza di differenza, rispetto alle donne sane, nella quantità di ATP presente all'interno delle cellule del cumulo. Inoltre, la disfunzione mitocondriale, lo squilibrio del potenziale redox e l'incremento dello stress ossidativo nelle cellule del cumulo, vanno ad ostacolare il metabolismo mitocondriale, inducendo l'intensificazione della glicolisi per compensare il rifornimento energetico (Zhao H et al, 2015).

Ad oggi, sono anche state identificate numerose interazioni tra questi metaboliti intermedi e le proteine della cromatina, in grado di provocare modificazioni epigenetiche (Gut P e Verdin E, 2013). Il lattato è infatti un inibitore degli enzimi istone deacetilasi (HDACs), per cui svolge un ruolo molto importante nell'espressione genica e nella regolazione trascrizionale (Latham et al, 2012), e quindi il suo basso livello nel fluido follicolare di donne con PCOS va a provocare considerevoli modificazioni epigenetiche. Il  $\beta$ -

idrossibutirrato, come il lattato, inibisce anch'esso gli enzimi HDACs, in particolar modo le HDACs 1, 3 e 4, determinando quindi l'incremento dell'acetilazione degli istoni H3K9 ed H3K14 e, conseguentemente, una conformazione della cromatina in grado di permettere la trascrizione di numerosi geni coinvolti nella risposta al danno ossidativo, quali Foxo3A ed Mt2 (Zhao et al, 2015): l'attivazione di Foxo3A è il passaggio chiave per l'attivazione del follicolo primordiale (Yang JL et al, 2010) per cui, essendo il  $\beta$ -idrossibutirrato abbondante nelle donne affette da PCOS, andrà a provocare in tali pazienti la formazione di un eccesso di follicoli precoci. Inoltre, la deacetilazione degli istoni è coinvolta nella corretta distribuzione dei cromosomi durante la divisione meiotica (Ma P e Schultz RM, 2013), per cui gli elevati livelli di corpi chetonici nel fluido follicolare delle pazienti affette da PCOS riducono la capacità di sviluppo dei follicoli (Zhao H et al, 2015).

Il C3DC è un derivato del malonil-CoA, la cui formazione è catalizzata dall'enzima acetil-CoA carbossilasi a partire dall'acetil-CoA citosolica e dalla  $CO_2$ : i bassi livelli di C3DC che si riscontrano nelle cellule follicolari di donne con PCOS sono quindi indice di livelli sierici più elevati di malonil-CoA il quale, a sua volta, è in grado di inibire allostericamente l'enzima carnitina palmitoiltrasferasi 1 (CPT1), con conseguente riduzione dell'ingresso degli acidi grassi all'interno dei mitocondri e quindi della loro ossidazione per la produzione di energia (Zhao H et al, 2015).

Le pazienti con PCOS presentano anche elevati livelli di succinato nel fluido follicolare, il quale contribuisce alla diminuzione della biogenesi dei mitocondri: esso, infatti, è un inibitore competitivo dell'enzima istone demetilasi per cui va a provocare alterazioni nello stato di metilazione degli istoni e del DNA nell'intero genoma (Xiao et al, 2012) il che, conseguentemente, contribuisce all'incremento del tasso di metilazione del gene codificante il promotore trascrizionale PGC1- $\alpha$  e quindi alla riduzione dei livelli del suo trascritto di mRNA, con successiva diminuzione della biogenesi mitocondriale. Il succinato, inoltre, in queste pazienti, influenza negativamente anche la capacità di sviluppo degli ovociti in quanto va ad indurre un segnale infiammatorio (Tannahill et al, 2013).

I ridotti livelli di N-metilnicotinammide (MNA) e dei prodotti finali della pathway del NAD, quali la N1-metil-2-piridone-5-carbossiammide (2PY) e la N1-metil-4-piridone-5-carbossiammide (4PY), nel fluido follicolare delle donne affette da PCOS sta ad indicare un'insufficiente riserva di NAD nelle cellule follicolari, il che va ad alterare il

normale sviluppo follicolare ed ovocitario: la mancanza di NAD, infatti, provoca la disfunzione degli enzimi NAD<sup>+</sup>-dipendenti quali le sirtuine, importanti regolatori dell'omeostasi energetica della cellula, in particolar modo per quanto riguarda le funzioni dei mitocondri e la trasduzione dei segnali intracellulari (Zhao et al, 2015). Le sirtuine possono infatti regolare la funzione mitocondriale attraverso processi di deacetilazione, demalonilazione e desuccinazione (He W et al, 2012; Sauve AA e Youn DY, 2012), per cui i cambiamenti nella quantità di acetyl-CoA, succinato e C3DC, che è un prodotto derivato dal malonil-CoA, causati dall'incremento del catabolismo degli amminoacidi ramificati, della  $\beta$ -ossidazione degli acidi grassi e della lipogenesi, che si hanno all'interno delle cellule follicolari delle pazienti con PCOS, vanno ad aggravare la disfunzione delle sirtuine, alterando conseguentemente la funzione dei mitocondri delle cellule del cumulo, con la ridotta biogenesi mitocondriale in tali cellule che è dovuta non solo alla metilazione ma anche alla deacetilazione di PGC1- $\alpha$  operata da SIRT1 (Rodrigue-Way et al, 2014). Inoltre, la disfunzione di SIRT3 favorisce lo sviluppo di un maggiore stress ossidativo nelle donne con PCOS (Kawamura Y et al, 2010), il che è anche dovuto a ridotti livelli di 2PY nel fluido follicolare a causa della diminuzione dell'azione protettiva operata attraverso l'inibizione delle PARPs e dalla deplezione del NAD (Slominska E et al, 2005).

I mitocondri svolgono un ruolo fondamentale e variegato nella riproduzione, infatti sono coinvolti nel metabolismo redox cellulare, e quindi producono le ROS che fungono da mediatori dello stress ossidativo, generano intermedi del ciclo dell'acido tricarbossilico e riducono gli equivalenti utilizzati nelle difese antiossidanti (Dumollard et al, 2009). L'iperandrogenismo che si osserva nelle donne con PCOS porta ad elevati livelli di DHEA (deidroepiandrosterone), un precursore degli androgeni che funge anche da inibitore dell'enzima glucosio-6-fosfato deidrogenasi, ovvero l'enzima limitante della pathway dei pentoso fosfati (Kohler E et al, 1970; Raineri R et al, 1970) il che provoca, conseguentemente, l'alterazione negativa del metabolismo ovocitario (Jimenez PT et al, 2013) a causa dell'inibizione di tale pathway nelle cellule del cumulo, con successivo incremento sia del tasso NADP<sup>+</sup>/NADPH, sia del processo di glicolisi; lo squilibrio del potenziale redox intracellulare causa l'incremento dello stress ossidativo e questi, nel loro insieme, vanno a provocare disfunzione mitocondriale la quale, a sua volta, aggrava lo squilibrio del potenziale redox intracellulare incrementando lo stress ossidativo, dando così vita ad un circolo vizioso.

### *1.7. Approccio terapeutico*

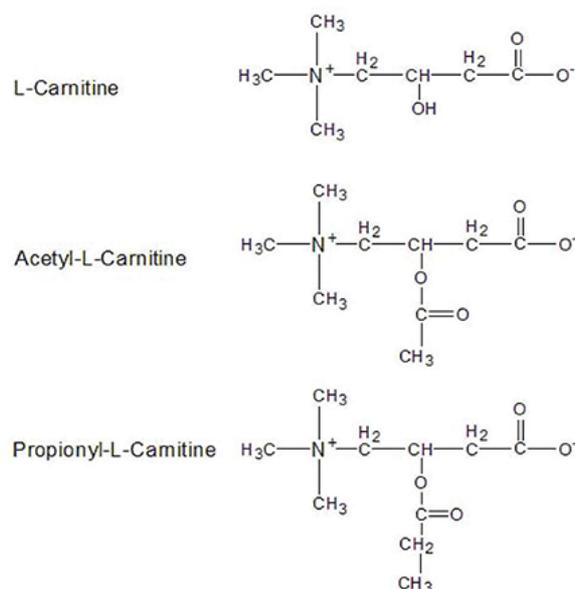
Le scelte terapeutiche variano in funzione dell'entità dei disturbi e dalla volontà o meno della paziente di avere una gravidanza: nel caso vi sia il desiderio di una gravidanza, infatti, la terapia ha come obiettivo principale la ricerca del concepimento e quindi si potranno risolvere alcuni dei disturbi legati alla sindrome. Gli obiettivi principali dell'azione terapeutica sono la riduzione degli androgeni circolanti e dei segni di iperandrogenismo (contraccettivi orali, anti-androgeni e GnRH analoghi), la riduzione della resistenza all'insulina e la prevenzione delle complicanze metaboliche e dei rischi cardiovascolari (farmaci insulino-sensibilizzanti, come la metformina), il raggiungimento di un peso corporeo ideale (dieta adeguata ed esercizio fisico), il controllo della ciclicità mestruale e/o dei sanguinamenti disfunzionali (contraccettivi orali), la correzione dell'infertilità mediante induzione dell'ovulazione spontanea e/o miglioramento della risposta alla terapia di induzione dell'ovulazione (clomifene citrato, gonadotropine esogene, GnRH pulsatile), la protezione dell'endometrio e la prevenzione del carcinoma dell'endometrio (Tresoldi G, 2009).

## 2. LE CARNITINE

La carnitina ( $\beta$ -idrossi- $\gamma$ -trimetil-ammino-butirrato) è un'ammina quaternaria idrofilica che gioca un ruolo essenziale nel metabolismo energetico in quanto è una molecola essenziale per il trasporto degli acidi grassi a lunga catena attraverso la membrana mitocondriale interna.

È stata isolata per la prima volta nel 1905 nel muscolo di bovino (Gulewitch VS e Krimberg R, 1905) e solo l'isomero L è bioattivo: quest'ultimo si trova all'interno dell'organismo principalmente nella forma non esterificata, ma può anche esistere sotto forma di esteri quali la acetil-L-carnitina, la propionil-L-carnitina e la palmitoil-L-carnitina (Figura 4) (Virmani A e Binienda Z, 2003) e nel loro insieme le carnitine appartengono ad una speciale classe di nutrienti chiamata "quasi- vitamine" o nutrienti "condizionatamente essenziali" (Vassiliadis S e Athanassakis I, 2011).

La L-carnitina può essere sintetizzata endogenamente oppure assunta con la dieta, in particolare attraverso carne e latticini (Longo N et al, 2016), per cui la sua omeostasi riflette l'equilibrio tra biosintesi endogena, assorbimento dalla dieta e riassorbimento renale (Rebouche CJ, 2004).



**Figura 4.** Struttura chimica della L-carnitina, acetil-L-carnitina e propionil-L-carnitina

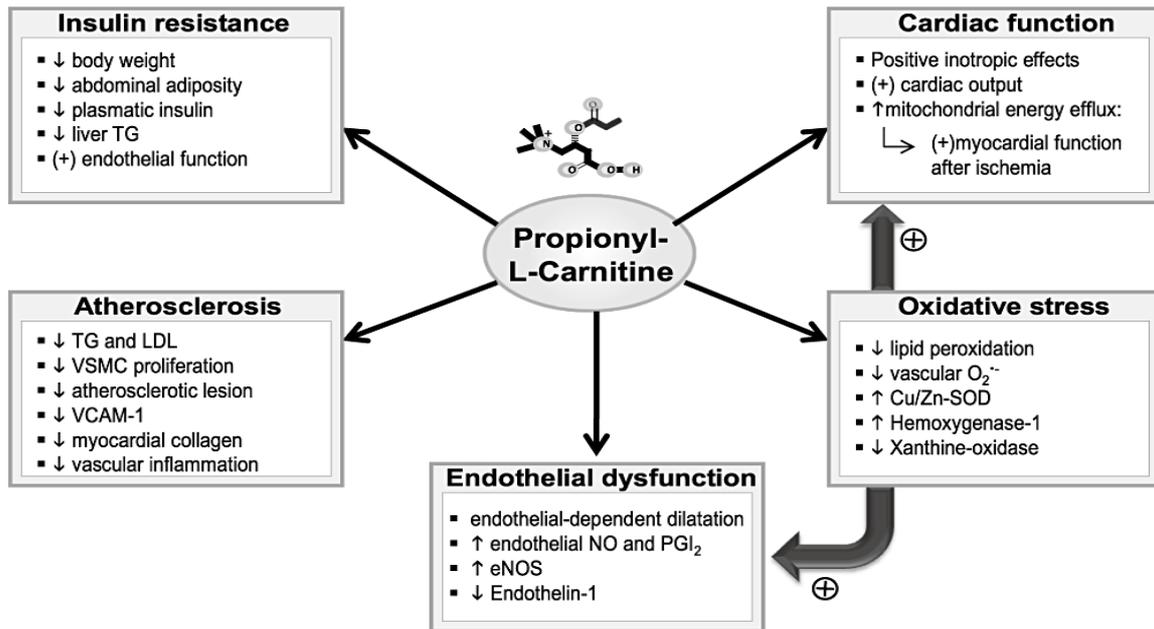
Insieme a L-carnitina, due esteri di carnitina a catena corta: acetil-L-carnitina (ALC) e propionil-L-carnitina (PLC), formano il pool endogeno di carnitina. Alcune evidenze suggeriscono che gli esteri di carnitina a catena corta (ALC e PLC) e, in particolare la PLC, possiedono maggiori effetti terapeutici rispetto alla L-carnitina stessa.

La propionil-L-carnitina (PLC) svolge un ruolo importante nel metabolismo dei carboidrati e dei lipidi, portando ad un aumento della generazione di ATP. La PLC, tuttavia, non è solo un farmaco metabolico; è anche un potente agente antiradicalico. È stato dimostrato che la PLC previene la progressione dell'aterosclerosi e, più recentemente, è stata utilizzata per migliorare alcune delle alterazioni cardiometaboliche che spesso accompagnano l'insulino-resistenza in diversi modelli di disfunzione sia cardiaca che endoteliale.

Di conseguenza, la maggior parte degli studi clinici condotti sull'uomo evidenziano come la PLC possa essere una potenziale opzione di trattamento nelle malattie cardiovascolari, specialmente in pazienti in cui siano presenti diabete mellito di tipo 2 o insulino-resistenza.

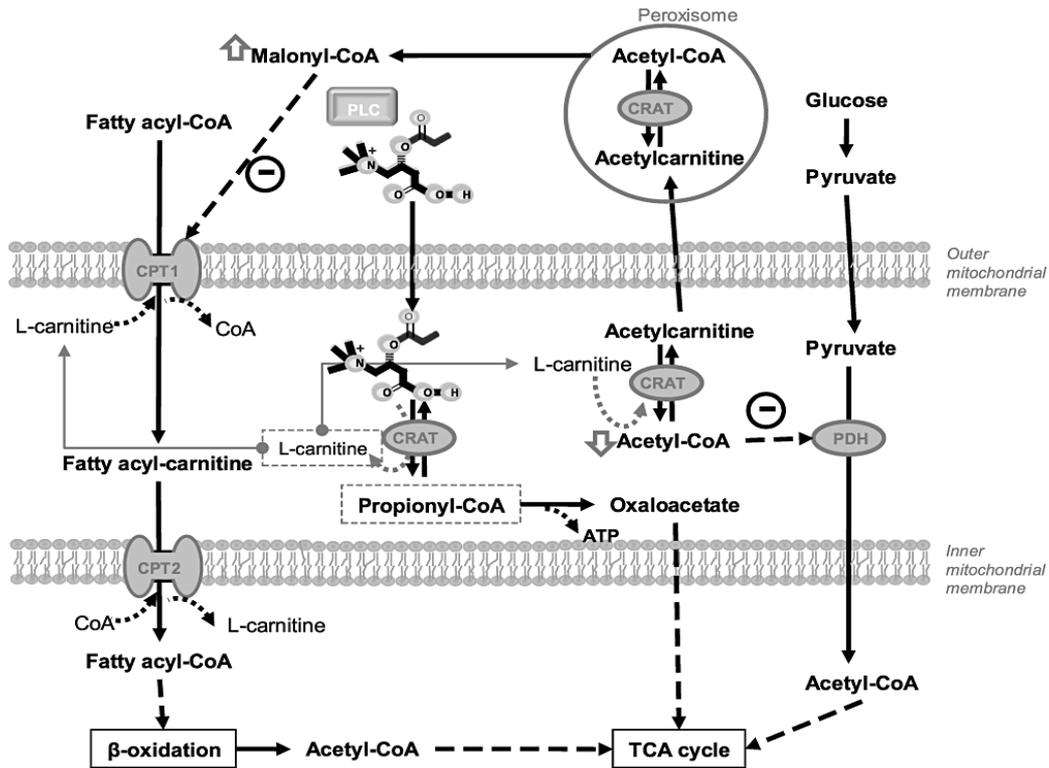
La molecola PLC si è dimostrata terapeuticamente molto più vantaggiosa della L-carnitina o dell'ALC probabilmente a causa della sua farmacocinetica e della sua elevata affinità per il muscolo scheletrico e cardiaco. Pertanto, è stata focalizzata un'attenzione particolare su questo estere a catena corta della carnitina. Quando la PLC viene somministrata in modo esogeno, a causa della sua elevata lipofilia e affinità per la acetilcarnitina transferasi, viene rapidamente convertita in L-carnitina libera e propionil-Coenzima A (propionil-CoA). In queste due forme, la PLC svolge un ruolo importante nel metabolismo sia dei carboidrati che dei lipidi, portando a un aumento dell'efflusso di ATP. È stato anche suggerito che la PLC può essere utilizzata direttamente dalle cellule prima di essere idrolizzata a propionil-CoA e L-carnitina. In effetti, è stato dimostrato che la PLC protegge i tessuti dai danni ossidativi e stabilizza le membrane biologiche influenzandone la dinamica molecolare e il turnover dei fosfolipidi.

È interessante notare che la PLC offre alcune proprietà potenzialmente più vantaggiose rispetto alla L-carnitina; l'attività della PLC è stata classicamente correlata alla funzione anaplerotica di rifornimento di substrati per il metabolismo energetico nei tessuti ischemici, vale a dire, la capacità di ricostituire gli intermedi del ciclo dell'acido tricarbossilico tramite la via dal propionil-CoA al succinil-CoA.



**Figura 5.** Effetti farmacologici attribuiti alla propionil-L-carnitina (PLC). Abbreviazioni: eNOS, ossido nitrico sintasi endoteliale; LDL, lipoproteine a bassa densità; NO, ossido nitrico; IGP2, prostaciclina; SOD, superossido dismutasi; TG, trigliceridi; VCAM-1, molecola di adesione delle cellule vascolari 1; VSMC, cellule muscolari lisce vascolari.

Numerosi studi hanno dimostrato i potenziali benefici della PLC negli stati patofisiologici aumentando le concentrazioni di L-carnitina libera intramitocondriale, diminuendo il rapporto acetil-CoA/CoA all'interno dei mitocondri mediante un efficace effetto di azione di massa sulla reazione liberamente reversibile catalizzata dall'acilcarnitina transferasi (CRAT) (Figura 6). La conseguente riduzione dell'acetil-CoA intramitocondriale diminuisce l'attività della piruvato deidrogenasi chinasi e aumenta quella della piruvato deidrogenasi con un aumento dell'ossidazione del glucosio. La riduzione del rapporto acetil-CoA / CoA può anche portare all'efflusso di acetil-L-carnitina dalla matrice al citosol, seguito da una maggiore produzione di malonil-CoA attraverso la acetilcarnitina transferasi presente nei perossisomi e, infine, dall'inibizione del trasporto degli acidi grassi a catena lunga nella matrice mitocondriale.



**Figura 6.** Effetti della propionil-L-carnitina (PLC) sul metabolismo energetico. CACT, traslcase di carnitina-acilcarnitina; CoA, coenzima A; CPT, carnitina palmitoil transferasi; CRAT, acilcarnitina transferasi; PDH, piruvato deidrogenasi; PLC, fosfolipasi C; TCA, acido tricarbossilico.

Il ruolo della PLC nel flusso di energia suggerisce un potenziale effetto terapeutico di questo derivato della carnitina nel trattamento di questi disturbi metabolici. Lo stato di insulino-resistenza è definito come una condizione in cui le cellule del corpo diventano meno sensibili agli effetti dell'insulina. Di conseguenza, i normali livelli ematici di insulina diventano inadeguati per mantenere la glicemia entro un intervallo normale. La resistenza all'insulina è anche caratterizzata dallo sviluppo di dislipidemia, steatosi epatica, disfunzione endoteliale e ipertensione. In effetti, l'effetto di un trattamento di 20 settimane con PLC è stato recentemente testato su un modello animale di obesità e insulino-resistenza. I risultati hanno mostrato una riduzione del peso corporeo, dell'adiposità addominale, dell'insulina plasmatica e del contenuto di trigliceridi nel fegato. Inoltre, la somministrazione cronica di PLC ha portato a un miglioramento della disfunzione endoteliale sviluppata da animali obesi.

L'effetto benefico del PLC sull'aterogenesi è stato segnalato per la prima volta da Spagnoli et al. nei conigli anziani con iperlipidemia indotta dalla dieta. Hanno scoperto che la somministrazione orale a lungo termine di PLC riduce i trigliceridi plasmatici, le

lipoproteine a bassa densità e le lipoproteine a bassissima densità ed è associata ad una diminuzione della proliferazione cellulare e della gravità dell'aterosclerosi aortica.

È stato dimostrato che la PLC riduce la perossidazione lipidica e l'attività della xantina ossidasi, stimolando l'espressione genica di alcuni marcatori antiossidanti, come eme ossigenasi-1 e ossido nitrico sintasi nelle cellule endoteliali umane. I dati hanno anche rivelato che l'effetto benefico della PLC sulla disfunzione endoteliale correlata all'ipertensione è fortemente legato alle sue azioni antiossidanti, poiché la somministrazione a lungo termine di PLC riduce la produzione arteriosa di  $O_2^-$ , il che probabilmente comporta una maggiore espressione aortica sia della superossido dismutasi che dell'ossido nitrico sintasi endoteliale.

Recenti ricerche hanno dimostrato che la PLC previene le lesioni strutturali e il deterioramento della funzione renale indotta dalla ri-perfusione ischemica nei reni di ratto sottoposti al trapianto. Questa azione del PLC è stata attribuita sia ad una riduzione della perossidazione lipidica che alla ridotta formazione di radicali liberi.

Altre ricerche evidenziano i potenziali benefici della supplementazione di PLC nei pazienti oncologici trattati con cisplatino. Gli effetti benefici di PLC sulla tossicità associata a cisplatino sono in parte correlati alla capacità di questa molecola di aumentare il contenuto di carnitina intracellulare. Questo porta ad una migliore efficienza della fosforilazione ossidativa mitocondriale, nonché ad una riduzione dello stress ossidativo. Orlandi e collaboratori hanno recentemente dimostrato che i meccanismi alla base dell'inibizione della crescita indotta da PLC e dell'aumento dell'apoptosi comportano l'inibizione dell'attivazione di NF- $\kappa$ B e la regolazione dell'espressione proteica inibente I $\kappa$ B- $\alpha$ . Tuttavia, il risultato più importante è stato il potenziamento della funzione mitocondriale.

L'effetto metabolico della PLC è dovuto sia all'aumento della L-carnitina libera che della propionil-CoA derivante dalla PLC. Tale effetto è specifico per la molecola di PLC perché l'aggiunta di L-carnitina o acido propionico non ha gli stessi effetti.<sup>16</sup> Il tessuto cardiaco ischemico può anche utilizzare il PLC esogeno per stimolare il ciclo dell'acido tricarbossilico attraverso la trasformazione del propionato risultante in succinato. Questo effetto anaplerotico del PLC è stato ben documentato nei cuori ischemici di ratti diabetici dopo somministrazione orale ripetuta di PLC.

## *2.1. Biosintesi endogena della carnitina*

La carnitina viene sintetizzata (1-2  $\mu\text{mol/Kg}$  di peso corporeo al giorno) fondamentalmente dagli amminoacidi essenziali lisina e metionina. Il 25% della quota giornaliera di carnitina è sintetizzato, principalmente nel fegato, nei reni e in alcune specie nei testicoli e nel cervello; la sua sintesi è svolta in organelli differenti e richiede numerosi cofattori quali piridossalfosfato, niacina, vitamina C e ferro (Beiber LL, 1988; Scaglia F e Longo N, 1999; Carter AL, 1995). La lisina fornisce lo scheletro carbonioso alla carnitina mentre i tre gruppi di 4-N-metile provengono dalla metionina. La reazione di N-metilazione è catalizzata da metiltransferasi specifiche, che usano la S-adenosilmetionina come donatore di metile. Nei mammiferi, alcune proteine contengono già residui di N'-trimetil-lisina (TML) come evento post-traslazionale in proteine del muscolo come la calmodulina, la miosina, l'actina, il citocromo c e le proteine istoniche. (Vaz & Wanders, 2002). L'idrolisi lisosomiale di queste proteine provoca il rilascio di TML, il primo metabolita della biosintesi della carnitina che entra nei mitocondri dove viene idrossilato in posizione 3 dalla TML diossigenasi (TMLD) per produrre 3-idrossi-TML (HTML), tale processo richiede vitamina C e ferro come cofattori; poi ritorna nel citosol dove viene scisso ad opera della HTML aldolase piridossalfosfato dipendente (HTMLA) per produrre 4-trimetilamminobutirraldeide (TMABA) e glicina (Scaglia F e Longo N, 1999). La deidrogenazione di TMABA da parte della TMABA deidrogenasi NAD<sup>+</sup>-dipendente (TMABA-DH) provoca la formazione di 4-N-trimetilaminobutirrato (butirrobetaina). Nell'ultimo passaggio, la  $\gamma$ -butirrobetaina idrolasi (BBD), una diossigenasi citosolica, inserisce in posizione 3 il gruppo idrossilico (ossidrile che la carnitina utilizza per formare esteri con le porzioni aciliche), con formazione della 3-idrossi-4-N-trimetil-ammino-butirrato, ovvero della carnitina (Vaz FM e Wander RJ, 2002; Scaglia F e Longo N, 1999).

Le strutture chimiche degli intermedi e degli enzimi della biosintesi della carnitina sono mostrate rispettivamente nella figura 7 (Scaglia F, 1999; Vaz et al. J 2002).

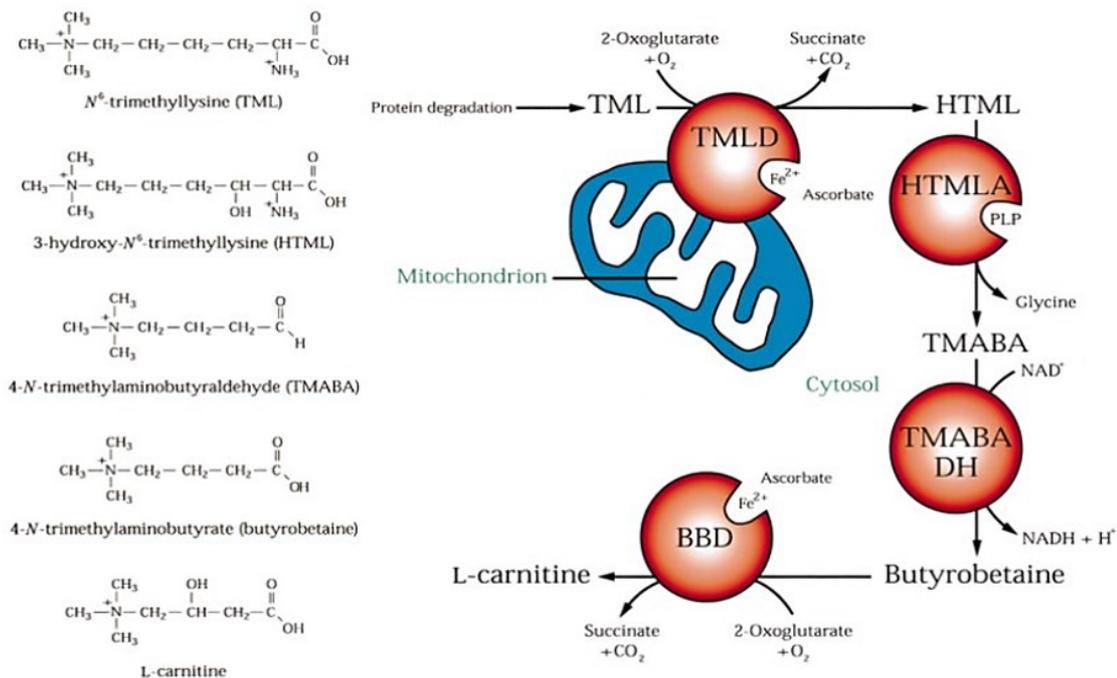


Figura 7. Struttura chimica degli intermedi e degli enzimi della biosintesi della carnitina

La disponibilità della trimetillisina intermedia limita la velocità di biosintesi della carnitina e, dato che la maggior parte dei depositi del corpo TML si trovano nelle proteine muscolari scheletriche, il *turnover* delle proteine muscolari scheletriche è considerato il fattore limitante della biosintesi della carnitina (Pande SV e Parvin R, 1980).

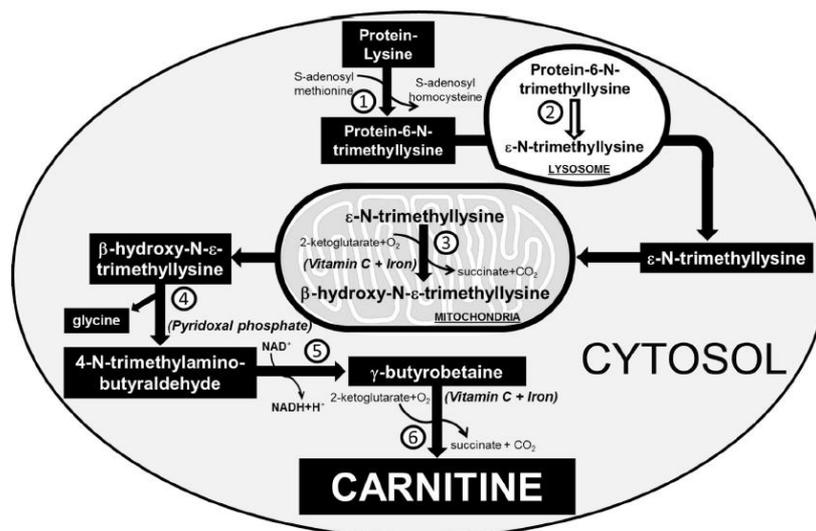
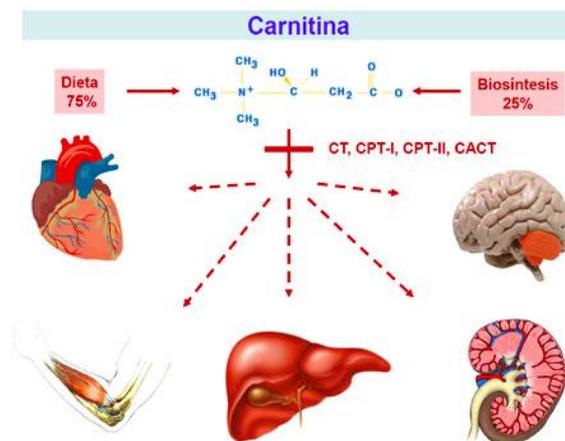


Figura 8. Processo di biosintesi della carnitina

I primi tre enzimi del processo di biosintesi endogena della carnitina, ovvero la ε-N-trimetillisina idrolasi, la β-idrossi-N-ε-trimetillisina aldolasi e la 4-N-trimetil-ammino-

butirraldeide deidrogenasi, sono ubiquitariamente presenti mentre la  $\gamma$ - butirrobetaina idrolasi è presente maggiormente nel rene, dove vi è la maggiore attività enzimatica, nel fegato e nel cervello, dove invece vi è la minore attività enzimatica misurabile; pertanto, il cuore ed i muscoli scheletrici non possono sintetizzare la carnitina e fanno affidamento esclusivamente sul trasporto da essa operato per l'ossidazione degli acidi grassi a lunga catena (Scaglia F e Longo N, 1999; Rebouche CJ e Engel AG, 1980) (Figura 9).



**Figura 9.** Organi in cui la carnitina svolge la propria azione

## 2.2. Assorbimento dalla dieta e riassorbimento renale della carnitina

La dieta media per gli adulti fornisce circa il 75% del fabbisogno giornaliero di carnitina, la quale è trasportata dal lume intestinale all'interno degli enterociti; tuttavia, una frazione di essa non è assorbita e di conseguenza viene completamente degradata dai batteri intestinali (Longo N et al, 2006; Vaz FM e Wanders RJ, 2002; Scaglia F e Longo N, 1999).

I tessuti animali contengono una quantità relativamente elevata di carnitina (tra 0.2 e  $6\mu\text{mol/g}$ ), con la concentrazione più alta che si osserva nel cuore e nel muscolo scheletrico (Vaz FM e Wanders RJ, 2002).

La sua presenza, inoltre, consente la produzione di altre sostanze che determinano il buon funzionamento del sistema nervoso a livello di memoria, di focus e di sostegno quando sottoponiamo il cervello a sforzi più intensi.

A concentrazioni normali ( $25\text{-}50\mu\text{M}$ ), la carnitina è efficacemente riassorbita mediante trasporto attivo grazie ad un trasportatore chiamato OCTN2 (Organic Cation Transporter

Novel 2), localizzato a livello dell'orletto a spazzola della membrana renale (Tamai et al, 1998; Scaglia et al, 1999).

### 2.3. Funzioni delle carnitine

La più importante funzione biologica della L-carnitina è il trasporto degli acidi grassi nei mitocondri per la successiva  $\beta$ -ossidazione, un processo che provoca l'esterificazione della L-carnitina per formare derivati denominati genericamente acil-carnitine. (Bremer., 1983; Bahl e Bressler., 1987). Il *pool* endogeno di carnitina è composto da L-carnitina e varie altre acil-carnitine che vanno dalla acetil-L-carnitina a catena corta (frazione acilica 2 di carbonio) alla stearoil-L-carnitina a catena lunga (porzione di acile 18 carbonio). La L-carnitina è il principale rappresentante nel pool di carnitina e il normale rapporto tra acil-carnitina e L-carnitina è normalmente circa 0,25; un rapporto di 0,4 o superiore è considerato anormale e rappresentativo di un metabolismo mitocondriale disturbato. Oltre al suo ruolo nel metabolismo degli acidi grassi mitocondriali, è stato accertato che la L-carnitina ha anche altre funzioni essenziali: nella regolazione del rapporto cellulare-mitocondriale tra CoA libero e acil-CoA, nel trasporto di gruppi acilici a corta e media dal perossisoma ai mitocondri e nella rimozione dei gruppi acilici in eccesso dal corpo attraverso l'escrezione renale preferenziale di acilcarnitine. (Bremer., 1983; Hoppel., 2003).

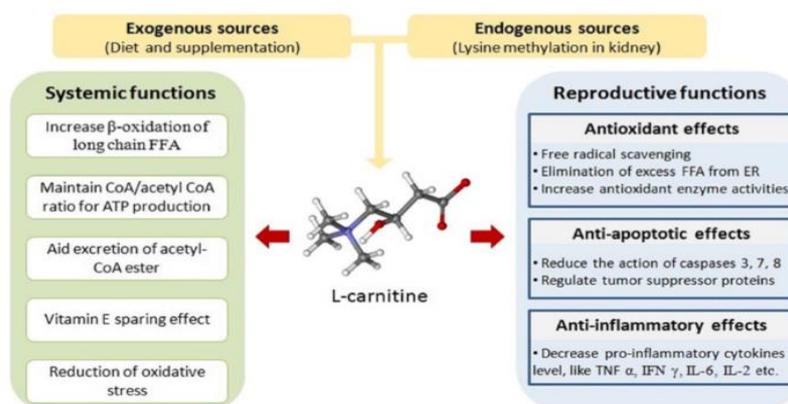
La carnitina presenta, inoltre, anche attività antiossidante, che comprende sia la funzione di *scavenger* nei confronti dei radicali liberi, sia la capacità di chelare gli ioni metallici (Abdelrazik H, 2009).

Oltre a ciò, essa permette anche la riduzione del danno al citoscheletro ed al DNA dell'ovocita (Mansour G et al 2009; Abdelrazik H et al, 2009), e non vi sono dubbi che lo stress ossidativo influenzi negativamente l'acquisizione della competenza per lo sviluppo da parte dell'ovocita durante la maturazione *in vitro* (Combelles CM et al, 2009) e lo sviluppo embrionale (Guerin P et al, 2001): infatti, l'aumento della produzione di ROS porta all'arresto dello sviluppo embrionale o ad uno sviluppo embrionale incompleto, con conseguente ritardo nella crescita dell'embrione (Agarwal A et al, 2005; Guerin P et al, 2001), ed induce anche danno alla membrana cellulare ed al DNA ed apoptosi, con quest'ultima che si traduce in embrioni frammentati e quindi con una capacità di impianto limitata, provocando conseguentemente la riduzione della fertilità (Jurisicova A et al, 1996). In questo senso, lo studio di Cetinkaya et al. ha determinato che la supplementazione con L- carnitina previene la deplezione degli *scavenger* dei

radicali liberi, come ad esempio il glutatione ridotto, ed aumenta in modo significativo i livelli dell'enzima SOD (SuperOssido Dismutasi) (Cetinkaya A et al, 2006). Per di più, essa migliora la funzione mitocondriale durante il processo di invecchiamento (Panneerselvam KS e Kumaran S, 2006) e ne stabilizza la membrana così da incrementare il rifornimento energetico per gli organelli e proteggere la cellula da morte apoptotica (Jurisicova A et al, 1996).

Invece, per quanto riguarda la funzione nervosa, il principale ruolo modulatore della L-carnitina consiste nel trasferimento, da essa mediato, di gruppi acetilici per la sintesi dell'acetilcolina, così da influenzare le *pathway* di trasduzione del segnale e l'espressione genica (Binienda ZK e Ali SF, 2001).

La L-carnitina riduce anche la concentrazione trans-cardiaca di endotelina, la cui funzione è quella di costringere i vasi sanguigni provocando conseguentemente l'aumento della pressione arteriosa (Lango et al, 2005), per cui favorisce il rilassamento endotelio dipendente (Cipolla et al, 1999) e quindi migliora in parte la reattività vascolare (Irat et al, 2003).

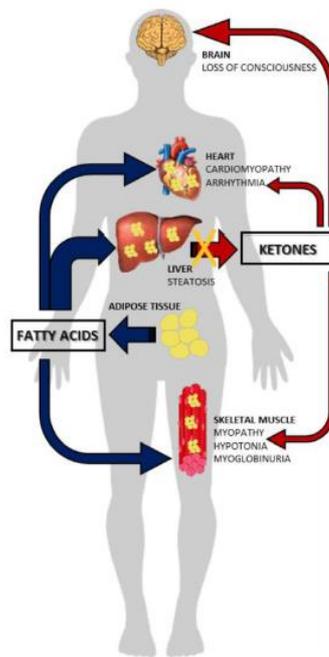


**Figura 10.** Funzioni delle carnitine

### 2.3.1. Ruolo delle carnitine nell'ossidazione degli acidi grassi

Glucosio, acidi grassi e aminoacidi sono i tre substrati che un organismo può utilizzare per mantenere l'omeostasi metabolica. Sono necessari per la generazione di energia, ma anche come elementi costitutivi della biosintesi di (macro) molecole. La via principale per la degradazione degli acidi grassi è la  $\beta$ -ossidazione degli acidi grassi mitocondriali (Bartlett ed Eaton 2004). La  $\beta$ -ossidazione è una via metabolica chiave per l'omeostasi energetica in organi come il fegato, il cuore e il muscolo scheletrico. Durante il digiuno, quando l'apporto di glucosio diventa limitato, la  $\beta$ -ossidazione è di particolare

importanza. In questa condizione, la maggior parte dei tessuti, tranne il cervello, può utilizzare direttamente gli acidi grassi per generare energia. Inoltre, il fegato converte gli acidi grassi in corpi chetonici, un processo per il quale la  $\beta$ -ossidazione è indispensabile. I corpi chetonici fungono da fonte di energia aggiuntiva che viene utilizzata da tutti i tessuti incluso il cervello, che non può utilizzare gli acidi grassi provenienti dai depositi adiposi. (Houten SM e Wanders RJ, 2010; Longo N et al, 2006).



**Figura 11.** Ossidazione degli acidi grassi in condizioni di digiuno

Il metabolismo mitocondriale degli acidi grassi citostolici inizia con l'attivazione dell'acido grasso a opera della acil-CoA sintasi per formare l'acil-CoA. Il risultante tioestere è quindi in grado di attraversare la membrana mitocondriale esterna attraverso un canale anionico voltaggio-dipendente nello spazio inter-membrana dove subisce la transesterificazione da parte della carnitina aciltransferasi. la L-carnitina viene legata all'acile per formare la corrispondente acilcarnitina e il CoA libero (McGarry e Brown 1997). Questa acilcarnitina viene quindi trasportata attraverso la membrana mitocondriale interna ad opera della L-carnitina/acilcarnitina translocasi legata alla membrana, in cambio di una L-carnitina libera all'interno dei mitocondri (Pande., 1975;1980). Una volta all'interno della matrice mitocondriale, l'acilcarnitina e il CoA libero mitocondriale vengono sottoposti a transesterificazione inversa dalla carnitina aciltransferasi per

liberare la L-carnitina e formare il corrispondente acil-CoA che entra nella via della  $\beta$ -ossidazione degli acidi grassi (Bremer 1983; Hoppel 2003).

Sono stati descritti tre diversi gruppi di carnitina aciltransferasi che differiscono nella specificità del loro substrato: la carnitina acetiltransferasi che mediano la transesterificazione dei gruppi acilici a catena corta; la carnitina ottanoiltransferasi che utilizzano come substrati gruppi acilici a catena media; e la carnitina palmitoiltransferasi che coinvolgono le frazioni aciliche a catena lunga (Bremer 1983; Hoppel 2003 Miyazawa., 1983; Bieber., 1988).

Dato che né gli acidi grassi liberi né l'acil-CoA sono in grado di muoversi da sole attraverso la membrana mitocondriale interna, il ruolo della L-carnitina e della carnitina aciltransferasi nel metabolismo degli acidi grassi è vitale.

Le fonti di acidi grassi sono principalmente tre: fonte esogena, in cui gli acidi grassi entrano nelle cellule dal sangue o dal lume intestinale; sintesi de novo a partire dall'acetil-CoA; idrolisi intracellulare di proteine, fosfolipidi e trigliceridi acilati (Cooper DE et al, 2015). Gli acidi grassi endogeni sono mobilizzati a partire dal tessuto adiposo e trasportati nella circolazione sanguigna mediante legame alle albumine.

Le proteine implicate nel trasferimento di questi acidi attraverso la membrana plasmatica sono chiamate FATPs (Fatty Acid Transport Proteins), FAT/CD36 (Fatty Acid Translocate), caveoline e FABPpm (plasma membrane Fatty Acid Binding Proteins) (Berlanga A et al, 2014; Schrader M et al, 2015; Anderson CM e Stahl A, 2013). All'interno della cellula, subiscono un'acilazione vettoriale catalizzata dall'acil-CoA sintasi (ACS), che li intrappola nel citoplasma come acil-CoA tioesteri; questi, a loro volta, vengono trasportati attraverso diverse pathway metaboliche nei mitocondri, nei perossisomi e nei microsomi in base allo stato energetico delle cellule (Schrader M et al, 2015).

Nello specifico, a livello mitocondriale, la membrana è impermeabile agli acil-CoA e quindi gli acidi grassi devono essere legati alla carnitina per entrare, la quale è accumulata all'interno delle cellule del cuore, del muscolo e del rene grazie al trasportatore ad elevata affinità OCTN2, mentre nel fegato è presente un altro trasportatore a bassa affinità ma ad elevata capacità (Scaglia F et al, 1999). La carnitina forma un legame estere ad elevata energia con gli acidi grassi a catena lunga tramite l'azione di CPT-1 (Carnitine Palmitoyl Transferase 1), localizzato a livello della membrana mitocondriale esterna, andando a formare l'acilcarnitina (Longo N et al, 2006).

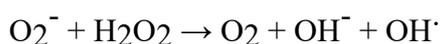


antiossidanti, i quali permettono il bilanciamento tra la generazione e l'inattivazione delle ROS e sono rappresentati principalmente da tre enzimi, ovvero glutazione perossidasi, catalasi e superossido dismutasi.

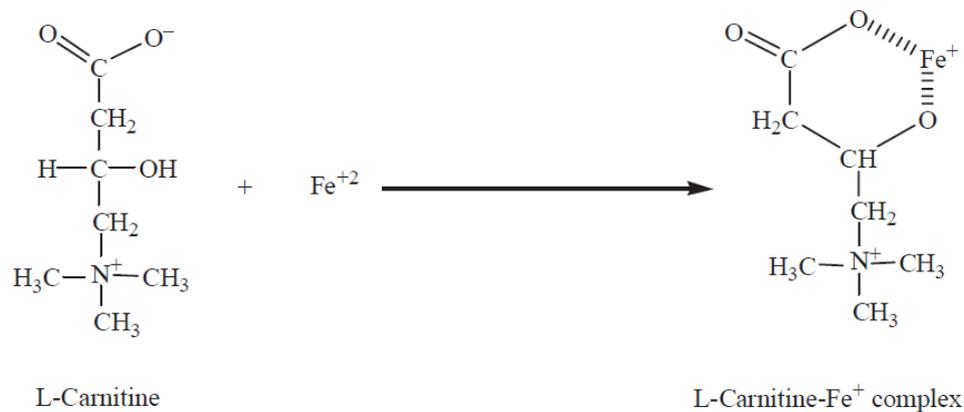
Tuttavia, in condizioni patologiche, le ROS sono over-prodotte, e tendono ad accumularsi nel momento in cui le difese antiossidanti endogene sono inadeguate, provocando conseguentemente stress ossidativo: lo squilibrio tra ROS e meccanismi di difesa antiossidanti porta quindi a modificazioni ossidative sia della membrana cellulare che delle molecole intracellulari (Duh PD et al, 1999; Buyukokuroglu ME et al, 2001).

Essa, inoltre, previene lo stress ossidativo regolando la produzione di ossido nitrico, la respirazione cellulare (Brown GC, 1999) e l'attività degli enzimi coinvolti nella difesa dagli agenti ossidanti (Kremser K et al, 1995); svolge un'azione protettiva nei confronti dell'enzima mitocondriale succinato deidrogenasi e degli enzimi antiossidanti catalasi e superossido dismutasi contro la tossicità indotta dall'acido 3- nitropropanoico (Binienda ZK e Ali SF, 2001), e riduce le alterazioni associate all'età e di cui i radicali liberi sono la principale causa (Kalaiselvi T e Panneerselvam C, 1998); inoltre, previene l'accumulo dei prodotti finali della perossidazione lipidica e presenta maggior una capacità antiossidante totale rispetto all' $\alpha$ -tocoferolo ed al trolox (Gulcin I, 2006). Per di più, è stato osservato che l'acetil-L-carnitina potenzia la capacità di apprendimento negli animali anziani (Ando S et al, 2001), migliora i sintomi delle patologie neurodegenerative come la malattia di Alzheimer (Pettegrew JW et al, 2000) ed attenua il danno neurologico che si instaura in seguito ad ischemia cerebrale (Calvani M e Arrigoni-Martelli E, 1999).

Inoltre, la L-carnitina ed i suoi esteri inibiscono parzialmente la perossidazione lipidica indotta dal ferro libero formando complessi con esso, fungendo quindi anche da agenti chelanti gli ioni metallici (Arduini A, 1992) (Figura 13), con tale effetto che è concentrazione dipendente, impedendo così l'elevata produzione di ROS da questi catalizzata attraverso la reazione di Haber-Weiss (Haber F and Weiss J, 1934)

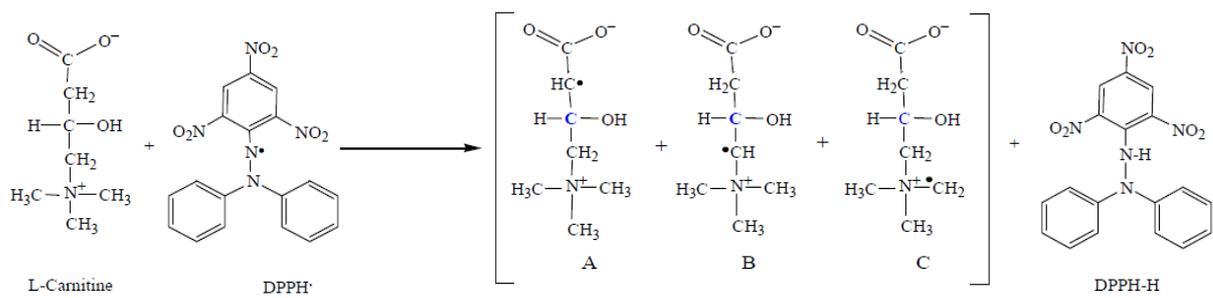


od anche attraverso la reazione di Fenton (Miller DD, 1996)  $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}^\cdot$



**Figura 13.** Meccanismo attraverso cui la L-carnitina chela gli ioni ferrosi

L'attività antiossidante della L-carnitina è stata determinata mediante il metodo DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazile) (Gulcin I, 2006), normalmente utilizzato per quantificare la capacità di scavenger di numerose sostanze antiossidanti (Ozcelik B et al, 2003). Nel saggio DPPH, le sostanze antiossidanti, attraverso la cessione di un atomo di idrogeno, vanno a ridurre il radicale stabile DPPH. nella sua forma non radicalica DPPH-H: è quindi possibile stimare la capacità antiossidante della sostanza in esame misurando il decremento dell'assorbanza del DPPH. a 517 nm che si ha nel momento in cui questo accetta un elettrone od un atomo di idrogeno dal composto antiossidante, passando così da una colorazione viola ad una gialla, diventando una molecola diamagnetica stabile (Matthaus B, 2002). Per quanto riguarda la L-carnitina, l'estrazione dell'atomo di idrogeno si verifica prevalentemente a livello dell'atomo di carbonio in posizione due rispetto all'atomo di carbonio in posizione  $\alpha$  (Figura 14).



**Figura 14.** Schema della reazione tra L-carnitina e DPPH'

### 3. IL RUOLO DELLE CARNITINE NELL'INFERTILITÀ FEMMINILE

Sia la LC che la ALC vengono normalmente utilizzate a scopo di ricerca nella biologia riproduttiva per migliorare la funzione mitocondriale nel trattamento dell'infertilità (Dunning KR et al, 2012; Cheng HJ et al, 2008;): nello specifico, ALC è prevalentemente impiegata per il suo effetto antiossidante ed anti-aging, la LC per favorire la capacità dell'organismo di ossidare le cellule adipose così da produrre energia e bruciare i grassi (Rebouche CJ, 1992) .

Infine, essa presenta anche un effetto anti-infiammatorio in quanto l'integrazione della dieta con LC diminuisce l'effetto anti-proliferativo indotto dalla presenza di interleuchine come TNF- $\alpha$ , la quale, per quanto riguarda l'embrione precoce, riduce il consumo di glucosio (Pampfer S et al, 1994) e la crescita della *inner cell mass* e del trofoectoderma nella blastocisti, il che porta al ritardo dello sviluppo embrionale ed alla riduzione della vitalità dell'embrione, fino alla sua morte (Glabowski W et al, 2005; Whiteside EJ et al, 2003).

È stato osservato che durante lo sviluppo ovocitario il complesso cumulo-ovocita (COC) svolge un ruolo essenziale nel metabolismo lipidico e quindi nella produzione di energia: pertanto, nell'ovocita, il mantenimento di un corretto metabolismo lipidico senza o con la minima generazione di radicali liberi è necessario per preservarne la qualità (Dunning KR et al, 2010).

#### *3.1. Ruolo della $\beta$ -ossidazione nello sviluppo ovocitario e dell'embrione precoce*

*In vivo*, la maturazione degli ovociti di mammifero è indotta dal picco di LH (Ormone Luteinizzante), il che dà inizio ad una cascata di eventi quali la ripresa della meiosi, l'espansione delle cellule del cumulo ed infine l'ovulazione. Sia prima che durante la maturazione ovocitaria, l'ovocita cresce e gradualmente acquisisce la competenza per lo sviluppo, definita come la capacità di essere fecondato e di supportare il conseguente sviluppo embrionale e, eventualmente, fetale.

La qualità ovocitaria e la competenza per lo sviluppo sono strettamente associate con il metabolismo ed il tasso metabolico dell'ovocita e delle cellule del cumulo che lo circondano (Biggers JD et al, 1967; Sugiura K e Eppig JJ, 2005), per cui è evidente che l'ATP ha un ruolo essenziale nella determinazione della qualità ovocitaria e nello

sviluppo embrionale (Van Blerkom J et al, 1995; Nagano M et al, 2006). La completa ossidazione di una singola molecola di glucosio produce approssimativamente 30 molecole di ATP (Rich PR, 2003), per cui l'ovocita e l'embrione precoce presentano una bassa capacità sia di recuperare che di utilizzare il glucosio per la produzione di energia (Rieger D e Loskutoff NM, 1994; Saito T et al, 1994; Conaghan J et al 1993). Inoltre, durante la maturazione ovocitaria, l'espansione della matrice del cumulo richiede un'elevata quantità di glucosio per la produzione di acido ialuronico attraverso la pathway di biosintesi delle esosammine, sottraendo il glucosio alla via glicolitica (Sutton ML et al, 2004).

Fonti energetiche alternative adatte agli ovociti comprendono innanzitutto gli acidi carbossilici piruvato e lattato ma, tuttavia, la produzione di ATP a partire da essi può essere limitata a causa del loro coinvolgimento nel mantenimento dell'omeostasi redox cellulare.

Al contrario, gli acidi grassi sono di gran lunga più ricchi di energia rispetto al glucosio, in quanto l'ossidazione dell'acido grasso palmitato permette di generare 106 molecole di ATP: quindi, grazie all'elevata capacità di generare ATP, i lipidi presentano una potenziale predisposizione a supportare e promuovere la maturazione ovocitaria e lo sviluppo embrionale.

Dunning et al. hanno infatti osservato che la  $\beta$ -ossidazione è significativamente up-regolata, sia in vitro che in vivo, durante la maturazione ovocitaria; inoltre, l'espressione dell'enzima iniziale e limitante della  $\beta$ -ossidazione CPT-1B (Carnitine Palmitoyl Transferase 1B) è anch'essa significativamente up-regolata nel complesso cumulo-ovocita in risposta all'hCG rilasciato durante l'ovulazione (Dunning KR et al, 2010): infatti, il trattamento con l'Etomoxir o il malonilCoA, inibitori del CPT- 1B, arresta la maturazione ovocitaria, la quale può però essere recuperata mediante il trattamento con acido palmitico o L-carnitina (Downs SM et al, 2009). Quindi, la supplementazione del mezzo di coltura con la L-carnitina va ad up-regolare la  $\beta$ -ossidazione durante la maturazione ovocitaria così da aumentare la capacità di acquisizione da parte dell'ovocita della competenza per lo sviluppo, il che è dimostrato dal significativo miglioramento dello sviluppo embrionale (Dunning KR et al, 2010).

Numerosi studi hanno indicato che la somministrazione sia di LC che di ALC migliora condizioni quali PCOS (Samimi M et al, 2016), endometriosi (Dionyssopoulou E et al, 2005) e amenorrea (Genazzani Ad et al, 2011); inoltre, le carnitine aumentano i livelli

delle gonadotropine e degli ormoni sessuali, come anche migliorano la salute dell'ovocita (Genazzani AD et al, 2011). Per quanto riguarda la PCOS, Samimi et al. hanno osservato che la supplementazione con LC (250 mg al giorno via os per 12 settimane) porta ad una significativa riduzione del peso corporeo, dell'indice di massa corporea e della circonferenza di vita e fianchi attraverso la diminuzione dei livelli ematici di glucosio e favorisce il contrasto dell'insulino-resistenza (Samimi M et al, 2016), il che può essere attribuito all'incremento della  $\beta$ -ossidazione degli acidi grassi e del tasso metabolico basale da questa indotto (Center SA et al, 2012). Siccome le donne con PCOS presentano anche uno squilibrio tra ormoni maschili e femminili poiché le loro ovaie tendono a produrre androgeni in eccessiva quantità, lo studio di Fencki et al. ha suggerito che tali fenomeni di iperandrogenismo e/o insulino-resistenza in donne con PCOS non obese possano essere associati con l'abbassamento dei livelli sierici di LC: queste, infatti, presentano una quota totale di LC nettamente inferiore ( $40.5 \pm 5.7 \mu\text{mol/L}$ ) rispetto donne adulte sane ( $91.1 \pm 15.2 \mu\text{mol/L}$ ), ma livelli di deidroepiandrosterone (DHEA), testosterone, ormone luteinizzante (LH), lipoproteine a bassa densità (LDL) ed insulina a digiuno più elevati (Fencki SM et al, 2008). Recenti studi di metabolomica basati su analisi UPLC e spettrometria di massa hanno confermato alterati livelli di acidi grassi e carnitine nel siero di pazienti PCOS (Chen et al, 2019).

Un'altra caratteristica tipica della PCOS è l'anovulazione cronica e l'approccio standard per il trattamento di donne con infertilità da anovulazione consiste nella somministrazione di clomifene citrato per indurre l'ovulazione; tuttavia, alcune donne non riescono ad ovulare nonostante assumano dosi crescenti di clomifene citrato e, pertanto, vengono definite clomifene citrato-resistenti. Ismail et al. hanno osservato che la somministrazione di clomifene citrato insieme a LC aumenta sia il tasso di ovulazione che quello di gravidanza nelle donne con PCOS clomifene citrato-resistenti; inoltre, l'integrazione con L-carnitina aumenta il numero di follicoli in grado di ovulare (diametro  $\geq 17$  mm), la  $\beta$ -ossidazione e la maturazione ovocitaria, come anche i livelli sierici di estradiolo e progesterone (Ismail AM et al, 2014). Un trattamento alternativo per indurre l'ovulazione in pazienti con PCOS clomifene citrato-resistenti consiste in nel trattamento terapeutico con gonadotropine; tuttavia, alcune di queste donne non rispondono ad entrambi i trattamenti: l'aggiunta di LC alla terapia stimola la crescita dei follicoli dominanti, favorendo il tasso di gravidanza; inoltre aumenta lo spessore medio dell'endometrio e la dimensione dei follicoli ovarici ancora presenti (Latifian S et al, 2015).

Per quanto riguarda l'amenorrea ipotalamica funzionale (FHA), è una forma di ipogonadismo ipogonadotropico dovuto all'alterazione del rilascio pulsatile da parte dell'ipotalamo dell'ormone di rilascio delle gonadotropine (GnRH), il che provoca la riduzione del rilascio delle gonadotropine, con la conseguente diminuzione della produzione di estradiolo nell'ovaio (Meczekalski B et al, 2014): è stato osservato che la somministrazione di ALC (1 gr/giorno via os per 16 settimane) a pazienti affette da FHA incrementava i livelli di LH contrastando specifiche pathway neuroendocrine con effetto inibitorio sull'asse riproduttivo (asse ipotalamo-ipofisi-gonadi), come la pathway oppioidergica, ed alterando la funzione di proteine ed ormoni attraverso l'acetilazione dei gruppi -OH degli amminoacidi serina, treonina e tirosina, così da potenziarne la funzione (Genazzani AD et al, 2011).

### *3.2. Studi in vitro ed in vivo*

#### *3.2.1. Studi in vitro e di riproduzione assistita*

Grazie ai loro effetti benefici sulla fertilità femminile, le carnitine sono state utilizzate in numerosi studi in vitro incentrati sul miglioramento della salute e della maturazione degli ovociti, sullo sviluppo embrionale e sulla riproduzione assistita; esse infatti permettono di ridurre il ritardo dello sviluppo embrionale dovuto alle ROS, la frammentazione del DNA e lo sviluppo di una blastocisti anormale a causa di una coltura prolungata (Abdelrazik H e Agarwal A, 2009; You J et al, 2012; Mishra A et al, 2016)

È stato infatti osservato che l'integrazione del mezzo di coltura con ALC (0,3, 0,6 e 1,2 mM per 5 ore e 24 ore) stabilizzava la membrana mitocondriale, aumentava il rifornimento energetico agli organelli e proteggeva l'embrione in via di sviluppo dall'apoptosi indotta dalla pathway mitocondriale, impedendone la frammentazione (Pillich RT et al, 2005). Per di più, l'integrazione del mezzo di coltura con LC (0,3 e 0,6 mg/mL), oltre a mostrare effetti antiapoptotici, incrementava il tasso di sviluppo della blastocisti (Abdelrazik H et al, 2009).

Inoltre, siccome le donne con endometriosi presentano un marcato aumento della concentrazione di TNF- $\alpha$  nelle cellule della granulosa (Agarwal A et al, 2005; Carlberg et al, 2000; Bedaiwy MA e Falcone T, 2003; Gupta S et al, 2008), il che porta alla

riduzione della dimensione della inner cell mass e della proliferazione del trofoectoderma nella blastocisti, è stato osservato che l'integrazione del mezzo di coltura con la stessa quantità di LC (0,3 e 0,6 mg/mL) permetteva di neutralizzare l'effetto antiproliferativo del TNF- $\alpha$  e di limitare il danno al DNA durante lo sviluppo (Abdelrazik H e AgarwalA, 2009).

La supplementazione del mezzo di coltura con la stessa quantità di LC (0,3 e 0,6 mg/mL) durante la maturazione in vitro degli ovociti, ne favoriva l'acquisizione della competenza per lo sviluppo, in quanto ne migliorava la maturazione citoplasmatica e nucleare, e riduceva i livelli di ROS nel mezzo di maturazione, mostrando un effetto antiossidante (Zare Z et al, 2015).

La stessa dose di LC (0,6 mg/mL) presentava anche un effetto protettivo nei confronti di ovociti ed embrioni contro gli effetti tossici del liquido peritoneale in donne con endometriosi, riducendo i livelli di apoptosi negli embrioni e potenziando la struttura microtubulare e cromosomica (Mansour G et al, 2009). Tale dose di LC (0,6 mg/mL), utilizzata per l'integrazione di un mezzo di maturazione di ovociti allo stadio di vescicola germinale, accresceva anche la proporzione di ovociti con un normale fuso mitotico in MII (Moawad AR et al, 2014).

Khanmohammadi et al. hanno valutato gli effetti della supplementazione del mezzo di coltura con LC (0,5 mg/mL) su numerosi indicatori dello sviluppo embrionale e della qualità della blastocisti quali lo spessore della zona pellucida, il tasso di *hatching* ed il numero di cellule della blastocisti: a tale concentrazione, la L-carnitina svolgeva un'azione antiossidante ed intensificava il metabolismo lipidico mitocondriale così da incrementare il numero di cellule della blastocisti, l'espansione della blastocisti stessa e l'assottigliamento della zona pellucida, così da promuovere la qualità della blastocisti, portando ad un *hatching* e ad un impianto di successo; tuttavia, la L-carnitina, ad elevate concentrazioni (4 mg/mL) aveva un effetto tossico sullo sviluppo embrionale *in vitro* e sulla qualità della blastocisti (Khanmohammadi N et al, 2016).

### 3.2.2. Studi su modelli murini

Virmani et al. hanno riportato che il trattamento di topi sia con LC che con ALC mostrava un incremento nel numero di ovociti maturi ed una minor degradazione ovocitaria, determinando che tale co-trattamento permetteva di conservare la qualità e la quantità di ovociti nel topo (Virmani MA et al, 2015). Sempre Virmani et al. hanno mostrato che la

somministrazione di carnitine (LC 0,4 mg/topo + ALC 0,12 mg/topo) a topi femmina CD1 di 8 settimane non solo aumentava il numero di ovociti formati, ma anche il numero di nati vivi da topi in cui era stata indotta superovulazione (Virmani MA et al, 2017). Tuttavia, Christiana et al. hanno osservato che l'assunzione di LC (2,5 mg/giorno/topo per 7 giorni) da parte di giovani topi femmina BALB/c sottoposti a superovulazione e successivamente accoppiati con maschi sani, portava all'alterazione del contenuto lipidico degli embrioni pre-impianto con conseguente assenza di nati vivi da tali topi: ciò perché il contenuto lipidico è un fattore molto importante tra quelli che contribuiscono alla salute dell'ovocita ed allo sviluppo embrionale, pertanto questa alterazione può condurre all'infertilità (Christiana K et al, 2014).

Fakhrildin e Flayyih hanno inoltre determinato che in topi femmina incinta, la somministrazione di una quantità di LC pari a 0,5 ed 1 mg/kg induceva l'aumento del peso degli organi riproduttivi (ovaie, utero, tube e vagina), dello spessore dell'endometrio e delle dimensioni della prole, come anche dei livelli sierici dell'ormone luteinizzante (LH), dell'ormone follicolo stimolante (FSH) e di estradiolo (E2), con tali parametri che non differivano significativamente tra le due dosi di LC utilizzate, per cui anche una bassa dose di LC era sufficiente per conferire effetti positivi alla gravidanza ed alla prole in topi incinta (Flayyih NK, 2012).

Solo recentemente sono stati determinati gli effetti della carnitina in un modello di topo PCOS. Nello studio di Kalhori et al. (2019) è stato dimostrato che la somministrazione di LC, agendo come sostanza antiossidante e antinfiammatoria, può migliorare la funzionalità e la struttura dell'ovaio promuovendo cambiamenti dello sviluppo follicolare, dei livelli di FSH, LH, testosterone, IL-6, TNF- $\alpha$  e MDA, che sono considerati importanti fattori che influenzano la follicologenesi nella PCOS (Kalhori Z et al, 2019).

### *3.3. Possibili meccanismi d'azione dell'L-carnitina*

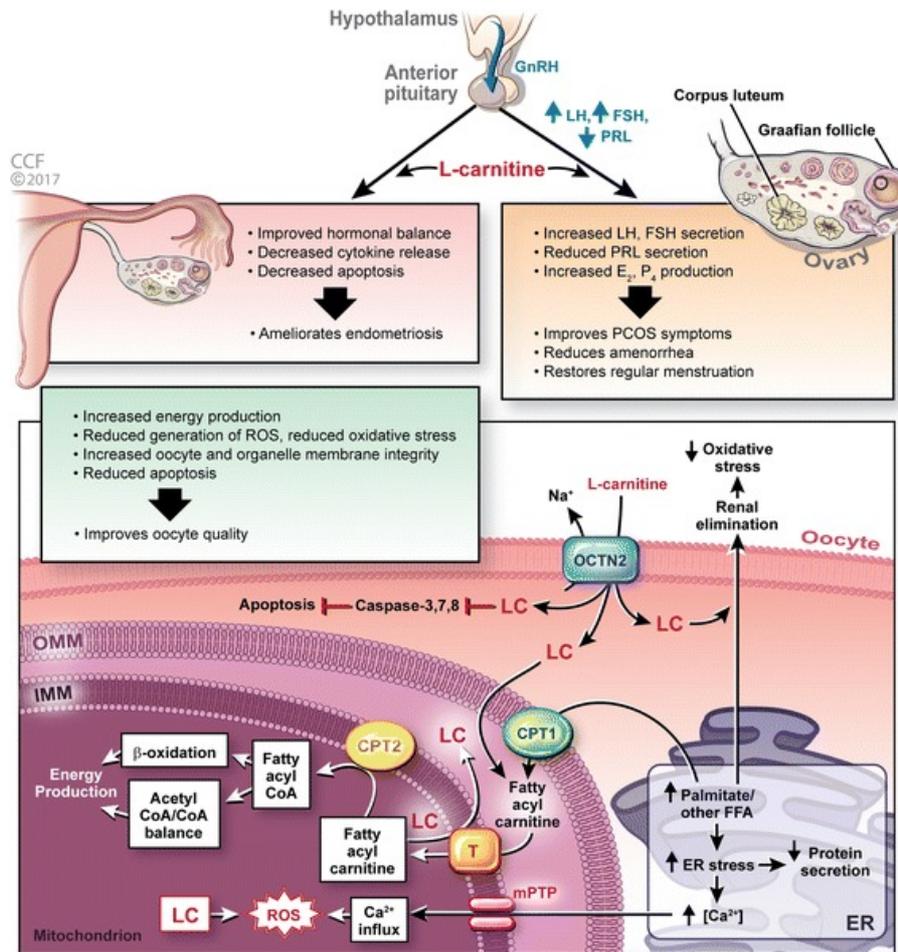
#### *3.3.1. Effetti diretti*

La LC è essenziale per il mantenimento dell'omeostasi energetica cellulare (Infante JP et al, 2002), per ridurre lo stress ossidativo (Vanella A et al, 2000) e per minimizzare la morte cellulare per apoptosi (Abdelrazik H et al, 2009), il che è necessario per una corretta crescita dell'ovocita e per la maturazione della blastocisti.

Innanzitutto, la LC favorisce il metabolismo lipidico del complesso cumulo- ovocita (COC), che è uno dei principali regolatori della maturazione ovocitaria, trasferendo gli acidi grassi nei mitocondri e facilitandone la  $\beta$ -ossidazione (Dunning KR et al, 2010): essa è acquisita dai tessuti mediante i canali  $\text{Na}^+$  voltaggio- dipendenti e trasportata negli ovociti ad opera dall'enzima Organic Cation/Carnitine Transporter Novel type 2 (OCTN-2) (Tamai I et al, 1998), dove viene convertita in ALC dall'enzima PalmitoilTrasferasi-I (CPT-1) a livello della membrana mitocondriale esterna, mentre l'enzima PalmitoilTrasferasi-II (CPT-2) è coinvolto nella rigenerazione della carnitina dall'ALC in seguito alla traslocazione degli acidi grassi a catena lunga nella matrice mitocondriale (Mingorance C et al, 2009).

All'interno dell'ovocita, la LC svolge un ruolo fondamentale nel reticolo endoplasmatico, nei mitocondri e nell'ooplasma. Nei mitocondri, è convertita in ALC così da bilanciare il tasso acetil-coenzima A/coenzima A per mantenere un adeguato metabolismo del glucosio attraverso il ciclo dell'acido tricarbossilico (TCA) e quindi produrre una maggior quantità di energia (Infante JP et al, 2002); essa inoltre riduce la concentrazione di piruvato, così da prevenire l'ingresso nel ciclo dell'acido tricarbossilico e quindi la produzione di una minor quantità di energia. (Figura 12), e funge da scavenger di ROS grazie alle sue proprietà antiossidanti. Nel reticolo endoplasmatico, modera la concentrazione di palmitato o trasferendolo ai mitocondri o eliminandolo, in quanto potrebbe causare lipotossicità per gli ovociti inducendo stress ossidativo (Infante JP et al, 2002): infatti, elevati livelli di ROS limitano la maturazione ovocitaria influenzando negativamente il COC, così da alterare lo sviluppo embrionale ed indurre la frammentazione della blastocisti (Bedaiwy MA et al, 2004).

Infine, la LC promuove anche la proliferazione cellulare e limita l'apoptosi inibendo il  $\text{TNF-}\alpha$  e gli altri agenti anti-proliferativi (Abdelrazik H et al, 2009).



**Figura 15.** Meccanismo d'azione della L-carnitina nella fertilità femminile

### 3.3.2. Effetti indiretti

La LC e la ALC influenzano anche l'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi (HPG), inducendo la secrezione degli ormoni riproduttivi (Krsmanovic LZ et al, 1992; Genazzani AD et al, 2011; Virmani MA et al, 1991). Tra i centri neurali, la concentrazione di LC è maggiore nell'ipotalamo (Bresolin N et al, 1982), dove riduce il tasso di morte delle cellule nervose ed il danno associato all'invecchiamento (Amenta F et al, 1986), grazie alla sua attività colinomimetica (Bodis-Wollner I, 1990).

Essa aumenta anche la secrezione dell'ormone di rilascio delle gonadotropine (GnRH) da parte dell'ipotalamo inducendo la depolarizzazione delle cellule nervose ipotalamiche così da incrementarne l'attività secretoria (Bigdeli H e Snyder PJ, 1978; Krsmanovic LZ et al, 1994).

La somministrazione di ALC invece accresce i livelli sierici di altri ormoni riproduttivi quali estradiolo, progesterone ed ormone luteinizzante (LH), mentre diminuisce quelli della prolattina (Krsmanovic LZ et al, 1992; Genazzani AD et al, 2011).

Quindi, attraverso il loro effetto endocrino indiretto, le carnitine possono prevenire la PCOS, l'amenorrea ed altre condizioni patologiche correlate al ciclo riproduttivo femminile.

## 4. GLI AGE ED IL LORO RUOLO NELLA RIPRODUZIONE FEMMINILE

Tra le più importanti modifiche post-traduzionali vi è la modificazione non enzimatica di proteine, lipidi ed acidi nucleici con il glucosio e la loro conseguente conversione in AGE. Gli AGE (Advanced Glycation End products) rappresentano, quindi, i prodotti finali di un processo chimico noto come reazione di Maillard, nella quale i gruppi elettrofili carbonilici del glucosio o di altri zuccheri reattivi reagiscono non enzimaticamente con i gruppi amminici primari delle proteine, specialmente con i residui basici di lisina e arginina, formando una base di Schiff non stabile, la cui ulteriore riorganizzazione porta alla formazione del prodotto di Amadori: le proteine contenenti questo prodotto sono note come proteine glicate, così da distinguerle da quelle glicosilate ottenute enzimaticamente, ed il processo di formazione è noto come glicazione. A seconda della natura di questi primi prodotti di glicazione, si vengono a formare addotti proteici o cross-linking proteici, dando origine agli AGE (Bucala R e Cerami A, 1992).

Alternativamente, gli AGE si possono formare o mediante reazioni di ossidazione, o a partire da intermedi glicolitici (gliossale, metilgliossale, 3-deossiglucosone) (Figura 13).

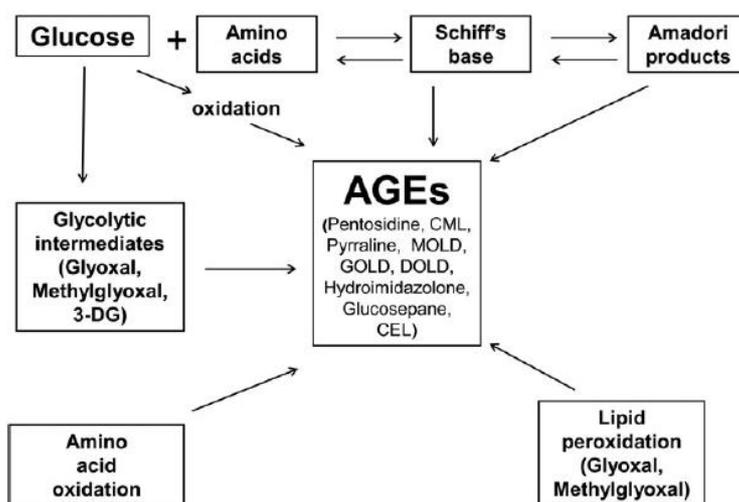


Figura 16. Schema della formazione degli AGE

Gli AGE possono essere assunti esogenamente, mediante il consumo di cibo ed il fumo di sigaretta, o prodotti endogenamente: in condizioni fisiologiche infatti, gli AGE si

formano molto lentamente mentre, in particolari condizioni di iperglicemia, insulino-resistenza, obesità, età, stress ossidativo e ipossia, si ha un'accelerazione del loro processo di formazione (Yamagishi S et al, 2005).

Tuttavia, il contenuto di AGE nell'organismo non è definito solo dal loro tasso di formazione, ma anche da quello di rimozione: le cellule infatti hanno sviluppato pathway di detossificazione contro l'accumulo di AGE come il sistema delle gliossalasi glutatione-dipendenti, che comprende le gliossalasi (Glo) I e II, le quali giocano un ruolo chiave nella difesa contro la glicazione ed usano il glutatione ridotto (GSH) per catalizzare la conversione di gliossale, metilgliossale ed altri nel D-lattato, un prodotto meno tossico (Thornalley PJ, 2003; Xue M et al, 2011). Altri sistemi enzimatici includono le ossidasi fruttosil-ammine (FAOX) e le chinasi fruttosammine, le quali riconoscono e rompono i prodotti di Amadori; tuttavia si ritrovano solo nei batteri, nei lieviti e nei funghi, e non nei mammiferi (Wu X e Monnier VM, 2003).

L'eventuale accumulo di AGE è associato a diverse patologie, come il diabete mellito di tipo 2, la sindrome metabolica, le malattie cardiovascolari, l'invecchiamento ovarico, i disordini neurodegenerativi, l'obesità e la PCOS (Yamagishi S et al, 2005; Diamanti-Kandarakis E et al, 2007; Tatone C e Amicarelli F, 2013): una volta formati, questi possono danneggiare le strutture cellulari attraverso una serie di meccanismi, tra cui la formazione di legami crociati tra le molecole chiave della membrana basale della matrice extracellulare e l'interazione con i recettori sulle superfici cellulari, portando in questo modo all'alterazione della funzione cellulare (Inagi R, 2011; Piperi C et al, 2012).

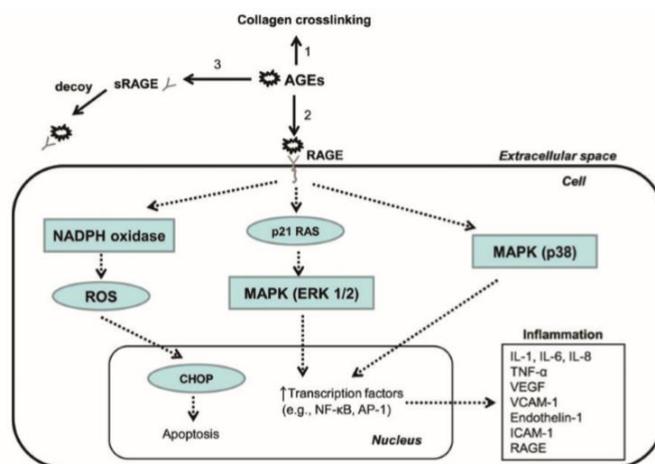
#### *4.1. RAGE*

Gli AGE circolano e agiscono su recettori della superficie cellulare noti come RAGE (Recettori per gli AGE), membri della superfamiglia dei recettori immunoglobulinici: l'interazione tra AGE e RAGE porta all'attivazione di un messaggero secondario che innesca NF- $\kappa$ B, con il conseguente sviluppo di uno stato pro-infiammatorio, tossicità cellulare e danno (Kalea AZ et al, 2009).

Il RAGE è un recettore transmembrana ed è espresso in numerosi tessuti inclusi ovaie, cuore, polmone e muscolo scheletrico, ma anche in monociti, macrofagi e linfociti (Basta G, 2008). Questo recettore è down-regolato in condizioni fisiologiche mentre con l'invecchiamento la sua espressione aumenta, probabilmente a causa dell'accumulo di

ligandi i quali, a loro volta, regolano, mediante feedback positivo, l'espressione del recettore stesso (Yan SF et al, 2007; Basta G, 2008; Kalea AZ et al, 2009).

Anche nel caso di diabete, infiammazione, aterosclerosi e PCOS, vi è una marcata induzione di RAGE a causa dell'azione dei ligandi e dei numerosi mediatori attivati dalle cellule infiammatorie (Diamanti-Kandarakis E et al, 2005). Nello specifico, il legame degli AGE stimola varie vie di segnalazione, tra cui p21-Ras ed ERK (Extracellular signal-Regulated Kinases) 1 e 2, e p38 (della famiglia delle MAPK), le quali inducono la trascrizione del fattore nucleare NF- $\kappa$ B e la conseguente attivazione di geni pro-infiammatori (Bierhaus A et al, 2005; Miyata T et al, 1994). Inoltre, l'attivazione dei RAGE può essere indotta direttamente, come dallo stress ossidativo mediante l'attivazione di ossidasi NADPH-dipendenti (NOX), dalla diminuzione dell'attivazione della superossido dismutasi (SOD), dalla catalasi e da altre pathway, od indirettamente, tramite la riduzione delle difese cellulari antiossidanti come il GSH e l'acido ascorbico (Bierhaus A et al, 2005; Loughlin DT e Artlett CM, 2010; Ramasamy R et al, 2005) (Figura 14).



**Figura 17.** Diagramma dell'effetto patogenetico degli AGE

Oltre al recettore normale, sono state descritte forme di RAGE prive sia del dominio citosolico che di quello transmembrana: queste forme, secrete extracellularmente, si ritrovano nella circolazione sanguigna e sono chiamate RAGE solubili (sRAGE) (Diamanti-Kandarakis E et al, 2005; Diamanti-Kandarakis E, 2006). Questi sRAGE sono considerati recettori “buoni”, poiché possono legare gli AGE in circolo, prevenendo gli eventi intracellulari avversi derivanti dall'interazione AGE-RAGE, infatti i loro livelli

sono down-regolati nell'iperglicemia e inversamente associati alla gravità di alcune complicanze vascolari (Basta G et al, 2006).

#### *4.2. Fattori che inducono la produzione di AGE*

I livelli di AGE nel sangue e nei tessuti dipendono da fonti endogene (reazioni chimiche) e fonti esogene (dieta e fumo). In particolare, numerosi studi su animali e uomini hanno mostrato come la dieta sia particolarmente importante: cibi ricchi di proteine e grassi, come la carne, il formaggio ed il tuorlo d'uovo, sono infatti ricchi di AGE (Goldberg T et al, 2004); inoltre, anche i metodi di cottura (ad esempio le alte temperature) aumentano drasticamente la loro concentrazione.

Uno studio su ratti femmine ha mostrato come una dieta ad alto contenuto di AGE per 6 mesi causi un aumento dei livelli sierici di questi prodotti e della presenza di RAGE nel tessuto ovarico; in aggiunta, è stato visto che, in questi animali, i livelli di glucosio a digiuno, di insulina e di testosterone, come anche il peso delle ovaie, risultano aumentati. (Diamanti-Kandarakis E et al, 2007): la presenza di AGE nel tessuto ovarico, insieme ad un profilo metabolico alterato ed a elevati livelli di testosterone, fornisce quindi prove di un doppio effetto degli AGE assunti con la dieta sulla funzione riproduttiva e metabolica (Merhi Z, 2013).

Il fumo è un'altra fonte esogena di AGE, i quali sono presenti negli estratti acquosi del tabacco e nel fumo di tabacco in una forma che può rapidamente reagire con le proteine: è stato infatti visto che i livelli sierici di AGE nei fumatori sono significativamente più elevati rispetto ai non fumatori (Cerami C et al, 1997).

#### *4.3. Correlazione tra AGE e aspetti della PCOS*

##### *4.3.1. AGE e insulino-resistenza*

Storicamente la PCOS è stata definita come un disordine dovuto ad un eccesso di androgeni; tuttavia, recenti studi hanno identificato come anche l'insulino-resistenza contribuisca in maniera significativa allo sviluppo della patologia: infatti, circa il 50-70% delle donne con PCOS presenta un certo grado di resistenza all'insulina, la quale è definita come uno stato in cui è richiesta una maggiore quantità di insulina rispetto al normale per ottenere una risposta appropriata (Diamanti-Kandarakis E, 2006). Oltre a contribuire all'iperandrogenismo associato alla PCOS, l'insulino-resistenza è anche legata allo sviluppo di una compromessa tolleranza al glucosio e di diabete mellito di tipo 2

(Legro RS et al, 1999), sia nelle donne obese che in quelle non obese affette da PCOS (Dunaif A et al, 1989).

Sebbene diversi studi abbiano dimostrato una correlazione tra i livelli di insulina a digiuno e la concentrazione di androgeni, non è chiaro se l'iperandrogenismo sia il risultato dell'iperinsulinemia o viceversa (Burghen GA et al., 1980): sia il fattore di crescita insulino-simile 1 (IGF-1) che l'insulina sono potenti stimolatori della produzione di androgeni ovarici, un'azione probabilmente mediata dal recettore dell'insulina (Burghen GA et al., 1980; Barbieri RL et al., 1988); inoltre, è possibile che l'aumento dei livelli di insulina circolante potenzi l'effetto dell'ormone luteinizzante (LH) sulle cellule della teca ovarica. Un altro meccanismo del possibile iperandrogenismo osservato nella PCOS è l'inibizione insulino-mediata della globulina legante gli ormoni sessuali, che determina un aumento degli androgeni non legati disponibili per il rilascio a livello dei tessuti bersaglio (Lindstedt G et al, 1991).

Poiché lo stress ossidativo e l'infiammazione sono strettamente associati alla resistenza all'insulina, è ipotizzabile che il sistema AGE-RAGE possa svolgere un ruolo nella patogenesi dell'insulino-resistenza osservata nella PCOS (Unoki H e Yamagishi S, 2008), indipendentemente dai livelli di glucosio circolanti, dal peso e dalla over-nutrizione/obesità. Uno studio condotto da Cai et al. ha infatti identificato gli AGE come un fattore di rischio per la resistenza all'insulina indipendente dall'over-nutrizione nei topi non obesi (Cai W et al, 2012), con tale insulino-resistenza che si manifestava prima delle alterazioni dei livelli di glucosio nel sangue. Un altro studio dimostra come i topi obesi knock-out per RAGE (RAGE  $-/-$ ) presentino un indice di valutazione del modello di omeostasi (HOMA, utilizzato per quantificare l'insulino-resistenza e la funzionalità delle cellule beta delle isole pancreatiche) superiore rispetto ai topi RAGE  $+/+$  obesi (Leuner B et al, 2012). Inoltre, un recente lavoro su donne in sovrappeso ha riportato che una dieta a basso contenuto di AGE migliora la sensibilità all'insulina (Mark AB et al, 2013).

#### *4.3.2. AGE e obesità*

Circa il 30-75% delle donne con PCOS è obesa (Ehrmann DA, 2005) e tali pazienti presentano una maggiore probabilità di subire conseguenze più gravi della PCOS, quali iperandrogenismo e sindrome metabolica, rispetto alle pazienti con un BMI normale (Kirchengast S e Huber J, 2001; Norman RJ et al., 2004); inoltre, è stato dimostrato che una modesta perdita di peso regola le mestruazioni, migliora le prestazioni riproduttive e

l'irsutismo, riduce i livelli sierici di androgeni e di insulina e migliora l'indice di sensibilità all'insulina nelle donne con PCOS (Norman RJ et al., 2004). In aggiunta, la distribuzione e la morfologia del tessuto adiposo sembrano fornire un contributo significativo alla fisiopatologia alla base della PCOS: la maggior parte delle donne affette presenta, infatti, una distribuzione addominale del tessuto adiposo (obesità centrale) indipendente dal BMI, il che è un effetto probabilmente associato all'elevata quantità di androgeni circolanti (Kirchengast S e Huber J, 2001).

Gli AGE, inoltre, sono direttamente correlati con la fisiologia degli adipociti (Jia X et al, 2012): usando linee cellulari derivanti dal tessuto adiposo (3T30LI) è stato dimostrato che gli AGE, in particolar modo il metilgliosale, stimolano l'adipogenesi.

Le donne obese presentano anche concentrazioni significativamente più basse sia di sRAGE che di adiponectina (Vazzana N et al, 2012), confermando le precedenti scoperte per le quali il livello di sRAGE è direttamente correlato con quello adiponectina, ovvero un ormone proteico che modula alcuni processi metabolici, inclusa la regolazione del glucosio ed il catabolismo degli acidi grassi, sia in soggetti diabetici che non diabetici (Choi KM et al, 2009). Oltre a ciò, è interessante notare che la perdita di peso indotta dalla dieta aumenta i livelli sierici di sRAGE del 150% (Vazzana N et al, 2012).

#### *4.3.3. AGE e infiammazione*

Gli AGE circolanti, come i derivati del metilgliosale, sono correlati con gli indicatori dell'infiammazione, quali la proteina C reattiva, CRP, e con lo stress ossidativo (Uribarri J et al, 2007). Inoltre, l'accumulo di AGE nei tessuti induce stress ossidativo cellulare e promuove l'infiammazione, aumentando in questo modo la vulnerabilità dei tessuti bersaglio alle lesioni (Vlassara H et al, 2002). La restrizione dietetica di AGE, infatti, è associata ad una significativa riduzione dei markers infiammatori, come CRP plasmatica, TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ) e VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1) (Uribarri J et al, 2011).

In uno studio con topi privi di RAGE, è stato osservato che l'assenza di questo recettore protegge i topi dalla peritonite multibatterica letale e dalla sepsi causata dalla legatura e dalla puntura dell'intestino cieco (Liliensiek B et al, 2004), mentre il recettore sRAGE si è mostrato in grado di ridurre con successo la risposta infiammatoria in numerosi modelli (Park L et al, 1998; Bucciarelli LG et al, 2002).

#### *4.3.4. Sistema AGE-RAGE sierico ed ovarico nella PCOS*

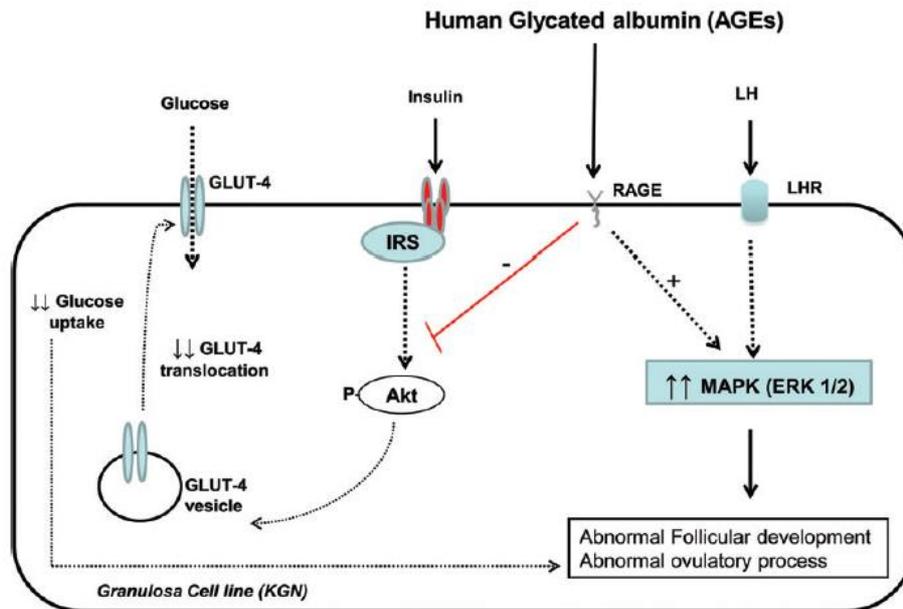
Le donne insulino-resistenti con PCOS senza iperglicemia presentano elevati livelli sierici di AGE e dell'espressione di RAGE nei monociti circolanti (Diamanti-Kandarakis E et al, 2005). Inoltre, i livelli sierici di AGE sono positivamente correlati ai livelli di testosterone e di androgeni liberi, all'insulina, all'HOMA e al rapporto vita-fianchi (Burghen GA et al, 1980).

Un altro studio ha mostrato che l'incremento dei livelli sierici di AGE è un tratto distintivo delle donne magre non insulino-resistenti, suggerendo che gli AGE sierici sono elevati nella PCOS indipendentemente dalla presenza dell'insulino-resistenza (Diamanti-Kandarakis E et al, 2008).

Recenti studi hanno inoltre dimostrato che i RAGE e le proteine AGE-modificate sono espresse nel tessuto ovarico umano (Fuji EY e Nakayama M, 2010; Tatone C e Amicarelli F, 2013): nello specifico, le donne con PCOS presentano un aumento dell'espressione di AGE e RAGE negli strati di cellule della teca e della granulosa, rispetto alle donne sane (Diamanti-Kandarakis E et al, 2007).

#### *4.4. Disfunzione ovarica collegata agli AGE*

Diamanti-Kandarakis et al. hanno dimostrato che il sistema AGE-RAGE potrebbe essere il responsabile del fallimento dell'ovulazione caratteristico della PCOS: in un modello di linee cellulari umane di granulosa, hanno osservato che gli AGE interferiscono in vitro con l'azione dell'LH portando ad una continua e anormale attivazione della pathway ERK1/2, la quale è importante per il normale sviluppo follicolare e per l'inizio del processo di ovulazione; questa inappropriata attivazione è parzialmente responsabile dello sviluppo follicolare alterato e quindi della disfunzione ovulatoria associata alla PCOS (Diamanti-Kandarakis E et al, 2013). Piperi et al. hanno ipotizzato che gli AGE all'interno dell'ovaio alterino il metabolismo del glucosio e la follicologenesi: mediante studi in vitro hanno infatti osservato che l'albumina umana glicata (HGA, ricca di AGE) inibisce la fosforilazione di Akt mediata dall'insulina e riduce significativamente la traslocazione di GLUT4 (trasportatore del glucosio) dal citoplasma alla membrana delle cellule della granulosa, concludendo che gli AGE potrebbero essere i responsabili della riduzione dell'uptake di glucosio da parte delle cellule della granulosa, con conseguente alterazione della crescita follicolare (Piperi C et al, 2013) (Figura 15).

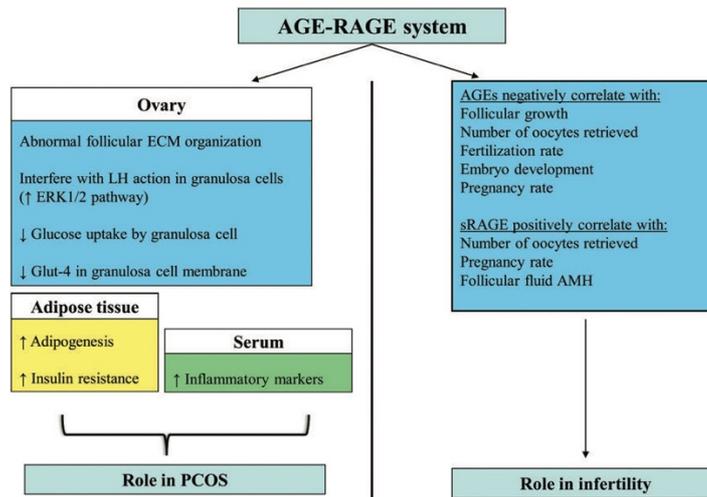


**Figura 18.** Meccanismo di riduzione dell'up-take di glucosio mediato dagli AGE

È stata inoltre documentata la relazione tra il sistema AGE-RAGE e l'infertilità: complessivamente, la letteratura fino ad oggi indica che gli AGE hanno un impatto negativo sull'esito riproduttivo nelle donne sottoposte ad ART (Assisted Reproduction Technology); inoltre, elevati livelli di AGE nelle donne senza PCOS sembrano essere correlati alla diminuzione della riserva ovarica ed alla follicologenesi funzionalmente anormale.

Al contrario, la quantità di sRAGE è positivamente correlata con il numero di ovociti recuperati, con il tasso di gravidanza e con i livelli di AMH (ormone anti- Mulleriano) nel fluido follicolare (Merhi Z, 2013) (Figura 16).

Il significato patologico di queste molecole infiammatorie di AGE, dannose per la salute dei follicoli, richiede chiaramente ulteriori indagini, ma l'individuazione di AGE specifici potrebbe offrire potenziali opzioni terapeutiche per il trattamento della diminuita risposta ovarica.



**Figura 19.** Correlazione tra il sistema AGE-RAGE e PCOS ed infertilità

## PARTE 1

### 5. SCOPO DELLA TESI

Come riportato nella parte introduttiva, sebbene i meccanismi patogenetici non siano stati ancora pienamente compresi, è noto che lo stress ossidativo rivesta un ruolo cruciale nella sindrome dell'ovaio policistico (PCOS). Nell'ultima decade è stato dimostrato che i prodotti finali della glicazione avanzata (AGE) sono coinvolti nella PCOS. La glicazione è una reazione spontanea non enzimatica tra alcuni zuccheri e i gruppi amminici liberi delle proteine, del DNA e dei lipidi che forma come prodotto finale gli AGE. Il più potente precursore degli AGE è il metilgliosale (MG), un composto dicarbonilico a basso peso molecolare che deriva dai processi metabolici. Il MG reagisce con i residui di arginina per formare gli idroimidazoloni e l'argpirimidina, qui definiti come MG-AGE. La detossificazione intracellulare degli MG-AGE dipende dall'attività del sistema delle gliossalasi che comprende gliossalasi 1 (GLO1) e gliossalasi 2 (GLO2). L'accumulo dell'MG potrebbe, quindi, derivare da un aumento del metabolismo glicolitico (come nel diabete), da una riduzione dell'attività e/o dell'espressione delle gliossalasi (come per es. nell'*aging*). L'accumulo di MG influenza le proteine mitocondriali e aumenta gli AGE, che possono attivare una *pathway* di segnalazione pro-ossidante mediata da recettore. Quindi, lo stress ossidativo è considerato un importante aspetto del cosiddetto *stress glicativo* (Rabbani and Thornalley, 2015). Numerose evidenze supportano il ruolo dell'MG nella PCOS (Diamanti-Kandarakis et al, 2007). Un recente lavoro di Di Emidio et al. (2019) ha dimostrato che nel topo la dieta supplementata con MG incrementa i livelli sierici di androstenedione, suggerendo un ruolo di MG e degli AGE nello stato iperandrogenico associato alla PCOS. Nello stesso modello è stato, inoltre, osservato che lo stress glicativo indotto da MG nella gonade femminile coinvolge il *network* di SIRT1. Questo enzima NAD<sup>+</sup>-dipendente con attività deacetilasica svolge un ruolo chiave nella follicologenesi attraverso la regolazione della biogenesi mitocondriale, delle difese antiossidanti e dell'omeostasi energetica (Tatone et al, 2018).

In questa parte del lavoro di tesi abbiamo ipotizzato che lo stress glicativo indotto da MG costituisca un aspetto importante del fenotipo ovarico della PCOS e abbiamo investigato se questa condizione è associata con la deregolazione del network di SIRT1 attraverso la regolazione della fisiologia mitocondriale e della sopravvivenza cellulare. A questo scopo, abbiamo sviluppato un modello di PCOS indotto da DHEA (deidroepiandrosterone) in topi CD-1. Il fenotipo tipico della PCOS è stato confermato

analizzando differenti parametri come la popolazione follicolare, la fibrosi ovarica, la dislipidemia, il ciclo estrale, l'ovulazione, la qualità ovocitaria e lo stress ossidativo.

Lo stress glicativo è stato dimostrato attraverso la valutazione dell'accumulo di MG-AGE nelle ovaie. In particolare, ci siamo focalizzati sull'argpirimidina, un MG-AGE, che è noto essere correlato con disfunzioni ovariche nel topo e nell'uomo. Tra le proteine che mediano l'azione SIRT1-dipendente sul mitocondrio, un ruolo importante è rivestito da PGC1 $\alpha$  (peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1 alpha), dalla SOD2 (superossido dismutasi 2) e da SIRT3, così come dalle proteine mitocondriali TFAM (mtTFA), che è un effettore a valle dell'asse SIRT1/PGC1 $\alpha$  e un marker indiretto del numero di mitocondri (Tang, 2012; Fulco e Sartorelli, 2008). In condizioni di stress, SIRT1 coopera con la protein chinasi attivata da AMP (AMPK) per ristabilire il bilancio energetico o per promuovere la morte cellulare. A tal fine, abbiamo indagato se nelle ovaie PCOS murine l'attivazione dell'asse di SIRT1/AMPK potesse essere associato con una aumentata autofagia, un tipo di morte cellulare recentemente riscontrata nelle ovaie PCOS (Li et al 2018, 2019).

## 6. MATERIALI E METODI

### 6.1. *Animali*

Il disegno sperimentale prevedeva l'utilizzo di 2 gruppi di topi femmina CD1 di 3-4 settimane (Charles River Italia), peso corporeo 20–21 g, denominati rispettivamente CTRL e DHEA. Il modello murino di PCOS è stato ottenuto attraverso la somministrazione di DHEA (deidroepiandrosterone) (Walters KA et al, 2012). Il primo gruppo (CTRL) è stato sottoposto a somministrazione sottocutanea di 100 µl di EtOH-olio di sesamo ed a somministrazione orale, tramite gavage gastrico, di 100 µl di acqua; il secondo gruppo (DHEA) è stato sottoposto a somministrazione sottocutanea di 100 µl di DHEA (6 mg/100 g di peso corporeo in EtOH-olio di sesamo) ed a somministrazione orale, tramite *gavage* gastrico, di 100 µl di acqua. I topi di ciascun gruppo ricevevano quindi il trattamento per 20 giorni consecutivi; il giorno successivo all'ultima somministrazione, i topi erano sottoposti al controllo del peso e sacrificati mediante overdose inalatoria di CO<sub>2</sub> (10-30%), seguita da dislocazione cervicale. Le ovaie erano prelevate e conservate con diverse modalità, come indicato nelle successive fasi sperimentali.

### 6.2. *Determinazione del ciclo estrale*

Per monitorare l'efficacia del DHEA nell'indurre il fenotipo caratteristico della PCOS, analisi dello striscio vaginale erano effettuate quotidianamente a partire dal settimo giorno dopo la prima iniezione di DHEA. Le cellule vaginali recuperate erano osservate a fresco al microscopio ottico (Marcondes et al, 2002) e la fase del ciclo era attribuita secondo i seguenti criteri: proestro, caratterizzato dalla predominanza di cellule epiteliali nucleate; estro, caratterizzato dalla presenza di cellule cornificate anucleate; metaestro, caratterizzato da una stessa proporzione di leucociti, cellule cornificate anucleate e cellule epiteliali nucleate; diestro, caratterizzato dalla predominanza di leucociti.

### 6.3. *Induzione della superovulazione e raccolta ovociti*

Per ottenere ovociti maturi allo stadio di MII, 48 ore dopo l'ultima somministrazione di DHEA, i topi ricevevano un'iniezione intraperitoneale di 10 IU di PMSG (Gonadotropina Sierica di Cavalla Gravida) (Folligon; Intervet International), seguita da un'iniezione intraperitoneale di 10 IU di hCG (Gonadotropina Corionica Umana) (Profasi HP 2000; Serono) per l'induzione della superovulazione (Di Emidio et al, 2019); 15 ore dopo la

somministrazione di hCG, i topi venivano sacrificati e i complessi ovocita-cellule del cumulo prelevati dalle ampolle ed esposti a 0.3 mg/ml di ialuronidasi per l'isolamento degli ovociti in MII.

#### *6.4. Colorazione con Ematossilina-Eosina, conta e classificazione dei follicoli*

Una parte delle ovaie era fissata in paraformaldeide (PFA) al 3.7% in PBS (Bio-Optica) per 12-16 ore per la colorazione con Ematossilina-Eosina (H&E), disidratata in concentrazioni crescenti di alcol, diafanizzata in xilene ed inclusa in paraffina. I campioni erano poi tagliati al microtomo in sezioni da 6  $\mu$ m. Le sezioni deparaffinate e trattate con Bio-clear (Bio Optica) e concentrazioni decrescenti di alcol venivano colorate con H&E (Bio Optica) ed osservate al microscopio ottico. La classificazione e il conteggio dei follicoli erano effettuate contando almeno tre sezioni seriali (circa 20 sezioni per ovaio) distanziate ~50  $\mu$ m. I follicoli erano classificati come normali o degenerati (atresici). I follicoli normali presentavano la membrana basale intatta, assenza di corpi picnotici nel nucleo, ed assenza di degenerazione ovocitaria. I follicoli normali erano classificati, in accordo con Gougeon, in: (i) follicoli primordiali, ovociti circondati da un singolo strato di cellule piatte della granulosa; (ii) follicoli primari, ovociti circondati da un singolo strato di cellule della granulosa cuboidali; (iii) follicoli secondari, con almeno due strati di cellule della granulosa; (iv) follicoli antrali, con sviluppo della cavità antrale.

#### *6.5. Colorazione tricromica di Heidenhain*

Le sezioni ovariche erano processate per la colorazione tricromica in accordo con le istruzioni del *kit* utilizzato (Electron Microscopy Sciences).

#### *6.6. Immunofluorescenza*

Per le analisi in immunofluorescenza, una parte delle ovaie era fissata in PFA 3.7% (Bio Optica) o immersa in azoto liquido e conservata a -80 °. Dopo lavaggio con PBS, le sezioni ovariche erano incubate con i seguenti anticorpi primari: anticorpi policlonali di coniglio anti-17 $\beta$ -HSD4, anti-TOMM20 (rispettivamente 1:100 e 1:400) (ThermoFisher Scientific) e anti-Von Willebrand Factor (vWF) (1:500) (Dako), tutti diluiti in 3% BSA in PBS, per 1 ora a TA; anticorpo monoclonale anti  $\alpha$ -SMA (Alpha Smooth Muscle Actin, 1:500, Abcam), diluito utilizzando un kit specifico (M.O.M mouse IgG blocking

reagent; Vector Laboratories) in accordo con le istruzioni del produttore. Dopo il lavaggio con PBS, venivano effettuate le incubazioni con gli anticorpi secondari (1:2000, anti rabbit IgG Alexa Fluor 633, Molecular Probes; 1:3000, anticorpo biotinilato anti-topo IgG, VECTOR), rilevato con Fluorescein Avidin DCS. Per la colorazione con il BODIPY le sezioni ovariche erano incubate con 4,4-difluoro-1,3,5,7,8-pentametil-4-boro-3a,4a-diazasindacene (1 µg/ml, BODIPY 493/503 Molecular Probes, Invitrogen), per 10 minuti, a TA. Infine, le sezioni venivano montate con Vectashield Mounting Medium con DAPI (Vector Laboratories) ed esaminate al microscopio confocale Leica TCS SP5 (Mannheim). I controlli negativi erano preparati senza l'aggiunta dell'anticorpo primario, utilizzando 3% BSA o con il diluente M.O.M. La quantizzazione dell'intensità del segnale fluorescente è stata effettuata mediante ImageJ 1.44p in accordo con Jansen (2013).

### 6.7. *Immunoistochimica*

Le sezioni ovariche deparaffinate e idratate erano bollite in buffer citrato (10mM pH, 6.1 Bio-Optica) in microonde a 720W (3 cicli di 3 minuti ciascuno) per aumentare l'immunoreattività e successivamente trattate per il blocco delle perossidasi endogene (Dako). Successivamente erano incubate con M.O.M mouse IgG blocking reagent *overnight* a 4°C. In seguito, erano incubate con anticorpo di topo anti-MG-AGE (Arg-Pyrimidine, AGE06B, BioLogo, 1:100) o anticorpo di coniglio anti 4-HNE (4 Hydroxynonenal, ab46545, Abcam, 1:100) diluito in M.O.M per 30 minuti. MG-AGE e 4-HNE erano rivelati tramite gli anticorpi secondari come descritto nella sezione precedente. La quantizzazione dell'intensità del segnale è stata effettuata mediante ImageJ 1.44p in accordo con Varghese et al. (2014).

### 6.8. *Western Blot analisi*

Una parte delle ovaie conservate a -80°C era processata per l'estrazione proteica. Il tessuto ovarico era omogenizzato mediante *potter* in RIPA buffer (Tris-HCl pH 7,5 25mM; NaCl 150mM; 1% Nonidet P-40; EDTA pH 8 1mM; H<sub>2</sub>O; PMSF 1mM; Sodio Ortovanadato 1mM; inibitori delle proteasi) e sottoposto a cicli di congelamento/scongelo in azoto liquido; tutti i campioni erano quindi centrifugati

(14.000 rpm per 90 minuti a 4°C) ed il surnatante recuperato per l'analisi proteica. La concentrazione delle proteine era determinata attraverso il metodo BCA (Pierce) utilizzando BSA come standard. I campioni proteici erano separati mediante SDS-PAGE e trasferiti su una membrana di polivinilidene difluoride (Sigma-Aldrich). I siti di legame non specifici venivano bloccati per 1 ora a TA con latte in polvere privo di grassi al 5% (Bio-Rad Laboratories) in tampone tris-salino contenente lo 0.05% di Tween 20 (TBS-T). Le membrane erano quindi incubate con anticorpi primari policlonali di coniglio anti-SIRT1 (Ab12193, Abcam, 1:700), anti-SIRT3 (Ab86671, Abcam, 1:500), anti-SOD2 (Ab86087, Abcam, 1:1000), anti-GLO1 (MA1-13029, Thermo Fisher, 1:400), anti-GLO2 (Ab154108, Abcam, 1:500), anti PGC1 $\alpha$  (SC-13067, Santa Cruz Biotechnology Inc., 1:500), anti-17 $\beta$ -HSD (SC-373902, Santa Cruz Biotechnology Inc., 1:1000), anti- PGC1 $\alpha$  (SC-13067, Santa Cruz Biotechnology Inc., 1:500), anti-RAGE (PAI-075, ThermoFisher Scientific, 1:750), anticorpo monoclonale anti-argpirimidina (AGE06B, BioLogo; 1:250), anti-mtTFA (SC-166995, Santa Cruz, 1:250), anti 17 $\beta$ -HSD4 (PA5-21522, ThermoFisher Scientific, 1:250), anti AMPK $\alpha$ 1 (AB-84049, Immunological Sciences, 1:500), anti phospho-AMPK $\alpha$ 1 (S487, ABP-0619, Immunological Sciences, 1:500), anti-LC3A/B (AB-83557, Immunological Sciences, 1:500), anti p-62 (AB-83779, Immunological Sciences, 1:500) o anti-GAPDH (TA802519, OriGene Technologies Inc., 1:750) *overnight* a 4°C; successivamente è stata effettuata l'incubazione con perossidasi (HRP) coniugata ad anticorpi secondari anti-coniglio (BA1054, Boster Biological Technology Co., 1:3000) o anti-topo (Ab6728, Abcam, 1:2000) per 1 h a TA. In seguito a lavaggio, gli specifici complessi immunoreattivi erano rilevati mediante ECL kit (Thermo Scientific, Waltham) ed Uvitec Cambridge system (Alliance series). Le bande venivano normalizzate rispetto alla GAPDH e valutate mediante l'analisi del valore medio dell'intensità dei pixel attraverso il software ImageJ 1.44p (JAVA); i valori erano riportati come unità relative (RU). Ciascun esperimento era effettuato in triplicato.

#### *6.9. Analisi della distribuzione del DNA e della configurazione del fuso di ovociti MII maturati in vivo*

Gli ovociti in MII erano fissati per l'immunofluorescenza e marcati con anticorpo primario di topo anti- $\alpha$ -tubulina (T9026, Sigma Aldrich, 1:200) *overnight* a 4°C e con anticorpo secondario coniugato con Alexa 594 (A90-137D4, Bethyl Laboratories Inc., 1:500) per 1 h a TA. La colorazione della cromatina veniva effettuata usando 5  $\mu$ g/ml di

Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) per 5 minuti a TA. Nel controllo negativo non era aggiunto anticorpo primario. Gli ovociti erano poi montati su vetrino e analizzati con microscopio ad epifluorescenza a 100x.

#### *6.10. Analisi statistica*

Le analisi erano eseguite utilizzando il software Sigma Stat (Jandel Scientific Corporation). Tutti i dati venivano presentati come media  $\pm$  SEM. L'analisi statistica era effettuata mediante One-Way ANOVA e comparazione multipla Holm-Sidak. Valori di  $P < 0.05$  indicavano differenze statisticamente significative.

## 7. RISULTATI

### *7.1. Analisi del fenotipo PCOS nel topo DHEA*

Il ciclo estrale dei due gruppi sperimentali è mostrato in figura 20 (a). La maggior parte dei topi di controllo (80%) mostrava un ciclo normale, mentre tutti i topi del gruppo DHEA erano completamente aciclici e rimanevano allo stadio di estro. Non erano riscontrate differenze significative nel peso dei gruppi come mostrato in figura 20 (b).

L'esame istologico delle ovaie DHEA mostrava una perdita di stroma corticale e di midollare rispetto al gruppo di controllo (figura 20 c,d). Quest'ultimo presentava una normale organizzazione istologica tipica di un ovaio murino con corticale esterna ricca di follicoli ovarici in sviluppo, corpi lutei e follicoli atresici interposti tra gli elementi stromali e le cellule interstiziali ghiandolari. Il gruppo trattato presentava, invece, cambiamenti nella struttura istologica dell'ovaio. La popolazione di follicoli primordiali, primari, secondari ed antrali appariva normale per densità e morfologia. Erano osservati evidenti corpi lutei, occasionalmente con infiltrazione di cellule del sangue. Erano evidenziate, inoltre, strutture simili a cisti con cellule tecali luteinizzate. L'analisi della popolazione follicolare nei topi DHEA rivelava un aumento significativo nei follicoli atresici (figura 20 e) rispetto al controllo.

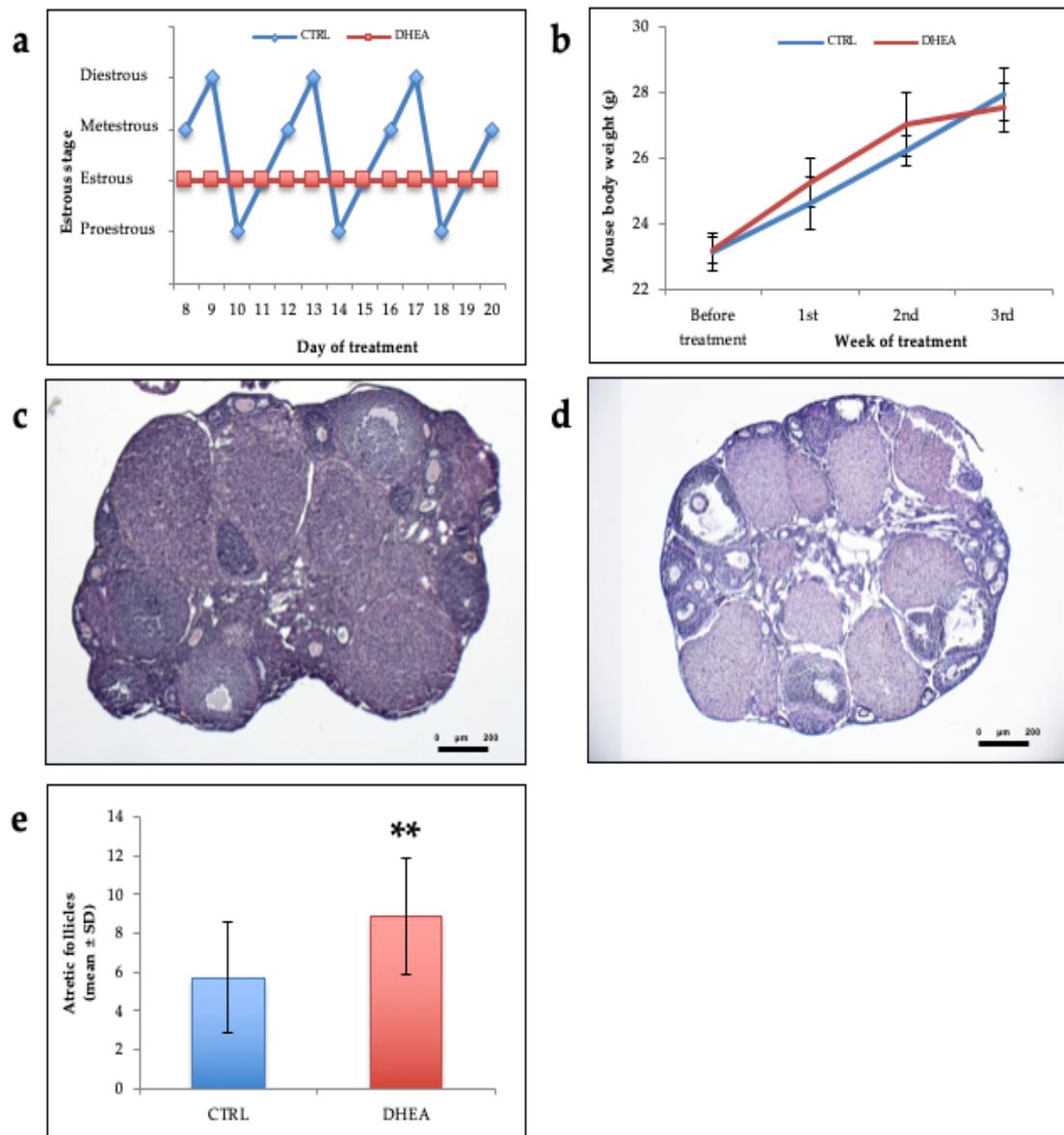
Come mostrato in figura 21 (a,b), la valutazione microscopica delle ovaie DHEA, sottoposte a colorazione tricromica, evidenziava un aspetto fibrotico della corticale ovarica. In particolare, la parete dei follicoli secondari ed antrali evidenziava una distribuzione di collagene concentrica, più intensa rispetto al controllo. Un'intensa colorazione per il collagene era inoltre ritrovata in corpi lutei di media grandezza.

Come evidenziato dalla colorazione con H&E, l'infiltrazione di cellule del sangue era diffusamente presente nei corpi lutei delle ovaie DHEA.

La colorazione simultanea per vWF (colorazione verde, marker delle cellule endoteliali) e  $\alpha$ -SMA (colorazione rossa, marker dei periciti) era utilizzata per la valutazione dei vasi sanguigni ovarici. Sia nel gruppo di controllo che nel DHEA, vWF non era co-localizzato con  $\alpha$ -SMA. (figura 21 c-f). La rete endoteliale era localizzata nello strato tecale di follicoli ovarici, e in particolare nei follicoli antrali di entrambi i gruppi. Nelle ovaie DHEA, le cellule endoteliali erano diffusamente localizzate nei corpi lutei, strettamente associate alle cellule luteali come nei follicoli atresici. Gruppi di periciti erano trovati

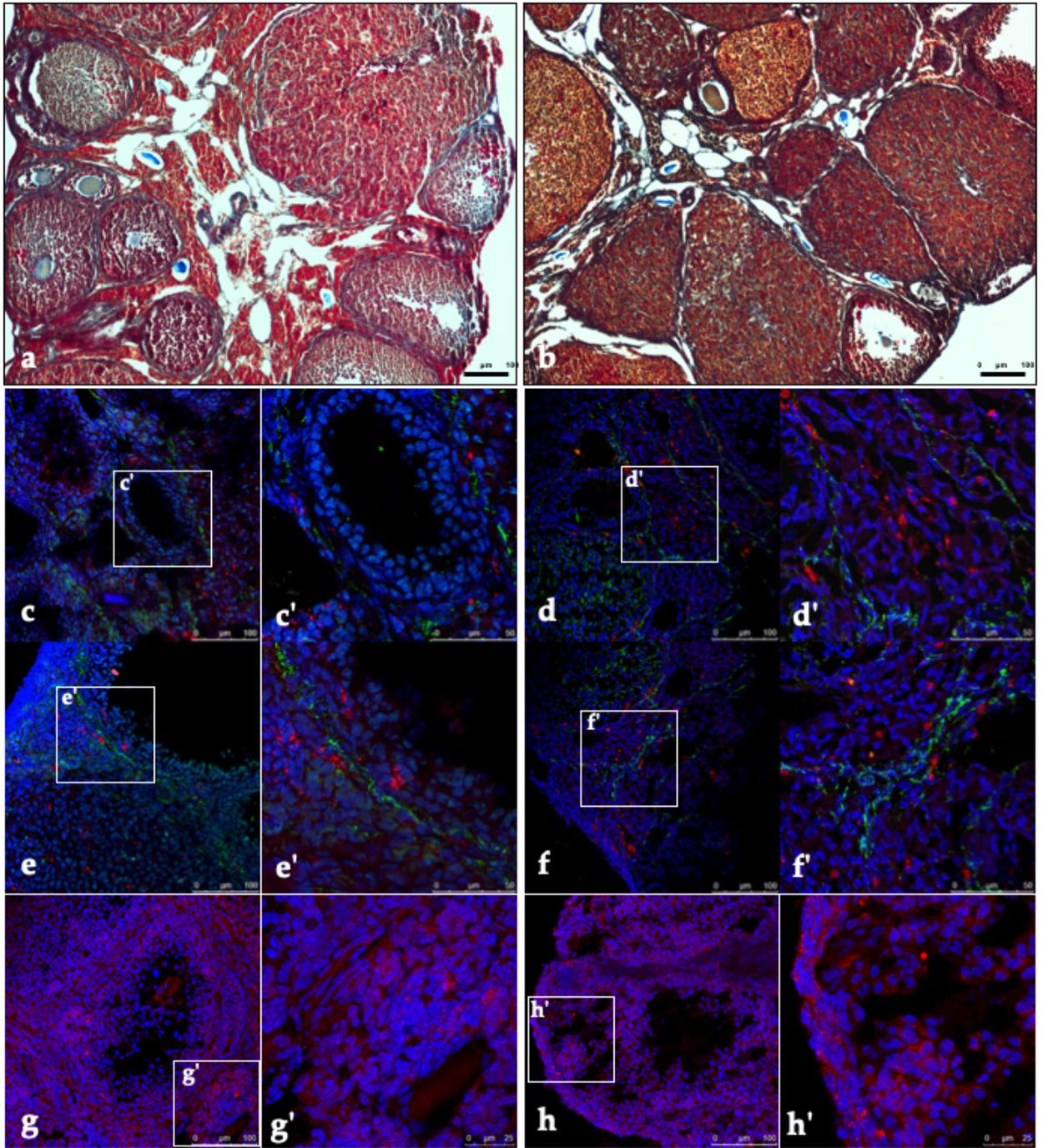
nella parete follicolare e luteale. Una colorazione diffusa era osservata nello stroma ovarico, specialmente nelle ovaie DHEA. Complessivamente sia vWF che  $\alpha$ -SMA erano più espressi delle ovaie DHEA.

La marcatura del BODIPY dopo somministrazione di DHEA era più evidente che nel controllo (figura 21 i,l). Mentre nel controllo le particelle lipidiche erano visibili come *spot* puntiformi nello stroma, follicoli e corpi lutei, le ovaie DHEA mostravano una maggiore presenza di goccioline lipidiche. La colorazione con anticorpo anti-17 $\beta$ -HSD risultava più marcata nelle ovaie DHEA rispetto al controllo (figura 21 g,h). Quest'ultimo presentava una diffusa e leggera colorazione nello stroma ovarico, più evidente nel compartimento della teca dei follicoli antrali e nei corpi lutei. Le ovaie DHEA mostravano un'intensa colorazione sulla superficie dell'epitelio ovarico.



**Figura 20.** Ciclo estrale, peso corporeo, morfologia ovarica nel topo. (a) Ciclo estrale rappresentativo di topi dal gruppo di controllo e DHEA. (b) Peso corporeo. (c-d) Colorazione con H&E rappresentativa di sezione ovarica di CTRL (c) e DHEA (d) Colorazione in H&E di sezione ovarica e) Follicoli atresici.

\*\*P<0.001, t-test.

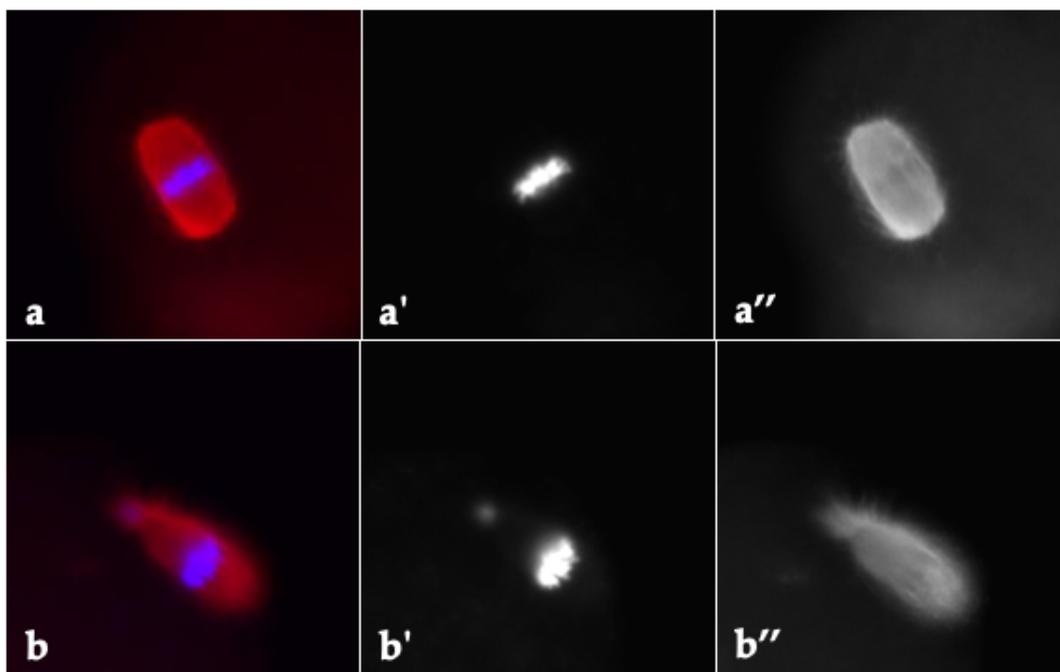


**Figura 21.** Immagine rappresentativa di colorazione tricromica nel CTRL **(a)** e DHEA **(b)**. **(c-f)** Immunolocalizzazione di vWF(verde) e alpha smooth muscle actin (rosso) nelle sezioni ovariche CTRL **(c,c' and e,e')** e DHEA **(d,d' and f, f')**. **(g-h)** Immunolocalizzazione di 17betaHSD4 (rosso) nelle sezioni ovariche di CTRL **(g)** e DHEA **(h)**. Immunocolorazione di particelle lipidiche con BODIPY 493/503 (verde) nelle sezioni ovariche di CTRL **(i)** e DHEA **(l)**. **(c-l)** Il DNA è colorato con DAPI (blu).

### 7.2. Il DHEA induce disfunzioni ovulatorie durante la superovulazione e influenza negativamente la qualità ovocitaria

Come riportato nella tabella 3, la somministrazione di DHEA influenzava negativamente il numero di ovociti ovulati per topo dopo la stimolazione ovarica con gonadotropine. Inoltre, nei topi DHEA si osservava un aumento del numero di ovociti degenerati. L'analisi dell'assetto metafase evidenziava effetti negativi del DHEA sul fuso e sull'organizzazione cromosomica. Questo era classificato come 'normale', quando i microtubuli erano organizzati in un fuso bipolare in associazione con una regolare organizzazione dei cromosomi sulla piastra metafase, o 'aberranti', se la lunghezza delle fibre del fuso appariva ridotta o si evidenziavano cromosomi sparsi, decondensati o disorganizzati (figura 22) (Liu et al, 2002). In accordo con questa classificazione, i nostri dati mostravano che la percentuale di ovociti MII 'normali' diminuiva di circa il 40% nel gruppo DHEA rispetto al gruppo di controllo (tabella 3).

<b>Tabella 3.</b> Effetto del DHEA su funzione ovulatoria e qualità ovocitaria. **P<0.01, t-test.		
	<b>CTRL (media ± SEM)</b>	<b>DHEA (media ± SEM)</b>
No. di ovociti per topo	17.4 ± 1.0	10.8 ± 1.0 **
Ovociti in MII (%)	92.1 ± 1.2%	86.4 ± 3.9%
Ovociti MII con piastra metafase normale (%)	77.2 ± 4.0%	44.0 ± 7.5% **
Ovociti degenerati (%)	8.0 ± 1.2%	13.6 ± 3.9%

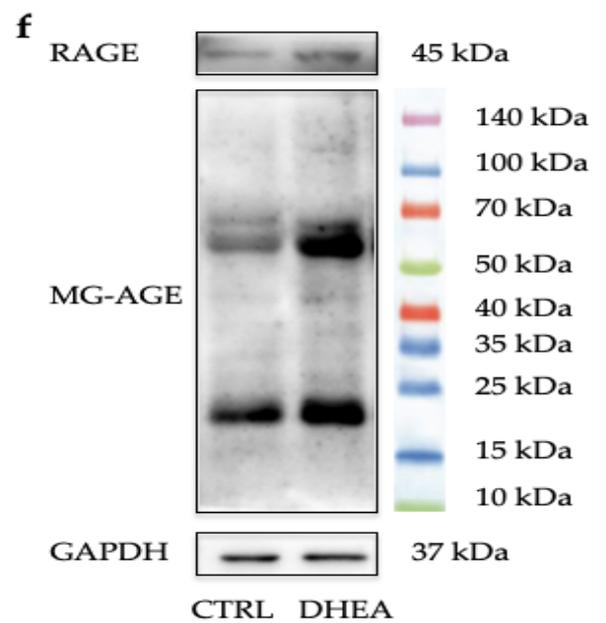
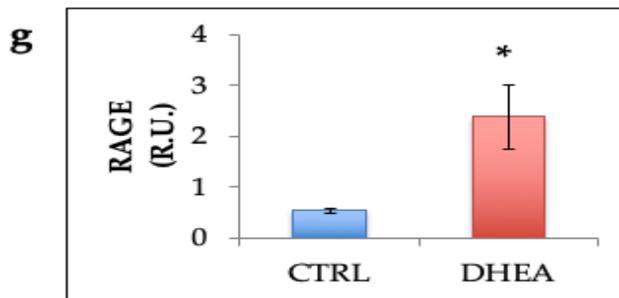
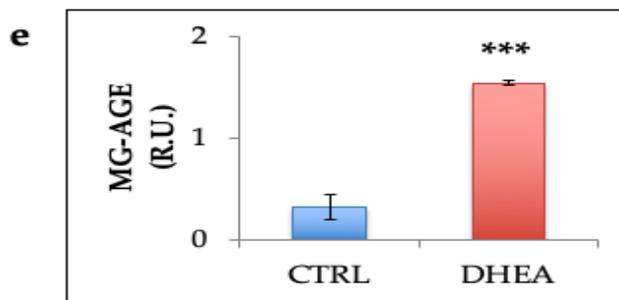
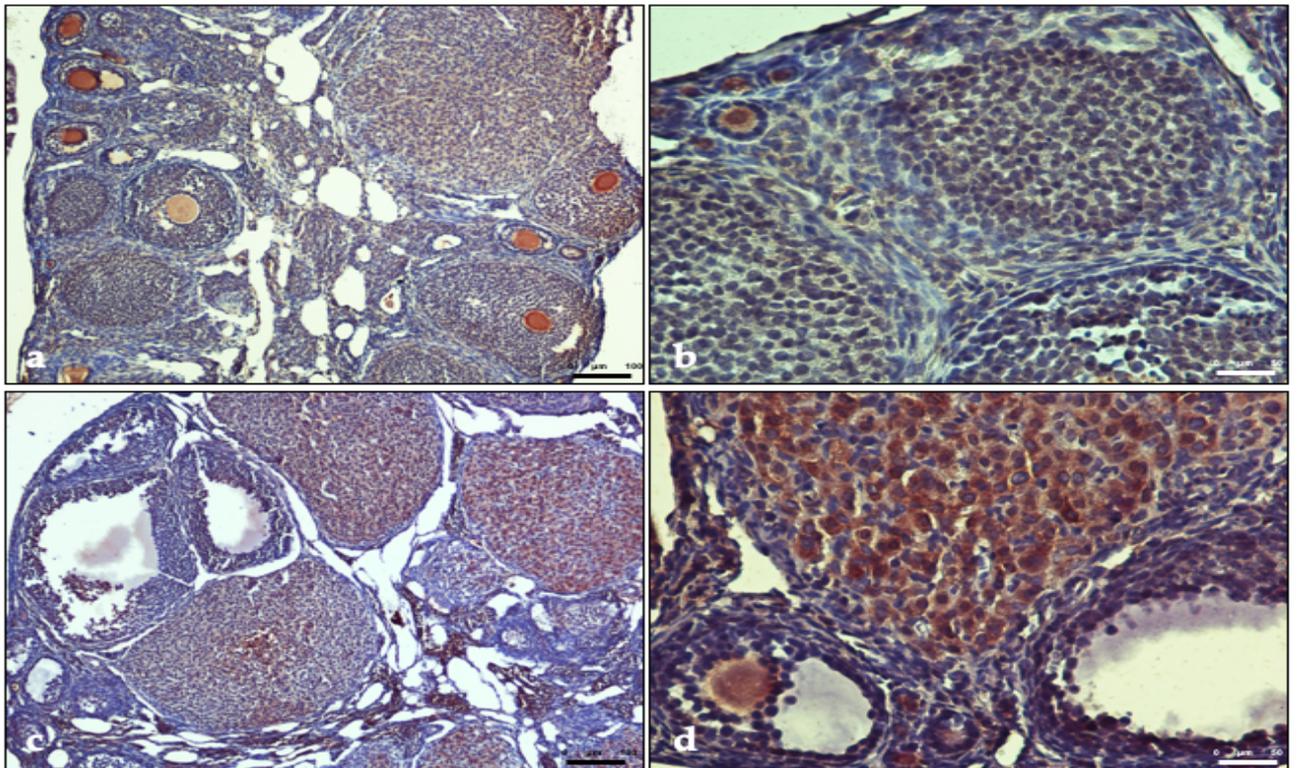


**Figura 22.** Immagine rappresentativa di piastra MII osservata in ovociti dal gruppo di controllo (**a–a''**) e DHEA (**b–b''**) in seguito a induzione di superovulazione. Il fuso è colorato con  $\alpha$ -tubulina (rosso) e i cromosomi sono colorati con hoechst 33342 (blu).

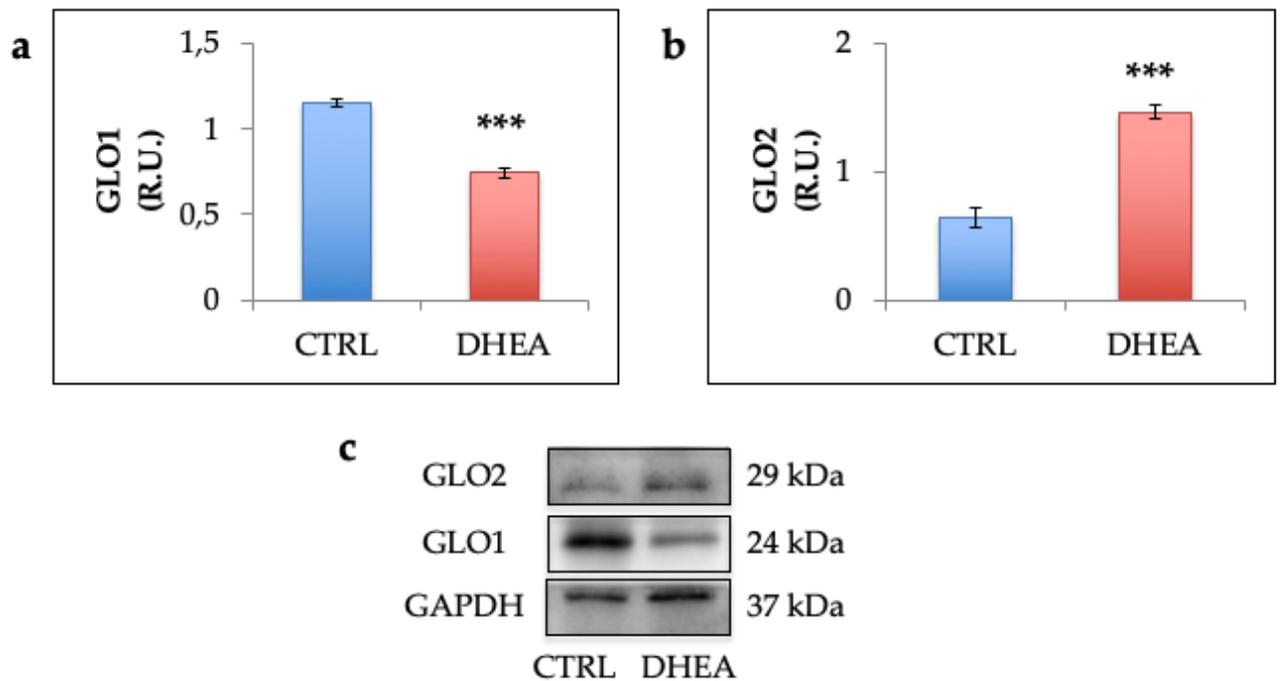
### 7.3. Le ovaie di topi DHEA presentano stress glicativo

Le analisi di immunostochimica rivelavano un aumento della marcatura degli MG-AGE nelle ovaie DHEA. I risultati ottenuti nelle ovaie di controllo mostravano una scarsa immunoreattività nelle cellule della granulosa da follicoli primari, preantrali e antrali, così come nelle cellule del cumulo, negli ovociti e nei vasi. Tuttavia, bassi livelli di MG-AGE potevano essere osservati nelle cellule stromali. Al contrario, le sezioni ovariche del gruppo DHEA mostravano una colorazione di MG-AGE intermedia negli ovociti e una intensa immunoreattività nelle cellule luteali, nei vasi e nelle cellule stromali (figura 23 a-d). Queste osservazioni erano confermate dalla comparazione delle bande immunoreattive nei gruppi DHEA e controllo (figura 23 e). L'accumulo di MG-AGE era supportato dall'osservazione di aumentata espressione di RAGE nelle ovaie di topi DHEA (figura 23 g).

Per studiare l'efficacia del sistema di detossificazione di MG, veniva valutata l'espressione delle proteine GLO 1 e GLO2; GLO1 risultava significativamente ridotta nelle ovaie DHEA in confronto al controllo, dove, al contrario, risultavano aumentati i livelli di GLO2 (figura 24).



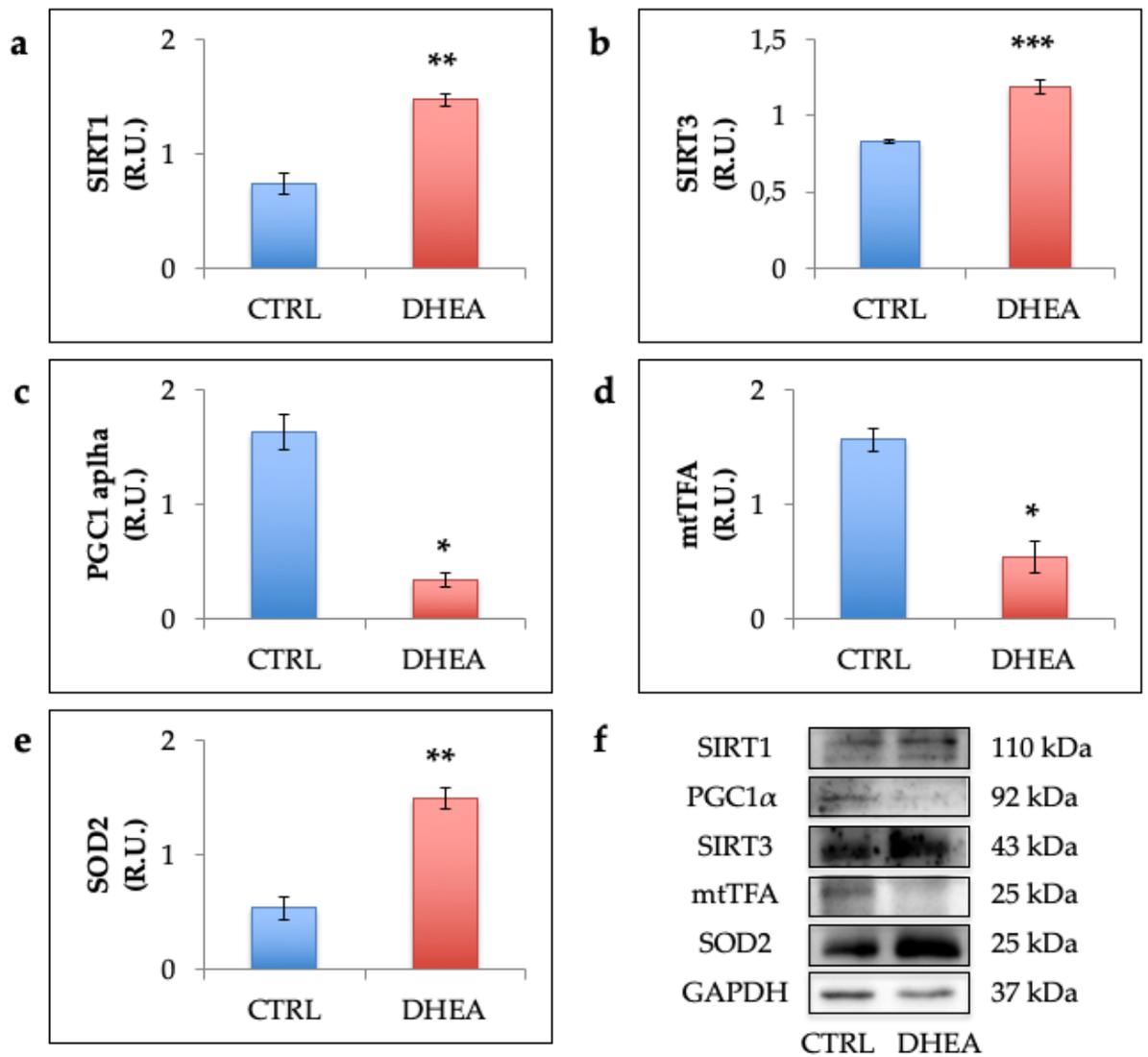
**Figura 23.** Immagini rappresentative dell'immunolocalizzazione MG-AGE nelle ovaie dei gruppi controllo (a, b) e DHEA (c,d). Analisi in Western blot di MG-AGE (e) e RAGE (g) e immagini rappresentative (f). I dati sono presentati come media  $\pm$  SEM di analisi densitometriche di bande immunoreattive normalizzate con GAPDH). \* $P < 0.05$ ; \*\*\* $P < 0.001$ , t-test.



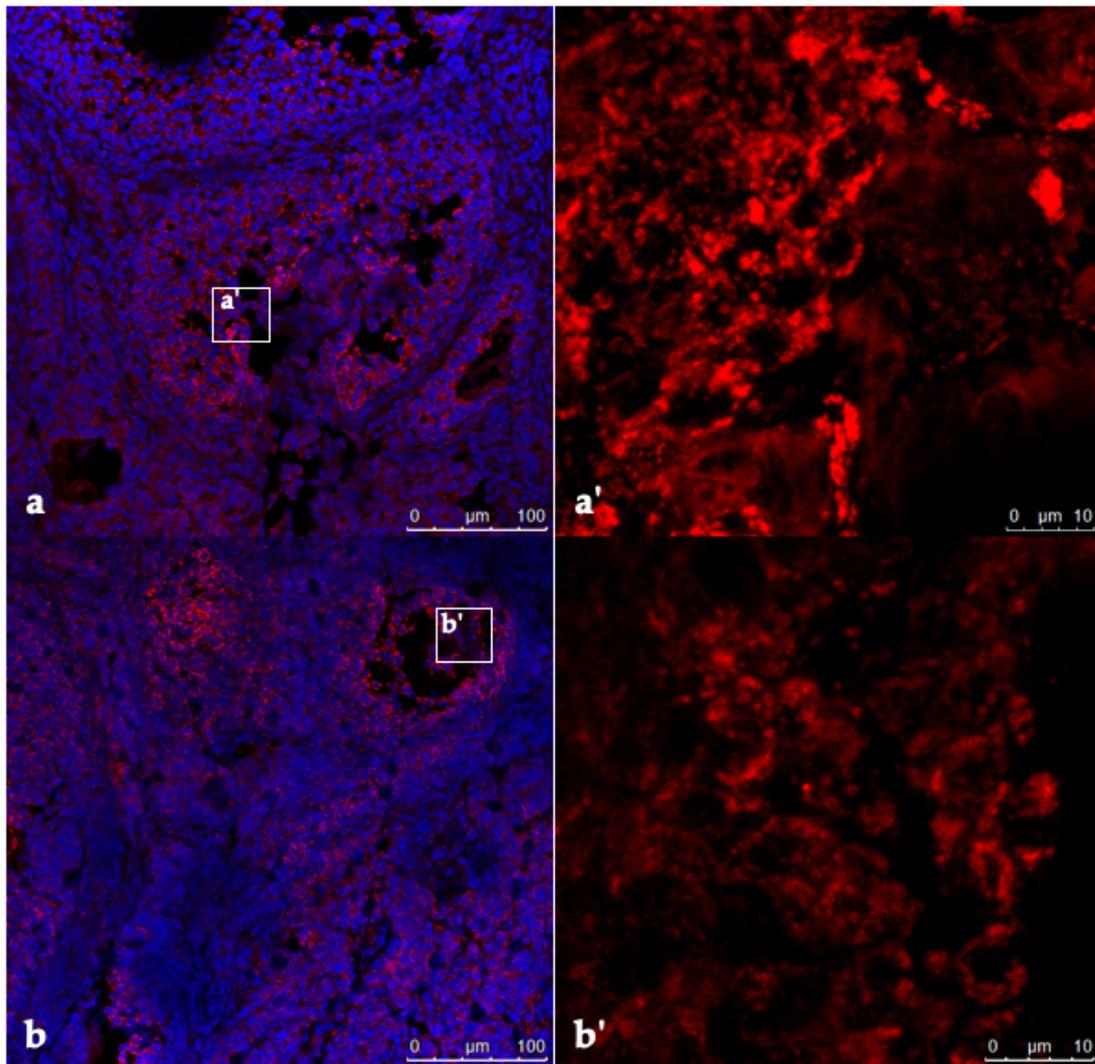
**Figure 24.** Analisi in Western blot di GLO1 (a) e GLO2 (b) e immagini rappresentative di bande immunoreattive (c). I dati sono presentati come media $\pm$  SEM di analisi densitometriche di bande immunoreattive normalizzate con la proteina (GAPDH). \*\*\*P < 0.001, t-test.

#### 7.4. Il network di SIRT1 che regola la fisiologia mitocondriale è alterato nelle ovaie DHEA

Per capire in che modo la PCOS, indotta dalla somministrazione di DHEA, era associata con la deregolazione di SIRT1 nella regolazione della fisiologia mitocondriale, erano valutati i livelli di SIRT1 e delle sue proteine mitocondriali nei gruppi controllo e DHEA. I dati riportati in figura 25 mostravano un aumento di SIRT1 nel gruppo trattato con DHEA. Inoltre, si evidenziava una up-regolazione delle proteine mitocondriali SIRT3 e SOD2 e una diminuzione di PGC1- $\alpha$ , maggiore regolatore della biogenesi e funzionalità mitocondriale, e di mtTFA, che riflette il contenuto di mtDNA e quindi, il numero di mitocondri. Quest'ultima osservazione è supportata anche dalle analisi al microscopio confocale che, utilizzando la colorazione con TOMM20, mostrava una riduzione per i trasportatori mitocondriali nelle ovaie DHEA. (figura 25)



**Figura 25.** Analisi in Western blot di SIRT1 (a), SIRT3 (b), PGC1α (c), mtTFA (d) e SOD2 (e) e immagini rappresentative di bande immunoreattive (f). I dati sono presentati come media ± SEM di analisi densitometrica di bande immunoreattive normalizzate con la proteina (GAPDH). \*\*\*P<0.001, \*\*P<0.01, \*P<0.05, t-test.

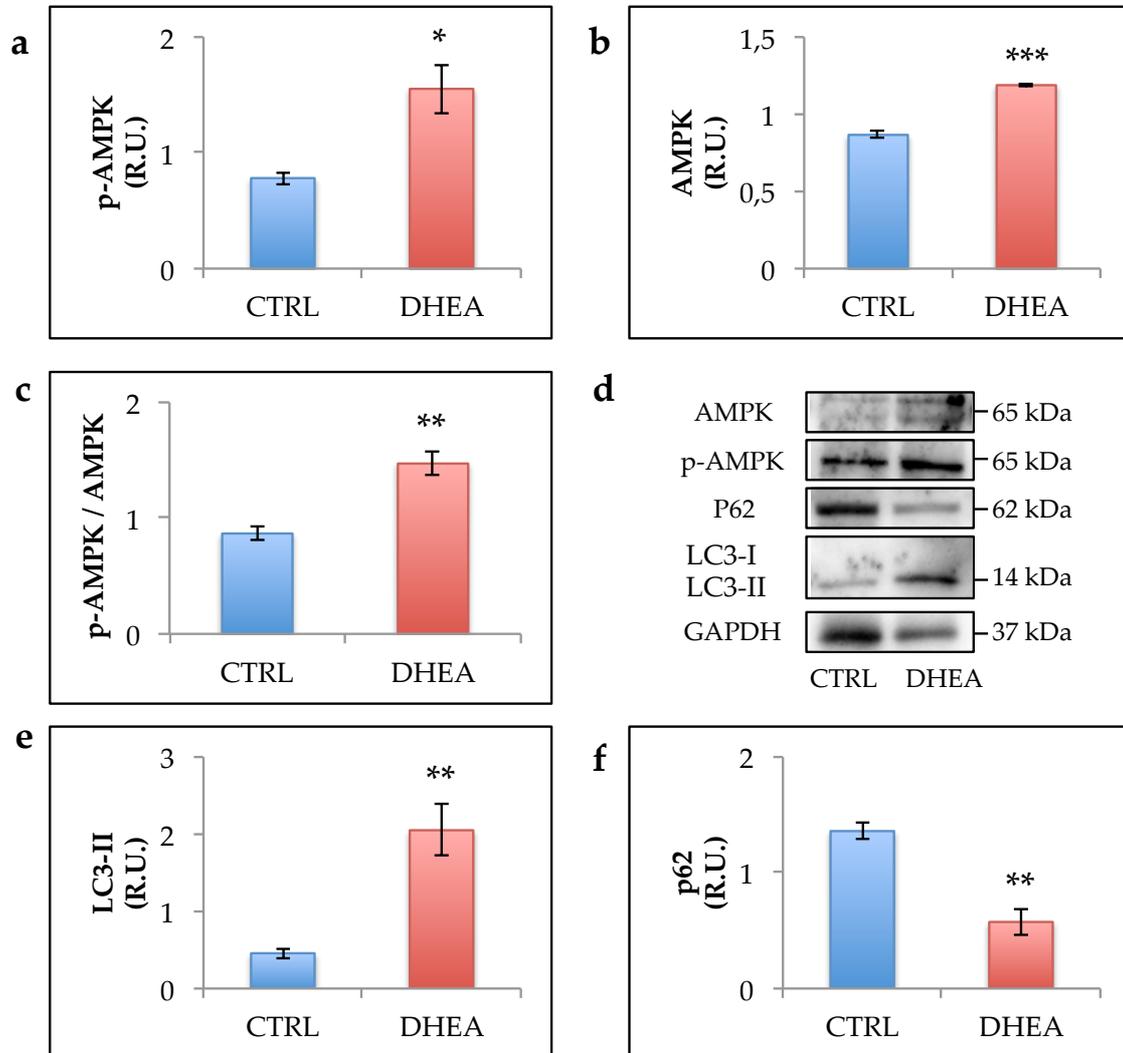


**Figura 26.** Colorazione con TOMM20 (rosso), un trasportatore mitocondriale, nei topi CTRL (**a, a'**) e DHEA (**b,b'**). Il DNA è colorato con DAPI (blu).

### *7.5. L'AMPK e l'autofagia aumentano nelle ovaie dei topi DHEA*

Essendo nota la cooperazione di SIRT1 con la protein chinasi attivata da AMP (AMPK) nella regolazione della sopravvivenza cellulare, veniva esaminata l'ipotesi che nelle ovaie DHEA l'attivazione di questa chinasi sia associata all'aumento dell'autofagia. Come mostrato in figura 27, nei topi DHEA veniva rilevata una maggiore espressione sia della forma attiva (fosfo-AMPK) che della AMPK totale (figura 27 a,b). Inoltre, un aumento del rapporto fosfo-AMPK/AMPK totale (figura 27c) confermava l'incremento nell'attivazione di questo enzima nelle ovaie DHEA. Era osservato inoltre, che le ovaie DHEA mostravano i più alti livelli proteici di LC3II e più bassi livelli di P62 quando

comparate con il controllo. Questa condizione era considerata come evidenza sperimentale di aumento di autofagia (Jiang, Mizushima.,2015; Yoshii et al.,2017).



**Figura 27.** Analisi in Western blot di p-AMPK (a), AMPK (b), rapporto p-AMPK/AMPK (c), LC3II (e) e p62 (e) e immagini rappresentative di bande immunoreattive(d). I dati sono rappresentati come media  $\pm$  SEM di analisi densitometrica di bande immunoreattive normalizzate con la (GAPDH). \*\*\*P<0.001, \*\*P<0.01, \*P<0.05, t-test.

## 8. DISCUSSIONE

Come è emerso recentemente, un aumento di AGE ha un ruolo chiave nelle disfunzioni ovariche e nella riduzione della fertilità associata alla PCOS. Tuttavia, il ruolo specifico del MG, noto come il più efficace precursore degli AGE, coinvolto nella patogenesi del diabete di tipo 2 e altre gravi patologie infiammatorie croniche, è stato poco studiato (Tatone et al., 2013; 2014). Nei nostri studi precedenti abbiamo dimostrato che i topi che ricevevano MG per via orale per circa un mese presentavano segni precoci di iperandrogenismo (Di Emidio et al, 2019). Inoltre, Lin et al. (2019) hanno riportato che la supplementazione nella dieta di MG-BSA generava fenotipi simili a quelli osservati nei ratti in cui la PCOS era indotta dal DHEA. I risultati presentati in questa tesi dimostrano, per la prima volta, che una condizione di stress glicativo MG-dipendente si instaura nell'ambiente ovarico di topi PCOS. Questa condizione risulta associata a cambiamenti della funzione di SIRT1 nella regolazione della fisiologia mitocondriale e della sopravvivenza cellulare.

Numerosi modelli di roditori sono stati utilizzati per studiare i meccanismi e le possibili terapie per la PCOS (Walters et al, 2012). Nel nostro studio, ci siamo basati su un modello ben studiato di topo PCOS indotto da DHEA (Li et al, 2016; Walters et al, 2012; Luchetti et al, 2004) e abbiamo approfondito la caratterizzazione del micro-ambiente ovarico nei topi DHEA. Come atteso, abbiamo riscontrato anovulazione in associazione con un aumento del numero di follicoli antrali atresici (Caldwell et al, 2014). In accordo con Huang et al. (2015), i topi DHEA utilizzati in questo studio presentavano una riduzione della quantità e qualità degli ovociti, in termini di alterazione del fuso mitotico e configurazione cromosomica, in seguito a superovulazione. Questo risultato è coerente con l'ipotesi che l'alterazione della competenza ovocitaria è alla base della subfertilità in molte donne con PCOS e conferma che l'iperandrogenismo è uno dei fattori principali del fenotipo PCOS (Palomba et al, 2017).

Abbiamo osservato, inoltre, che le ovaie DHEA erano caratterizzate da un'alterata deposizione di collagene, evidenza di un aumento del tessuto fibroso tipicamente osservato nell'area interstiziale delle ovaie di pazienti PCOS (Takahashi et al, 2017). Abbiamo anche fornito l'evidenza di aumento della vascolarizzazione nelle ovaie DHEA, che potrebbe essere un effetto della deregolazione dell'angiogenesi ovarica associata alle alterazioni dello sviluppo follicolare nella PCOS (Di Pietro et al, 2018). Nelle ovaie

DHEA poteva essere osservato, inoltre, un accumulo intraovarico di particelle lipidiche, osservazione coerente con l'alterata composizione di acidi grassi recentemente osservata nel fluido follicolare di pazienti PCOS (Bousmpoula et al, 2019). La dislipidemia intraovarica rappresenta probabilmente una conseguenza dei cambiamenti associati al metabolismo nei follicoli (Bousmpoula et al, 2019). Inoltre, l'esposizione del cumulo a alte concentrazioni lipidiche è noto avere influenze negative sulla maturazione ovocitaria (Yang et al, 2012). Infine, un'alterata steroidogenesi a livello ovarico era evidenziata dall'aumento dell'espressione dell'isoforma IV dell'enzima 17- $\beta$ HSD nelle cellule della granulosa di ovaie DHEA, un risultato che evidenzia la necessità di ulteriori studi nelle donne PCOS (Tatone et al 2016; Belani et al 2018).

Differenti approcci hanno portato a dimostrare che lo stress glicativo, dipendente da MG, partecipa al fenotipo ovarico della PCOS. Sebbene i livelli di MG non siano stati monitorati, il fatto che ci sia un aumento della deposizione di MG-AGE, rappresenta l'evidenza della distruzione dell'equilibrio nel processo detossificazione/ formazione di MG nelle ovaie dei topi DHEA. Il potenziale ruolo di MG nelle disfunzioni ovariche è stato ben evidenziato da precedenti studi del nostro gruppo. Basandosi su studi *in vitro*, l'esposizione a dosi sopra-fisiologiche di MG danneggia la meiosi negli ovociti e diminuisce il potenziale redox e la distribuzione della membrana mitocondriale interna (Tatone et al, 2011). Studi *in vitro* sulla regolazione delle gliossalasi ci hanno aiutato a dimostrare che l'aumento dell'espressione di GLO1 e GLO2 in risposta a MG è dipendente dall'attività di SIRT1 negli ovociti di topo (Di Emidio et al, 2019). Similmente, la somministrazione orale di MG determinava una maggiore espressione ovarica di SIRT1 e GLO1, come componente di una risposta adattativa in grado di contrastare l'accumulo di MG-AGE (Di Emidio et al, 2019). Al contrario, in questo studio abbiamo osservato che la somministrazione di DHEA era responsabile dell'aumentata espressione di AGE e RAGE e della deregolazione del sistema delle gliossalasi, ben note caratteristiche dello stress glicativo. Questa condizione potrebbe derivare da un alterato metabolismo del glucosio e/o da un aumento dello stress ossidativo, che induce la formazione di AGE e influenza negativamente l'attività delle gliossalasi (Rabbani et al., 2015). Inoltre, lo stress glicativo può contribuire all'aumento della fibrosi e all'alterazione della vascolarizzazione da noi osservato nelle ovaie DHEA.

Recentemente è aumentato l'interesse nel coinvolgimento di SIRT1 nello sviluppo e nella progressione della PCOS (Tatone et al 2018). Qui abbiamo riportato che i topi DHEA mostrano un'aumentata espressione ovarica di SIRT1. E' ben noto che l'aumento

dell'espressione delle sirtuine rappresenta una risposta adattativa ad uno stress ossidativo moderato, mentre condizioni ossidative severe ne determinano la degradazione (Buler et al, 2016). Il reclutamento di SIRT1 nelle ovaie DHEA in risposta a condizioni pro-ossidative è supportato anche dall'aumento dell'espressione proteica di SIRT3 e SOD2, elementi del network di SIRT1 coinvolto nella risposta anti-ossidante. Questo *network*, tuttavia, sembra non essere in grado di prevenire il danno mitocondriale, evidenziato nelle ovaie DHEA dal decremento di PGC1 $\alpha$ , mtTFA e TOMM20. Per quanto è noto, questa è la prima evidenza di disfunzioni mitocondriali nelle ovaie PCOS e supporta precedenti ipotesi sul coinvolgimento di questo organulo cellulare nella patologia (Zhang et al, 2019).

Basandosi sulle recenti osservazioni di un aumento dell'autofagia nelle ovaie PCOS (Li et al., 2018, 2019), è stata investigata la presenza di questo fenomeno nei topi DHEA, considerando anche che SIRT1 è un sensore energetico che regola la sopravvivenza cellulare. SIRT1 regola il meccanismo di autofagia tramite meccanismi multipli inclusa, in modo diretto, la deacetilazione delle proteine legate all'autofagia, come LC3 (Kitada et al 2016), o tramite l'attivazione dell'AMPK, altro importante sensore di energia (Fulco et al 2008). In questo studio, abbiamo trovato che l'up regolazione di SIRT1 nelle ovaie DHEA è associato ad un aumento dell'attivazione di AMPK e alla presenza di marker di autofagia, indicando così che l'asse SIRT1/AMPK regola l'autofagia nelle ovaie PCOS. In conclusione, le ricerche di questa parte della tesi rappresentano un importante contributo alla caratterizzazione di marker biochimici del modello murino DHEA e mettono in evidenza nuovi meccanismi molecolari alla base dello sviluppo e della progressione della PCOS. In particolare, i nostri risultati dimostrano il ruolo di MG nello stress glicativo caratteristico della PCOS ed evidenziano l'importanza di ulteriori studi sull'implicazione di SIRT1, mitocondri e autofagia nella patogenesi della PCOS. Approcci che riducano i livelli di MG a livello ovarico potrebbero costituire le basi per nuove strategie di trattamento atte a migliorare il potenziale di fertilità nelle pazienti PCOS.

## PARTE 2

### 9 SCOPO DELLA TESI

Numerosi studi clinici hanno riportato che la somministrazione di L-carnitina (LC) e /o acetyl-L-carnitina (ALC) allevia alcuni effetti della PCOS determinando un aumento dell'*outcome* riproduttivo (Samimi et al., 2016; Center et al., 2012; Fenkci et al., 2008; Ismail et al., 2014; Latifian S et al., 2015). Tuttavia, non è noto se l'effetto benefico sia dovuto all'azione diretta di queste molecole sull'ambiente follicolare e, in particolare, sugli ovociti. Rimangono, inoltre, da investigare gli effetti degli esteri della LC che sono parte del pool di carnitine intracellulari. Tra queste, la propionil-L-carnitina (PLC) sembra essere la più efficace. Infatti, grazie alla sua elevata lipofilia e affinità per l'acetyl carnitina trasferasi, è rapidamente convertita in LC e propionil coenzima A, svolgendo così un ruolo importante nel metabolismo energetico. Inoltre, prima di essere idrolizzata, la PLC può essere utilizzata dalle cellule contro lo stress ossidativo (Mingorance et al 2019).

Numerosi studi hanno evidenziato l'effetto benefico della LC sullo sviluppo embrionale in diverse specie di mammifero. Negli ovini, la LC migliora lo sviluppo embrionale *in vitro* (Reader et al., 2015) e allevia lo stress ossidativo associato alla maturazione *in vitro* diminuendo i livelli di ROS intracellulari e aumentando quelli di glutathione (Mishra et al., 2016). Recentemente è stato evidenziato l'effetto benefico della LC sull'IVM e sullo sviluppo embrionale pre-impianto di ovociti di bovini giovani e in avanzata età riproduttiva (Phongnimitr et al., 2013; Jiang et al., 2019). Non ci sono, tuttavia, evidenze riguardanti l'efficacia delle carnitine nel contrastare l'effetto dello stress ossidativo associato alla PCOS a livello intrafollicolare. Quindi, per verificare l'ipotesi di un'azione diretta delle carnitine nell'alleviare gli effetti della PCOS a livello del gamete femminile, abbiamo utilizzato un modello di maturazione *in vitro* di ovociti di topo esposti a stress ossidativo moderato (Di Emidio et al., 2014).

Sulla base di queste osservazioni, in questa parte della tesi abbiamo verificato gli effetti di diverse concentrazioni di L-carnitina associata ad acetyl-L-carnitina e di propionil-L-carnitina sulla qualità degli ovociti sottoposti a IVM dopo esposizione a stress ossidativo indotto da acqua ossigenata.

## 10 MATERIALI E METODI

### 10.1. Raccolta degli ovociti e maturazione *in vitro* (IVM)

Al fine di valutare l'effetto delle carnitine sulla IVM, ovociti allo stadio di vescicola germinale (GV) erano recuperati da follicoli antrali di topi CD1 (Charles River Italia s.r.l., Calco, Italy) di 4 settimane, mantenuti in stabulario e manipolati secondo la normativa vigente (v. Parte 1).

Gli ovociti allo stato di GV erano recuperati dopo puntura dei follicoli antrali e divisi nei vari gruppi di trattamento, come descritto nel disegno sperimentale, e mantenuti in blocco meiotico mediante l'aggiunta di cilostamide 1  $\mu\text{M}$  (Sigma-Aldrich) prima di essere sottoposti a IVM nel terreno di coltura MEM- $\alpha$  (Sigma-Aldrich). Dopo l'induzione di un moderato stress ossidativo mediante esposizione a 25  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  per 30 minuti, gli ovociti erano sottoposti a maturazione *in vitro* (IVM) in MEM- $\alpha$  supplementato con tre differenti concentrazioni di LC e ALC rispettivamente 0.2-0.4 mg/ml; 0.4-0.8 mg/ml e 0.8-1.6 mg/ml) e di PLC 0.2 mg/ml, 1 mg/ml e 2 mg/ml. Dopo 16 ore di incubazione, gli ovociti in MII venivano conteggiati sulla base della presenza del primo globulo polare (MII, metafase seconda) e sottoposti all'analisi in immunofluorescenza del fuso meiotico.

### 10.2. Immunofluorescenza

Gli ovociti MII maturati *in vitro* erano trattati come descritto nella sezione 6 dei materiali e metodi della parte 1.



**Figura 28.** Immagine rappresentative dei differenti stadi della IVM di ovociti di topo: (A) Vescicola germinale (GV). (B) Germinal vesicle breakdown (GVBD). (C) Estrusione del primo globulo polare (PBI).

Sulla base delle caratteristiche del fuso meiotico gli ovociti sono stati classificati in: i) normali, caratterizzati da un fuso mitotico correttamente assemblato e bipolare; ii) leggermente aberranti, caratterizzati da un fuso meiotico con lieve disorganizzazione dei microtubuli o con struttura di poco anormale; iii) aberranti, caratterizzato da un fuso mitotico completamente disorganizzato o anormale o assente. Sulla base delle caratteristiche dei cromosomi gli ovociti sono stati classificati in: i) normali; ii) leggermente aberranti, caratterizzati da una lieve dispersione dei cromosomi, con massimo 4 di essi non localizzati nella piastra metafase; iii) aberranti, caratterizzati da una totale disorganizzazione della piastra metafase o da cromosomi non condensati

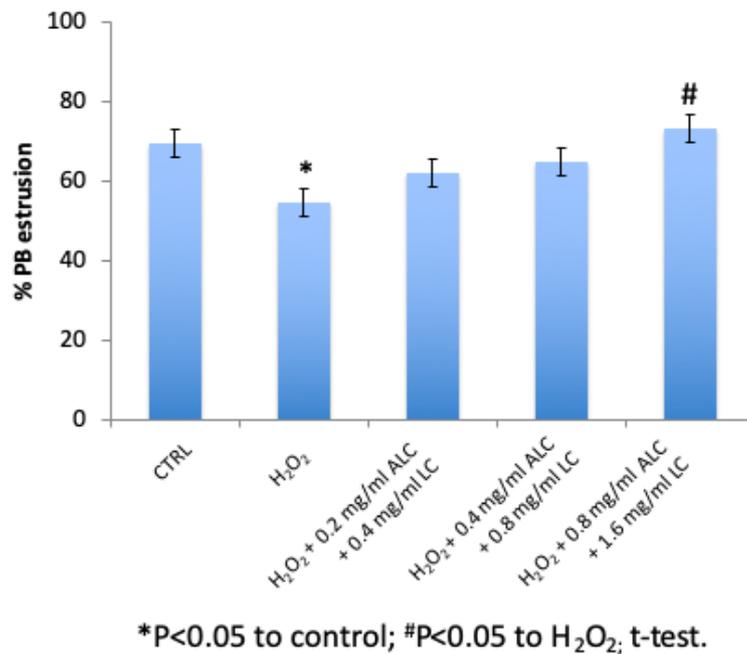
### *10.3. Analisi statistica*

Le analisi erano eseguite utilizzando il software Sigma Stat (Jandel Scientific Corporation). Tutti i dati venivano presentati come media  $\pm$  SEM. L'analisi statistica era effettuata mediante One-Way ANOVA e comparazione multipla Holm-Sidak. Valori di  $P < 0.05$  indicavano differenze statisticamente significative.

## 11 RISULTATI

### *11.1. Effetti della combinazione di L-Carnitina e acetyl-L-carnitina sulla maturazione in vitro degli ovociti dopo esposizione a stress ossidativo moderato*

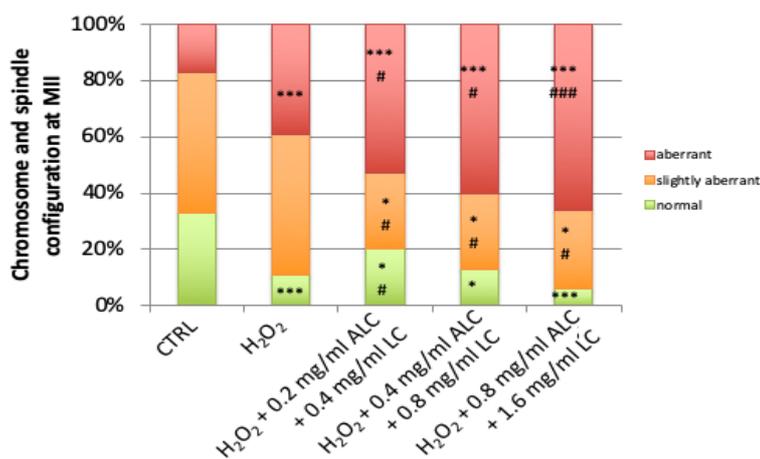
Per riprodurre gli effetti intraovarici della PCOS abbiamo esposto gli ovociti ovarici bloccati allo stadio di GV ad uno stress ossidativo moderato prima della IVM (Di Emidio et al, 2014). L'esposizione al trattamento ossidativo riduceva la percentuale di ovociti che dopo 16 ore erano in grado di completare la meiosi ed emettere il primo globulo polare rispetto al controllo (Figura 29). L'aggiunta di 0.8 mg/ml ALC e 1.6 mg/ml LC al terreno di coltura dopo l'esposizione a stress ossidativo moderato aumentava significativamente la capacità degli ovociti di completare la meiosi rispetto al gruppo esposto al perossido di idrogeno, raggiungendo livelli simili al controllo. Concentrazioni più basse di ALC e LC non erano in grado di contrastare gli effetti indotti dal perossido di idrogeno.



**Figura 29.** Percentuale ovociti che emettono il globulo polare dopo IVM.

### 11.2. Effetti della combinazione di L-carnitina e acetyl-L-carnitina sulla qualità degli ovociti maturati in vitro dopo esposizione a stress ossidativo moderato

Come riportato in figura 30, l'esposizione al trattamento ossidativo riduceva la percentuale di ovociti che presentavano una piastra metafasica normale e aumentava il numero di ovociti con conformazione aberrante rispetto al controllo. L'aggiunta di ALC e LC (0.2 mg/ml ALC + 0.4 mg/ml LC) al terreno di coltura dopo l'esposizione allo stress ossidativo moderato era in grado di aumentare significativamente il numero di ovociti con conformazione normale rispetto al perossido di idrogeno pur non raggiungendo i livelli osservati nel controllo. Inoltre, si riduceva la percentuale di ovociti con conformazione leggermente aberrante e, aumentava il numero degli aberranti rispetto sia all'acqua ossigenata che al controllo. L'aggiunta di concentrazioni più elevate di ALC e LC (0.4 mg/ml ALC + 0.8 mg/ml LC e 0.8 mg/ml ALC + 1.6 mg/ml LC) al terreno di coltura dopo l'esposizione allo stress ossidativo moderato non era in grado di migliorare il numero di ovociti con conformazione normale rispetto al controllo ed al perossido di idrogeno. Si riduceva, inoltre, la percentuale di ovociti con conformazione leggermente aberrante e, aumentava il numero degli aberranti rispetto sia all'acqua ossigenata che al controllo.



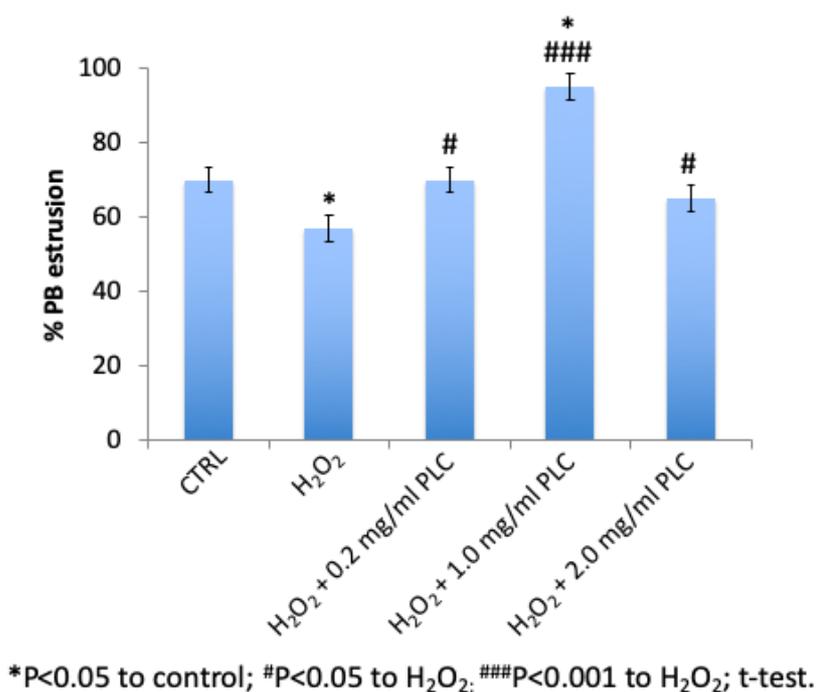
\*P<0.05 to control; \*\*\*P<0.001 to control; #P<0.05 to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; ###P<0.001 to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; t-test.

**Figura 30.** Percentuali ovociti con conformazione normale, leggermente aberrante ed aberrante.

### 11.3. Effetti della Propionil-L-carnitina sulla maturazione in vitro degli ovociti dopo esposizione a stress ossidativo moderato

Considerando che i dosaggi di ALC e LC in grado di migliorare il numero di ovociti che completavano la meiosi non erano efficaci nel ridurre i danni indotti dallo stress ossidativo sull'assetto metafasico, è stato valutato se l'esposizione alla PLC potesse produrre entrambi gli effetti.

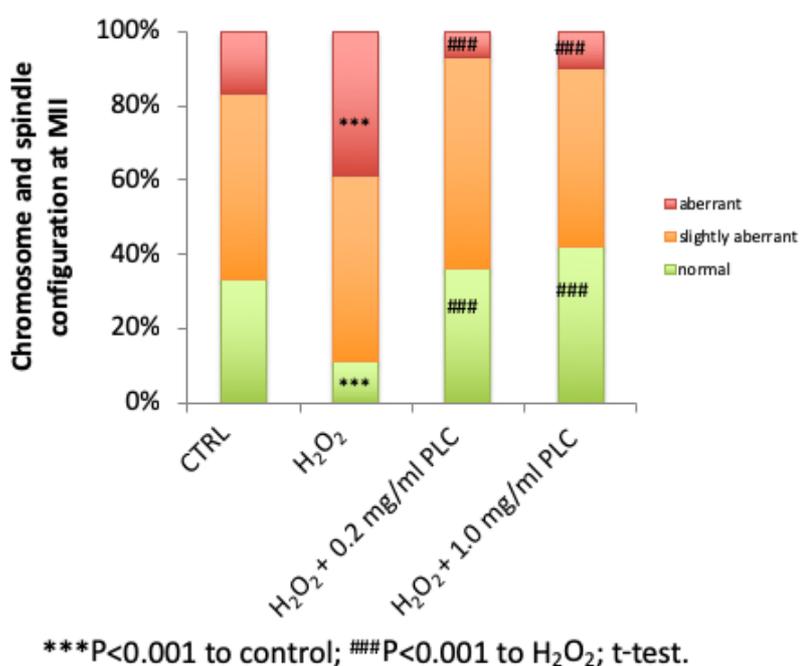
Come mostrato in figura 31 tutte le concentrazioni di PLC utilizzate (0.2 mg/ml, 1.0 mg/ml e 2.0 mg/ml) erano in grado di aumentare significativamente il numero di ovociti che emettevano il primo globulo polare dopo 16 ore di IVM dopo esposizione allo stress ossidativo moderato. Inoltre, la concentrazione di 1.0 mg/ml PLC induceva un aumento del numero di ovociti che completavano la meiosi rispetto al controllo non trattato.



**Figura 31.** Percentuale ovociti che emettono il globulo polare dopo IVM.

#### 11.4. Effetto della propionil-L-Carnitina sulla qualità degli ovociti maturati in vitro dopo esposizione a stress ossidativo moderato

Come mostrato nella figura 32, l'aggiunta della PLC al terreno di coltura alle concentrazioni testate dopo l'esposizione allo stress ossidativo moderato era in grado di aumentare significativamente il numero di ovociti con conformazione normale rispetto al perossido di idrogeno raggiungendo i livelli osservati nel controllo. Inoltre, si riduceva la percentuale di ovociti con conformazione aberrante rispetto all'acqua ossigenata con valori simili al controllo.



**Figura 32.** Percentuali ovociti con conformazione normale, leggermente aberrante ed aberrante.

## 12 DISCUSSIONE

Obiettivo di questa parte della tesi è stato quello di verificare l'efficacia di diverse carnitine nell'alleviare il danno ossidativo, noto essere una delle possibili cause della ridotta qualità ovocitaria associata alla PCOS (Lai et al., 2018). I nostri risultati hanno dimostrato che LC e ALC alle concentrazioni più elevate testate in questo studio erano efficaci nel prevenire gli effetti dello stress ossidativo sulla maturazione nucleare, ma non contrastavano l'azione negativa di questo sull'organizzazione di un fuso meiotico normale negli ovociti in MII. Al contrario, l'esposizione alla PLC da sola migliorava la maturazione in vitro in presenza di stress sia in termini di completamento della meiosi che di qualità degli ovociti maturi. Questo studio rappresenta la prima evidenza che la LC e i suoi esteri ALC e PLC possono agire direttamente sull'ovocita influenzando la sua capacità di mettere in atto una risposta adattativa a possibili alterazioni dello stato redox nel microambiente follicolare. Inoltre, questa ricerca ha consentito di evidenziare per la prima volta l'effetto della PLC su cellule riproduttive.

In accordo con la letteratura, la maggiore efficacia della PLC rispetto alle combinazioni di LC e ALC potrebbe essere legata alla sinergia della sua azione antiossidante e della capacità di migliorare il metabolismo energetico mitocondriale (Mingorance et al., 2011). Questa conclusione è in accordo con osservazioni sul tessuto endoteliale e sul tessuto cardiaco che hanno evidenziato che la PLC è in grado di migliorare il metabolismo dei carboidrati e dei lipidi aumentando la produzione di ATP, e di proteggere dal danno ossidativo attraverso la stabilizzazione delle membrane (Huelsmann, 1991; Arduini et al., 1995) e la riduzione sia della perossidazione lipidica. E' stata ,inoltre, osservata una diminuzione dell'espressione della NO sintetasi inducibile (Mister et al., 2002; Azzollini et al., 2008).

In conclusione, i risultati ottenuti in questa parte dello studio aprono nuove ipotesi sul ruolo delle carnitine e della beta-ossidazione degli acidi grassi nell'omeostasi energetica delle cellule germinali già proposto in precedenti studi (Paczkowski et al., 2015; Dunning et al., 2010). Evidenziano, inoltre, la necessità di chiarire il meccanismo d'azione della PLC in questo sistema verificando l'effetto di questo

estere della carnitina su parametri quali la produzione di ATP, ROS e sull'espressione dei trasportatori mitocondriali delle carnitine.

## PARTE 3

### 13 SCOPO DELLA TESI

Come riportato nella parte introduttiva, basandosi sull'evidenza di ridotti livelli di LC nel siero di pazienti PCOS, alcuni studi hanno verificato l'efficacia di questa molecola nel mitigare alcuni sintomi di questa sindrome sia a livello sistemico che riproduttivo (Samimi M et al, 2016). Sulla base delle evidenze ottenute nella PARTE 2, riguardanti l'efficacia della PLC come protettore degli ovociti murini dallo stress ossidativo, in questa parte della tesi è stata verificata l'ipotesi che la somministrazione della PLC possa contrastare gli effetti della PCOS a livello ovarico. In particolare, abbiamo formulato l'ipotesi che l'aggiunta di PLC a formulazioni di LC e ALC, già presenti in prodotti nutraceutici in commercio destinati a migliorare il potenziale riproduttivo, possa conferire a queste una maggiore efficacia e un'eventuale specificità nell'impiego in pazienti affette da PCOS. A questo scopo, è stata valutata l'efficacia della somministrazione di LC ed ALC (C1) in presenza o assenza di PLC (C2) in topi PCOS utilizzando il modello murino descritto e caratterizzato nella prima parte della tesi.

## 14 MATERIALI E METODI

### *14.1. Modello murino di PCOS e trattamento con acil-L-carnitine*

Il disegno sperimentale prevedeva l'utilizzo di 4 gruppi di topi femmina CD1 di 3-4 settimane denominati rispettivamente CTRL, DHEA, DHEA+C1 e DHEA+C2.

Il modello murino di PCOS è stato ottenuto come descritto nella sezione 6.1. Il gruppo DHEA+C1 era sottoposto a somministrazione sottocutanea di 100 µl di DHEA (6 mg/100 g di peso corporeo in EtOH-olio di sesamo) ed a somministrazione orale, tramite *gavage* gastrico, di 100 µl di una formulazione di LC (0.4 mg/topo) ed ALC (0.2 mg/topo), il gruppo DHEA+C2 era sottoposto a somministrazione sottocutanea di 100 µl di DHEA (6 mg/100 g di peso corporeo in EtOH-olio di sesamo) ed a somministrazione orale, tramite *gavage* gastrico, di 100 µl di una formulazione di LC (0.4 mg/topo), ALC (0.2 mg/topo) e PLC (0.08 mg/topo).

I topi di ciascun gruppo ricevevano il trattamento per 20 giorni consecutivi; il giorno successivo all'ultima somministrazione, 3 topi per gruppo erano sacrificati, le ovaie prelevate e conservate fino al successivo utilizzo.

### *14.2. Valutazione della funzionalità ovarica*

Per monitorare l'efficacia del DHEA nell'indurre il fenotipo caratteristico della PCOS, dopo 7 somministrazioni era monitorato giornalmente il ciclo estrale mediante striscio vaginale e lo stadio del ciclo estrale era valutato come discusso nella sez. 6.2.

### *14.3. Induzione della superovulazione*

I restanti topi hanno ricevevano un'iniezione intraperitoneale di 10 IU di PMSG seguita da un'iniezione intraperitoneale di 10 IU di hCG per l'induzione della superovulazione come descritto nella sez. 6.3.

### *14.4. Classificazione degli ovociti ovulati sulla base delle caratteristiche del fuso meiotico e dell'assetto cromosomi*

Gli ovociti precedentemente raccolti erano sottoposti ad immunofluorescenza e classificati come indicato nella sezione 10.2

#### *14.5. Analisi mediante Western blot*

Le ovaie erano processate per le analisi in Western blot come indicato nella sezione 6.8. Le membrane erano, quindi, incubate con anticorpi primari policlonali di coniglio anti-17 $\beta$ -HSD (SC-373902, Santa Cruz Biotechnology Inc., 1:1000), anti- PGC1 $\alpha$  (SC-13067, Santa Cruz Biotechnology Inc., 1:500), anti-mtTFA (SC- 166995, Santa Cruz Biotechnology Inc., 1:300) anti-RAGE (PAI-075, ThermoFisher Scientific, 1:750) overnight a 4°C; successivamente era effettuata l'incubazione con perossidasi di rafano (HRP) coniugata ad anticorpi secondari anti-coniglio (BA1054, Boster Biological Technology Co., Ltd., 1:3000) od anti-topo (Ab6728, Abcam, 1:2000) per 1 ora a temperatura ambiente. Ciascun esperimento era ripetuto tre volte.

#### *14.6. Immunoistochimica*

Le analisi in immunoistochimica erano svolte come in sezione 6.7. Le sezioni erano in seguito incubate con anticorpo di topo anti-(MG)-AGE Arg-Pyrimidine, AGE06B, BioLogo, 1:100) e poi rivelate tramite anticorpi IgG anti-topo.

#### *14.7. Analisi statistica*

Le analisi erano eseguite utilizzando il software Sigma Stat (Jandel Scientific Corporation). Tutti i dati venivano presentati come media  $\pm$  SEM. L'analisi statistica era effettuata mediante One-Way ANOVA e comparazione multipla Holm-Sidak. Valori di  $P < 0.05$  indicavano differenze statisticamente significative

## 15 RISULTATI

### 15.1. Analisi del ciclo estrale

I topi di ciascuno gruppo sperimentale erano anche sottoposti a valutazione del ciclo estrale dopo la seconda e terza settimana di trattamento.

Dopo due settimane di trattamento, solo 4 topi su 6 del gruppo CTRL presentavano ciclo estrale regolare (67%); nei gruppi DHEA+C1 e DHEA+C2 la percentuale di topi con ciclo estrale regolare era nettamente inferiore, rispettivamente 1 topo su 6 (17%) e 2 topi su 6 (33%), mentre nel gruppo DHEA nessun topo presentava ciclo estrale regolare (0%).

Dopo tre settimane di trattamento, era possibile osservare l'aumento del numero di topi con ciclo estrale regolare nei gruppi CTRL e DHEA+C2, rispettivamente 5 topi su 6 (84%) e 3 topi su 6 (50%); nel gruppo DHEA+C1, invece, si aveva la riduzione del numero di topi con ciclo estrale regolare, ovvero 0 su 6 (0%), mentre nel gruppo DHEA tale numero rimaneva stabile, 0 su 6 (0%).

**Tabella 4.** Valutazione della presenza di ciclo estrale regolare dopo 2 e 3 settimane di trattamento

Gruppi sperimentali	II settimana	III settimana
Controllo	67%	83%
DHEA	0%	0%
DHEA + C1	17%	0%
DHEA + C2	33%	50%

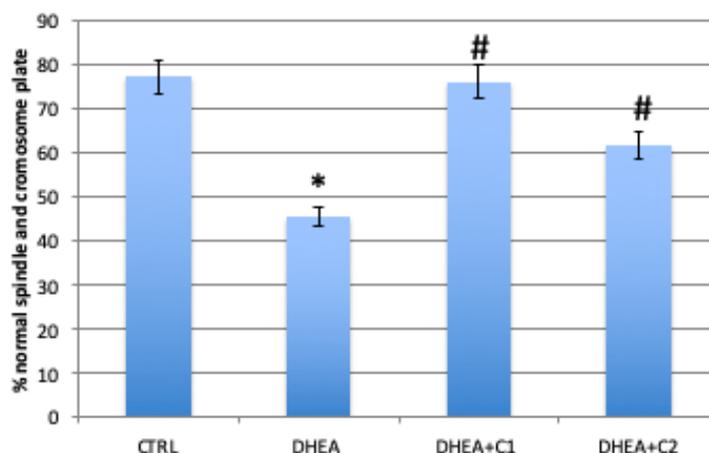
### 15.2. Analisi della funzione ovulatoria

Il maggior numero di ovociti ovulati si riscontrava nel gruppo CTRL (n.52); nei gruppi DHEA (n.38), DHEA+C1 (n.39) e DHEA+C2 (n.44) si osservava invece un numero totale di ovociti ovulati molto simile. Nello specifico, la percentuale di ovociti in MII normali era molto elevata per i gruppi CTRL (92%) e DHEA+C1 (97%); al contrario, era leggermente più bassa nel gruppo DHEA (86%) e notevolmente inferiore nel gruppo DHEA+C2 (73%) (Tabella 5).

<b>Tabella 5.</b> Effetto del trattamento con DHEA e con le differenti formulazioni di carnitine sulla funzione ovulatoria in topi sottoposti a superovulazione				
	<b>CTRL</b>	<b>DHEA</b>	<b>DHEA+C1</b>	<b>DHEA+C2</b>
No. ovociti ovulati	52	38	39	44
Ovociti in MII (%)	92%	86%	97%	73%

### 15.3. Analisi dell'effetto sulla qualità ovocitaria

Sulla base della classificazione precedentemente effettuata (sezione 10.2.) (Figura 33) la percentuale di ovociti normali per quanto riguarda la struttura del fuso mitotico e della piastra metafasica era notevolmente ridotta nel gruppo DHEA (41%) rispetto al CTRL. Tale percentuale nel gruppo DHEA+C1 (76%) e nel gruppo DHEA+C2 (62%) era simile al gruppo CTRL (71 %) (Figura 33).

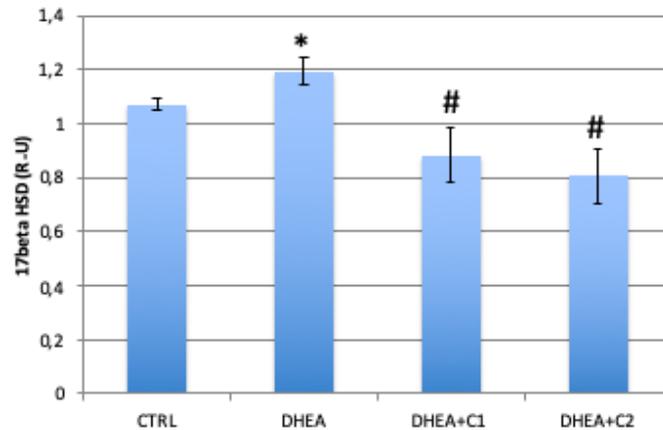


**Figura 33.** Valutazione della percentuale di ovociti normali in ciascuna classe sperimentale. Paired T-Test: \*P<0.05 #P<0.05 rispetto al DHEA

### 15.4. Effetto della somministrazione di carnitine su un marker di steroidogenesi

Per valutare l'effetto della somministrazione delle due differenti formulazioni di acil-L-carnitine nei topi con fenotipo PCOS, era misurata l'espressione del 17- $\beta$  HSD (17- $\beta$  idrossisteroide deidrogenasi), un enzima che catalizza l'interconversione del DHEA in androstenediolo, dell'androstenedione in testosterone e dell'estrone in estradiolo (Labrie F et al, 1997). Dalla comparazione dell'intensità media dei pixel delle bande immunoreattive in entrambi i gruppi trattati con le carnitine (DHEA+C1 e DHEA+C2) si

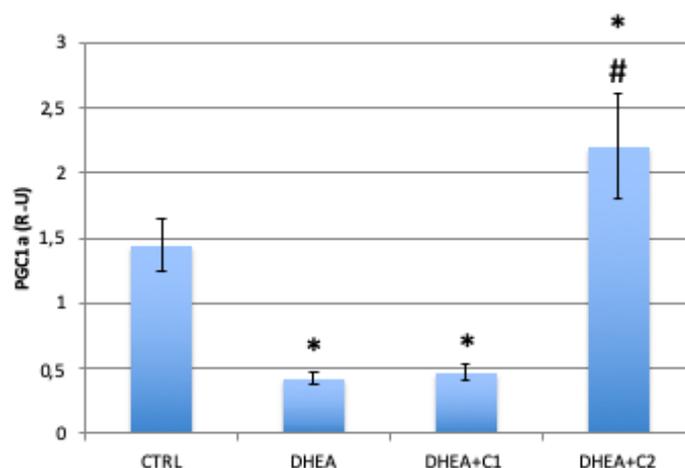
osservava la riduzione dell'espressione dell'enzima 17- $\beta$  HSD rispetto al gruppo DHEA (Figura 34).



**Figura 34.** Quantificazione dell'espressione proteica di 17- $\beta$  HSD, normalizzata rispetto al GAPDH. Paired T-Test: \*P<0.05 rispetto al controllo; #P<0.05 rispetto al DHEA

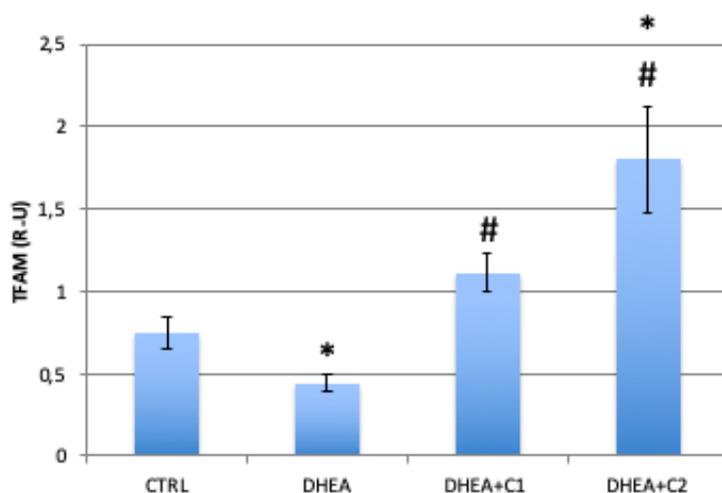
#### 15.5. Effetto della somministrazione di carnitine sulla funzionalità mitocondriale

Per valutare tale effetto è stata effettuata l'analisi dell'espressione della proteina PGC-1 $\alpha$ . Dalla comparazione dell'intensità media dei pixel delle bande immunoreattive si osservava che l'espressione di tale enzima, ridotta nel gruppo DHEA, era nettamente più elevata nel gruppo DHEA+C2 rispetto al gruppo CTRL. Al contrario, nel gruppo DHEA+C1 risultava simile al DHEA (Figura 35).



**Figura 35.** Quantificazione dell'espressione proteica di PGC-1 $\alpha$ , normalizzata rispetto al GAPDH. Paired T-Test: \*P<0.05 rispetto al controllo; #P<0.05 rispetto al DHEA

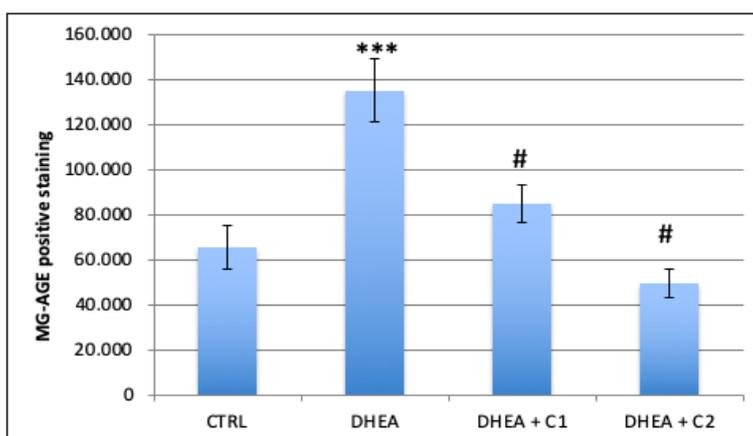
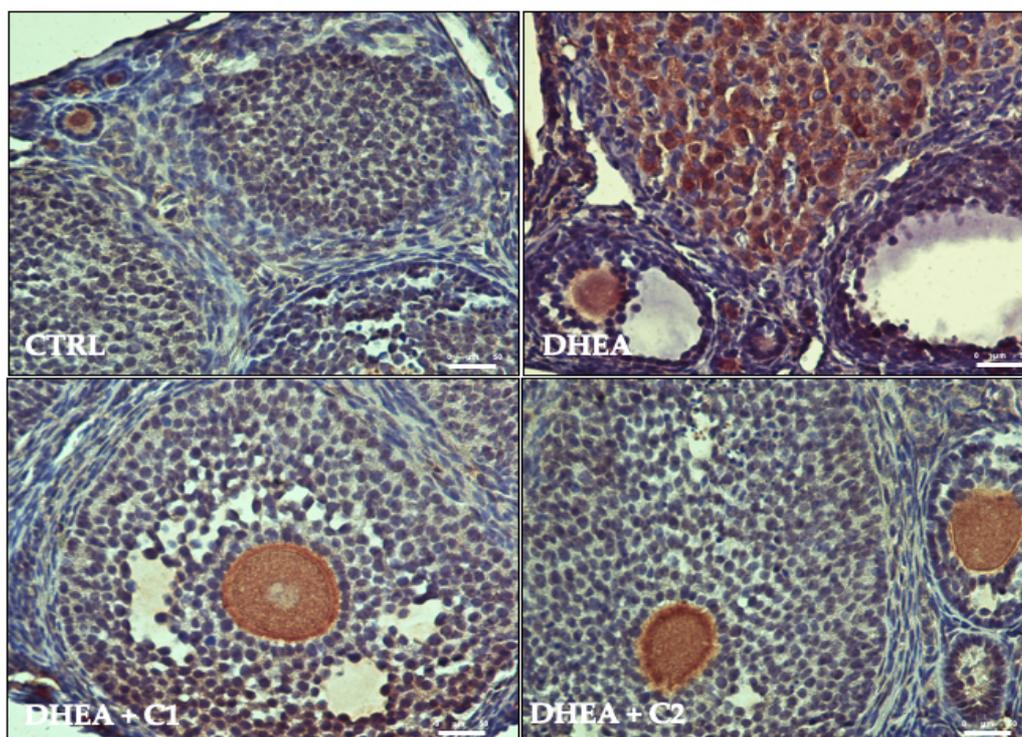
Successivamente, è stata saggiata l'espressione di mtTFA. Dalla comparazione dell'intensità media dei pixel delle bande immunoreattive si osservava che l'espressione di tale fattore trascrizionale era superiore nei gruppi DHEA+C1 e DHEA+C2, rispetto al DHEA, e raggiungeva valori più elevati se comparata con il gruppo CTRL (Figura 36).



**Figura 36.** Quantificazione dell'espressione proteica di mtTFA, normalizzata rispetto al GAPDH. Paired T-Test: \* $P < 0.05$  rispetto al controllo; # $P < 0.05$  rispetto al DHEA

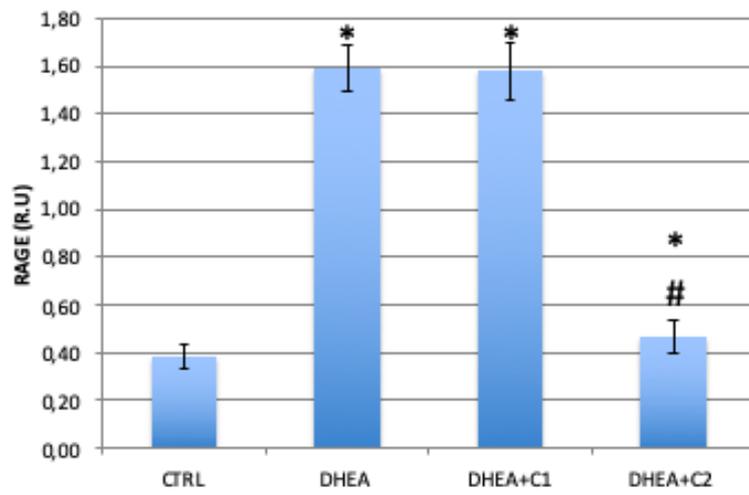
### 15.6. Effetto della supplementazione di carnitine sullo stress glicativo

Per verificare l'effetto delle carnitine sullo stress glicativo associato alla PCOS è stata effettuata l'analisi della produzione di AGE (Advanced Glycation End products) derivanti dal metilgliosale (MG-AGE) ed il livello di espressione dei RAGE a livello ovarico. L'espressione di questi, infatti, aumenta a causa dell'accumulo di AGE attraverso un feedback positivo (Yan et al., 2007). Sulla base dell'analisi istochimica, nei gruppi DHEA+C1 e DHEA+C2 era osservata una diminuzione dei livelli di MG-AGE rispetto al gruppo DHEA (Figura 37).



**Figura 37.** Immunolocalizzazione e quantificazione della marcatura di MG-AGE. Immagini rappresentative di MG-AGE nei diversi gruppi di trattamento. Quantificazione del segnale: i dati sono presentati come media  $\pm$  SEM dell'intensità media dei pixel. Test t, \*\*\* P < 0,001, #rispetto al DHEA.

Dalla comparazione dell'intensità media dei pixel delle bande immunoreattive ottenute mediante Western blotting si osservava una minore espressione di RAGE nel gruppo DHEA+C2 rispetto al DHEA, con valori simili a quelli del CTRL; al contrario, il gruppo DHEA+C1 non mostrava differenze significative rispetto al DHEA (Figura 38).



**Figura 38.** Quantificazione dell'espressione dei RAGE, normalizzata rispetto al GAPDH. Paired T-Test:  
\*P<0.05\*P<0.05 rispetto al controllo; #P<0.05 rispetto al DHEA

## 16 DISCUSSIONE

In questa parte dello studio è stata valutata l'efficacia di alcune formulazioni di acil-L-carnitine, costituite da LC ed ALC in presenza o assenza di PLC, somministrate ai topi DHEA. Entrambe le formulazioni di carnitine risultavano avere un effetto benefico, determinando un incremento del numero di topi con ciclo estrale regolare rispetto al gruppo DHEA. Nonostante ciò, l'effetto della formulazione LC ed ALC (C1) risultava transitorio poiché, al termine della terza settimana di trattamento, tutti i topi presentavano il blocco del ciclo estrale. La formulazione contenente PLC (C2), invece, determinava un ulteriore aumento del numero di topi con ciclo estrale regolare rispetto alla settimana precedente. Tale dato indica una maggiore efficacia della PLC rispetto alla combinazione di LC ed ALC.

Per quanto riguarda l'effetto sull'ovulazione indotta da gonadotropine, il confronto del numero di ovociti ovulati nelle diverse condizioni evidenzia che entrambe le formulazioni di carnitine sono in grado di contrastare l'effetto del DHEA.

Per quanto riguarda la qualità ovocitaria, in termini di normalità sia della struttura del fuso che dell'assetto metafaseico, la somministrazione di entrambe le formulazioni di carnitine ne consentiva il miglioramento rispetto al gruppo DHEA.

Questi effetti positivi delle carnitine a livello del ciclo, della funzione ovulatoria e della qualità ovocitaria potrebbero essere attribuiti ad un miglioramento della steroidogenesi investigata attraverso la valutazione dell'espressione proteica del  $17\beta$ -HSD, l'enzima coinvolto nell'interconversione del DHEA in androstenedione, che si riduceva rispetto al gruppo DHEA. Rivolgendo l'attenzione all'attività mitocondriale, i risultati di questo studio consentono di ipotizzare che questi organuli rappresentino uno dei target dell'attività svolta dalle carnitine nei modelli sperimentali utilizzati. Infatti, l'espressione di PGC1- $\alpha$  e di mtTFA risultava significativamente aumentata in seguito alla somministrazione delle carnitine, anche se limitatamente al gruppo ricevente la PLC. Questo risultato conferma l'ipotesi che questo estere della carnitina presenta una maggiore efficacia nella regolazione del metabolismo energetico rispetto alla LC e ALC. Nonostante i numerosi effetti riportati, entrambe le formulazioni di carnitine testate riducevano la produzione e l'accumulo di MG-AGE nelle ovaie dei topi DHEA. Inoltre, i livelli di RAGE si mostravano notevolmente ridotti, ma soltanto nel gruppo C2. Concludendo, la formulazione contenente LC ed ALC, pur esercitando un effetto positivo sulla qualità ovocitaria, non era in grado di revertire il blocco del ciclo estrale. La

formulazione contenente PLC risultava quindi più efficace in quanto, oltre a migliorare la qualità ovocitaria, era in grado di regolarizzare il ciclo estrale. Inoltre, sulla base dei dati ottenuti dalla valutazione dell'espressione di PGC1- $\alpha$  e mtTFA, la presenza di PLC nella formulazione consente di ripristinare o migliorare la funzionalità mitocondriale. Questa maggiore attività protettiva attribuibile alla presenza della PLC nella formulazione è supportata anche dall'osservazione di un'attività anti-glicante evidenziata dalla riduzione sia di AGE che di RAGE. Allo scopo di investigare il meccanismo alla base di questo effetto, saranno necessari esperimenti volti ad indagare l'attività delle gliossalasi e il coinvolgimento di cambiamenti dello stato redox. Anche se la rilevanza dei risultati ottenuti è limitata dall'utilizzo di un modello animale, questo studio ha rivelato l'importanza del metabolismo mitocondriale a livello ovarico nel mitigare gli effetti della PCOS sulla fertilità. Rappresenta, quindi, un importante punto di partenza per l'identificazione di nuove formulazioni nutraceutiche da impiegare in campo clinico.

## CONCLUSIONI

I risultati di questo studio basati su modelli *in vitro* di stress ossidativo e su un modello *in vivo* di PCOS indotta da iperandrogenismo (DHEA) hanno evidenziato l'effetto benefico delle carnitine sulle cellule riproduttive e la funzionalità ovarica, nonché l'azione differenziale dei diversi esteri presenti nel pool cellulare di carnitine. Le carnitine sono essenziali nel metabolismo degli acidi grassi e possono agire proteggendo dal danno mitocondriale e da condizioni di bilancio energetico alterato come quelle presenti nella sindrome dell'ovaio policistico (PCOS), evidenziate anche dai ridotti livelli di L-carnitina nel siero delle pazienti affette da questa patologia.

Ripristinare l'equilibrio energetico e fornire adeguate riserve di energia all'ovocita durante la follicologenesi e la maturazione può rappresentare un'importante strategia per migliorare l'ambiente intraovarico e aumentare la probabilità di gravidanza.

In questo contesto, composti metabolici, come le carnitine, con effetti positivi sull'attività mitocondriale e sullo *scavenging* dei radicali liberi, possono contribuire a mitigare gli effetti della PCOS.

## BIBLIOGRAFIA

- ABDELRAZIK H, AGARWAL A. L-carnitine and assisted reproduction. *Arch Med Sci.* 2009; 1A:S43–47.
- ABDELRAZIK H, SHARMA R, MAHFOUZ R, AGARWAL A. L-Carnitine decrease DNA damage and improves the in vitro blastocyst development rate in mouse embryos. *Fertil Steril.* 2009; 91:589-596.
- ABUJA PM, ALBERTINI R. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clin Chim Acta.* 2001;306:1-17
- AGARWAL A, APONTE-MELLADO A, PREMKUMAR BJ, SHAMAN A, GUPTA S. The effects of oxidative stress on female reproduction: A review. *Reprod Biol Endocrinol.* 2012; 10:49
- AGARWAL A, GUPTA S, SHARMA RK. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol.* 2005; 3:28.
- AGARWAL A, SENGUPTA P, DURAIRAJANAYAGAM D. Role of L-carnitine in female infertility. *Reprod Biol Endocrinol.* 2018 Jan 26; 16(1):5.
- AKBARALI HI. Oxidative stress and ion channels. In: Laher I, editor. *Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014. p. 355-373
- AL-GUBORY KH, FOWLER PA, GARREL C. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010;42:1634-1650
- AMATO G, CONTE M, MAZZIOTTI G, LALLI E, VITOLO G, TUCKER AT, ET AL. Serum and follicular fluid cytokines in polycystic ovary syndrome during stimulated cycles. *Obstet Gynecol.* 2003;101:1177-1182.
- AMENTA F, CAVALLOTTI C, DE ROSSI M, BOSSONI G, CARPI C. Effect of acetyl-L-carnitine treatment on some behavioural, histochemical and histological parameters of methylazoxymethanol microencephalic rats. *Int J Tissue React.* 1986; 8:513–526.
- ANDERSON CM, STAHL A. SLC27 fatty acid transport proteins. *Mol Aspects Med.* 2013; 34:516–528.
- ANDO S, TADENUMA T, TANAKA Y, FUKUI F, KOBAYASHI S, OHASHI Y, KAWABATA T. Enhancement of learning capacity and cholinergic synaptic function by carnitine in aging rats. *Journal of Neuroscience Research.* 2001; 66:266-271.
- ANSARI A, RAHMAN MS, SAHA SK, SAIKOT FK, DEEP A, KIM KH. Function of the SIRT3 mitochondrial deacetylase in cellular physiology, cancer, and neurodegenerative disease. *Aging Cell.* 2017; 16(1):4-16.
- ARDUINI A. Carnitine and its acetyl esters as secondary antioxidants? *American Heart Journal.* 1992; 123:1726-1727
- ARDUINI A, DOTTORI S, SCIARRONI AF, ET AL. Effect of propionyl-L-carnitine treatment on membrane phospholipid fatty acid turnover in diabetic rat erythrocytes. *Mol Cell Biochem.* 1995;152:31–37.
- ARSLANIAN SA, LEWY VD, DANADIAN K. Glucose intolerance in obese adolescents with polycystic ovary syndrome: roles of insulin resistance and beta-cell dysfunction and risk of cardiovascular disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86:66–71.
- AZZIZ, R.; CARMINA, E.; CHEN, Z.; DUNAIF, A.; LAVEN, J.S.; LEGRO, R.S.; LIZNEVA, D.; NATTERSON-HOROWITZ, B.; TEEDE, H.J.; YILDIZ, B.O. Polycystic ovary syndrome. *Nat Rev Dis Primers* 2016, 2, 16057. doi: 10.1038/nrdp.2016.57.
- AZZIZ R, CARMINA E, DEWAILLY D, DIAMANTI-KANDARAKIS E, ESCOBAR- MORREALE HF, FUTTERWEIT W, ET AL. Androgen Excess Society. Positions statement: criteria for defining polycystic ovary syndrome as a predominantly hyperandrogenic syndrome: an Androgen Excess Society guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91:4237-4245.
- AZZIZ R, WOODS KS, REYNA R, KEY TJ, KNOCHENHAUER ES, YILDIZ BO. The prevalence and features of the polycystic ovary syndrome in an unselected population. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89:2745–2749.
- AZZOLLINI N, CUGINI D, CASSIS P, ET AL. Propionyl-L-carnitine prevents early graft dysfunction in allogeneic rat kidney transplantation. *Kidney Int.* 2008;74:1420–1428
- BAHL JJ, BRESSLER R. The pharmacology of carnitine. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1987; 27: 257-77

- BALEN A. Polycystic ovary syndrome and cancer. *Hum Reprod Update*. 2001; 7:522–525.
- BALEN AB, RUTHERFORD AJ. Managing anovulatory infertility and polycystic ovary syndrome. *BMJ*. 2007; 335:663–666.
- BALEN AH, CONWAY GS, KALTSAS G, TECHATRASAK K, MANNING PJ, WEST C, JACOBS HS. Polycystic ovary syndrome: the spectrum of the disorder in 1741 patients. *Hum Reprod*. 1995; 10:2107–2111.
- BALEN AH, LAVEN JS, TAN SL, DEWAILLY D. Ultrasound assessment of the polycystic ovary: international consensus definitions. *Hum Reprod Update*. 2003; 9:505–514.
- BARBIERI RL, MAKRIS A, RANDALL RW, DANIELS G, KISTNER RW, RYAN KJ. Insulin stimulates androgen accumulation in incubations of ovarian stroma obtained from women with hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab*. 1986; 62:904–910.
- BARBIERI RL, MAKRIS A, RYAN KJ. Effects of insulin on steroidogenesis in cultured porcine ovarian theca. *Fertil Steril*. 1983; 40:237–241.
- BARBIERI RL, SMITH S, RYAN KJ. The role of hyperinsulinemia in the pathogenesis of ovarian hyperandrogenism. *Fertil Steril* 1988; 50:197–212.
- BARNARD L, FERRIDAY D, GUENTHER N, STRAUSS B, BALEN AH, DYE L. Quality of life and psychological well being in polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod*. 2007; 22:2279– 2286.
- BARONDEAU DP, KASSMANN CJ, BRUNS CK, TAINER JA, GETZOFF ED. Nickel superoxide dismutase structure and mechanism. *Biochemistry*. 2004;43: 8038-8047
- BASKOL G, AYGEN E, ERDEM F, CANIKLIOGLU A, NARIN F, SAHIN Y, ET AL. Assessment of paraoxonase 1, xanthine oxidase and glutathione peroxidase activities, nitric oxide and thiol levels in women with polycystic ovary syndrome. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2012; 91:326-330.
- BASTA G. Receptor for advanced glycation endproducts and atherosclerosis: from basic mechanisms to clinical implications. *Atherosclerosis*. 2008; 196:9–21.
- BEDAIWY MA, FALCONE T, MOHAMED MS, ALEEM AA, SHARMA RK, WORLEY SE, THORNTON J, AGARWAL A. Differential growth of human embryos in vitro: role of reactive oxygen species. *Fertil Steril*. 2004;82:593–600.
- BEDAIWY MA, FALCONE T. Peritoneal fluid environment in endometriosis. *Clinicopathological implications*. *Minerva Ginecol*. 2003;55:333–345.
- BELANI, M.; DEO, A.; SHAH, P.; BANKER, M.; SINGAL, P.; GUPTA, S. Differential insulin and steroidogenic signaling in insulin resistant and non-insulin resistant human luteinized granulosa cells-A study in PCOS patients. *J Steroid Biochem Mol Biol* **2018**, 178, 283-292. doi: 10.1016/j.jsbmb.2018.01.008.
- BERLANGA A, GUIU-JURADO E, PORRAS JA, AUGUET T. Molecular pathways in non- alcoholic fatty liver disease. *Clin Exp Gastroenterol*. 2014; 7:221–239
- BIEBER LL. Carnitine. *Annu Rev Biochem*. 1988; 57:261–283.
- BIERHAUS A, HUMPERT PM, MORCOS M, WENDT T, CHAVAKIS T, ARNOLD B, ET AL. Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *J Mol Med (Berl)*. 2005; 83:876-886;
- BIGDELI H, SNYDER PJ. Gonadotropin releasing hormone release from the rat hypothalamus: dependence on membrane depolarization and calcium influx. *Endocrinology*. 1978; 103:281–286.
- BIGGERS JD, WHITTINGHAM DG, DONAHUE RP. The pattern of energy metabolism in the mouse oocyte and zygote. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1967; 58:560-567.
- BINIENDA ZK, ALI SF. Neuroprotective role of l-carnitine in the 3- nitropropionic acid induced neurotoxicity. *Toxicology Letters*. 2001; 125:67-73.
- BODIS-WOLLNER I. Physiological effects of acetyl-levo-carnitine in the central nervous system. *Int J Clin Pharmacol Res*. 1990;10:109–114.
- BOUAYED J, BOHN T. Exogenous antioxidants—Double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxid Med Cell Longevity*. 2010; 3:228-237
- BOUSMPOULA, A.; BENIDIS, E.; DEMERIDOU, S.; KAPETA-KOURKOULI, R.; CHASIAKOU, A.; CHASIAKOU, S.; KOUSKOUNI, E.; BAKA, S. Serum and follicular fluid irisin levels in women with polycystic ovaries undergoing ovarian stimulation: correlation with insulin resistance and lipoprotein lipid profiles. *Gynecol Endocrinol* **2019**, 35, 803-806. doi: 10.1080/09513590.2019.1594761.

- BREDDT DS. Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. *Free Radic Res.* 1999; 31(6): 577-596
- BREMER J. Carnitine-metabolism and functions. *Physiol Rev.* 1983;63: 1420–1480.
- BRESOLIN N, FREDDO L, VERGANI L, ANGELINI C. Carnitine, carnitine acyltransferases, and rat brain function. *Exp Neurol.* 1982; 78:285–292.
- BROWN, GC. Nitric oxide and mitochondrial respiration. *Biochimica and Biophysica Acta.* 1999; 1411:351-369.
- BUCALA R, CERAMI A. Advanced glycosylation: chemistry, biology, and implications for diabetes and aging. *Adv Pharmacol.* 1992; 23:1–34.
- BUCCIARELLI LG, WENDT T, QUW, LU Y, LALLA E, RONG LL, GOOVA MT, MOSER B, KISLINGER T, LEE DC ET AL. RAGE blockade stabilizes established atherosclerosis in diabetic apolipoprotein E-null mice. *Circulation.* 2002; 106:2827–2835
- BULER, M.; ANDERSSON, U.; HAKKOLA, J. Who watches the watchmen? Regulation of the expression and activity of sirtuins. *FASEB J* **2016**; 30, 3942–3960.
- BURGHEEN GA, GIVENS JR, KITABCHI AE. Correlation of hyperandrogenism with hyperinsulinism in polycystic ovarian disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 1980; 50:113–116.
- BUYUKOKUROGLU ME, GULCIN, I, OKTAY M, KUFREVIOGLU OI. In vitro antioxidant properties of dantrolene sodium. *Pharmacological Research.* 2001; 44:491-495.
- CABISCOL E, ROS J. Oxidative damage to proteins: structural modifications and consequences in cell function. *Redox proteomics: From protein modification to cellular*
- CALDWELL, A.S.; MIDDLETON, L.J.; JIMENEZ, M.; DESAI, R.; MCMAHON, A.C.; ALLAN, C.M.; HANDELSMAN, D.J.; WALTERS, K.A. Characterization of reproductive, metabolic, and endocrine features of polycystic ovary syndrome in female hyperandrogenic mouse models. *Endocrinology* **2014**, 155, 3146-59. doi: 10.1210/en.2014-1196.
- CAI W, RAMDAS M, ZHU L, CHEN X, STRIKER GE, VLASSARA H. Oral advanced
- CALIGIONI, C.S. Assessing reproductive status/stages in mice. *Curr Protoc Neurosci* **2009**, Appendix 4I. doi: 10.1002/0471142301.nsa04is48.
- CALVANI M, ARRIGONI-MARTELLI E. Attenuation by acetyl-L-carnitine of neurological damage and biochemical derangement following brain ischemia and reperfusion. *International Journal of Tissue Reactions-Experimental and Clinical.* 1999; 21:1-6.
- CARLBERG M, NEJATY J, FROYSA B, GUAN Y, SODER O, BERGQVIST A. Elevated expression of tumour necrosis factor alpha in cultured granulosa cells from women with endometriosis. *Hum Reprod.* 2000; 15:1250–1255.
- CARMINA E, OBERFIELD SE, LOBO RA. The diagnosis of polycystic ovary syndrome in adolescents. *Am J Obstet Gynecol.* 2010; 203: 201.e1–201.e5.
- CARTER AL, ABNEY TO, LAPP DF. Biosynthesis and metabolism of carnitine. *J Child Neurol.* 1995; 10(Suppl 2): S3-7.
- CENTER SA, WARNER KL, RANDOLPH JF, SUNVOLD GD, VICKERS JR. Influence of dietary supplementation with (L)-carnitine on metabolic rate, fatty acid oxidation, body condition, and weight loss in overweight cats. *Am J Vet Res.* 2012; 73:1002–1015.
- CERAMI C, FOUNDS H, NICHOLL I, MITSUHASHI T, GIORDANO D, VANPATTEN S, LEE A, AL-ABED Y, VLASSARA H, BUCALA R ET AL. Tobacco smoke is a source of toxic reactive glycation products. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:13915–13920.
- CETINKAYA A, BULBULOGLU E, KANTARCEKEN B, CIRALIK H, KURUTAS EB, BUYUKBESE MA. Effects of L-carnitine on oxidant/antioxidant status in acet acid-induced colitis. *Dig Dis Sci.* 2006; 51:488-494.
- CHEN X, LU T, WANG X, SUN X, ZHANG J, ZHOU K, JI X, SUN R, WANG X, CHEN M,
  - LING X. Metabolic alterations associated with polycystic ovary syndrome: A UPLC Q-Exactive based metabolomic study. *Clin Chim Acta.* 2019 Nov 20.
- CHENG G, CAO Z, XU X, VAN MEIR EG, LAMBETH JD. Homologs of gp91phox: Cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. *Gene* 2001; 269:131-140.
- CHENG HJ, CHEN T. Clinical efficacy of combined L-carnitine and acetyl-L-carnitine on idiopathic asthenospermia. *Zhonghua Nan Ke Xue.* 2008;14: 149–151.

- CHENG Z, TSENG Y, WHITE MF. Insulin signaling meets mitochondria in metabolism. *Trends Endocrinol Metab.* 2010; 21:589-598.
- CHITTENDEN BG, FULLERTON G, MAHESHWARI A, BHATTACHARYA S. Polycystic ovary syndrome and the risk of gynaecological cancer: a systematic review. *Reprod Biomed Online.* 2009; 19:398–405.
- CHOI KM, YOO HJ, KIM HY, LEE KW, SEO JA, KIM SG, KIM NH, CHOI DS, BAIK SH. Association between endogenous secretory RAGE, inflammatory markers and arterial stiffness. *Int J Cardiol.* 2009; 132:96–101.
- KYVELIDOU C, TSEREVELAKIS G, FILIPPIDIS G, TSAGKARAKI M, TSOUKO A, FOKATIS C, ATHANASSAKIS I. L-carnitine alters lipid body content in pre-implantation embryos leading to infertility. *J Reprod Immunol.* 2014;101-102:18–39.
- CIPOLLA MJ, NICOLOFF A, REBELLO T, AMATO A, PORTER JM. Propionyl- l-carnitine dilates human subcutaneous arteries through an endothelium-dependent mechanism. *J vasc Surg.* 1999; 29:1097–1103.
- COFFEY S, BANO G, MASON HD. Health-related quality of life in women with polycystic ovary syndrome: a comparison with the general population using the Polycystic Ovary Syndrome Questionnaire (PCOSQ) and the Short Form-36 (SF-36). *Gynecol Endocrinol.* 2006; 22:80–86.
- COMBELLES CM, GUPTA S, AGARWAL A. Could oxidative stress influence the in vitro maturation of oocytes?. *Reprod Biomed Online.* 2009; 18:864-880.
- CONOGHAN J, HANDYSIDE AH, WINSTON RM, LEESE HJ. Effects of pyruvate and glucose on the development of human preimplantation embryos in vitro. *J Reprod Fertil.* 1993; 99:87-95.
- COOPER DE, YOUNG PA, KLETT EL, COLEMAN RA. Physiological Consequences of Compartmentalized Acyl-CoA Metabolism. *J Biol Chem.* 2015; 290:20023–20031.
- DALLE-DONNE I, ALDINI G, CARINI M, COLOMBO R, ROSSI R, MILZANI A. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *J Cell Mol Med.* 2006; 10:389-406.
- DAVEY MW, STALS E, PANIS B, KEULEMANS J, SWENNEN RL. High-throughput determination of malondialdehyde in plant tissues. *Anal Biochem.* 2005;347:201-207.
- DEEKS AA, GIBSON-HELM ME, PAUL E, TEEDE HJ. Is having polycystic ovary syndrome a predictor of poor psychological function including anxiety and depression? *Hum Reprod.* 2011; 26:1399–1407.
- DEUGARTE CM, BARTOLUCCI AA, AZZIZ R. Prevalence of insulin resistance in the polycystic ovary syndrome using the homeostasis model assessment. *Fertil Steril.* 2005; 83:1454–1460.
- DEUGARTE CM, WOODS KS, BARTOLUCCI AA, AZZIZ R. Degree of facial and body terminal hair growth in unselected black and white women: toward a populational definition of hirsutism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91:1345–1350.
- DI EMIDIO G, SANTINI SJ, D'ALESSANDRO AM, VETUSCHI A, SFERRA R, ARTINI PG, CARTA G, FALONE S, AMICARELLI F, TATONE C. SIRT1 participates in the response to methylglyoxal-dependent glycation stress in mouse oocytes and ovary. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2019; 1865(6):1389-1401.
- DI NISIO V, ROSSI G, PALMERINI MG, MACCHIARELLI G, TIBONI GM, CECCONI S. Increased rounds of gonadotropin stimulation have side effects on mouse fallopian tubes and oocytes. *Reproduction.* 2018; 155(3):245-250.
- DIAMANTI-KANDARAKIS E, KATSIKIS I, PIPERI C, KANDARAKI E, PIOUSKA A, PAPAVALASSILOU AG, PANIDIS D. Increased serum advanced glycation end products is a distinct finding in lean women with polycystic ovary syndrome (PCOS). *Clin Endocrinol (Oxf)* 2008; 69:634–641.
- DIAMANTI-KANDARAKIS E, PIPERI C, KALOFOUTIS A, CREATSAS G. Increased levels of serum advanced glycation end-products in women with polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2005; 62:37–43.
- DIAMANTI-KANDARAKIS E, PIPERI C, KORKOLOPOULOU P, KANDARAKI E, LEVIDOU G, PAPAVALASSILOU AG, PATSOURIS E, PAPAVALASSILOU AG. Accumulation of dietary glycotoxins in the reproductive system of normal female rats. *J Mol Med.* 2007;85: 1413–1420.
- DIAMANTI-KANDARAKIS E, PIPERI C, LIVADAS S, KANDARAKI E, PAPAVALASSILOU AG, KOUTSILIERIS M. Interference of AGE-RAGE Signaling with Steroidogenic Enzyme Action in Human Ovarian Cells. San Francisco, CA: Endocrine Society, 2013.

- DIAMANTI-KANDARAKIS E, PIPERI C, PATSOURIS E, KORKOLOPOULOU P, PANIDIS D, PAWELCZYK L, PAPAVALASSIOU AG, DULEBA AJ. Immunohistochemical localization of advanced glycation end-products (AGEs) and their receptor (RAGE) in polycystic and normal ovaries. *Histochem Cell Biol* 2007; 127:581–589.
- DIAMANTI-KANDARAKIS E. Insulin resistance in PCOS. *Endocrine* 2006; 30:13–17.
- DIAMANTI-KANDARAKIS E, DUNAIF A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome revisited: An update on mechanisms and implications. *Endocr Rev*. 2012; 33:981-1030.
- DIAMANTI-KANDARAKIS E. Polycystic ovarian syndrome: Pathophysiology, molecular aspects and clinical implications. *Expert Rev Mol Med*. 2008; 10:e3.
- DINGER Y, AKCAY T, ERDEM T, ILKER SAYGILI E, GUNDOGDU S. DNA damage, DNA susceptibility to oxidation and glutathione level in women with polycystic ovary syndrome. *Scand J Clin Lab Invest*. 2005; 65:721-728.
- DI PIETRO, M.; PASCUALI, N.; PARBORELL, F.; ABRAMOVICH, D. Ovarian angiogenesis in polycystic ovary syndrome. *Reproduction* **2018**, 155, R199-R209. doi:10.1530/REP-17-0597.
- DIONYSOPOULOU E, VASSILIADIS S, EVANGELIOU A, KOUMANTAKIS EE, ATHANASSAKIS I. Constitutive or induced elevated levels of L-carnitine correlate with the cytokine and cellular profile of endometriosis. *J Reprod Immunol*. 2005; 65:159–170.
- DOKRAS A, CLIFTON S, FUTTERWEIT W, WILD R. Increased risk for abnormal depression scores in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta- analysis. *Obstet Gynecol*. 2011; 117:145–152.
- DORSAM G, TAHER MM, VALERIE KC, KUEMMERLE NB, CHAN JC, FRANSON RC. Diphenylethiodium chloride blocks inflammatory cytokine-induced up-regulation of group IIA phospholipase A2 in rat mesangial cells. *JPharmacolExp Ther*. 2000; 292:271-279.
- DOWNS SM, MOSEY JL, KLINGER J. Fatty acids oxidation and meiotic resumption in mouse oocytes. *Mol Reprod Dev*. 2009; 76:844-853. 88
- DUH PD, TU YY, YEN GC. Antioxidant activity of water extract of harnng jjur (Chrysanthemum morifolium Ramat). *Lebensmittel Wissenschaft und-Technologie*. 1999; 32:269-277.
- DUMOLLARD R, CARROLL J, DUCHEN MR, CAMPBELL K, SWANN K. Mitochondrial function and redox state in mammalian embryos. *Semin Cell Dev Biol*. 2009; 20:346-353.
- DUNAIF A, FINEGOOD DT. Beta-cell dysfunction independent of obesity and glucose intolerance in the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996; 81:942–947.
- DUNAIF A, GIVENS J, HASELTINE F, MERRIAM G. Current issues in endocrinology and metabolism: polycystic ovary syndrome. Acute augmentation of plasma androstenedione and dehydroepiandrosterone by euglycemic insulin infusion: evidence for a direct effect of insulin on ovarian steroidogenesis. Cambridge, UK: Blackwell. 1992.
- DUNAIF A, SEGAL KR, FUTTERWEITW, DOBRJANSKY A. Profound peripheral insulin resistance, independent of obesity, in polycystic ovary syndrome. *Diabetes*. 1989; 38:1165– 1174.
- DUNAIF A, WU X, LEE A, DIAMANTI-KANDARAKIS E. Defects in insulin receptor signaling in vivo in the polycystic ovary syndrome (PCOS). *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001.
- DUNAIF A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. *Endocr Rev*. 1997; 18:774–800.
- DUNNING KR, CASHMAN K, RUSSELL DL, THOMPSON JG, NORMAN RJ, ROBKER RL. Beta-oxidation is essential for mouse oocyte developmental competence and early embryo development. *Biol Reprod*. 2010; 83:909-918.
- DUNNING KR, ROBKER RL. Promoting lipid utilization with l-carnitine to improve oocyte quality. *Anim Reprod Sci*. 2012; 134:69–75.
- DVORAKOVA M, HÖHLER B, VOLLERTHUN R, FISCHBACH T, KUMMER W. Macrophages: A major source of cytochrome b558 in the rat carotid body. *Brain Res*. 2000; 852:349-354.
- EHRMANN DA, KASZA K, AZZIZ R, LEGRO RS, GHAZZI MN. Effects of race and family history of type 2 diabetes on metabolic status of women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005; 90:66–71.
- EHRMANN DA. Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med* 2005; 352:1223–1236.

- FAUSER BC, TARLATZIS BC, REBAR RW, LEGRO RS, BALEN AH, LOBO R, ET AL. Consensus on women's health aspects of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): the Amsterdam ESHRE/ASRM-Sponsored 3rd PCOS Consensus Workshop Group. *Fertil Steril*. 2012; 97:28- 38e25.
- FENKCI SM, FENKCI V, OZTEKIN O, ROTA S, KARAGENC N. Serum total L-carnitine levels in non-obese women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod*. 2008; 23:1602–1606.
- FENKCI V, FENKCI S, YILMAZER M, SERTESER M. Decreased total antioxidant status and increased oxidative stress in women with polycystic ovary syndrome may contribute to the risk of cardiovascular disease. *Fertil Steril*. 2003; 80:123–127.
- FLAYYIH NK. Effect of L-carnitine administration to pregnant mice on some reproductive hormones and organs. *Iraqi J Vet Med*. 2012;36:68–74.
- FRANKS S, MCCARTHY M. Genetics of ovarian disorders: polycystic ovary syndrome. *Rev Endocr Metab Disord*. 2004; 5:69–76.
- FUJII EY, NAKAYAMA M. The measurements of RAGE, VEGF, and AGEs in the plasma and follicular fluid of reproductive women: the influence of aging. *Fertil Steril*. 2010;94:694–700.
- FULCO, M.; SARTORELLI, V. Comparing and contrasting the roles of AMPK and SIRT1 in metabolic tissues. *Cell Cycle* **2008**, 7, 3669-79.
- GARG D, MERHI Z. Relationship between advanced glycation end products and steroidogenesis in PCOS. *Reprod Biol Endocrinol*. 2016;14:71.
- GARG, D.; GRAZI, R.; LAMBERT-MESSERLIAN, G.M.; MERHI, Z. Correlation between follicular fluid levels of sRAGE and vitamin D in women with PCOS. *J Assist Reprod Genet* 2017, 34, 1507-1513. doi: 10.1007/s10815- 017-1011-6.
- GEISZT M, KAPUS A, NÉMET K, FARKAS L, LIGETI E. Regulation of capacitative Ca<sup>2+</sup> influx in human neutrophil granulocytes alterations in chronic granulomatous disease. *JBiolChem*. 1997;272:26471-26478.
- GENAZZANI AD, LANZONI C, RICCHIERI F, SANTAGNI S, RATTIGHIERI E, CHIERCHIA E, MONTELEONE P, JASONNI VM. Acetyl-L-carnitine (ALC) administration positively affects reproductive axis in hypogonadotropic women with functional hypothalamic amenorrhea. *J Endocrinol Investig*. 2011; 34:287–291.
- GLABOWSKI W, KURZAWA R, WISZNIEWSKA B, BACZKOWSKI T, MARCHLEWICZ M, BRELIK P. Growth factors effects on preimplantation development of muose embryos exposed to tumor necrosis factor alpha. *Reprod Biol*. 2005; 5:83-99.
- GOLDBERG T, CAIW, PEPPA M, DARDAINE V, BALIGA BS, URIBARRI J, VLASSARA H. Advanced glycoxidation end products in commonly consumed foods. *J Am Diet Assoc* 2004; 104:1287–1291.
- GOMES, R.; SOUSA SILVA, M.; QUINTAS, A.; CORDEIRO, C.; FREIRE, A.; PEREIRA, P.; MARTINS, A.; MONTEIRO, E.; BARROSO, E.; PONCES FREIRE, A. Argpyrimidine, a methylglyoxal-derived advanced glycation end-product in familial amyloidotic polyneuropathy. *Biochem J* 2005, 385, 339-45.
- GOMEZ-AMORES L, MATE A, REVILLA E, SANTA-MARIA C, VAZQUEZ CM. Antioxidant activity of propionyl-L-carnitine in liver and heart of spontaneously hypertensive rats. *Life Sci*. 2006.
- GONZALEZ F, ROTE NS, MINIUM J, KIRWAN JP. Reactive oxygen species-induced oxidative stress in the development of insulin resistance and hyperandrogenism in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91:336-340.
- GOUGEON, A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocr Rev* 1996,17, 121-55.
- GUERIN P, EL MOUATASSIM S, MENEZO Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update* 2001; 7:175-189.
- GÜLÇİN I. Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine. *Life Sci*. 2006; 78(8):803-811.
- GULEWITCH VS, KRIMBERG R. Zur Kenntnis der Extraktivstoffe der Muskeln. II. Mitteilung: Über das Carnitin. *Zeits für Physiol Chem*. 1905;45:326–330.
- GUPTA S, GOLDBERG JM, AZIZ N, GOLDBERG E, KRAJCIR N, AGARWAL A. Pathogenic mechanisms in endometriosis-associated infertility. *Fertil Steril*. 2008;90:247–257.
- GUT P, VERDIN E. The nexus of chromatin regulation and intermediary metabolism. *Nature*. 2013; 502:489-498.
- HABER F, WEISS J. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proceedings of the Royal Society of London*. 1934; 147:332-351.

- HALLIWELL B, GUTTERIDGE JM. Free Radicals in Biology and Medicine. Clarendon Press, Oxford. 1989; pp. 23-30.
- HARDIMAN P, PILLAY OC, ATIOMO W. Polycystic ovary syndrome and endometrial carcinoma. *Lancet*. 2003; 361:1810–1812.
- HASSANI F, KARAMI M, JALALI NADOUSHAN MR, YAZDI PE. Nitric Oxide-Induced Polycystic Ovaries in The Wistar Rat. *Int J Fertil Steril* 2012; 6:111-6.
- HE W, NEWMAN JC, WANG MZ, HO L, VERDIN E. Mitochondrial sirtuins: regulators of protein acylation and metabolism. *Trends Endocrinol Metab*. 2012; 23:467-476.
- HOUTEN SM, WANDERS RJ. A general introduction to the biochemistry of mitochondrial fatty acid beta-oxidation. *J Inherit Metab Dis*. 2010; 33:469–477.
- HUANG, Y.; YU, Y.; GAO, J.; LI, R.; ZHANG, C.; ZHAO, H.; ZHAO, Y.; QIAO, J. Impaired oocyte quality induced by dehydroepiandrosterone is partially rescued by metformin treatment. *PLoS One* **2015**, *10*, e0122370. doi:10.1371/journal.pone.0122370.
- HÜLSMANN WC. Biochemical profile of propionyl-L-carnitine. *Cardiovasc Drugs Ther*. 1991;5:7–9.
- IAGER AE, KOCABAS AM, OTU HH, RUPPEL P, LANGERVELD A, SCHNARR P, SUAREZ M, JARRETT JC, CONAGHAN J, ROSA GJ, FERNANDEZ E, RAWLINS RG, CIBELLI JB, CROSBY JA. Identification of a novel gene set in human cumulus cells predictive of an oocyte's pregnancy potential. *Fertil Steril*. 2013; 99:745-752 e746.
- JINNO, M.; TAKEUCHI, M.; WATANABE, A.; TERUYA, K.; HIROHAMA, J.; EGUCHI, N.; MIYAZAKI, A. Advanced glycation end-products accumulation compromises embryonic development and achievement of pregnancy by assisted reproductive technology. *Hum Reprod* 2011, 26, 604–610, <https://doi.org/10.1093/humrep/deq388>.
- IBAÑEZ L, HALL JE, POTAU N, ET AL. Ovarian 17-hydroxyprogesterone hyperresponsiveness to gonadotropin-releasing hormone (GnRH) agonist challenge in women with polycystic ovary syndrome is not mediated by luteinizing hormone hypersecretion: evidence from GnRH agonist and human chorionic gonadotropin stimulation testing. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996; 81:4103.
- INAGI R. Inhibitors of advanced glycation and endoplasmic reticulum stress. *Methods Enzymol* 011; 491:361–380.
- INFANTE JP, TSCHANZ CL, SHAW N, MICHAUD AL, LAWRENCE P, BRENNAN JT.
- IRAT AM, AKTAN F, OZANSOY G. Effects of L-carnitine treatment on oxidant/ antioxidant state and vascular reactivity of streptozotocin-diabetic rat aorta. *J Pharm Pharmacol*. 2003;55:1389–1395.
- ISIK H, AYNIOGLU O, TIMUR H, SAHBAZ A, HARMA M, CAN M, ET AL. Is Xanthine oxidase activity in polycystic ovary syndrome associated with inflammatory and cardiovascular risk factors? *J Reprod Immunol*. 2016;116:98-103.
- ISMAIL AM, HAMED AH, SASO S, THABET HH. Adding L-carnitine to clomiphene resistant PCOS women improves the quality of ovulation and the pregnancy rate. A randomized clinical trial. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2014; 180:148–152.
- JIA X, CHANG T, WILSON TW, WU L. Methylglyoxal mediates adipocyte proliferation by increasing phosphorylation of Akt1. *PloS One* 2012; 7:e36610.
- JIANG W, LI Y, ZHAO Y, GAO Q, JIN Q, YAN C, XU Y. L-carnitine supplementation during in vitro culture regulates oxidative stress in embryos from bovine aged oocytes. *Theriogenology*. 2019 Nov 30;143:64-73. doi:10.1016/j.theriogenology.2019.11.036. [Epub ahead of print] PubMed PMID:31837632.
- JIMENEZ PT, FROLOVA AI, CHI MM, GRINDLER NM, WILLCOCKSON AR, REYNOLDS KA, ZHAO Q, MOLEY KH. DHEA-mediated inhibition of the pentose phosphate pathway alters oocyte lipid metabolism in mice. *Endocrinology*. 2013; 154:4835-4844.
- JOHNSON LJ, MEACHAM SL, KRUSKALL LJ. The antioxidants- vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids. *J Agromedicine*. 2003; 9:65-82.
- JOHNSON T, KAPLAN L, OUYANG P, ET AL. NIH EbMW Report. Bethesda, MD: National Institutes of Health; 2013. National Institutes of Health evidence-based methodology workshop on polycystic ovary syndrome (PCOS); p. 1 <https://prevention.nih.gov/programs-events/pathways-to-prevention/previous-workshops/pcos/workshop-resources> [accessed 14 Nov, 2014].
- JURISICOVA A, VARMUZA S, CASPER RF. Programmed cell death and human embryo fragmentation. *Mol Hum Reprod* 1996; 2:93-98.

- KALAISELVI T, PANNEERSELVAM C. Effect of L-carnitine on the status of lipid peroxidation and antioxidants in aging rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 1998; 9:575- 581.
- KALEA AZ, SCHMIDT AM, HUDSON BI. RAGE: a novel biological and genetic marker for vascular disease. *Clin Sci (Lond)* 2009; 116:621–637.
- KALHORI Z, MEHRANJANI MS, AZADBAKHT M, SHARIATZADEH MA. L-Carnitine improves endocrine function and folliculogenesis by reducing inflammation, oxidative
  - stress and apoptosis in mice following induction of polycystic ovary syndrome. *Reprod Fertil Dev*. 2019 Jan;31(2):282-293. doi: 10.1071/RD18131. PubMed PMID: 31039949.
- KANDARAKI, E.; CHATZIGEORGIOU, A.; PIPERI, C.; PALIOURA, E.; PALIMERI, S.; KORKOLOPOULOU, P.; KOUTSILIERIS, M.; PAPAVALASSILOU A.G. Reduced ovarian glyoxalase-I activity by dietary glycotoxins and androgen excess: a causative link to polycystic ovarian syndrome. *Mol Med* 2012, 18, 1183–1189, <https://doi.org/10.2119/molmed.2012.00293>.
- KAWAMURA Y, UCHIJIMA Y, HORIKE N, TONAMI K, NISHIYAMA K, AMANO T, ASANO T, KURIHARA Y, KURIHARA H. Sirt3 protects in vitro-fertilized mouse preimplantation embryos against oxidative stress-induced p53-mediated developmental arrest. *J Clin Invest*. 2010; 120:2817
- KELLY CC, LYALL H, PETRIE JR, GOULD GW, CONNELL JM, SATTAR N. Low grade chronic inflammation in women with polycystic ovarian syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001; 86:2453-2455.
- KHANMOHAMMADI N, MOVAHEDIN M, SAFARI M, SAMENI HR, YOUSEFI B, JAFARI B, ZARBAKSH S. Effect of L-carnitine on in vitro developmental rate, the zona pellucida and hatching of blastocysts and their cell numbers in mouse embryos. *Int J Reprod Biomed (Yazd)*. 2016;14:649–656.
- KIRCHENGAST S, HUBER J. Body composition characteristics and body fat distribution in lean women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod*. 2001; 16:1255–1260.
- KITADA, M.; OGURA, Y.; KOYA, D. The protective role of Sirt1 in vascular tissue: its relationship to vascular aging and atherosclerosis. *Aging (Albany NY)* **2016**, 8, 2290-2307. doi: 10.18632/aging.101068.
- KOHLER E, BARRACH H, NEUBERT D. Inhibition of NADP dependent oxidoreductases by the 6-aminonicotinamide analogue of NADP. *FEBS Lett*. 1970; 6:225-228.
- KOMATSU K, IWASE A, MAWATARI M, WANG J, YAMASHITA M, KIKKAWA F. Mitochondrial membrane potential in 2-cell stage embryos correlates with the success of preimplantation development. *Reproduction*. 2014; 147(5):627-38.
- KREMSER K, STANGL H, PAHAN K, SINGH I. Nitric oxideregulates peroxisomal enzyme activities. *Europe Journal of Clinic Chemistry and Clinic Biochemistry*. 1995; 33:763-774.
- KRSMANOVIC LZ, VIRMANI MA, STOJILKOVIC SS, CATT KJ. Actions of acetyl- Lcarnitine on the hypothalamo-pituitary-gonadal system in female rats. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1992; 43:351–358.
- KRSMANOVIC LZ, VIRMANI MA, STOJILKOVIC SS, CATT KJ. Stimulation of gonadotropinreleasing hormone secretion by acetyl-L-carnitine in hypothalamic neurons and GT1 neuronal cells. *Neurosci Lett*. 1994; 165:33–36.
- KURDOGLU Z, OZKOL H, TULUCE Y, KOYUNCU I. Oxidative status and its relation with insulin resistance in young non-obese women with polycystic ovary syndrome. *J Endocrinol Invest*. 2012;35:317-321.
- KUSCU NK, VAR A. Oxidative stress but not endothelial dysfunction exists in non-obese, young group of patients with polycystic ovary syndrome. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2009; 88:612-617.
- LABRIE F, LUU-THE V, LIN SX, LABRIE C, SIMARD J, BRETON R, BÉLANGER A. The key role of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases in sex steroid biology. *Steroids*. 1997; 62 (1): 148–158
- Lai Q, Xiang W, Li Q, Zhang H, Li Y, Zhu G, Xiong C, Jin L. Oxidative stress in granulosa cells contributes to poor oocyte quality and IVF-ET outcomes in women with polycystic ovary syndrome. *Front Med*. 2018 Oct;12(5):518-524. doi:10.1007/s11684-017-0575-y. Epub 2017 Dec 19. PubMed PMID: 29260383.
- LANGO R, SMOLEŃSKI RT, ROGOWSKI J, SIEBERT J, WUJTEWICZ M, SŁOMIŃSKA LARSSON NG, WANG J, WILHELMSSON H, OLDFORS A, RUSTIN P, LEWANDOSKI M, BARSH GS, CLAYTON DA. Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. *Nat Genet*. 1998; 18(3):231-236.
- LATHAM T, MACKAY L, SPROUL D, KARIM M, CULLEY J, HARRISON DJ, HAYWARD L, LANGRIDGE-SMITH P, GILBERT N, RAMSAHOYE BH. Lactate, a product of glycolytic metabolism,

- inhibits histone deacetylase activity and promotes changes in gene expression. *Nucleic Acids Res.* 2012; 40:4794-4803.
- LATIFIAN S, HAMDI K, TOTAKNEH R. Effect of addition of l-carnitine in polycystic ovary syndrome (PCOS) patients with clomiphene citrate and gonadotropin resistant. *Int J Curr Res Acad Rev.* 2015; 3:469–476.
  - LAVEN JS, IMANI B, EIJKEMANS MJ, FAUSER BC. New approach to polycystic ovary syndrome and other forms of anovulatory infertility. *Obstet Gynecol Surv.* 2002; 57:755–767.
  - LEGRO RS, DRISCOLL D, STRAUSS III JF, FOX J, DUNAIF A. Evidence for a genetic basis for hyperandrogenemia in polycystic ovary syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95:14956–14960.
  - LEGRO RS, KUNSELMAN AR, DODSON WC, DUNAIF A. Prevalence and predictors of risk for type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in polycystic ovary syndrome: a prospective, controlled study in 254 affected women. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:165– 169.
  - LEUNER B, MAX M, THAMM K, KAUSLER C, YAKOBUS Y, BIERHAUS A, SEL S, HOFMANN B, SILBER RE, SIMM A ET AL. RAGE influences obesity in mice. Effects of the presence of RAGE on weight gain, AGE accumulation, and insulin levels in mice on a high fat diet. *ZGerontol Geriatr.* 2012; 45:102–108.
  - LI, D.; YOU, Y.; BI, F.F.; ZHANG, T.N.; JIAO, J.; WANG, T.R.; ZHOU, Y.M.; SHEN, Z.Q.; WANG, X.X.; YANG, Q. Autophagy is activated in the ovarian tissue of polycystic ovary syndrome. *Reproduction* **2018**, 155, 85-92. doi: 10.1530/REP-17-0499.
  - LI, X.; QI, J.; ZHU, Q.; HE, Y.; WANG, Y.; LU, Y.; WU, H.; SUN, Y. The role of androgen in autophagy of granulosa cells from PCOS. *Gynecol Endocrinol* **2019**, 35, 669-672. doi: 10.1080/09513590.2018.1540567.
  - LILIENSIEK B, WEIGAND MA, BIERHAUS A, NICKLAS W, KASPER M, HOFER S, PLACHKY J, GRONE HJ, KURSCHUS FC, SCHMIDT AM ET AL. Receptor for advanced glycation end products (RAGE) regulates sepsis but not the adaptive immune response. *J Clin Invest.* 2004;113:1641–1650.
  - LIN, P.H.; CHANG, C.C.; WU, K.H.; SHIH, C.K.; CHIANG, W.; CHEN, H.Y.; SHIH, Y.H.; WANG, K.L.; HONG, Y.H.; SHIEH, T.M.; HSIA, S.M. Dietary Glycotoxins, Advanced Glycation End Products, Inhibit Cell Proliferation and Progesterone Secretion in Ovarian Granulosa Cells and Mimic PCOS-like Symptoms. *Biomolecules* **2019**, 9, pii: E327. doi:10.3390/biom9080327.
  - LINDSTEDT G, LUNDBERG PA, LAPIDUS L, LUNDGREN H, BENGTTSSON C, BJORNTORP P. Low sex-hormone-binding globulin concentration as independent risk factor for development of NIDDM. 12-yr follow-up of population study of women in Gothenburg, Sweden. *Diabetes.* 1991; 40:123–128.
  - LIU, L.; KEEFE, D.L. Ageing-associated aberration in meiosis of oocytes from senescence-accelerated mice. *Hum Reprod* **2002**, 17, 2678-85.
  - LONGO N, AMAT DI SAN FILIPPO C, PASQUALI M. Disorders of carnitine transport and the carnitine cycle. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2006; 142C:77–85.
  - LONGO N, FRIGENI M, PASQUALI M. Carnitine transport and fatty acid oxidation. *Biochim Biophys Acta.* 2016; 1863(10):2422-2435.
  - LOUGHLIN DT, ARTLETT CM. Precursor of advanced glycation end products mediates ER- stress-induced caspase- 3 activation of human dermal fibroblasts through NAD(P)H oxidase 4. *PLoS One* 2010.
  - LUCHETTI, C.G.; SOLANO, M.E.; SANDER, V.; ARCOS, M.L.; GONZALEZ, C.; DI GIROLAMO, G.; CHIOCCHIO, S.; CREMASCHI, G.; MOTTA, A.B. Effects of dehydroepiandrosterone on ovarian cystogenesis and immune function. *J Reprod Immunol* **2004**, 64, 59-74.
  - MA P, SCHULTZ RM. Histone deacetylase 2 (HDAC2) regulates chromosome segregation and kinetochore function via H4K16 deacetylation during oocyte maturation in mouse. *PLoS Genet.* 2013.
  - MAGOFFIN DA. Ovarian theca cell. *Intl J Biochem Cell Biol.* 2005; 37:1344–1349.
  - MANO, J. Reactive carbonyl species: their production from lipid peroxides, action in environmental stress, and the detoxification mechanism. *Plant Physiol Biochem* 2012, 59, 90-7. doi: 10.1016/j.plaphy.2012.03.010.
  - MANSOUR G, ABDELRAZIK H, SHERMA RK, RADWAN E, FALCONE T, AGARWAL A. L-Carnitine supplementation reduces oocyte cytoskeleton damage and embryo apoptosis induced by incubation in peritoneal fluid from patients with endometriosis. *Fertil Steril* 2009; 91:2079-2086.
  - MARCONDES FK, BIANCHI FJ, TANNO AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol.* 2002; 62(4A):609-614.

- MARÍ M, MORALES A, COLELL A, GARCÍA-RUIZ C, FERNÁNDEZ-CHECA JC. Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant. *Antioxid Redox Signal*. 2009; 11:2685-2700.
- MARK AB, POULSEN MW, ANDERSEN S, ANDERSEN JM, BAK MJ, RITZ C, HOLST JJ, NIELSEN J, DE COURTEN B, DRAGSTED LO ET AL. Consumption of a Diet Low in 93 Advanced Glycation Endproducts for 4 weeks Improves Insulin Sensitivity in Overweight Women. *Diabetes Care* 2013 Aug 19.
- MARTORELL R, KHAN LK, HUGHES ML, GRUMMER-STRAWN LM. Obesity in women from developing countries. *Eur J Clin Nutr*. 2000; 54:247–252.
- MATTHAUS B. Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002; 50:3444-3452.
- MATZUK MM, BURNS KH, VIVEIROS MM, EPPIG JJ. Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. *Science*. 2002; 296:2178-2180.
- MAYES, PA. Lipids of physiologic significance. In: Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell, V.W. (Eds.), *Harper's Biochemistry*, Appleton and Lange, Stamford. 2000; 160-171.
- MCGARRY JD, BROWN NF. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *Eur J Biochem* 1997; 244 (1): 1-14
- MECZEKALSKI B, KATULSKI K, CZYZYK A, PODFIGURNA-STOPA A, MACIEJEWSKA-JESKE M. Functional hypothalamic amenorrhea and its influence on women's health. *J Endocrinol Investig*. 2014; 37:1049–1056.
- MERHI Z. Advanced glycation end products and their relevance in female reproduction. *Human Reproduction* 2014; 29:135-145.
- MILLER DD. Mineral. In: Fennema, O.R. (Ed.), *Food Chemistry*. Marcel Dekker, New York. 1996; 618-649.
- MINGORANCE C, RODRIGUEZ-RODRIGUEZ R, JUSTO ML, HERRERA MD, DE SOTOMAYOR MA. Pharmacological effects and clinical applications of propionyl-L- carnitine. *Nutr Rev*. 2011; 69:279–290.
- MINGRONE G, GRECO AV, CAPRISTO E, BENEDETTI G, GIANCATERINI A, DE GAETANO A, GASBARRINI G. L-carnitine improves glucose disposal in type 2 diabetic patients. *J Am Coll Nutr*. 1999; 18:77–82.
- MISHRA A, REDDY IJ, GUPTA PS, MONDAL S. L-carnitine mediated reduction in oxidative stress and alteration in transcript level of antioxidant enzymes in sheep embryos produced in vitro. *Reprod Domest Anim*. 2016; 51:311–321.
- MISTER M, NORIS M, SZYMCZUK J, ET AL. Propionyl-L-carnitine prevents renal function deterioration due to ischemia/ reperfusion. *Kidney Int*. 2002;61:1064–1078.
- MIYATA T, INAGI R, IIDA Y, SATO M, YAMADA N, ODA O, ET AL. Involvement of beta 2-microglobulin modified with advanced glycation end products in the pathogenesis of hemodialysis-associated amyloidosis. Induction of human monocyte chemotaxis and macrophage secretion of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1. *J Clin Invest* 1994; 93:521-528.
- MIYAZAWA S, OZASA H, OSUMI T, ET AL. Purification and properties of carnitine octanoyltransferase and carnitine palmitoyltransferase from rat liver. *J Biochem* 1983; 94 (2): 529-42
- MOAWAD AR, XU B, TAN SL, TAKETO T. L-carnitine supplementation during vitrification of mouse germinal vesicle stage-oocytes and their subsequent in vitro maturation improves meiotic spindle configuration and mitochondrial distribution in metaphase II oocytes. *Hum Reprod*. 2014; 29:2256–2268.
- MOHAMMADI M. Oxidative stress and polycystic ovary syndrome: a brief review. *Int J Prev Med*. 2019; 10:86.
- MOHAN S, PRIYA V. Lipid peroxidation, glutathione, ascorbic acid, vitamin E, antioxidant enzyme and serum homocysteine status in patients with polycystic ovary syndrome. *Biol Med*. 2009; 1:44-49.
- MORAN LJ, MISSO ML, WILD RA, NORMAN RJ. Impaired glucose tolerance, type 2 diabetes and metabolic syndrome in polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta- analysis. *Hum Reprod Update*. 2010; 16:347–363.
- MORTENSEN M, EHRMANN DA, LITTLEJOHN E, ET AL. Asymptomatic volunteers with a polycystic ovary are a functionally distinct but heterogeneous population. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009; 94:1579.
- MOTTA AB. Dehydroepiandrosterone to induce murine models for the study of polycystic ovary syndrome. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2010; 119(3-5):105-111.

- MURRI M, LUQUE-RAMÍREZ M, INSENER M, OJEDA-OJEDA M, ESCOBAR-MORREALE HF. Circulating markers of oxidative stress and polycystic ovary syndrome (PCOS): A systematic review and meta-analysis. *Human Reprod Update*. 2013;19:268-288.
- NACUL AP, ANDRADE CD, SCHWARZ P, DE BITTENCOURT PI JR, SPRITZER PM. Nitric oxide and fibrinogen in polycystic ovary syndrome: Associations with insulin resistance and obesity. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2007;133:191-196.
- NAGANO M, KATAGIRI S, TAKAHASHI Y. ATP content and maturational/developmental ability of bovine oocytes with various cytoplasmic morphologies. *Zygote* 2006; 14:299-304.
- NORMAN RJ, DEWAILLY D, LEGRO RS, HICKEY TE. Polycystic ovary syndrome. *Lancet*. 2007; 370:685–697.
- Nelson, V.L.; Qin, K.N.; Rosenfield, R.L.; Wood, J.R.; Penning, T.M.; Legro, R.S.; Strauss, J.F. 3<sup>rd</sup>; McAllister, J.M. The biochemical basis for increased testosterone production in theca cells propagated from patients with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* **2001**, 86, 5925-33.
- NORMAN RJ, NOAKES M, WU R, DAVIES MJ, MORAN L, WANG JX. Improving reproductive performance in overweight/obese women with effective weight management. *Hum Reprod Update* 2004; 10:267–280.
- OZCELIK B, LEE JH, MIN DB. Effects of light, oxygen and pH on the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method to evaluate antioxidants. *Journal of Food Science*. 2003; 68:487-490.
- PAIK WK, KIM S. Protein methylation. *Science*. 1971; 174:114-119.
- PALOMBA, S.; DAOLIO, J.; LA SALA, G.B. Oocyte Competence in Women with Polycystic Ovary Syndrome. *Trends Endocrinol Metab* **2017**, 28, 186-198. doi: 10.1016/j.tem.2016.11.008
- PAMPFER S, MOULAERT B, VANDERHEYDEN I, WUU YD, DE HERTOOGH R. Effect of tumor necrosis factor alpha on rat blastocyst growth and glucose metabolism. *J Reprod Fertil*. 1994; 101:199-206.
- PANNEERSELVAM KS, KUMARAN S. L-Carnitine and alpha-lipoic acid improves mitochondrial function during ageing process. *Clin Nutr* 2006.
- PACZKOWSKI M, SCHOOLCRAFT WB, KRISHER RL. Fatty acid metabolism during maturation affects glucose uptake and is essential to oocyte competence. *Reproduction*. 2014 Oct;148(4):429-39. doi: 10.1530/REP-14-0015. Epub 2014 Jul 25. PubMed PMID: 25062802.
- PANDE SV, PARVIN R. Carnitine-acylcarnitine translocase catalyzes an equilibrating unidirectional transport as well. *J Biol Chem* 1980; 255 (7): 2994-300114.
- PANDE SV. A mitochondrial carnitine acylcarnitine translocase system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975; 72 (3): 883-7
- PAPALOU, O.; VICTOR, V.M.; DIAMANTI-KANDARAKIS, E. Oxidative Stress in Polycystic Ovary Syndrome. *Curr Pharm Des* 2016, 22, 2709-22.
- PARK L, RAMAN KG, LEE KJ, LU Y, FERRAN LJ JR, CHOW WS, STERN D, SCHMIDT AM. Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for advanced glycation endproducts. *Nat Med*. 1998; 4:1025–1031.
- PARK YW, ZHU S, PALANIAPPAN L, HESHKA S, CARNETHON MR, HEYMSFIELD SB. The metabolic syndrome: prevalence and associated risk factor findings in the US population from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Arch Int Med*. 2003; 163:427–436.
- PASQUALI M, MONSEN G, RICHARDSON L, ALSTON M, LONGO N. Biochemical findings in common inborn errors of metabolism. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2006; 142C:64–76.
- PEPPA, M.; URIBARRI, J.; VLASSARA, H. Aging and glycoxidant stress. *Hormones (Athens)* 2008, 7, 123-32.
- PETTEGREW JW, LEVINE J, MCCLURE RJ. Acetyl-l-carnitine physical-chemical, metabolic, and therapeutic properties: relevance for its mode of action in Alzheimer's disease and geriatric depression. *Molecular Psychiatry*. 2000; 5:616-632.
- PHONGNIMITR T, LIANG Y, SRIRATTANA K, PANYAWAI K, SRIPUNYA N, TREETAMPINICH C, ET AL. Effect of L-carnitine on maturation, cryo-tolerance and embryo developmental competence of bovine oocytes. *Animal science journal* 1/4 *Nihon chikusan Gakkaiho* 2013;84:719e25.
- PILLICH RT, SCARSELLA G, RISULEO G. Reduction of apoptosis through the mitochondrial pathway by the administration of acetyl-L-carnitine to mouse fibroblasts in culture. *Exp Cell Res*. 2005;306:1–8.

- PIPERI C, ADAMOPOULOS C, DALAGIORGOU G, DIAMANTI-KANDARAKIS E, PAPA VASSILIOU AG. Crosstalk between advanced glycation and endoplasmic reticulum stress: emerging therapeutic targeting for metabolic diseases. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012; 97:2231–2242.
- PIPERI C, P E, KOUTSILIERIS M, DIAMANTI-KANDARAKIS E. Advanced Glycation End- Products Inhibit Insulin Signaling in Human Granulosa Cells: A Causative Link to PCOS Pathogenesis. San Francisco, CA: Endocrine Society, 2013.
- POWER RA, HULVER MW, ZHANG JY, DUBOIS J, MARCHAND RM, ILKAYEVA O, MUOIO DM, MYNATT RL. Carnitine revisited: potential use as adjunctive treatment in diabetes. *Diabetologia.* 2007; 50:824–832.
- RABBANI, N.; THORNALLEY, P.J. Dicarbonyl stress in cell and tissue dysfunction contributing to ageing and disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2015, 458, 221-6. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.01.140.
- RAINERI R, LEVY HR. On the specificity of steroid interaction with mammary glucose 6- phosphate dehydrogenase. *Biochemistry.* 1970; 9:2233-2243.
- RAMSAY RR, ZAMMIT VA. Carnitine acyltransferases and their influence on CoA pools in health and disease. *Mol Aspects Med.* 2004;25:475–493.
- RAMASAMY R, VANNUCCI SJ, YAN SS, HEROLD K, YAN SF, SCHMIDT AM. Advanced glycation end products and RAGE: a common thread in aging, diabetes, neurodegeneration, and inflammation. *Glycobiology* 2005; 15:16R-28R.
- RASHIDI B, HAGHOLLAHI F, SHARIAT M, ZAYERII F. The effects of calcium-vitamin D and metformin on polycystic ovary syndrome: A pilot study. *Taiwan J Obstet Gynecol.* 2009; 48:142-147.
- READER KL, COX NR, STANTON JA, JUENGEL JL. Effects of a cetyl-L-carnitine on lamb
  - oocyte blastocyst rate, ultrastructure, and mitochondrial DNA copy number. *Theriogenology* 2015;83:1484e92.
- REBOUCHE CJ. Carnitine function and requirements during the life cycle. *FASEB J.* 1992; 6:3379–3386.
- REBOUCHE CJ. Kinetics, pharmacokinetics, and regulation of L-carnitine and acetyl-L- carnitine metabolism. *Ann N Y Acad Sci.* 2004; 1033:30–41.
- REBOUCHE CJ, ENGEL AG. Tissue distribution of carnitine biosynthetic enzymes in man. *Biochim Biophys Acta.* 1980; 630:22-29.
- REVELLI A, DELLE PIANE L, CASANO S, MOLINARI E, MASSOBRIO M, RINAUDO P. Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics. *Reprod Biol Endocrinol.* 2009; 7:40.
- RICH PR. The molecular machinery of Keilin's respiratory chain. *Biochem Soc Trans* 2003; 31:1095-1105.
- RIEGER D, LOSKUTOFF NM. Changes in the metabolism of glucose, pyruvate, glutamine and glycine during maturation of cattle oocytes in vitro. *J Reprod Fertil* 1994; 100:257-262.
- RODRIGUE-WAY A, CARON V, BILODEAU S, KEIL S, HASSAN M, LEVY E, MITCHELL GA, TREMBLAY A. Scavenger receptor CD36 mediates inhibition of cholesterol synthesis via activation of the PPARgamma/PGC-1alpha pathway and Insig1/2 expression in hepatocytes. *FASEB J.* 2014.
- ROSENFELD RL, WROBLEWSKI K, PADMANABHAN V, ET AL. Antimüllerian hormone levels are independently related to ovarian hyperandrogenism and polycystic ovaries. *Fertil Steril.* 2012; 98:242.
- ROTTERDAM ESHRE/ASRM-SPONSORED PCOS CONSENSUS WORKSHOP. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Hum Reprod.* 2004; 19:41–47.
- SABUNCU T, VURAL H, HARMA M. Oxidative stress in polycystic ovary syndrome and its contribution to the risk of cardiovascular disease. *Clin Biochem* 2001; 34:407-413.
- SAITO T, HIROI M, KATO T. Development of glucose utilization studied in single oocytes and preimplantation embryos from mice. *Biol Reprod.* 1994; 50:266-270.
- SAMIMI M, JAMILIAN M, EBRAHIMI FA, RAHIMI M, TAJBAKHSB B, ASEMI Z. Oral carnitine supplementation reduces body weight and insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Clin Endocrinol.* 2016; 84:851–857.
- SAUVE AA, YOUN DY. Sirtuins: NAD(+)-dependent deacetylase mechanism and regulation. *Curr Opin Chem Biol.* 2012; 16:535-543.
- SAVITHA S, PANNEERSELVAM C. Mitochondrial membrane damage during aging process in rat heart: potential efficacy of L-carnitine and DL alpha lipoic acid. *Mech Ageing Dev.* 2006; 127.

- SCAGLIA F, LONGO N. Primary and secondary alterations of neonatal carnitine metabolism. *Semin Perinatol.* 1999; 23:152–161.
- SCAGLIA F, WANG Y, LONGO N. Functional characterization of the carnitine transporter defective in primary carnitine deficiency. *Arch Biochem Biophys.* 1999; 364:99–106.
- SCAGLIA F, WANG Y, LONGO N. Functional characterization of the carnitine transporter defective in primary carnitine deficiency. *Arch Biochem Biophys.* 1999; 364:99–106.
- SCHRADER M, COSTELLO J, GODINHO LF, ISLINGER M. Peroxisome-mitochondria interplay and disease. *J Inherit Metab Dis.* 2015; 38:681–702.
- SEAVER LC, IMLAY JA. Are respiratory enzymes the primary sources of intracellular hydrogen peroxide? *J Biol Chem.* 2004; 279:48742-48750.
- SETHI R, DHALLA KS, GANGULY PK, FERRARI R, DHALLA NS. Beneficial effects of propionyl L-carnitine on sarcolemmal changes in congestive heart failure due to myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 1999; 42:607–615.
- SHENK JC, LIU J, FISCHBACH K. The effect of acetyl-Lcarnitine and R-alpha-lipoic acid treatment in ApoE4 mouse as a model of human Alzheimer's disease. *J Neurol Sci.* 2009; 283:199–206.
- SHIPANOVA, I.N.; GLOMB, M.A.; NAGARAJ, R.H. Protein modification by methylglyoxal: chemical nature and synthetic mechanism of a major fluorescent adduct, *Arch. Biochem. Biophys* 1997, 344, 29–36.
- SIMG (SOCIETÀ ITALIANA DI MEDICINA GENERALE), Dossier infertilità: la sindrome dell'ovaio policistico, Giorgio Tresoldi, 2009.
- SIRMANS, S.M.; PATE, K.A. Epidemiology, diagnosis, and management of polycystic ovary syndrome. *Clin Epidemiol* 2013; 6, 1-13. doi: 10.2147/CLEP.S37559.
- SLOMINSKA EM, SMOLENSKI RT, OSBORNE F, SWIERCZYNSKI J, YACOUB MH. The effect of N-methyl-2-pyridone-5-carboxamide--A nicotinamide catabolite on poly ADP- ribosylation and oxidative stress injury in endothelial cells. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2005; 24:259-262.
- STEPHENS FB, CONSTANTIN-TEODOSIU D, LAITHWAITE D, SIMPSON EJ, GREENHAFF PL. A threshold exists for the stimulatory effect of insulin on plasma L-carnitine clearance in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007; 292:637–641.
- SUGIURA K, EPPIG JJ. Society for Reproductive Biology Founders' Lecture 2005. Control of metabolic cooperativity between oocytes and their companion granulosa cells by mouse oocytes. *Reprod Fertil Dev.* 2005; 17:667-674.
- SUN L, HU W, LIU Q, HAO Q, SUN B, ZHANG Q, MAO S, QIAO J, YAN X. Metabonomics reveals plasma metabolic changes and inflammatory marker in polycystic ovary syndrome patients. *J Proteome Res.* 2012; 11:2937-2946.
- TAKAHASHI, N.; HARADA, M.; HIROTA, Y.; NOSE, E.; AZHARY, J.M.; KOIKE, H.; KUNITOMI, C.; YOSHINO, O.; IZUMI, G.; HIRATA, T.; KOGA, K.; WADA-HIRAIKE, O.; CHANG, R.J.; SHIMASAKI, S.; FUJII, T.; OSUGA, Y. Activation of Endoplasmic Reticulum Stress in Granulosa Cells from Patients with Polycystic Ovary Syndrome Contributes to Ovarian Fibrosis. *Sci Rep* 2017, 7, 10824. doi: 10.1038/s41598-017-11252-7.
- TANG, B.L.; Sirt1 and the Mitochondria. *Mol Cells* 2016, 39, 87-95. doi: 10.14348/molcells.2016.2318
- TANNAHILL GM, CURTIS AM, ADAMIK J, PALSSON-MCDERMOTT EM,
- TATONE C, AMICARELLI F. The aging ovary-the poor granulosa cells. *Fertil Steril.* 2013; 99:12–17.
- TATONE C, HEIZENRIEDER T, DI EMIDIO G, TREFFON P, AMICARELLI F, SEIDEL T, EICHENLAUB-RITTER U. Evidence that carbonyl stress by methylglyoxal exposure induces DNA damage and spindle aberrations, affects mitochondrial integrity in mammalian oocytes and contributes to oocyte ageing. *Hum Reprod.* 2011; 26(7):1843-59.
- TATONE, C.; DI EMIDIO, G.; VITTI, M.; DI CARLO, M.; SANTINI, S. JR.; D'ALESSANDRO, A.M.; FALONE, S.; AMICARELLI, F. Sirtuin functions in female fertility: possible role in oxidative stress and aging. *Oxidative Med Cell Longev* 2015, 2015, 659687. doi.org/10.1155/2015/659687.
- TATONE, C.; DI EMIDIO, G.; BARBONETTI, A.; CARTA, G.; LUCIANO, A.M.; FALONE, S.; AMICARELLI, F. Sirtuins in gamete biology and reproductive physiology: emerging roles and therapeutic potential in female and male infertility. *Hum Reprod Update* 2018, 24, 267–289, <https://doi.org/10.1093/humupd/dmy003>.

- Tatone, C.; Benedetti, E.; Vitti, M.; Di Emidio, G.; Ciriminna, R.; Vento, M.E.; Cela, V.; Borzi, P.; Carta, G.; Lispi, M.; Cimini, A.M.; Artini, P.G.; Italian Society of Embryology, Reproduction and Research (SIERR). Modulating Intrafollicular Hormonal Milieu in Controlled Ovarian Stimulation: Insights From PPAR Expression in Human Granulosa Cells. *J Cell Physiol* **2016**, *231*, 908-14. doi: 10.1002/jcp.25182.
- THORNALLEY PJ. The enzymatic defence against glycation in health, disease and therapeutics: a symposium to examine the concept. *Biochem Soc Trans.* 2003; 31:1341-1342;
- THORPE SR, BAYNES JW. Role of the Maillard reaction in diabetes mellitus and diseases of aging. *Drugs Aging.* 1996; 9:69-77.
- THURSTON RC, KUBZANSKY LD, KAWACHI I, BERKMAN LF. Is the association between socioeconomic position and coronary heart disease stronger in women than in men? *Am J Epidemiol.* 2005; 162:57–65.
- TRIKUDANATHAN, S. Polycystic ovarian syndrome. *Med Clin North Am* 2015, 99, 221-35. doi: 10.1016/j.mcna.2014.09.003.
- UNOKI H, YAMAGISHI S. Advanced glycation end products and insulin resistance. *Curr Pharm Design* 2008; 14:987–989.
- URIBARRI J, CAI W, PEPPA M, GOODMAN S, FERRUCCI L, STRIKER G, VLASSARA H. Circulating glycotoxins and dietary advanced glycation endproducts: two links to inflammatory response, oxidative stress, and aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2007;62:427–433.
- URIBARRI J, CAIW, RAMDAS M, GOODMAN S, PYZIK R, CHEN X, ZHU L, STRIKER GE, VLASSARA H. Restriction of advanced glycation end products improves insulin resistance in human type 2 diabetes: potential role of AGER1 and SIRT1. *Diabetes Care.* 2011;34:1610–1616.
- VALERO T. Mitochondrial biogenesis: pharmacological approaches. *Curr. Pharm. Des.* 2014; 20 (35): 5507–5509
- VAN BLERKOM J, DAVIS PW, LEE J. ATP content of human oocytes and developmental potential and outcome after in vitro fertilization and embryo transfer. *Hum Reprod.* 1995; 45:18-21.
- VAN BLERKOM J, DAVIS PW, MATHWIG V, ALEXANDER S. Domains of high-polarized and low-polarized mitochondria may occur in mouse and human oocytes and early embryos. *Hum Reprod.* 2002; 17(2):393-406.
- VANELLA A, RUSSO A, ACQUAVIVA R, CAMPISI A, DI GIACOMO C, SORRENTI V, BARCELLONA ML. L -Propionyl-carnitine as superoxide scavenger, antioxidant, and DNA cleavage protector. *Cell Biol Toxicol.* 2000;16:99–104.
- VASSILIADIS S, ATHANASSAKIS I. A "conditionally essential" nutrient, L-carnitine, as a primary suspect in endometriosis. *Fertil Steril.* 2011; 95:2759–2760.
- VAZ FM, WANDERS RJ. Carnitine biosynthesis in mammals. *Biochem J.* 2002; 361:417–429.
- VAZZANA N, GUAGNANO MT, CUCCURULLO C, FERRANTE E, LATTANZIO S, LIANI R, ROMANO M, DAVI G. Endogenous secretory RAGE in obese women: association
- VERIT FF, EREL O. Oxidative stress in nonobese women with polycystic ovary syndrome: Correlations with endocrine and screening parameters. *GynecolObstetInvest.* 2008;65:233-239.
- VICTOR VM, ROCHA M, BANULS C, ALVAREZ A, DE PABLO C, SANCHEZ- SERRANO M, GOMEZ M, HERNANDEZ-MIJARES A. Induction of oxidative stress and human leukocyte/endothelial cell interactions in polycystic ovary syndrome patients with insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011; 96:3115-3122.
- VINK JM, SADRZADEH S, LAMBALK CB, BOOMSMA DI. Heritability of polycystic ovary syndrome in a Dutch twin-family study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91:2100–2104.
- VIRMANI MA, BINIENDA Z. The Mitochondriotropic effects of L-carnitine and its esters in the central nervous system. *Curr Med Chem - Cent Nervous Sys Agents.* 2003; 3:275–282.
- VIRMANI MA, KRSMANOVIC LZ, STOJILKOVIC SS, CATT KJ. Stimulatory effects of Lacetyl carnitine on the pituitary-gonadal axis in female rats. In: *Advances in human female reproduction.* New York: Sereno Symposium Publication, Raven Press. 1991; 291–296.
- VIRMANI MA, VIRTULLO P, COSSETTI C. Improving Oocyte and Sperm Quality by L- Carnitine, Acetyl-L-carnitine and Other Nutrients as Major Determinant in Pregnancy Success. *Journal of Perinatal Medicine.* 45 Supplement. 2017; 1:3.

- VIRMANI MA, ZERELLI S, VITULLO P, COSSETTI C. Effect Of nutrients on ovulation and oocytes quality in mice. In: Proceedings of 11th congress of the European Society of Gynecology. Roma: Edizioni Internazionali. 2015; 212–214.
- VLASSARA H, PALACE MR. Diabetes and advanced glycation endproducts. *J Intern Med.* 2002; 251:87–101.
- WALTERS KA, ALLAN CM, HANDELSMAN DJ. Rodent models for human polycystic ovary syndrome. *Biol Reprod.* 2012; 86(5):149, 1-12.
- WANG Q, FROLOVA AI, PURCELL S, ADASTRA K, SCHOELLER E, CHI MM, SCHEDL T, MOLEY KH. Mitochondrial dysfunction and apoptosis in cumulus cells of type I diabetic mice. *PLoS One.* 2010; 5:e15901.
- WANG X, MARTINDALE JL, LIU Y, HOLBROOK NJ. The cellular response to oxidative stress: Influences of mitogen-activated protein kinase signalling pathways on cell survival. *Biochem J.* 1998; 333:291-300.
- WHITESIDE EJ, BOUCAUT KJ, TEH A, GARCIA-ARAGON J, HARVEY MB, HERINGTON AC. Elevated concentration of TNF-alpha induces trophoblast differentiation in mouse blastocyst outgrowths. *Cell Tissue Res.* 2003; 14:275-280.
- WIGGLESWORTH K, LEE KB, O'BRIEN MJ, PENG J, MATZUK MM, EPPIG JJ. Bidirectional communication between oocytes and ovarian follicular somatic cells is required for meiotic arrest of mammalian oocytes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013; 110:E3723-3729.
- WILLIS D, FRANKS S. Insulin action in human granulosa cells from normal and polycystic ovaries is mediated by the insulin receptor and not the type-I insulin-like growth factor receptor. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995; 80:3788–3790.
- YAMAGISHI S, NAKAMURA K, IMAIZUMI T. Advanced glycation end products (AGEs) and diabetic vascular complications. *Curr Diabetes Rev.* 2005; 1:93–106.
- YAN SF, D'AGATI V, SCHMIDT AM, RAMASAMY R. Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE): a formidable force in the pathogenesis of the cardiovascular complications of diabetes & aging. *Curr Mol Med.* 2007; 7:699–710.
- YANG, X.; WU, L.L.; CHURA, L.R.; LIANG, X.; LANE, M.; NORMAN, R.J.; ROBKER, R.L. Exposure to lipid-rich follicular fluid is associated with endoplasmic reticulum stress and impaired oocyte maturation in cumulus-oocyte complexes. *Fertil Steril* **2012**, *97*, 1438-43. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.02.034.
- YE D, XIONG Y, GUAN KL. Inhibition of alpha-KG-dependent histone and DNA demethylases by fumarate and succinate that are accumulated in mutations of FH and SDH tumor suppressors. *Genes Dev.* 2012; 26:1326-1338. 23:2113–2121.
- XIAOM, YANGH, XUW, MAS, LINH, ZHUH, LIUL, LIUY, YANGC, XUY, ZHAOS, YANGJL, ZHANGCP, LIL, HUANGL, JISY, LUCL, FANCH, CAIH, RENY, HUZY, GAO, LIUYX. Testosterone induces redistribution of forkhead box-3a and down-regulation of growth and differentiation factor 9 messenger ribonucleic acid expression at early stage of mouse folliculogenesis. *Endocrinology.* 2010; 151:774-782.
- WU X, MONNIER VM. Enzymatic deglycation of proteins. *Arch Biochem Biophys.* 2003; 419:16-24.
- XUE M, RABBANI N, THORNALLEY PJ. Glyoxalase in ageing. *Semin Cell Dev Biol.* 2011; 22:293-301.
- YOU J, LEE J, HYUN SH, LEE E. L-carnitine treatment during oocyte maturation improves in vitro development of cloned pig embryos by influencing intracellular glutathione synthesis and embryonic gene expression. *Theriogenology.* 2012;78:235–243.
- ZARE Z, MASTERI FARAHANI R, SALEHI M, PIRYAEI A, GHAFFARI NOVIN M, FADAEI FATHABADI F, MOHAMMADI M, DEGHANI-MOHAMMADABADI M. Effect of L-carnitine supplementation on maturation and early embryo development of immature mouse oocytes selected by brilliant cresyle blue staining. *J Assist Reprod Genet.* 2015; 32:635– 643.
- ZAWADSKI JF, DUNAIF A. Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome: towards a rational approach. *Polycystic ovary syndrome.* Boston: Blackwell Scientific; 1992.
- ZHANG, J.; BAO, Y.; ZHOU, X.; ZHENG, L. Polycystic ovary syndrome and mitochondrial dysfunction. *Reprod Biol Endocrinol* **2019**, *17*, 67. doi:10.1186/s12958-019-0509-4.
- ZHANG H, JIA H, LIU J. Combined R-alpha-lipoic acid and acetyl-L-carnitine exerts efficient preventative effects in a cellular model of Parkinson's disease. *J Cell Mol Med.* 2010;14:215–225

- ZHAO H, XU X, XING X, WANG J, HE L, SHI Y, SHI Y, ZHAO Y, CHEN ZJ. Family-based analysis of susceptibility loci for polycystic ovary syndrome on chromosome 2p16.3, 2p21 and 9q33.3. *Hum Reprod.* 2012; 27:294–298.
- ZHAO H, ZHAO Y, LI T, LI M, LI J, LI R, LIU P, YU Y, QIAO J. Metabolism alteration in follicular niche: The nexus among intermediary metabolism, mitochondrial function, and classic polycystic ovary syndrome. *Free Radic Biol Med.* 2015; 86:295-307.
- ZHAO X, ZHONG J, MO Y, CHEN X, CHEN Y, YANG D. Association of biochemical hyperandrogenism with type 2 diabetes and obesity in Chinese women with polycystic ovary syndrome. *Int J Gynaecol Obstet.* 2010; 108:148–151.
- ZHAOX,XUF,QIB,HAOS,LIY,ZOUL,LUC,XUG,HOUL. Serummetabolomics study of polycystic ovary syndrome based on liquid chromatography-mass spectrometry. *J Proteome Res.* 2014; 13:1101-1111.
- ZHAOY,FUL,LIR,WANGLN,YANGY,LIUNN,ZHANGCM,WANGY,LIUP,TU BB, ZHANG X, QIAO J. Metabolic profiles characterizing different phenotypes of polycystic ovary syndrome: plasma metabolomics analysis. *BMC Med.* 2012; 10:153.