



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

Analisi ultrastrutturale di ovociti di topo esposti *in vitro* a differenti concentrazioni del fungicida Mancozeb

Dipartimento di Scienze Odontostomatologiche e Maxillo-Facciali
Dottorato di Ricerca in Tecnologie Innovative nelle Malattie dello Scheletro, della
Cute e del Distretto oro-cranio-facciale
Curriculum in Anatomia, Chirurgia, Chirurgia Plastica e Medicina Rigenerativa
XXXVI Ciclo
SSD BIO/16

Dottoranda
Marta Gatti

Relatrice
Prof.ssa Stefania Annarita Nottola

A.A. 2022/2023

INDICE

Sommario	1
Abstract	3
Premessa	4
Capitolo Uno: I pesticidi	7
1.1 Introduzione ai pesticidi: storia e classificazione.....	7
1.2 Uso e diffusione ambientale dei pesticidi in Europa ed in Italia.....	8
1.3 Impatto dell'esposizione ai pesticidi sulla salute.....	12
1.4 Gli Interferenti endocrini.....	14
1.5 Il mancozeb.....	18
1.5.1 Classificazione e generalità.....	18
1.5.2 Tossicità del mancozeb.....	21
1.5.3 Tossicità riproduttiva del mancozeb: studi <i>in vivo</i> ed <i>in</i> <i>vitro</i>	23
Capitolo Due: L'oogenesi nei mammiferi: cenni generali	27
2.1 Lo sviluppo delle cellule germinali femminili.....	27
2.1.1 Follicologenesi e maturazione dell'ovocita.....	30
2.2 Interazione tra le cellule del cumulo e l'ovocita.....	33
2.3 Il ruolo protettivo delle cellule del cumulo nei confronti dell'ovocita.....	36
Capitolo Tre: Scopo dello studio	39

Capitolo Quattro: Materiali e Metodi	42
4.1 Animali.....	42
4.2 Protocollo sperimentale ed isolamento dei CCO.....	42
4.3 Maturazione <i>in vitro</i> dei CCO.....	43
4.4 Preparativa per la Microscopia ottica e per la Microscopia Elettronica a Trasmissione.....	43
4.5 Analisi morfometrica.....	44
4.6 Analisi statistica.....	45
Capitolo Cinque: Risultati	47
5.1 Controlli.....	47
5.2 Mancozeb 0.001 µg/ml.....	47
5.3 Mancozeb 0.01 µg/ml.....	48
5.4 Mancozeb 0.1 µg/ml.....	49
5.5 Mancozeb 1 µg/ml.....	50
5.6 Pannelli di figure.....	51
5.7 Analisi morfometrica.....	56
Capitolo Sei: Discussione e conclusione	59
Bibliografia	65

Il presente studio è stato sostenuto da fondi dell'Università Sapienza di Roma (Bando SEED-PNR 2021, CUP B89J21032850001 e 2022, n. Prot. SP1221845B9BEB96) e dell'Università degli Studi dell'Aquila, L'Aquila (fondi RIA 2012-2015).

Le attività di ricerca riportate in questa tesi di dottorato sono state svolte presso:

- il laboratorio di microscopia elettronica “Pietro M. Motta” del Dipartimento di Scienze Anatomiche, Istologiche, Medico legali e dell’Apparato Locomotore (Sezione di Anatomia), dell’Università La Sapienza di Roma, sotto la supervisione della Prof.ssa Stefania Annarita Nottola
- il laboratorio di microscopia elettronica e anatomia umana del Dipartimento di Medicina Clinica, Sanità Pubblica, Scienze della Vita e dell’Ambiente, dell'Università degli Studi dell'Aquila, sotto la supervisione del Prof. Guido Macchiarelli e della Prof.ssa Maria Grazia Palmerini

“Il presente documento è distribuito secondo la licenza Creative Commons CC BY-NC-SA, attribuzione, non usi commerciali, condividi allo stesso modo.”

Sommario

Il mancozeb è un fungicida ampiamente utilizzato in agricoltura e classificato come interferente endocrino. L'esposizione ad inquinanti ambientali di questo tipo è legata a vari rischi per la salute umana, tra cui la fertilità femminile. Nonostante mostri una bassa tossicità acuta nei mammiferi, il mancozeb può colpire le funzioni riproduttive sia negli animali che nell'uomo esposti. Studi *in vivo* e *in vitro* hanno evidenziato la sua tossicità riproduttiva sugli ovociti di topo, dimostrando modificazioni della morfologia del fuso meiotico, in grado di compromettere il processo di maturazione degli ovociti, la fecondazione e di conseguenza l'impianto dell'embrione. È stato visto che il mancozeb induce anche una tossicità dose-dipendente sull'ultrastruttura delle cellule della granulosa di topo, determinando la condensazione della cromatina, il blebbing della membrana e la vacuolizzazione. In questo lavoro, sono stati valutati gli effetti sull'ultrastruttura di ovociti di topo isolati da complessi cumulo-ovocita (CCO), esposti *in vitro* a concentrazioni crescenti di mancozeb ed è stata eseguita un'analisi morfometrica degli organelli più significativi. I CCO sono stati fatti maturare *in vitro* con o senza (controllo) basse concentrazioni di fungicida (0.001-1 µg/ml). Tutti gli ovociti maturi sono stati raccolti e preparati per la microscopia ottica ed elettronica a trasmissione. I risultati hanno mostrato un'ultrastruttura preservata alle dosi più basse di fungicida (0.001-0.01 µg/ml), con gruppi di mitocondri dalla forma rotonda ed ovoidale, granuli corticali rotondi ben evidenti e densi di elettroni, e numerosi microvilli, lunghi e sottili. Segni di cambiamenti ultrastrutturali hanno iniziato ad essere visibili alle dosi più alte (0.1-1 µg/ml). In particolare, alla concentrazione di mancozeb pari a 1 µg/ml, la distribuzione degli organelli risultava alterata rispetto ai controlli, con una riduzione del numero dei mitocondri, che apparivano moderatamente vacuolati, dei granuli corticali e dei microvilli, che si presentavano corti e meno abbondanti. In conclusione, i dati ultrastrutturali hanno rivelato cambiamenti ultrastrutturali principalmente alla concentrazione più alta di mancozeb, sugli ovociti di topo. Ciò potrebbe essere responsabile di un'alterata capacità di

maturazione degli ovociti, di fecondazione e di impianto dell'embrione come precedentemente descritto, dimostrando il suo impatto sulla salute riproduttiva e sulla fertilità.

Abstract

Mancozeb is a widely used fungicide, considered to be an endocrine disruptor. Exposure to endocrine-disrupting pollutants, such as the fungicide mancozeb, is linked to various environmental health hazards, including female fertility. Although it has low reported toxicity in mammals, mancozeb impairs female reproductive functions in exposed animals and humans. *In vivo* and *in vitro* studies evidenced its reproductive toxicity on mouse oocytes by altering spindle morphology, impairing oocyte maturation, fertilization, and embryo implantation. Mancozeb also induces dose-dependent toxicity on the ultrastructure of mouse granulosa cells, including chromatin condensation, membrane blebbing, and vacuolization. We evaluated the effects on the ultrastructure of mouse oocytes isolated from cumulus-oocyte complexes (COCs), exposed *in vitro* to increasing concentrations of mancozeb. COCs were matured *in vitro* with or without (control) low fungicide concentrations (0.001-1 $\mu\text{g/ml}$) and to perform a morphometric analysis over significant organelles. All mature oocytes were collected and prepared for light and transmission electron microscopy. Results showed a preserved ultrastructure at the lowest doses (0.001-0.01 $\mu\text{g/ml}$), with evident clusters of round-to-ovoid mitochondria, visible electron-dense round cortical granules, and thin microvilli. Signs of ultrastructural changes started to be visible at the highest doses (0.1-1 $\mu\text{g/ml}$). Mostly, at mancozeb concentration of 1 $\mu\text{g/ml}$, which affected organelle density, compared to controls, with a reduction of mitochondria, appearing moderately vacuolated, cortical granules, and microvilli, short and less abundant. In summary, ultrastructural data revealed changes mainly at the highest concentration of mancozeb on mouse oocytes. This could be responsible for the previously described impaired capability in oocyte maturation, fertilization, and embryo implantation, demonstrating its impact on reproductive health and fertility.

Premessa

Negli ultimi decenni, le filiere agricole ed industriali sono invase dalla chimica: dai fertilizzanti agli agrofarmaci, dalle biotecnologie ai medicinali per animali da allevamento, dagli additivi alimentari agli aromi, fino ad arrivare alle materie plastiche. Tutto ciò ha contribuito notevolmente allo sviluppo ed alla crescita della popolazione mondiale, che è arrivata a 8 miliardi nel 2022.

Il connubio tra chimica ed agricoltura ha sancito l'inizio della "Rivoluzione verde", in cui in particolare l'utilizzo di pesticidi e fertilizzanti su una varietà di vegetali, geneticamente selezionati, ha determinato un approccio innovativo ed un incremento significativo delle produzioni agricole. Gli effetti di questa rivoluzione hanno condotto quindi ad una crescita significativa della popolazione ed alla protezione delle colture, favorendo la produzione agricola. È assodato che l'introduzione di questi nuovi mezzi tecnici ha indiscutibilmente portato al progresso delle società avanzate. Tuttavia, le problematiche ad essi correlati sono diventate con il tempo sempre più evidenti. Il diffuso utilizzo di pesticidi ed agrofarmaci ha destrutturato i sistemi produttivi locali tradizionali, ha determinato la dipendenza dell'alimentazione dai prodotti d'importazione, innescando il fenomeno degli allevamenti intensivi e promuovendo la separazione della zootecnia dall'agricoltura.

Nonostante gli iniziali benefici produttivi e di biosicurezza, con il passare del tempo sono divenute sempre più evidenti le contaminazioni degli ambienti naturali e delle attività umane da parte di queste sostanze ed il loro apporto di sicurezza alimentare ha iniziato ad essere controverso. In particolare, da tempo sono documentati i rischi sulla salute in seguito all'esposizione ai pesticidi, che possono ritrovarsi negli alimenti, nel suolo, nell'acqua e aria. I loro effetti dannosi possono variare in relazione alla tipologia delle molecole considerate, ai loro metaboliti, alla loro quantità, ai contesti ambientali in cui tali sostanze si disperdono ed alla diversità degli organismi esposti. L'uso di molti pesticidi è stato messo in relazione all'aumento dello sviluppo di patologie neurodegenerative, di

diverse forme di tumori ed alterazioni del sistema endocrino. Per questo motivo, lo Stato e la Comunità Europea ne regolamentano quantità, qualità e modalità d'impiego. Attualmente, il diffuso utilizzo di queste sostanze suggerisce una contaminazione ed una conseguente esposizione tale da non poter essere più ignorata.

Molte di queste sostanze tossiche sono state ritirate dal mercato, in seguito al riconoscimento ed alla documentazione della loro tossicità sulla salute umana, animale ed ambientale. Tuttavia, alcune di esse presentano caratteristiche tossicologiche che le rendono capaci di persistere sulle matrici ambientali a lungo oppure vengono reintrodotte a causa dei fenomeni di importazione/esportazione da e verso Paesi in cui l'utilizzo non è stato bandito, contribuendo all'arrivo di sostanze e/o alimenti contaminati ed alla continua esposizione. Alla luce di quanto detto, è importante conoscere ed approfondire i potenziali effetti di queste sostanze tossiche sull'ecosistema e sull'uomo, per mettere in atto azioni che possano proteggere il nostro pianeta e la nostra salute.

Capitolo Uno

I pesticidi

1.1 Introduzione ai pesticidi: storia e classificazione

I pesticidi, conosciuti anche come “fitofarmaci”, sono prodotti (naturali o industriali) in grado di ostacolare tutti quegli organismi nocivi (quali parassiti, specie animali e vegetali indesiderati, compresi vettori di malattie) che possono colpire lo stato di salute delle piante. Queste sostanze, infatti, vengono largamente utilizzate in agricoltura o semplicemente negli orti e nei giardini, per mantenere in buona salute le coltivazioni ed impedire loro di essere distrutte da malattie e infestazioni, in grado di compromettere la produzione agricola, nonché la qualità e la resa del raccolto (Report pesticidi WWF, 2022).

L’impiego dei pesticidi risale all’antichità, ma bisognerà attendere la Grande Guerra perché siano gettate le basi della loro produzione di massa, grazie allo sviluppo della chimica organica e della ricerca sui gas bellici. Tuttavia, soltanto intorno agli anni ‘40 si è assistito ad un incremento del loro utilizzo, a seguito dell’immissione in commercio di un numero sempre maggiore di composti chimici sintetici.

I pesticidi comprendono sostanze come gli insetticidi (capaci di uccidere gli insetti), gli erbicidi (composti in grado di distruggere gli organismi vegetali), i fungicidi (sostanze impiegate per limitare la crescita di funghi) acaricidi, fitoregolatori e repellenti.

Oggigiorno sono presenti sul mercato più di mille pesticidi, distinti in diversi gruppi. Una delle classificazioni più comuni è quella in base alla loro struttura chimica, in cui si identificano cinque differenti classi:

- organoclorurati (come DDT, endosulfan, lindano, mirex, dieldrin, clordano),
- organofosfati (come malathion, parathion),
- carbammati (come carbaryl, carbofuran, aminocarb),
- piretroidi (come cipermetrina, permetrina),
- triazine (come l’atrazina, l’erbicida triazinico più studiato)

Ciascuna di queste classi include, a sua volta, ulteriori categorie di prodotti distinti in relazione all’organismo target e alla modalità di azione (Balduini e Costa, 2015).

Ad esempio, alcuni erbicidi agiscono come regolatori della crescita delle piante, altri sono in grado di interferire sul processo di fotosintesi, oppure alcuni fungicidi sono in grado di uccidere o controllare la crescita dei funghi, altri, invece, agiscono sulle spore (Rajmohan *et al.*, 2020). I fitofarmaci, dunque, esercitano la loro azione grazie alla loro capacità di interferire con le molecole o con le funzioni fondamentali per il ciclo vitale dell'organismo bersaglio.

Il diffuso impiego di queste sostanze chimiche ha consentito di mantenere in buona salute le coltivazioni e di produrre grandi quantità di alimenti su appezzamenti di terreno relativamente limitati, con un altrettanto limitato impegno in termini di lavoro umano. Inoltre, hanno contribuito all'eliminazione da alcuni territori di malattie come la malaria, favorendo una maggiore produzione agricola, e far fronte in questo modo al numero crescente della popolazione mondiale (Report Legambiente, 2022).

Tuttavia, quasi come ogni nuova conquista, anche con i pesticidi è stato fatto un uso indiscriminato. Sebbene il loro impiego abbia apportato dei benefici subito percepibili all'umanità, gli effetti negativi esercitati da tali sostanze a lungo termine, sull'ecosistema e sulla salute dell'uomo, destano ancora oggi molta preoccupazione.

1.2 Uso e diffusione ambientale dei pesticidi in Europa ed in Italia

I pesticidi di sintesi sono progettati per mantenere inalterate nel tempo e nelle matrici ambientali le loro proprietà tossicologiche; questa rappresenta una caratteristica tecnologica molto importante, poiché condiziona sia l'impatto ecologico, sia il valore economico di ogni singolo composto di sintesi che viene lanciato sul mercato. Per questo motivo, possono restare negli ecosistemi per tempi imprecisabili e pertanto vengono definiti "persistenti" (Modonesi, 2015).

La produzione agricola europea si basa su elevati volumi di pesticidi chimici per proteggere i raccolti. Dal 2011 al 2020, le vendite di pesticidi nell'UE-27 (Unione Europea) sono rimaste relativamente stabili, corrispondenti a circa 350.000 tonnellate all'anno (Eurostat, 2021) (Figura 1.1).

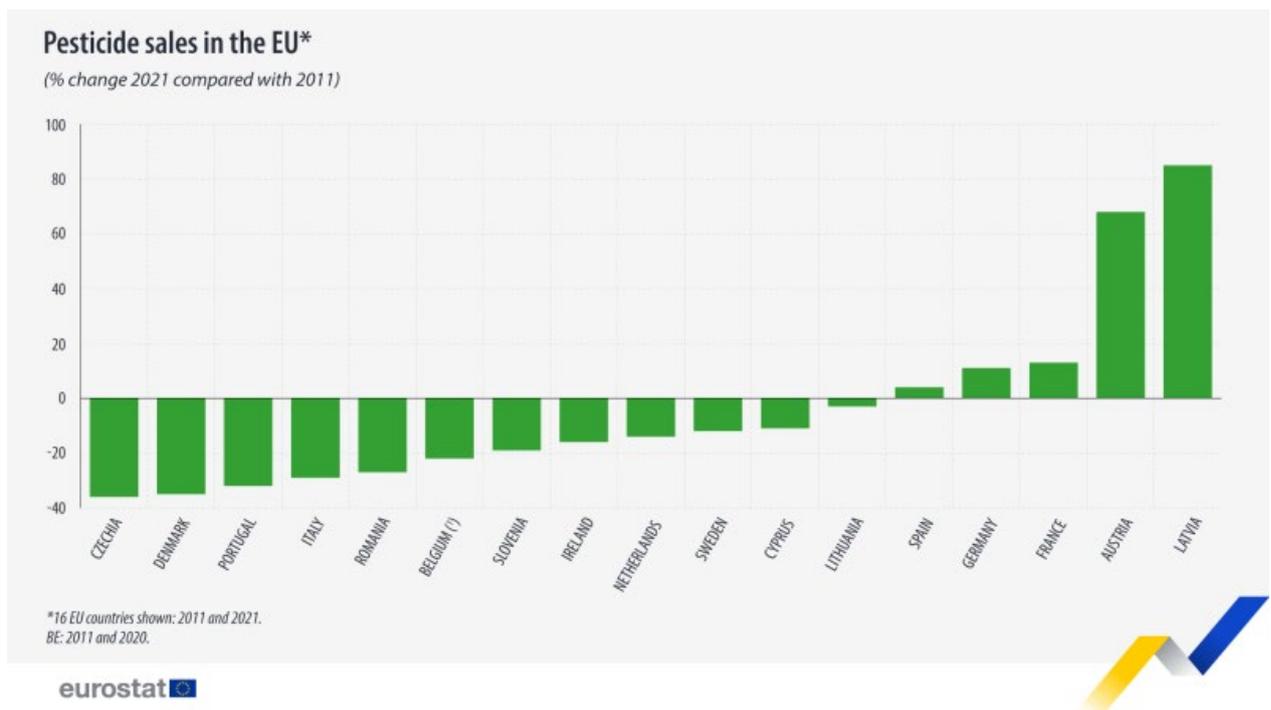


Figura 1.1: Diagramma dell'andamento delle vendite di pesticidi in Europa comparate tra 2011 e 2021 (Eurostat, 2021)

Visto l'uso smodato e la presenza costante nel nostro ambiente, residui di pesticidi si ritrovano in circa la metà della frutta e verdura che ogni giorno arriva nei nostri piatti. Nel mercato europeo, il 45% degli oltre 90mila campioni alimentari analizzati dall'EFSA

(Autorità Europea per la Sicurezza Alimentari) (2021), presenta uno o più residui di pesticidi in concentrazioni inferiori o uguali ai livelli massimi consentiti, e il 2% (per un totale di 241 alimenti) contiene concentrazioni di residui superiori ai limiti consentiti. Non solo gli alimenti, anche altri substrati ambientali sono stati oggetto di studio di contaminazione da pesticidi, come le acque ed il suolo.

Nel 2020, sulla base dei dati nazionali comunicati all'EEA (Agenzia Europea per l'Ambiente), utilizzati per il monitoraggio ambientale, sono stati rilevati uno o più pesticidi al di sopra delle soglie di effetto o di qualità nel 22% dei siti di monitoraggio delle acque superficiali segnalati in Europa, inclusi fiumi e laghi (Figura 1.2).

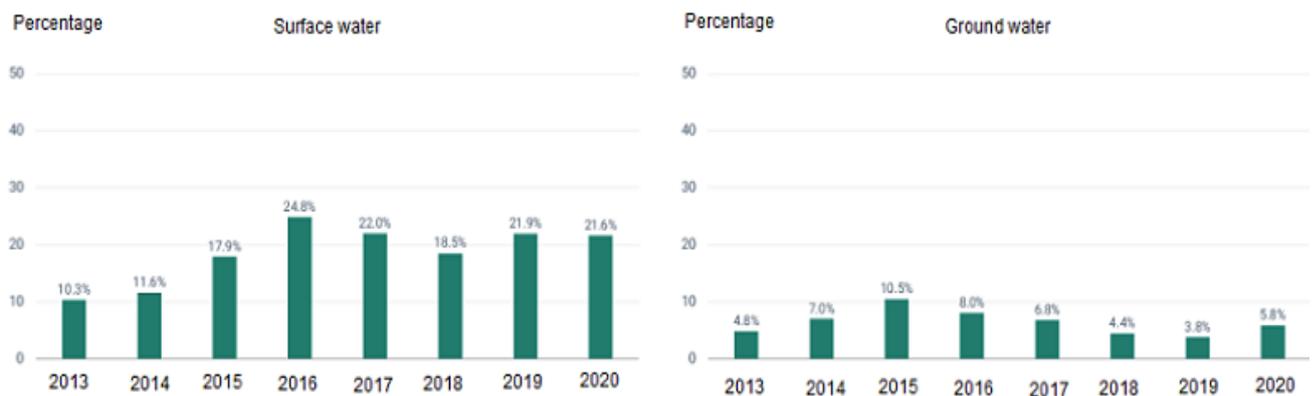


Figura 1.2: Eurostat, 2021. È mostrata la percentuale di siti di monitoraggio segnalati con pesticidi che superano le soglie nelle acque superficiali e nelle acque sotterranee in Europa, ponderata per area del paese.

I pesticidi che causano i superamenti delle soglie di accettabilità variano da un Paese all'altro; quelli che nel 2020 hanno mostrato il più alto numero assoluto di superamenti in tutta Europa risultavano essere l'insetticida imidacloprid e l'erbicida metolachlor. Nelle acque sotterranee, invece, l'erbicida più altamente persistente è risultato l'atrazina insieme con i suoi metaboliti, nonostante ne sia stato vietato l'utilizzo a partire dal 2007.

Infatti, la maggior parte delle sostanze per le quali si registra un numero elevato di superamenti in tutta Europa non sono più approvate nell'UE. Ciò rende ancora più evidente l'impatto a lungo termine dell'uso di pesticidi e i possibili usi di emergenza.

Riguardo gli ecosistemi terrestri, non esiste attualmente uno standard di qualità UE per i pesticidi nel suolo. Tuttavia, studi recenti hanno rilevato la presenza nell'83% dei terricci analizzati di uno o più residui di pesticidi; il più comune era l'erbicida glifosato e il suo metabolita acido aminometilfosfonico (Silva *et al.*, 2019).

Anche in Italia l'uso di pesticidi è ancora estremamente diffuso, rendendo il nostro Paese uno dei maggiori consumatori di tutta Europa. Sebbene la vendita ufficiale di queste sostanze risulti diminuita quasi del 20% dal 2011 al 2020, secondo i dati Eurostat 2021, l'Italia risulta essere al sesto posto delle nazioni europee per ricorso alla chimica di sintesi nella difesa delle colture, con un consumo di pesticidi per unità di superficie coltivata doppio rispetto a Francia e Germania. In particolare, in Italia si usano centinaia di tonnellate l'anno di pesticidi, costituite da circa 400 sostanze diverse, costituendo una fonte non indifferente di contaminazione di alimenti, delle acque superficiali e sotterranee e del suolo.

Nel 2021, sono stati analizzati oltre 2500 campioni di alimenti di origine vegetale, includendo anche i prodotti derivati da apicoltura. Dalla lettura dei dati, è emerso che il 54,81% degli alimenti risulta a norma di legge e senza residui, mentre nel 44,19%, vi sono tracce di uno o più fitofarmaci, in linea con la tendenza degli anni precedenti (Report Legambiente, 2022). La categoria di alimenti in cui è stata riscontrata la presenza di più tracce di almeno una sostanza attiva è principalmente la frutta. Anche i prodotti di derivazione animale come carne, uova e latticini sono interessati da fenomeni di contaminazione da pesticidi. Gli animali da allevamento, infatti, possono venire a contatto sia con residui di fitofarmaci, legati alla contaminazione diffusa delle matrici ambientali (suolo, acqua, aria), sia nutrendosi di mangimi derivati da colture che ne hanno già accumulato in elevate quantità (Report Legambiente, 2022).

In merito alla contaminazione chimica delle acque italiane invece, i dati dell'ISPRA del rapporto del 2019-2020 hanno documentato la diffusa presenza di pesticidi nei corpi idrici

superficiali e profondi. Le indagini, che hanno riguardato 4.775 punti di campionamento e 16.962 campioni, hanno rilevato residui di pesticidi nel 77.3% dei 1.980 punti di monitoraggio nelle acque superficiali, e nel 32.2% dei 2.795 punti in quelle sotterranee.

Le concentrazioni misurate sono in genere frazioni di $\mu\text{g/L}$ (parti per miliardo), ma gli effetti nocivi delle sostanze si possono manifestare anche a concentrazioni molto basse. Sono state cercate complessivamente 426 sostanze e ne sono state trovate 299 (ISPRA, edizione 2022). Rispetto al passato, in cui i composti principalmente rinvenuti erano gli erbicidi, è aumentata significativamente la presenza di fungicidi e insetticidi, soprattutto nelle acque sotterranee. Ciò ha dimostrato come nel nostro Paese, le acque siano contaminate da pesticidi in quantità superiori ai limiti della legge.

1.3 Impatto dell'esposizione ai pesticidi sulla salute

A causa dell'utilizzo eccessivo dei pesticidi in tutto il mondo, l'esposizione cronica sia dell'uomo che degli animali a queste sostanze è aumentata notevolmente. Per questo motivo, fin dalla loro introduzione, i pesticidi hanno rappresentato fonte di preoccupazione e si è resa sempre più evidente la necessità di chiarirne i possibili effetti sulla salute umana.

Gli studi presenti in letteratura sulla tossicità dei fitofarmaci e i meccanismi con cui questi agiscono sulle specie "non-target" sono sempre più numerosi.

La suscettibilità ai pesticidi è influenzata da molteplici fattori come età, sesso, la dieta, stile di vita e variabilità genetica (Eskenazi *et al.*, 2014).

Una caratteristica peculiare dei pesticidi è che, essendo altamente lipofili, mostrano un'elevata capacità di bioaccumulo, riuscendo in questo modo ad essere immagazzinati negli organismi in concentrazioni superiori a quelle riscontrate nell'ambiente circostante, e sono capaci di aumentare esponenzialmente la concentrazione lungo la catena alimentare (biomagnificazione), colpendo anche specie non bersaglio e contribuendo così alla perdita di biodiversità e all'alterazione di interi ecosistemi.

L'esposizione a queste sostanze può avvenire in diversi modi: in ambito professionale, durante le attività agricole e/o di giardinaggio, tramite l'assorbimento cutaneo o l'inalazione, vivendo in prossimità di ambienti in cui se ne fa un largo utilizzo, oppure per via orale, attraverso l'ingestione di cibo ed acqua contaminati (Damalas ed Eleftherehorinos, 2011).

La figura 1.3 delinea una panoramica delle vie e dei percorsi di esposizione umana ai pesticidi.

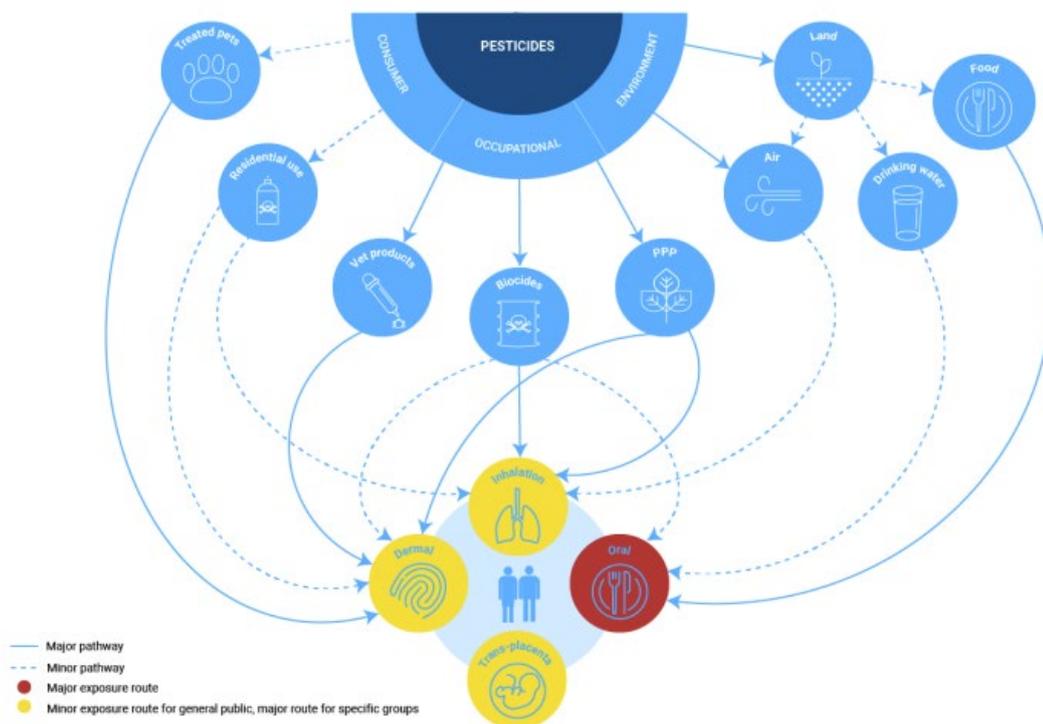


Figura 1.3: La linea in grassetto indica un percorso di esposizione principale, mentre la linea tratteggiata indica un percorso minore. I cerchi rossi indicano un'importante via di esposizione. I cerchi gialli indicano una via di esposizione minore per la popolazione generale che può tuttavia essere una via principale per gruppi specifici (HBM4EU).

Oltre ai fattori intrinseci, è probabile che anche elementi estrinseci come la durata e la tempistica dell'esposizione rivestano un ruolo significativo nella gravità dei disturbi ad essi correlati. Uno studio condotto sul rapporto tra l'esposizione cronica ai pesticidi, con

piccole dosi ma prolungate nel tempo, e l'alterazione della funzionalità di sistemi dell'organismo umano, ha dimostrato un aumento del rischio di cancro, patologie respiratorie, disturbi nella funzionalità riproduttiva, disfunzioni metaboliche ed ormonali (Mostafalou e Abdollahi, 2015).

Per comprendere meglio l'esposizione umana ai pesticidi, l'iniziativa europea di biomonitoraggio umano (HBM4EU) ha condotto un'indagine su larga scala in adulti e bambini in cinque paesi europei tra il 2014 e il 2021. In totale, sono stati identificati circa 46 pesticidi e i loro metaboliti, con almeno due sostanze attive rilevate nell'84% dei campioni raccolti. I livelli di pesticidi in questo studio risultavano costantemente più alti nei bambini che negli adulti (Huber *et al.*, 2022).

Non è ancora possibile stimare il numero di patologie legate ai pesticidi in Europa, né per la popolazione generale né per gruppi specifici. Tuttavia, sono stati dimostrati forti o nessi sospetti tra l'esposizione ai pesticidi e l'aumento del rischio di numerose malattie croniche, tra cui tumori (linfoma non Hodgkin, mieloma multiplo, tumori ovarici, mammari, cerebrali e prostatici), malattie neurodegenerative come il morbo di Parkinson e l'Alzheimer, malattie cardiovascolari, ritardi nello sviluppo nei bambini, effetti sulla capacità riproduttiva e sulla sterilità maschile e femminile, disturbi cognitivi, e malattie respiratorie.

Sebbene non sempre sia stato possibile identificare le sostanze attive coinvolte nell'eziologia di tali patologie, alcuni gruppi di pesticidi sono stati associati a un rischio maggiore di determinati effetti sulla salute. Ad esempio, gli organoclorurati (come DDT e lindano), gli organofosfati ed i piretroidi sono stati correlati a disturbi dello sviluppo neurologico e al cancro alla prostata, il glifosato al linfoma non Hodgkin (Leemans *et al.*, 2019).

Da non sottovalutare sono anche le miscele di pesticidi e altre sostanze chimiche, che possono amplificare i loro effetti potenzialmente dannosi per la salute umana.

Sulla base dei dati ottenuti fino ad oggi, è evidente che i pesticidi siano responsabili di una vera e propria pandemia silenziosa.

1.4 Gli interferenti endocrini

Alcuni inquinanti ambientali hanno la capacità di influenzare il sistema endocrino, alterando i normali processi di sviluppo nell'uomo e nelle specie animali.

L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) definisce gli interferenti endocrini come "sostanze esogene o miscele che alterano le funzioni del sistema endocrino e di conseguenza causano effetti avversi sulla salute in un organismo intatto, nella sua progenie o in (sotto)popolazioni". Gli interferenti endocrini sono quindi sostanze in grado di agire sulla sintesi, l'azione e il metabolismo degli ormoni steroidei sessuali, che a loro volta regolano i meccanismi di riproduzione, la fertilità e capacità fecondante, esercitando effetti negativi sull'asse ipotalamo-ipofisi-gonade. In particolare, sull'apparato riproduttore femminile, gli interferenti endocrini causano irregolarità mestruale, azione ormonale interrotta, ridotta fertilità, infertilità, sindrome dell'ovaio policistico (PCOS), endometriosi, tumori sensibili agli ormoni, pubertà precoce e/o ritardata (Yesildaglar *et al.*, 2010; Rattan *et al.*, 2017). Residui di interferenti endocrini sono stati ritrovati anche nel fluido follicolare delle donne interferendo con i normali processi di steroidogenesi nell'ovaio, essenziali per la salute riproduttiva femminile (Mlynarcikova *et al.*, 2014). Anche l'apparato riproduttore maschile risente dell'azione di queste sostanze. Gli interferenti endocrini possono colpire la spermatogenesi, rendono la qualità delle cellule spermatiche scarsa e, di conseguenza, determinano una ridotta fertilità maschile (Den Hond *et al.*, 2014).

Queste sostanze, quindi, possono non solo esplicitare effetti negativi sull'individuo esposto, ma, agire sulle stesse cellule germinali, determinando alterazioni che si trasmettono alle generazioni successive attraverso modificazioni di tipo epigenetico. Tali effetti si manifestano spesso tardivamente (anche dopo decenni) e variano non solo in base alla durata, al tipo di sostanza e alla loro quantità, ma anche a seconda del momento in cui avviene l'esposizione (Rattan e Flaws, 2019).

Gravidanza, allattamento, vita fetale, infanzia e pubertà rappresentano momenti cruciali, "finestre espositive", in cui il contatto con tali agenti può comportare effetti particolarmente gravi. È stato recentemente dimostrato che l'esposizione a DDT (un

agente in uso come insetticida negli anni '50 che - anche se bandito da anni - ancor oggi è presente nelle matrici ambientali) è correlato ad un aumentato rischio di cancro mammario se l'esposizione è avvenuta in età prepubere (Cohn *et al.*, 2007). L'esposizione pre-concepimento dei genitori e l'esposizione in utero a sostanze chimiche (generazione F0), quindi, come i pesticidi, causano alterazioni epigenetiche nella linea germinale che possono essere trasmesse da una generazione alla successiva e influenzano la suscettibilità alle malattie (incluso il cancro) nella progenie.

Diversi sono i meccanismi che giocano un ruolo importante nella trasmissione multigenerazionale e transgenerazionale della predisposizione alla malattia. Tra essi vi sono: la metilazione del DNA, i modelli di metilazione del DNA associati al fattore di trascrizione, le modificazioni degli istoni e gli RNA non codificanti (Collotta *et al.*, 2013; Rattan e Flaws, 2019).

I paradigmi di esposizione multipla indicano come l'esposizione ai pesticidi possa produrre effetti multigenerazionali e transgenerazionali. Il primo paradigma è l'esposizione durante la vita adulta, che può causare modificazioni epigenetiche, soprattutto nelle cellule germinali. Gli effetti multigenerazionali di questa prima esposizione, dunque, si vedranno nelle generazioni F1 ed F2, come feto e cellula germinale, rispettivamente. Infatti, diversi studi epidemiologici hanno dimostrato che l'esposizione ai pesticidi, anche a basse dosi, durante la gravidanza o la prima infanzia aumenta il rischio di leucemia nei bambini (Khan *et al.*, 2021). La generazione F3 non è esposta direttamente ma si ritiene che gli effetti siano causati da modificazioni epigenetiche subite dalle generazioni F1 ed F2 (Figura 1.4).

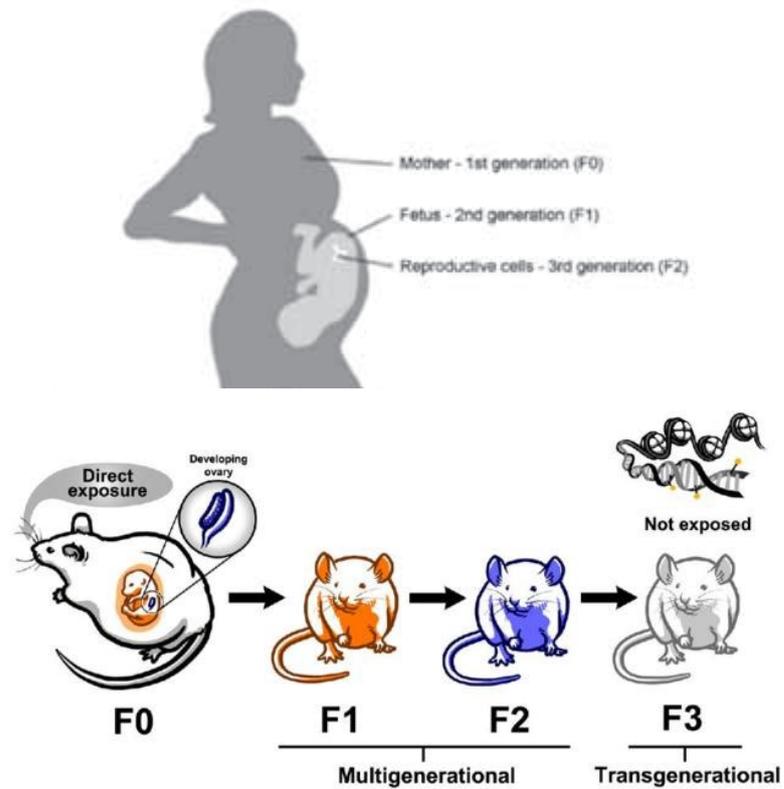


Figura 1.4: Esposizioni ambientali e trasmissione transgenerazionale dei danni (Rattan e Flaws, 2019).

Un grande numero di sostanze chimiche è stato identificato come interferenti endocrini ai quali l'uomo può essere esposto. Alcuni di essi sono stati ritirati dal mercato molti anni fa, ma si trovano ancora nell'ambiente, a causa della loro capacità di persistenza. Tra questi troviamo:

- Insetticidi clorurati (lindano, dieldrin),
- Fungicidi (vinclozolin, linorun),
- Trazoli (ciproconazolo),
- Imidazoli (imizaloil),
- Triazine (atrazina, simazina),
- Etilene bisditiocarbammatil (mancozeb),
- Coformulanti (alchifenoli).

Generalmente sono molecole lipofile che tendono ad accumularsi nel tessuto adiposo e dunque presentano un'emivita molto lunga nel corpo.

Oltre a svolgere il ruolo di distruttori endocrini, è ormai assodato che molti di questi agenti hanno anche una azione mutagena e cancerogena e numerosissimi sono i tipi di cancro messi in relazione con la loro esposizione.

Un numero sempre crescente di studi epidemiologici collega l'esposizione ambientale ai pesticidi al rischio di sviluppare cancro ormono-dipendente, infatti alti livelli di pesticidi sono stati trovati in campioni di grasso di donne con cancro al seno. È stato dimostrato un rischio di cancro al seno quattro volte superiore nelle donne con un aumento dei livelli ematici di interferenti endocrini (Montes-Grajales *et al.*, 2016). Così come uno studio epidemiologico condotto in Spagna tra il 1999 e il 2009 ha mostrato che su un totale di 2.661 casi di cancro al seno riportati nella popolazione femminile, 2.173 (81%) sono stati osservati nelle aree ad alta contaminazione da pesticidi (Valerón *et al.*, 2009). Altri lavori hanno rivelato un possibile collegamento tra l'esposizione a pesticidi e la comparsa di cancro alla prostata con un rischio più elevato nelle popolazioni addette all'agricoltura (Van Maele-Fabry *et al.*, 2003). Studi simili hanno rivelato correlazioni tra danni al sistema immunitario ed una maggiore quantità di residui organoclorurati in certi tessuti cancerosi. Infatti, è emerso un aumentato rischio di leucemie, di linfoma non-Hodgkin e di mieloma multiplo (Gentilini, 2014). È evidente quindi che esiste una relazione tra lo sviluppo di patologie come il cancro (in particolare tumori ematologici) e pesticidi, soprattutto quelli con proprietà di interferenti endocrini e l'aumento sempre più frequente di queste patologie non può più essere trascurabile.

1.5 Il mancozeb

1.5.1 Classificazione e generalità

Il mancozeb è un fungicida appartenente al gruppo degli etilenbisditiocarbammati (EBDC), utilizzati in agricoltura dal 1947 e considerati il più importante e versatile gruppo di fungicidi organici mai scoperto.

Grazie alla sua natura multi-sito, il mancozeb presenta un ampio spettro d'azione contro numerosi funghi, senza determinare effetti fitotossici sulle piante, ragion per cui è uno dei

principi attivi più utilizzati in agricoltura, principalmente su frutta, piante e ortaggi (Colosio *et al.*, 2002). Dall'inizio della sua commercializzazione avvenuta nel 1962, è stato utilizzato in oltre settanta tipi di colture per il controllo di numerosi funghi patogeni ed è attualmente impiegato in 120 paesi in tutto il mondo: nel 2007 è risultato il secondo pesticida più venduto a livello mondiale con un fatturato di circa 500 milioni di dollari (Gullino *et al.*, 2010). Il mancozeb è attualmente registrato come pesticida per uso generale dall'Environmental Protection Agency (EPA).

Esso ha la capacità di inattivare i gruppi sulfidrilici degli aminoacidi e degli enzimi all'interno delle cellule fungine, e tipicamente causa l'interruzione dei processi metabolici e della funzione mitocondriale, inibendo la germinazione delle spore (Yang *et al.*, 2011).

Dal punto di vista chimico, è formato dalla combinazione di due ditiocarbammati: etilene-bis-ditiocarbammato di manganese (maneb) ed etilene-bis-ditiocarbammato di zinco (zineb) (Gullino *et al.*, 2010). Le sue proprietà chimico-fisiche sono riportate in Tabella 1.1.

Nome sostanza: Mancozeb, Complesso (polimerico) di etilenbis(ditiocarbammato) di manganese con sale di zinco	
Gruppo di appartenenza	3-potenziale IE
Numero CAS (Chemical Abstract Service)	8018-01-7
Formula chimica	$C_4H_6MnN_2S_4)_x(Zn)_y$
Peso Molecolare	541.045725 g/mol
Colore	bianco giallastro
Stato fisico	polvere
Punto d'ebollizione	138 °C
Punto di fusione	172 °C
Densità	1,92 g/cm ³ a 20° C

Tabella 1.1: Proprietà chimico-fisiche del mancozeb

Tra i suoi prodotti di degradazione è presente l'etilentiourea (ETU), molecola considerata potenzialmente cancerogena. Infatti, il mancozeb e altri composti appartenenti agli EBDC sono stati oggetto di due revisioni speciali da parte dell'EPA, iniziate nel 1977 e nel 1987 a causa di preoccupazioni per la salute, tra cui effetti sullo sviluppo cognitivo e sulla tiroide, in presenza del metabolita ETU (EPA, 2005) (Figura 1.5).

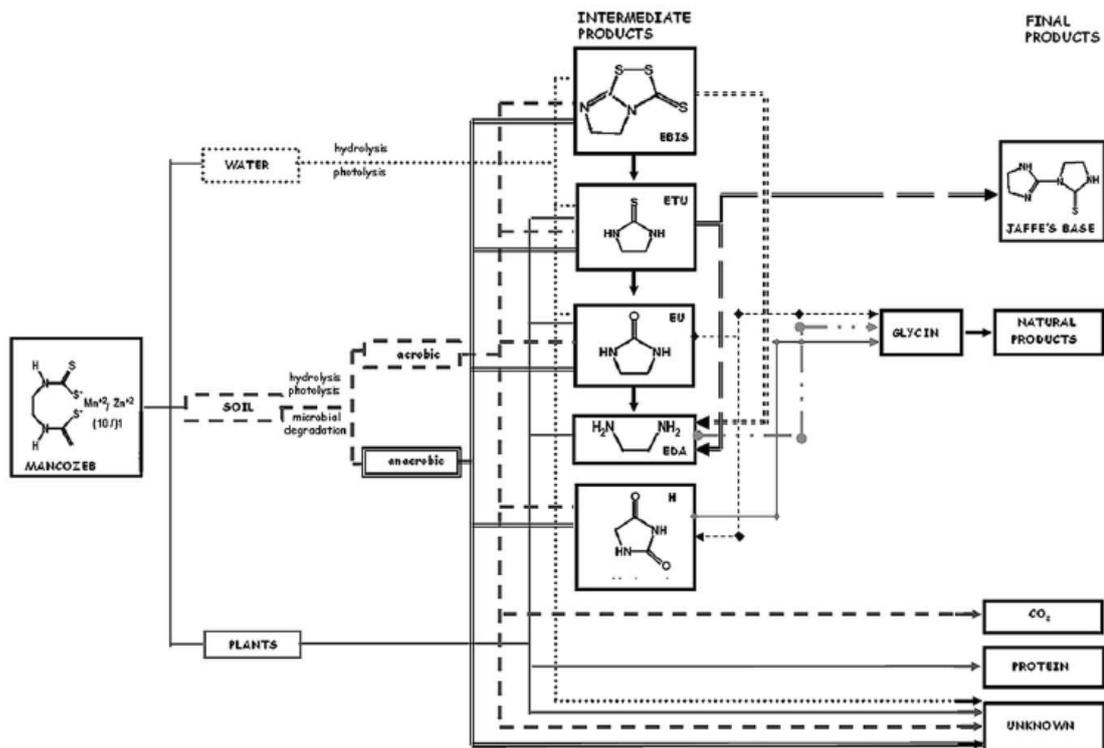


Figura 1.5: Percorso di degradazione del Mancozeb. EBIS: etilenbisisotiocianato; ETU: etilenetiourea; EU: etilenurea; EDA: etilendiammina; H: idantoina (Cecconi et al., 2007)

Con il tempo, sono emersi i danni in seguito all'uso incondizionato di questi fungicidi, con dati sulla loro tossicità subcronica e cronica, riguardanti genotossicità, neurotossicità ed effetti avversi sul sistema ematopoietico, caratteristiche tossicologiche che non potevano essere ignorate.

A dicembre 2020, dopo la valutazione effettuata dall'Agenzia Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA), la Commissione Europea ha emanato il regolamento (UE) n. 2020/2087, con cui ha deciso di ritirare definitivamente dal mercato il mancozeb a causa dei suoi effetti tossici sulla salute riproduttiva, sull'ambiente e per le sue proprietà di interferente endocrino. La Commissione Europea ha inoltre concluso che le stime di esposizione non alimentare superano i valori di riferimento per gli impieghi rappresentativi nei pomodori, nelle patate, nei cereali e nelle viti e pertanto, anche l'esposizione non alimentare al mancozeb non poteva più essere considerata trascurabile.

Nonostante ne sia stato vietato l'utilizzo, il processo della globalizzazione e dell'importazione delle merci da quei continenti, in cui l'uso di questo fungicida è ancora permesso, contribuisce ugualmente l'arrivo in Italia ed in Europa di prodotti trattati con il mancozeb ed alla conseguente e continua esposizione della popolazione ad esso.

1.5.2 Tossicità del mancozeb

La tossicità del mancozeb è ampiamente attribuita agli effetti negativi causati del suo metabolita, l'ETU. Nell'uomo, l'esposizione a questo fungicida viene valutata in base alla presenza del suo prodotto di degradazione (Skalny *et al.*, 2021) nelle urine. È stato visto che nei lavoratori esposti a 147.11 µg di fungicida per 38 giorni lavorativi, la concentrazione di ETU nelle urine variava da 0.8 a 61.4 µg/L (Aprea *et al.*, 1996; Colosio *et al.*, 2002; Mandic-Rajcevic *et al.*, 2018). Tuttavia, in letteratura mancano dati sulla concentrazione soglia nei fluidi umani. È stato proposto un valore di 0.05 mg/kg di peso corporeo come dose giornaliera ammissibile (DGA) per l'uomo (Iorio *et al.*, 2015).

Dosi elevate di metaboliti del mancozeb (da ng/L a mg/L) sono spesso rilevate nel suolo e nell'acqua circostante alle zone in cui è stato utilizzato (Wang *et al.*, 2021). Secondo una recente analisi, il mancozeb è stato individuato ad una concentrazione di 39 µg/L nell'acqua ambientale vicino alle aziende agricole (Archer *et al.*, 2015). L'US. EPA (Environmental Protection Agency) (2013) ha riportato una concentrazione di mancozeb nell'acqua superficiale compresa tra 0.1 e 25.2 µg/L (U.S. EPA/OPP, 2013). Nell'aria della California, i valori di mancozeb registrati erano compresi tra 0.29 µg/m³ e 1.81 µg/m³ (Kolmann, 1995).

La persistenza ambientale del mancozeb nel suolo è stata considerata piuttosto bassa, con un tempo di dimezzamento che va dai 2 agli 8 giorni in terreni aerobici e anaerobici, rispettivamente. Tuttavia, nei terreni in cui era stato utilizzato il mancozeb presentavano un aumento della formazione di ETU, per 30 giorni con un successivo declino di concentrazione (Hanumantharaju e Awasthi, 2004). Per questa ragione, si ritiene che gli effetti pericolosi dell'esposizione al mancozeb si osservino con l'uso frequente e prolungato nel tempo. Nel 1988, l'OMS ha stimato che l'esposizione al mancozeb e all'ETU

era di 0.01-1 µg/kg di peso corporeo/giorno per la popolazione generale. Piccole quantità di ETU sono state rilevate nel tabacco, nella frutta e nella verdura. Le attività agricole e di allevamento rappresentano le principali fonti di contaminazione per la popolazione generale, così come l'inalazione, il contatto diretto con la pelle e con l'assunzione di cibi contenenti residui del fungicida.

Sebbene siano stati osservati effetti teratogeni e cancerogeni sugli animali, il mancozeb e il suo metabolita sono stati considerati dalla AIRC (Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro) cancerogeni di classe 3, poiché i dati riportati sull'uomo restano ancora esigui. Numerosi studi però ne dimostrano la tossicità. L'esposizione *in vitro* di linfociti umani al mancozeb (0.5, 2 e 5 µg/ml) è stata correlata ad una significativa alterazione dell'espressione genica dei fattori trascrizionali thrombospondin-1 (THBS-1), fosfo-proteina-1 secretoria (SPP-1), glicoproteina non metastatica-β (GPNMB) e fattore di allungamento ζ-1 (FEZ-1) (Sirvastava *et al.*, 2012), facendo supporre l'alterazione di alcuni meccanismi immunitari quali la proliferazione, l'adesione cellulare, l'apoptosi e l'attivazione delle cellule da parte del fungicida. Ulteriori esperimenti *in vitro* hanno evidenziato danni allo sviluppo neurologico dopo l'esposizione a mancozeb ed ETU, i quali determinano l'inibizione della respirazione mitocondriale (2.6-31.2µg/ml), generazione attiva di specie reattive dell'ossigeno (ROS) (0.08-7.8 µg/ml) (Domico *et al.*, 2006; Domico *et al.*, 2007), dell'induzione di stress ossidativo, della genotossicità e dell'apoptosi nei fibroblasti di ratto (0.125-0.5 µg/ml). Dopo un'ora dall'esposizione al mancozeb (da 125 a 500 ng/ml), è stato visto che le cellule subivano una rottura del DNA a singolo filamento, misurata mediante elettroforesi su gel a singola cellula, aumento nella produzione di addotti al DNA come la 8-idrossi-2-deossiguanosina (8-OHdg) e di ROS. Tempi di esposizione più lunghi (quattro ore) hanno indotto apoptosi, come risultato dall'alterata espressione di BCL-2 e C- MYC, con una maggiore sensibilità dei fibroblasti. A concentrazioni più elevate di mancozeb o per periodi più lunghi, maggiori di quattro ore, sono stati registrati apoptosi ed alterazioni necrotiche.

La tossicità del mancozeb (20-200 µM) è stata dimostrata anche a livello gastrointestinale; esso determina l'accumulo di metalli quali rame, zinco e manganese all'interno delle linee

cellulari HT-29 e cellule del colon, portando ad un aumento dello stress ossidativo intracellulare associato ad un incremento nella produzione e accumulo dei radicali liberi, che contribuiscono ad aumentarne la tossicità (Hoffman *et al.*, 2015). Studi *in vivo* su ratti a cui sono stati somministrate differenti concentrazioni di mancozeb (da 0 a 1000 ppm) nel mangime per 104 settimane hanno dimostrato l'aumento dei tumori maligni alla mammella, pancreas, tiroide ed epatocarcinomi. Per questo motivo è stato considerato un agente carcinogeno multipotente (Belpoggi *et al.*, 2002).

1.5.3 Tossicità riproduttiva del mancozeb: studi *in vivo* ed *in vitro*

Il mancozeb è stato classificato come interferente endocrino, ovvero una sostanza in grado di mimare la sintesi, la secrezione, il trasporto l'azione di alcuni ormoni endogeni o di sostituirsi ad essi, interagendo con i loro recettori, responsabili dello sviluppo, del comportamento, della fertilità, e del mantenimento dell'omeostasi cellulare. È stato ipotizzato che l'effetto negativo di queste sostanze si verifichi tramite un'alterazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonade oppure direttamente sugli organi genitali, tramite la citotossicità delle cellule germinali, inducendo tossicità riproduttiva (Jacobsen *et al.*, 2012; Hass *et al.*, 2017). Tutto ciò conduce alla compromissione della funzione riproduttiva e/o all'alterazione dello sviluppo embrionale, come ritardo della crescita, malformazioni e morte.

La tossicità riproduttiva del mancozeb è stata studiata in diversi modelli animali e sull'uomo, tramite esperimenti *in vitro* e *in vivo*.

Nonostante mostri una bassa tossicità acuta nei mammiferi ($DL_{50}=8\text{g/kg/giorno}$ nei ratti), è stato dimostrato che l'esposizione a lungo termine al mancozeb induca aborto spontaneo, mortalità e malformazioni fetali nei ratti e nei conigli, tossicità gonadica nelle femmine di ratto, con conseguenti alterazioni genotossiche e maligne nelle cellule ovariche umane (Paro *et al.*, 2012; Srivastava *et al.*, 2012; Runkle *et al.*, 2017).

I risultati di studi *in vivo* supportano l'idea che il mancozeb e i ditiocarbammati esercitino effetti negativi sul processo riproduttivo, determinando uno squilibrio ormonale in grado di colpire la secrezione di gonadotropina e, di conseguenza, la performance riproduttiva

di entrambi i sessi (Stocker *et al.*, 2003). L'analisi trascrittomiche delle ovaie di topi esposti *in vivo* (100 mg/kg) ha rivelato un'anomalia della funzione della catena respiratoria mitocondriale, responsabile del disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa, dello stress ossidativo, delle lesioni ovariche e dell'apoptosi (Bao *et al.*, 2022).

La maturazione *in vitro* degli ovociti di topo può essere utilizzata come test sensibile per valutare eventuali alterazioni cellulari causate da pesticidi, anche a basse concentrazioni ed aiutare a chiarire gli effetti dose-dipendenti.

Per esempio, in letteratura è riportato che il mancozeb altera le funzionalità riproduttive quando usato a concentrazioni inferiori a quelle utilizzate per altre cellule. Infatti, a concentrazioni di 0.003 µg/ml di mancozeb è stata evidenziata l'apoptosi dei blastomeri nel topo, provocando un arresto dello sviluppo embrionale (Greenlee *et al.*, 2004).

Studi più recenti *in vitro* hanno mostrato come il mancozeb abbia compromesso la ricettività dell'endometrio attraverso la soppressione diretta dell'espressione della prostaglandina E sintasi (PGS) nel microambiente uterino (Akthar *et al.*, 2020) ed influenzato l'impianto dell'embrione di topo, riducendo l'attaccamento degli sferoidi trofoblastici (surrogati dell'embrione) alle cellule epiteliali endometriali tramite la down regolazione dell'espressione del recettore β degli estrogeni (ERβ) e dell'integrina β3 (ITGβ3) (Wang *et al.*, 2021). Inoltre, è stato descritto recentemente come il mancozeb (0.3-30 µg/ml) possa ridurre l'espansione delle cellule del cumulo, indicando un'insufficiente maturazione del citoplasma degli ovociti di capre in seguito all'esposizione ad alte dosi (Dinisri *et al.*, 2021).

Nei complessi cellule del cumulo-ovocita (CCO) esposti a basse concentrazioni di mancozeb (dai 0.001 a 1 µg/ml), durante il periodo di maturazione *in vitro*, sono state osservate alterazioni della morfologia del fuso meiotico, associate a una riduzione del tasso di fecondazione *in vitro*, in maniera dose-dipendente (Rossi *et al.*, 2006a). A tal proposito, una ridotta capacità di sostenere le prime fasi della fecondazione, cioè la formazione di due pronuclei, è stata confermata anche *in vivo* (Rossi *et al.*, 2006b). È stato ipotizzato che nel periodo pre-ovulatorio l'aumento della vascolarizzazione cellulare possa facilitare il trasferimento di queste sostanze chimiche negli ovociti, come riscontrato

dalla presenza di numerosi pesticidi nel liquido follicolare umano. Questo indica che, oltre ai vari meccanismi d'azione, inquinanti ambientali come il mancozeb possono determinare effetti tossici importanti sugli ovociti dei mammiferi; pertanto, il loro ruolo come causa di infertilità non dovrebbe essere sottovalutato (Rossi *et al.*, 2006a). La possibilità che la cellula germinale femminile possa essere un bersaglio specifico del mancozeb suggerisce per questo fungicida una probabile causa di infertilità anche nelle popolazioni umane esposte (Cecconi *et al.*, 2007).

Tuttavia, il meccanismo con il quale il mancozeb agisce sul sistema riproduttivo e sull'embriogenesi resta ancora oggi in gran parte sconosciuto.

La tossicità di questo fungicida è stata osservata anche sulle cellule della granulosa. Dopo l'esposizione, nelle cellule della granulosa di topo si verificava la down regolazione di p53, l'aumento della produzione di ROS e le alterazioni dell'attività mitocondriale (Paro *et al.*, 2012; Iorio *et al.*, 2015). Tutti questi risultati sono stati ulteriormente confermati dall'analisi ultrastrutturale delle cellule della granulosa di topo, in cui è stata evidenziata la condensazione della cromatina, il blebbing della membrana, la vacuolizzazione citoplasmatica e la degenerazione cellulare (Palmerini *et al.*, 2018).

Vista la stretta associazione tra le cellule della granulosa e l'ovocita, i danni causati al comparto somatico delle CCO possono essere corresponsabili delle alterazioni delle cellule germinali, con conseguenze sulla funzionalità legate alla capacità fecondante degli ovociti stessi e quindi alla fertilità.

Capitolo Due

L'oogenesi nei mammiferi: cenni generali

Una breve descrizione degli aspetti chiave dell'oogenesi dei mammiferi e della sua regolazione ormonale è utile per evidenziare che le complesse relazioni molecolari tra fattori ovarici, paracrini ed endocrini controllano e moderano la capacità di produrre un ovocita fecondabile, un evento che può essere considerato un indicatore dello stato di salute riproduttivo nei mammiferi.

Nei mammiferi, la fecondazione dipende dal coordinamento di numerosi processi. Dal lato materno, comporta la crescita, il reclutamento e la maturazione degli ovociti sotto l'effetto di fattori endocrini periferici e follicolari, direttamente o attraverso l'interazione con le cellule della granulosa follicolare; qualsiasi deviazione rispetto alla corretta progressione di questi eventi può portare alla produzione di ovociti meno competenti. Dal lato paterno, gli spermatozoi devono progredire fino all'ampolla dell'ovidotto, dove qualsiasi alterazione del microambiente può influire sul rilascio, il trasporto e l'interazione degli spermatozoi con l'ovocita (Greve e Callesen, 2001).

2.1 Lo sviluppo delle cellule germinali femminili

In tutte le specie di mammiferi, lo sviluppo del follicolo e dell'ovocita segue una serie precisa e caratteristica di eventi che inizia con la formazione dell'ovaio poco dopo il concepimento e termina con l'ovulazione ciclica di un ovocita maturo e competente in metafase II (MII) (Picton *et al.*, 2008). Questo processo nella femmina è conosciuto come oogenesi o gametogenesi femminile.

Nel periodo prenatale, circa 1000-2000 cellule germinali primordiali (PGC), che si formano nell'epiblasto, migrano verso la cresta gonadica a formare gli ovogoni (cellule diploidi specializzate). La migrazione delle PGC nei mammiferi avviene con tempistiche diverse (Figura 2.1); negli esseri umani, la migrazione inizia durante la 3^a-5^a settimana dell'embriogenesi e si conclude durante la 5^a-10^a settimana. La regolazione dell'ingresso e della progressione meiotica nei topi è molto simile a quella degli esseri umani. Nei topi, le

PGC migrano nella gonade fetale allo stadio embrionale E1.5 ed entrano nella profase meiotica I nella femmina quando le cellule germinali maschili vanno in arresto mitotico a E13.5 (Sou *et al.*, 2021).

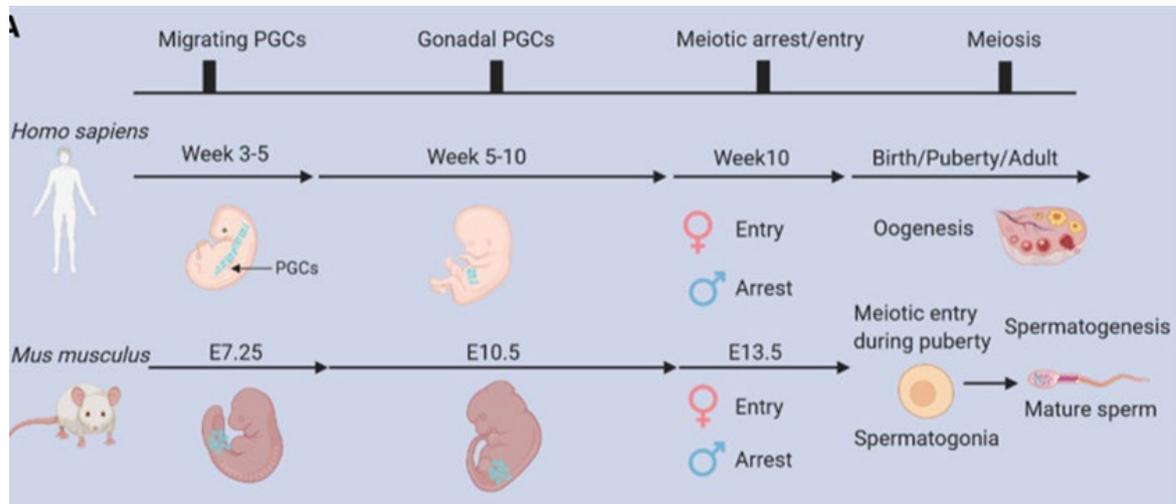


Figura 2.1: la migrazione delle PGC e l'ingresso meiotico in Homo sapiens e Mus musculus (Sou *et al.*, 2021)

Attraverso un'attività mitotica intensa, le PGC proliferano e conducono ad un aumento del numero di ovogoni, raggiungendo un massimo di 6-7 milioni, nell'uomo. L'attività mitotica delle PGC è caratterizzata da citochinesi incompleta: gli ovogoni, derivanti dalla stessa cellula germinale primordiale, restano collegati tra loro da ponti citoplasmatici, formando strutture chiamate "cisti" o "nidi" (Pepling, 2006) e durante la loro divisione sincrona, si associano alle cellule follicolari in via di sviluppo nella regione corticale dell'ovaio (Motta *et al.*, 2000). Nell'uomo, dopo la 20° settimana di gestazione iniziano fenomeni degenerativi e apoptotici (atresici) che porteranno ad una drastica riduzione del numero di ovogoni. Gli ovogoni arrestano le divisioni mitotiche, si trasformano in ovociti primari, che entrano nella profase della prima divisione meiotica e si arrestano allo stadio di diplotene, formando i cosiddetti follicoli primordiali, i quali permangono in questo stadio di sospensione fino alla pubertà, quando verrà riattivata ciclicamente la follicologenesi sotto la stimolazione degli ormoni ipotalamo-ipofisari.

Lo sviluppo dell'ovocita umano e di topo avviene in maniera simile; la differenza sostanziale è che nel topo il processo avviene in maniera più veloce, probabilmente a causa della loro vita più breve (Wang e Pepling, 2021). Nell'uomo, l'inizio della pubertà coincide con la prima mestruazione, che si verifica tra i 10 e i 16 anni, mentre nel topo il periodo di estro inizia tra il 30° e 50° giorno post-natale ed ha durata di 4-5 giorni.

Alla nascita, gli ovociti sono circa 1-2 milioni e vanno incontro a un'ulteriore riduzione fino alla pubertà, durante la quale restano mediamente circa 400.000-500.000 ovociti: di questi, solo circa 400-500 ovociti giungeranno a maturazione e all'ovulazione (Gilbert, 2016).

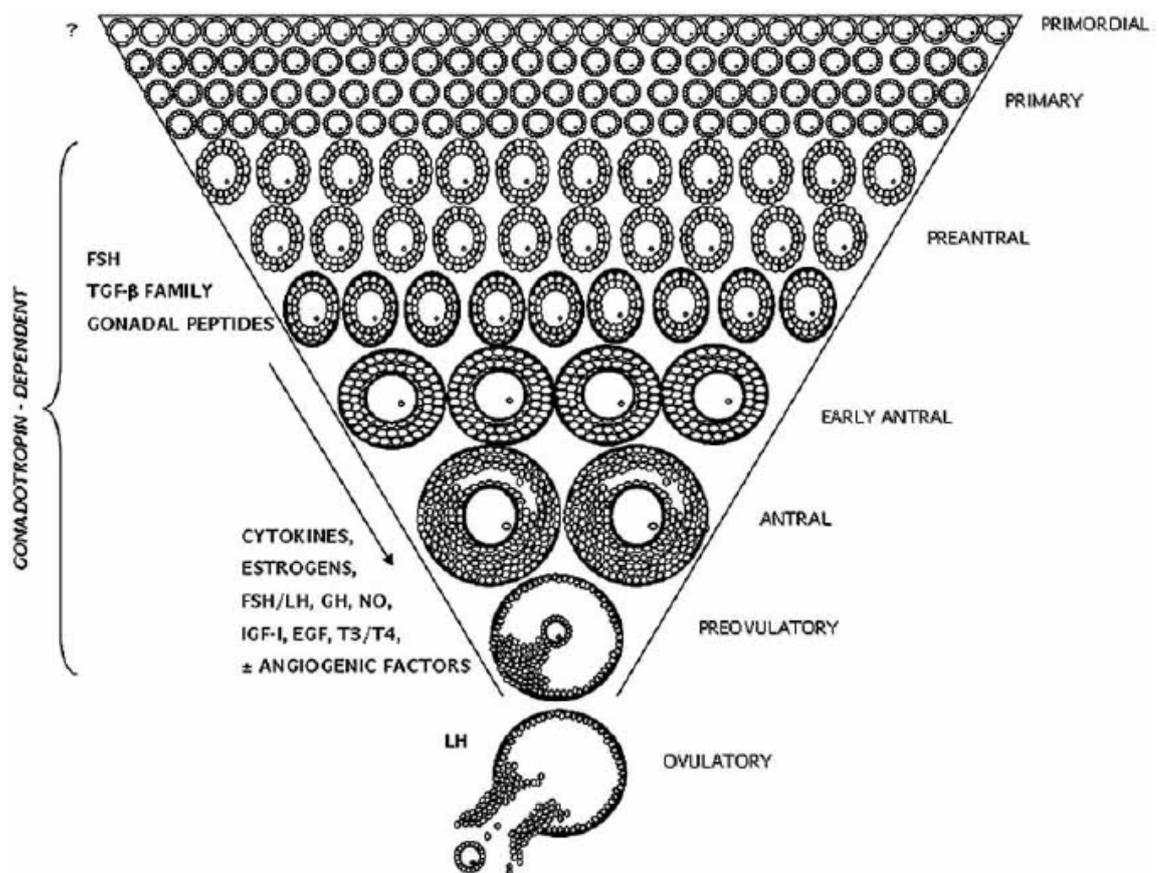


Figura 2.2: Rappresentazione schematica dello sviluppo dei follicoli nei mammiferi. Il reclutamento iniziale è stimolato da fattori sconosciuti, mentre FSH, peptidi gonadici e fattori della famiglia TGF-β stimolano la crescita, la differenziazione e la sopravvivenza dei follicoli primari/secondari. Durante lo sviluppo antrale, si verificano la selezione e la dominanza, che portano alla produzione di

follicoli in grado di raggiungere lo stadio preovulatorio. I follicoli reclutati sintetizzano 17- β -estradiolo, fondamentale per la loro sopravvivenza (Cecconi *et al.*, 2007).

2.1.1 Follicologenesi e maturazione dell'ovocita

I follicoli primordiali sono circa 1-2 milioni alla nascita e sono costituiti dall'ovocita centrale, circondato da uno strato di cellule follicolari, appiattite. Essi costituiscono la riserva ovarica, che condiziona la potenzialità fertile e restano nello stato di quiescenza finché non vengono reclutati nel pool di crescita.

La transizione da follicolo primordiale, conosciuta come attivazione o reclutamento, a follicolo primario è caratterizzata da un cambiamento morfologico delle cellule follicolari, che da appiattite diventano cuboidali, con un successivo accrescimento dell'ovocita, ed è finemente regolata da un equilibrio di ormoni stimolatori, inibitori e di fattori di crescita (Fortune *et al.*, 2000). I follicoli rimangono nella fase primaria fino a quando non ricevono il segnale per iniziare il processo di maturazione, attraverso un aumento dell'ormone follicolo-stimolante (FSH). In questa fase, comincia ad essere visibile la zona pellucida, costituita dalle quattro glicoproteine (ZP1-ZP2-ZP3-ZP4). La membrana basale separa le cellule follicolari dallo stroma circostante mentre le cellule che circondano il follicolo primario iniziano ad organizzarsi in strati concentrici (teca follicolare). Nella maturazione a follicolo secondario, l'ovocita continua a crescere e aumentare in diametro mentre iniziano a formarsi diversi strati di cellule follicolari e della teca, tra i quali si formano i vasi capillari che fanno circolare il sangue da e verso l'ovocita, portando alla formazione del follicolo pre-antrale (Van den Hurk e Zhao, 2005). Le cellule della teca si differenziano in due strati cellulari, la teca interna e la teca esterna. Esse presentano caratteristiche ultrastrutturali ben precise (da cellule allungate e fusiformi divengono poliedriche), maturano nel citoplasma gli organuli caratteristici della steroidosintesi, fungendo da fonte di androgeni, precursori della sintesi di estrogeni operata dalle cellule della granulosa (Maggofin, 2005). Lo strato interno della teca (teca interna) diventa sempre più vascolarizzato man mano che il follicolo continua a svilupparsi, mentre lo strato della granulosa rimane avascolare (Knight *et al.*, 2012). L'ovocita si affida alle cellule della

granulosa per sostenere il suo sviluppo, ma a sua volta svolge un ruolo critico nel regolare il tasso di crescita follicolare controllando la proliferazione e la differenziazione delle cellule della granulosa e della teca (Edson *et al.* 2009; Eppig *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2006, 2015). Infatti, sebbene la crescita dei follicoli pre-antrali sia indipendente dalle gonadotropine, è regolata dalla comunicazione bidirezionale tra l'ovocita e le cellule somatiche circostanti, che viene mediata dalle giunzioni gap (Peters *et al.*, 1975; Van den Hurk e Zhao, 2005).

Successivamente, all'interno del follicolo si forma una cavità nota come antro, portando in questo modo al follicolo antrale. L'antro follicolare definisce due popolazioni separate di cellule follicolari: le cellule del cumulo, che sono adiacenti all'ovocita, e le cellule della granulosa murali che rivestono la parete del follicolo e fungono da fonte principale di ormoni steroidei, agendo in collaborazione con le cellule della teca (Edson *et al.*, 2009).

La follicologenesi in questa fase dipende dalla presenza delle gonadotropine ipofisarie, ovvero l'FSH e l'ormone luteinizzante (LH). L'FSH è necessario per la sopravvivenza, la proliferazione, la produzione di estradiolo e l'espressione del recettore per l'LH dei follicoli antrali (Edson *et al.*, 2009; Richards e Pangas 2010a, Canipari *et al.*, 2020). La maggior parte dei follicoli antrali subirà poi una degenerazione atresica, mentre solo una parte di essi continuerà a svilupparsi fino a giungere allo stadio pre-ovulatorio (Figura 2.3B). L'accrescimento continuo del follicolo favorisce sia la vascolarizzazione sia il differenziamento in teca interna e teca esterna.

A questo punto avviene un'altra tappa importante per la maturazione del follicolo, la selezione del follicolo dominante, che andrà avanti nel processo di maturazione sino all'ovulazione, mentre tutti gli altri andranno incontro ad atresia. In questa fase vi è un aumento dell'FSH plasmatico. Il follicolo antrale che esprime il maggior numero di recettori per l'FSH diventa dominante, accrescendo il suo volume e continuando a maturare, e questo processo si accelera nelle 12 ore precedenti l'ovulazione (Peters *et al.*, 1975; Edson *et al.*, 2009; Canipari *et al.*, 2020) (Figura 2.3A).

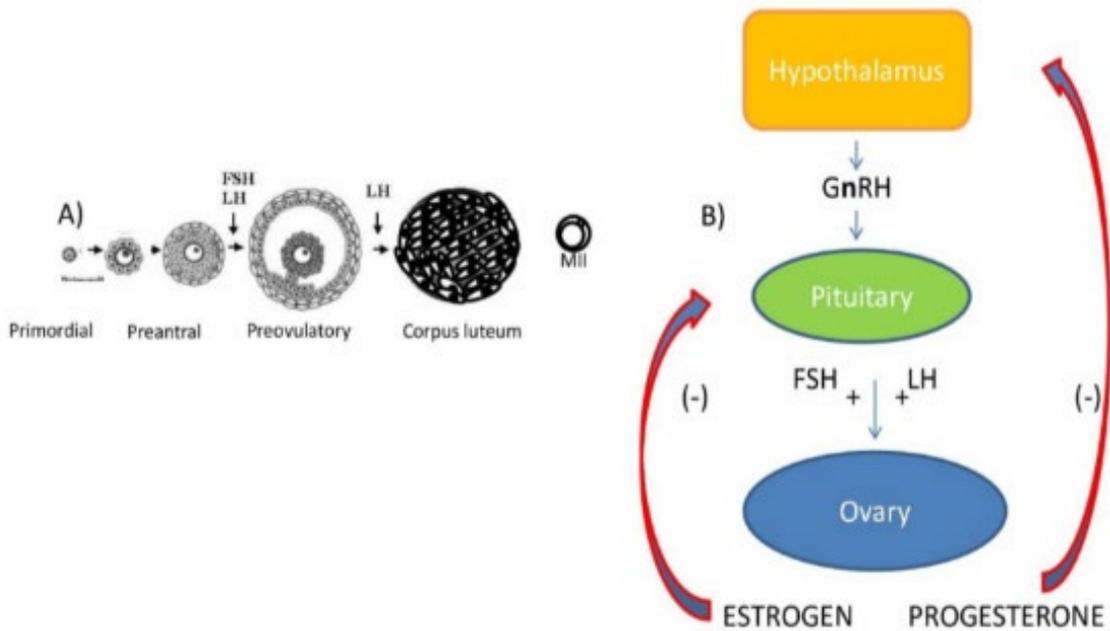


Figura 2.3: Sviluppo del follicolo ovarico e asse ipotalamo/ipofisi/ovarico. (A) Rappresentazione schematica dello sviluppo del follicolo nei mammiferi, dallo stadio primordiale alla formazione del corpo luteo. L'ovocita ovulato si arresta in MII fino alla fecondazione. (B) Il GnRH (ormone di rilascio delle gonadotropine) stimola il rilascio di FSH e LH. Quando le gonadotropine legano recettori specifici presenti sulle cellule somatiche ovariche, stimolano la produzione di estrogeni e progesterone, che esercitano un feedback negativo sul rilascio di gonadotropine (Canipari et al., 2020).

Le cellule della granulosa murali del follicolo selezionato cominciano ad esprimere un'alta concentrazione di recettori per l'LH. In seguito al picco pre-ovulatorio di LH, si attivano una sequenza di eventi culminante nell'ovulazione del follicolo dominante. Fino alla fase pre-ovulatoria, il follicolo contiene un ovocita primario che è arrestato nella profase della prima divisione meiotica. Durante la fase pre-ovulatoria tardiva, avviene la ripresa meiotica dell'ovocita, che completa la prima divisione meiotica estrudendo il primo globulo polare, inizia la seconda divisione meiotica, fino all'arresto in MII, si verifica l'espansione delle cellule del cumulo e la rottura del follicolo con il rilascio del complesso cumulo-ovocita (CCO). L'ovocita secondario è completamente maturo e acquisisce la capacità di essere fecondato (Peters et al., 1975; Edson et al., 2009).

Una volta che l'ovocita viene rilasciato, le restanti cellule della granulosa e della teca vanno incontro a differenziazione terminale per creare il corpo luteo (Edson et al., 2009). Il corpo luteo è essenziale per l'instaurazione e il mantenimento della gravidanza,

soprattutto attraverso la secrezione di progesterone. Nel caso in cui non si verifichi la fecondazione, esso degenera (Stocco *et al.*, 2007).

2.2 Interazione tra le cellule del cumulo e l'ovocita

Un ambiente intrafollicolare sano favorisce l'acquisizione della competenza allo sviluppo degli ovociti, in gran parte attraverso il contributo coordinato delle cellule del cumulo e del liquido follicolare (Eppig *et al.*, 1994; Dumesic *et al.*, 2015). L'interazione tra l'ovocita e le cellule del follicolo si instaura a partire dalla formazione del follicolo primordiale fino al momento dell'ovulazione. Questa comunicazione intercellulare è essenziale per lo sviluppo del comparto follicolare, per la maturazione dell'ovocita e per l'acquisizione della capacità fecondante (Dumesic *et al.*, 2015; Da Broi *et al.*, 2018).

Nei follicoli antrali, le cellule del cumulo contribuiscono al supporto metabolico e al mantenimento dell'arresto meiotico nell'ovocita in crescita (Kidder *et al.*, 2010; Coticchio *et al.*, 2015); quelle più vicine all'ovocita si dispongono in maniera raggiata formando la corona radiata e sono dotate di prolungamenti citoplasmatici che raggiungono la superficie dell'ovocita, attraversando la zona pellucida, prendendo il nome di *proiezioni transzonal* citoplasmatiche (Figura 2.4) (Familiari, 2016).

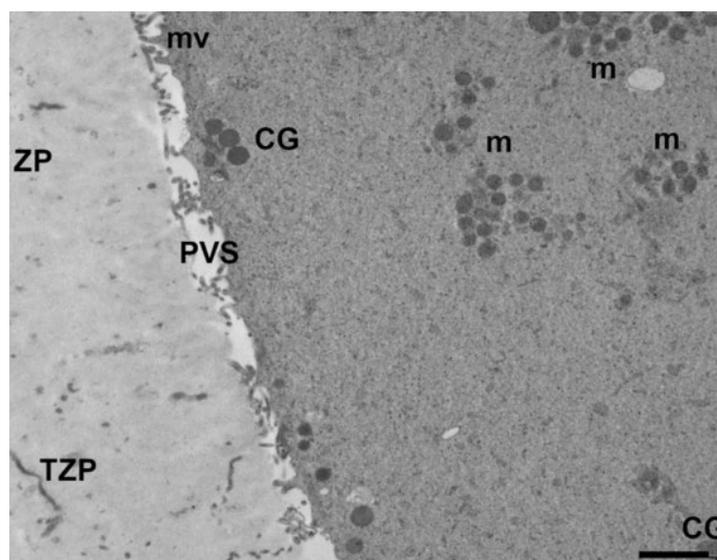


Figura 2.4: Micrografia rappresentativa di ovociti umani allo stadio di vescicola germinale (GV). La zona pellucida (ZP) è attraversata da numerosi residui di proiezioni transzonal (TZP). È visibile lo spazio perivitellino (PVS) in cui sono presenti

numerosi microvilli (*mv*). L'ooplasma è caratterizzato dalla presenza di granuli corticali subolemmali (CG) e di numerosi mitocondri (*m*); TEM, barra: 1 μm (Palmerini *et al.*, 2022).

Le cellule del cumulo svolgono diverse funzioni; favoriscono la capacitazione degli spermatozoi e la reazione acrosomiale, rendono più penetrabile la zona pellucida, favoriscono la sintesi di ormoni, producendo enzimi necessari alle tappe metaboliche, presentano attività fagocitaria, mediano l'interazione tra spermatozoo ed ovocita, aumentando la superficie di contatto. Inoltre, hanno la capacità di sostenere le prime fasi di sviluppo dell'embrione grazie alla produzione di piruvato, a partire da glucosio e lattosio. Per tale ragione sono conosciute anche come *cellule nutrici* (Familiari, 2016).

Il dialogo intercellulare quindi si basa su una comunicazione bidirezionale ed avviene attraverso due meccanismi principali: le giunzioni gap e i segnali paracrini (Da Broi *et al.*, 2018).

Le giunzioni gap sono canali di membrana intercellulare formati da connesine, che consentono il trasferimento di piccole molecole dalle cellule del cumulo all'ovocita, tra cui ioni, nucleotidi ciclici (cAMP, cGMP), metaboliti, aminoacidi e trascritti di RNA, che contribuiscono alla meiosi, alla produzione di ATP e all'equilibrio del pH nell'ovocita (Kidder, 2002; Winterhager e Kidder, 2015).

L'altra modalità di comunicazione prevede la segnalazione paracrina intrafollicolare; essa è attiva durante tutta l'oogenesi e svolge un ruolo critico durante la crescita e la maturazione follicolare, attraverso recettori e vie di segnalazione specifiche (Thomas *et al.*, 2006).

La segnalazione paracrina dalle cellule del cumulo all'ovocita favorisce la ripresa meiotica, consente la maturazione nucleare, citoplasmatica e controlla l'attività trascrizionale (Monniaux, 2016).

A sua volta, l'ovocita modula le attività delle cellule del cumulo producendo dei fattori paracrini in grado di mediarne il metabolismo, la maturazione, la differenziazione e la sopravvivenza (Glichrist *et al.*, 2008; De Broi *et al.*, 2018).

La segnalazione paracrina determinata dall'ovocita verso le cellule del cumulo è stata dimostrata *in vitro* da esperimenti in cui gli ovociti denudati presentavano anomalie nella maturazione nucleare e citoplasmatica, riduzione della sintesi di acido ialuronico, e riduzione dell'espansione delle cellule del cumulo (Buccione *et al.*, 1990).

I fattori paracrini principalmente secreti dall'ovocita sono il GDF9 e il BMP15, appartenenti alla superfamiglia TGF β (Chang *et al.*, 2002), diffondono attraverso la massa del cumulo, e agiscono sulle cellule follicolari regolandone l'espressione genica, favorendo il loro sviluppo ed il loro differenziamento (Dong *et al.*, 1996; Yan *et al.*, 2001).

Il GDF9 contribuisce al meccanismo di rimodellamento follicolare attraverso un aumento della quantità di mRNA che codificano per le componenti strutturali filopodiali che formano le proiezioni transzonali, le quali favoriscono la comunicazione tra cellule del cumulo ed ovocita. Il BMP-15, invece, riveste un ruolo fondamentale nell'ovulazione ed in generale nel metabolismo. Insieme al GDF-9 è coinvolto nella proliferazione cellulare, nella biosintesi di colesterolo e nella glicolisi, fondamentali nelle prima fasi di sviluppo dell'embrione (Figura 2.5) (Su *et al.*, 2009; Robker *et al.*, 2018).

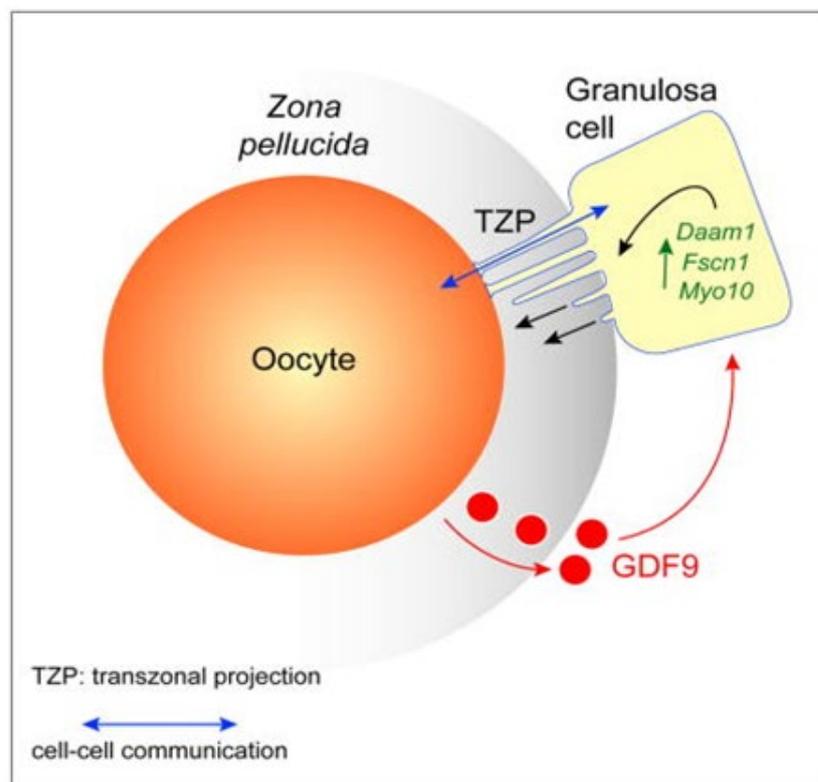


Figura 2.5: Rappresentazione schematica delle proiezioni transzonali (TZP) che originano dalle cellule della granulosa (Sou et al., 2009).

2.3 Il ruolo protettivo delle cellule del cumulo nei confronti dell'ovocita

Le cellule del cumulo svolgono un ruolo essenziale nei processi di crescita e maturazione dell'ovocita. Nel follicolo, l'intensa interazione bidirezionale tra ovocita e cellule del cumulo, attraverso lo scambio di metaboliti durante diversi processi biologici, regola quei meccanismi in grado di rendere l'ovocita competente per la fecondazione (Von Medgden *et al.*, 2020).

Insieme, le cellule del cumulo e l'ovocita formano il CCO, situato all'interno del follicolo antrale, ed entra in contatto con il liquido follicolare, in un compartimento avascolare. Il liquido follicolare è prodotto dalle cellule follicolari nelle ultime fasi di sviluppo del follicolo secondario ed è costituito da un fluido simile al plasma. Esso costituisce una fonte di metaboliti, piccole molecole di segnalazione, proteine, ROS e antiossidanti (Dumesic *et al.*, 2015; Freitas *et al.*, 2017).

Le cellule del cumulo rappresentano i sensori della salute del follicolo e dell'ovocita e sono in grado di modulare il microambiente extra-follicolare in risposta a richieste specifiche; fungono da ponte e da barriera biologica, selezionando l'ingresso ed elaborando i metaboliti. Le cellule del cumulo sostengono le esigenze dell'ovocita, preservandone la loro competenza di sviluppo e la sua maturazione (Eppig, 1996).

Ad esempio, proteggono l'ovocita dai danni dello stress ossidativo e si occupano delle sostanze che l'ovocita non è in grado di metabolizzare, svolgendo quindi un'importante funzione metabolica (Tatemoto *et al.*, 2000). Dati in letteratura confermano la capacità delle cellule del cumulo di proteggere ed isolare il gamete femminile in presenza di condizioni pericolose per la sua maturazione e per la sua acquisizione della competenza. Tatemoto e collaboratori (2000) hanno messo in evidenza il ruolo delle cellule del cumulo nella protezione dell'ovocita da fenomeni di morte cellulare e apoptosi causati dalle ROS. Dalla loro analisi è emerso che gli ovociti privati delle cellule del cumulo mostravano segni di

degenerazione, incremento di apoptosi ed un aumento dell'arresto della meiosi, in seguito all'esposizione ai ROS, rispetto ai complessi cumulo-ovocita. Dati provenienti da uno studio più recente, in cui è stata valutata la capacità dei ROS di superare le funzioni protettive delle cellule del cumulo e di influire sulla qualità dell'ovocita, ha dimostrato che esse possono neutralizzare concentrazioni basse di H_2O_2 e $-OH$, ma ad elevate concentrazioni diminuiscono nel numero e nella vitalità, riducendo la risposta antiossidante e rendendo gli ovociti più suscettibili ai danni (Shaeib *et al.*, 2016).

Come detto precedentemente, il liquido follicolare costituisce un serbatoio in cui si accumulano composti, anche tossici, in grado di influenzare la maturazione degli ovociti. In situazioni avverse di questo tipo, le cellule del cumulo possono non essere più in grado di proteggere l'ovocita dalle alterazioni causate dai composti tossici presenti, poiché essi possono interrompere le funzionalità delle cellule del cumulo e ridurre di conseguenza la qualità dell'ovocita. Numerosi studi hanno dimostrato le correlazioni tra i livelli di contaminanti presenti nel liquido follicolare e la riduzione della fertilità femminile o dei risultati della riproduzione assistita (Pocar *et al.*, 2005; Campen *et al.*, 2017). Ad esempio, l'esposizione al bisfenolo-A (BPA) è stata correlata ad una riduzione del numero di follicoli antrali e dei tassi di fecondazione e impianto (Souter *et al.*, 2013).

Anche condizioni patologiche in siti lontani dalle ovaie (come processi infettivi e infiammatori) possono influenzare il follicolo, danneggiare la qualità degli ovociti e ridurre la fertilità. Alcuni studi hanno suggerito che le tossine, le molecole infiammatorie ed i ROS possono raggiungere la circolazione ed entrare nell'ovocita o essere metabolizzati dalle cellule del cumulo. Durante la fase antrale avanzata, quando il follicolo diventa altamente vascolarizzato e il liquido follicolare rispecchia l'ambiente sistemico, queste molecole possono avere ripercussioni importanti nel follicolo: possono interferire con l'asse ipotalamo-ipofisi-gonade, influenzare le funzioni delle cellule del cumulo e sregolare la steroidogenesi (Smith *et al.*, 1979; Bolumar *et al.*, 1982; Da Broi *et al.*, 2018).

Queste considerazioni dimostrano l'importanza del ruolo protettivo che le cellule del cumulo svolgono verso l'ovocita e come la perturbazione della loro funzionalità possa

influenzare negativamente lo sviluppo e l'acquisizione della capacità fecondante della cellula germinale femminile, ripercuotendosi di conseguenza sulla fertilità.

Capitolo Tre

Scopo dello studio

Al giorno d'oggi, l'utilizzo crescente di composti chimici nei settori agricoli ed industriali rende l'uomo sempre più esposto a queste sostanze tossiche. L'esposizione ad inquinanti come il fungicida mancozeb è legata a vari rischi per la salute umana, tra cui problematiche inerenti alla fertilità. Il mancozeb, membro del gruppo dei ditiocarbammati, è utilizzato nella gestione delle malattie fungine delle piante ed è stato classificato come interferente endocrino. Nonostante la sua bassa tossicità acuta, l'esposizione cronica al mancozeb può ripercuotersi sulla salute riproduttiva. Dati riguardo i suoi effetti sugli organi e sulle funzioni del sistema riproduttore hanno mostrato una diminuzione del peso dell'utero, delle ovaie e dei testicoli, interruzione del ciclo estrale e cambiamenti patologici negli organi riproduttivi, ad alte concentrazioni. I suoi effetti citotossici sono presenti anche a basse concentrazioni. *In vitro*, a dosi comprese tra 0.001 e 1 µg/ml, altera la morfologia del fuso meiotico nei CCO di topo, associata ad una riduzione del tasso di fecondazione. Studi più recenti hanno mostrato che il mancozeb potrebbe ridurre l'espansione delle cellule del cumulo, indicando un'insufficiente maturazione del citoplasma dell'ovocita. Sulle cellule della granulosa di topo, il mancozeb determina una down regolazione di p53, l'aumento della produzione di ROS ed alterazioni dell'attività mitocondriale, risultati ulteriormente confermati dall'analisi ultrastrutturale in cui è stata mostrata una condensazione della cromatina, blebbing della membrana, vacuolizzazione citoplasmatica e degenerazione cellulare, all'aumentare delle concentrazioni di mancozeb somministrate. Questi disturbi, agendo sulle cellule somatiche della parete del follicolo ovarico, potrebbero portare ad un'alterazione, *in vivo*, delle funzioni di sostegno e nutritive che tali cellule esercitano sull'ovocita, influenzando negativamente la maturazione e la competenza alla fecondazione dell'ovocita stesso. Tuttavia, i meccanismi di azione con cui il mancozeb agisce sugli organi riproduttivi femminili restano ancora sconosciuti e gli studi morfologici ultrastrutturali sui tessuti esposti a tale fungicida sono al momento pochi e insufficienti a chiarirne l'effettiva tossicità riproduttiva. Lo scopo del

presente lavoro è stato, quindi, quello di analizzare l'ultrastruttura degli ovociti di topo esposti *in vitro* a concentrazioni crescenti di mancozeb (0.001-1 µg/ml), mediante l'utilizzo di microscopia ottica (MO) e microscopia elettronica a trasmissione (MET), e di eseguire un'analisi morfometrica degli organelli più significativi, per valutare gli effetti potenzialmente dannosi dell'esposizione al mancozeb e le sue eventuali ripercussioni sulla fertilità.

Capitolo Quattro

Materiali e metodi

4.1 Animali

Il modello animale usato nel presente lavoro è stato il topo Swiss CD1. Durante tutto lo studio, gli animali sono stati mantenuti in condizioni di temperatura costante (tra i 21-22°C), con almeno 12 ore di luce al giorno e libero accesso a cibo e acqua.

Dodici femmine prepubere di 21-23 giorni sono state trattate i.p. con 5UI di PMSG (*pregnant mare serum gonadotropin*, gonadotropina corionica equina) (Intervet, Milano, Italia), ad azione follicolo stimolante. Dopo 48 ore, gli animali sono stati sacrificati tramite dislocazione cervicale (Palmerini *et al.*, 2018). Gli animali sono stati mantenuti secondo la Guida per la cura e l'uso degli animali da laboratorio del Ministero della Salute italiano. Il comitato locale ha approvato il protocollo sperimentale sulla cura degli animali e in conformità con gli standard internazionali di cura degli animali e di pratica medica veterinaria (Univaq 2012-2014).

4.2 Protocollo sperimentale ed isolamento dei CCO

Per questo studio, è stata valutata la tossicità riproduttiva del mancozeb, utilizzando concentrazioni comprese in un range che va da 0.001 a 1 µg/ml. Sono state analizzate le seguenti condizioni sperimentali:

- 1) Controlli
- 2) Mancozeb 0.001 µg/ml
- 3) Mancozeb 0.01 µg/ml
- 4) Mancozeb 0.1 µg/ml
- 5) Mancozeb 1 µg/ml

Le ovaie di topo sono state bucate con aghi di siringhe da insulina per recuperare il contenuto dei follicoli antrali, da cui sono stati ottenuti i CCO.

4.3 Maturazione *in vitro* dei CCO

I CCO (10/gruppo) sono stati portati a maturazione *in vitro* a 37 °C e 5% di CO₂ in MEM alfa, integrato con 0.23 mM di piruvato e 2 mM di L-glutammina, con o senza (controllo) basse concentrazioni di fungicida, ovvero da 0.001 a 1 µg/ml.

Queste concentrazioni sono state selezionate sulla base di risultati ottenuti da precedenti studi sugli ovociti e sulle cellule della granulosa di topo trattati con il mancozeb (Rossi *et al.*, 2006b; Palmerini *et al.*, 2018). È stata preparata una soluzione madre di mancozeb (50 µg/ml, 50X) risospendendo il fungicida nel terreno di coltura o nel veicolo (DMSO: dimetilsolfossido) per ottenere le concentrazioni desiderate, diluendo con il terreno di coltura. Il volume finale dei veicoli aggiunti ai campioni non ha mai superato lo 0.1% (v/v) e non sono stati osservati effetti negativi sulla maturazione (Rossi *et al.*, 2006a).

Dopo 16 ore, gli ovociti di controllo e quelli esposti al mancozeb, alle diverse concentrazioni, sono stati privati delle cellule del cumulo ed arrestati in MII, come evidenziato dall'estrusione del primo globulo polare. Gli esperimenti sono stati ripetuti in triplicato.

4.4 Preparativa per la Microscopia Ottica e per la Microscopia Elettronica a Trasmissione

Dopo il prelievo, gli ovociti sono stati immediatamente fissati in glutaraldeide al 2.5% (Agar Scientific, Cambridge Road Stansted Essex, Regno Unito) in PBS (soluzione salina tamponata con fosfato, pH=7-7.4) e sono stati mantenuti a 4 °C fino alla successiva preparazione per le osservazioni al MET (Nottola *et al.*, 2007; Khalili *et al.*, 2012; Coticchio *et al.*, 2012; Palmerini *et al.*, 2017; Palmerini *et al.*, 2018). Dopo diversi lavaggi in PBS, gli ovociti di topo sono stati post-fissati con tetrossido di osmio all'1% (Electron Microscopy Sciences) in PBS per 1 ora e mezza, tenuti in un compartimento buio a 4 °C. Successivamente, sono stati quindi incorporati in piccoli blocchi di agar all'1% delle dimensioni di circa 5 × 5 × 1 mm, disidratati in etanolo a concentrazioni crescenti, immersi in ossido di propilene per la sostituzione del solvente e lasciati per una notte in una

soluzione di ossido di propilene/resina 1:1. Infine, sono stati inclusi in resina epossidica EMbed-812 (Electron Microscopy Sciences, 1560 Industry Road, Hatfield, PA, USA) e sezionati con un ultramicrotomo Ultracut E (Leica EMUC6, Wetzlar, Germania). Le sezioni semifini (dallo spessore di 1 μm) sono state tagliate con lame di vetro, colorate con blu di metilene (Sigma-Aldrich), esaminate con MO (Zeiss Axioskop) e fotografate con una fotocamera digitale (Leica DFC230).

Le sezioni ultrasottili (dallo spessore di 70-90 nm) sono state ottenute con una lama di diamante, raccolte su retini di rame e contrastate con Uranylless (alternativa all'acetato di uranile) (TAAB Laboratories Equipment Ltd., Aldermaston, Regno Unito) e Citrato di piombo (Electron Microscopy Science) prima di essere esaminate e fotografate con i microscopi elettronici Zeiss EM10 e Philips TEM CM100, operanti a 80 kV.

I parametri valutati mediante MO e MET e presi in considerazione per l'analisi morfologica qualitativa delle caratteristiche ultrastrutturali degli ovociti sono stati i seguenti: caratteristiche generali (comprese forma e dimensioni); organizzazione citoplasmatica e organuli cellulari (stato di conservazione, tipo, distribuzione); oolemma (integrità della membrana, presenza, aspetto e distribuzione dei microvilli); spazio perivitellino (larghezza, presenza di frammenti citoplasmatici) e zona pellucida.

4.5 Analisi morfometrica

Dopo l'osservazione delle fotografie al MET a basso ingrandimento degli ovociti di controllo e di quelli trattati con il mancozeb, per misurare la densità numerica di mitocondri, del reticolo endoplasmatico liscio (REL), delle vescicole autofagiche, dei corpi multivescicolari e dei corpi densi lamellari, dei granuli corticali e dei microvilli, è stato utilizzato il software ImageJ 1.54 v (Palmerini *et al.*, 2017; Leoni *et al.*, 2018). In particolare, la densità numerica dei mitocondri, degli elementi del REL vescicolari e tubulari, delle vescicole autofagiche, dei corpi multivescicolari e dei corpi lamellari densi è stata determinata su almeno cinque sezioni equatoriali (distanza tra le sezioni: 3 μm) di due ovociti per gruppo. I valori sono stati espressi come densità numerica per 50 μm^2 dell'area

dell'ovocita. La valutazione della densità dei granuli corticali e dei microvilli è stata eseguita analizzando micrografie MET a 2500× dei profili dell'intera superficie su cinque sezioni equatoriali (Bianchi *et al.*, 2014) di due ovociti per gruppo. I valori sono stati espressi come densità di granuli corticali e di microvilli (numero di granuli corticali e microvilli per 10 µm del profilo di superficie lineare dell'ovocita).

4.6 Analisi Statistica

Tutti i dati sono espressi come medie ± deviazione standard (DS). I confronti statistici sono stati eseguiti utilizzando l'ANOVA ad una via con il test HSD ("differenza onestamente significativa") di Tukey per l'analisi post-hoc (GraphPad InStat. GraphPad Software, La Jolla, San Diego, CA, USA). Le differenze nei valori sono state considerate significative se $p < 0,05$.

Capitolo Cinque

Risultati

5.1 Controlli

Al microscopio ottico, le sezioni semifini degli ovociti di controllo hanno mostrato una forma rotonda, regolare con un diametro equatoriale di circa 80 μm . L'ooplasma appariva denso e omogeneo, circondato da una zona pellucida intatta (Figura 5.1 A, riquadro).

L'analisi al MET ha rivelato la presenza di numerosi organuli cellulari distribuiti uniformemente nell'ooplasma, indice di un alto rapporto tra citoplasma/organelli (Figura 5.1 A). I mitocondri erano numerosi, dalla forma sia rotonda che ovoidale, ed erano per lo più organizzati a gruppi nell'ooplasma. Le creste mitocondriali erano ben distinguibili, con una matrice mitocondriale densa; sia la membrana mitocondriale interna che quella esterna apparivano elettrone-dense (Figura 5.1 B-D). In tutto l'ooplasma era diffusa una tipica struttura fibrillare degli ovociti di topo, definita "lattice citoplasmatico". Le goccioline lipidiche ed il REL erano presenti (Figura 5.1 B). Erano presenti numerosi corpi lamellari densi, mentre aggregati multivescicolari di piccole vescicole e grandi vacuoli erano per lo più localizzati nella regione corticale dell'ooplasma (Figura 5.1 C). Occasionalmente, alcune vescicole di autofagosomi immature si presentavano sparse nel citoplasma. I granuli corticali erano numerosi, rotondi, uniformemente elettrone-densi, e disposti linearmente al di sotto dell'oolemma (Figura 5.1 B). Lo spazio perivitellino risultava stretto ed occupato da numerosi microvilli, lunghi e sottili, che originavano dall'oolemma. La zona pellucida appariva continua e caratterizzata da un aspetto poco denso (Figura 5.1 B-C). Nella Tabella 5.1 è mostrata una sintesi dei risultati principali.

5.2 Mancozeb 0.001 $\mu\text{g/ml}$

Gli ovociti esposti *in vitro* alla più bassa concentrazione di mancozeb presentavano caratteristiche morfologiche simili al gruppo di controllo. Al microscopio ottico, la zona pellucida era intatta, lo spazio perivitellino sottile ma ben evidente e l'ooplasma mostrava un'elevata densità di organelli (Figura 5.2 A, riquadro).

Le microfotografie MET a basso ingrandimento hanno confermato un'ultrastruttura citoplasmatica simile ai controlli, con gli organelli numerosi e distribuiti omogeneamente nell'ooplasma (Figura 5.2 A); il lattice citoplasmatico risultava ben distinguibile ed uniformemente distribuito nell'ooplasma. I mitocondri erano gli organelli più evidenti. Ad alto ingrandimento, i mitocondri si presentavano raggruppati in clusters, e conservavano le loro caratteristiche ultrastrutturali simili ai controlli, ossia una forma da rotonda a ovoidale, con le membrane mitocondriali interna ed esterna elettrone-dense (Figura 5.2 B-D). Raramente, nell'ooplasma erano presenti mitocondri vacuolati. Era possibile riscontrare numerosi corpi multivescicolari ed il REL, isolati o disposti in gruppi; spesso nell'ooplasma sono stati rilevati anche corpi densi lamellari legati alla membrana, contenenti un denso materiale non digeribile (Figura 5.2 B-C). Occasionalmente, sono state trovate vescicole autofagiche immature con un lume marcato e delimitato da una doppia membrana (Figura 5.2 D). I granuli corticali dalla forma tondeggiante, con contenuto scuro e denso di elettroni, erano numerosi e localizzati appena sotto l'oolemma (Figura 5.2 C). I microvilli, spessi e corti, erano regolarmente distribuiti lungo l'oolemma mentre lo spazio perivitellino appariva stretto (Figura 5.2 A-C). La Tabella 5.1 mostra una sintesi dei risultati principali.

5.3 Mancozeb 0.01 µg/ml

Al microscopio ottico, gli ovociti trattati con una concentrazione di 0.01 µg/ml di mancozeb apparivano con forma rotonda e una zona pellucida intatta. Lo spazio perivitellino risultava meno spesso rispetto ai controlli e al mancozeb 0.001 µg/ml (Figura 5.3 A, riquadro).

Diversamente dai gruppi precedenti, la valutazione al MET ha evidenziato una distribuzione meno omogenea degli organelli che, seppur presenti, risultavano essere meno abbondanti nell'ooplasma (Figura 5.3 A-B). Era possibile notare la presenza di gruppi di mitocondri, con forma rotondeggiante, in cui si distinguevano le membrane mitocondriali interna ed esterna, dense di elettroni. Talvolta nell'ooplasma, apparivano

alcuni mitocondri vacuolati, in cui la membrana esterna e le creste mitocondriali non erano ben distinguibili (Figura 5.3 B-D-E). Erano visibili le vescicole del REL (Figura 5.3 B), insieme ad aggregati multivescicolari e corpi multivescicolari. Le strutture fibrillari, tipiche del lattice citoplasmatico, apparivano ben riconoscibili (Figura 5.3 B-C). Nell'ooplasma erano presenti anche numerosi corpi densi lamellari e le vescicole mature associate all'autofagia (Figura 5.3 C, riquadro). Nella porzione corticale degli ovociti, i granuli corticali risultavano meno abbondanti, rispetto ai gruppi precedenti (Figura 5.3 D). I microvilli si presentavano leggermente più corti in lunghezza, meno numerosi e distribuiti in modo più irregolare lungo l'oolemma; inoltre, nello spazio perivitellino sono stati riscontrati materiali extracellulari e detriti cellulari (Figura 5.3 C). La zona pellucida, invece, presentava un'elevata densità (Figura 5.3 C). Nella Tabella 5.1 sono riportati i principali risultati.

5.4 Mancozeb 0.1 µg/ml

Gli ovociti esposti alla concentrazione di mancozeb pari a 0.1 µg/ml apparivano, tramite l'analisi con il MO, con una forma da rotonda a ovale, lo spazio perivitellino molto stretto e la zona pellucida era intatta (Figura 5.4 A, riquadro).

L'analisi ultrastrutturale ha invece evidenziato una drastica riduzione della densità degli organelli (Figura 5.4 A). Rispetto al gruppo precedente (0.01 µg/ml), i mitocondri risultavano meno numerosi, e le loro creste mitocondriali meno evidenti (Figura 5.4 A-B-C), alcuni di essi apparivano vacuolati (Figura 5.4 D), anche se la quantità di mitocondri vacuolizzati è rimasta quasi invariata in confronto al gruppo precedente. Occasionalmente, gli elementi tubulari del REL erano riconoscibili (Figura 5.4 B). Gli aggregati multivescicolari erano distribuiti nella porzione corticale del citoplasma degli ovociti, accompagnati dai corpi lamellari densi (Figura 5.4 B). Inoltre, le osservazioni al MET hanno rilevato la presenza di strutture compatibili con vescicole autofagiche mature, racchiuse da una singola membrana e contenenti materiale membranoso di origine non riconoscibile (Figura 5.4 C, riquadro). La densità numerica dei granuli corticali risultava

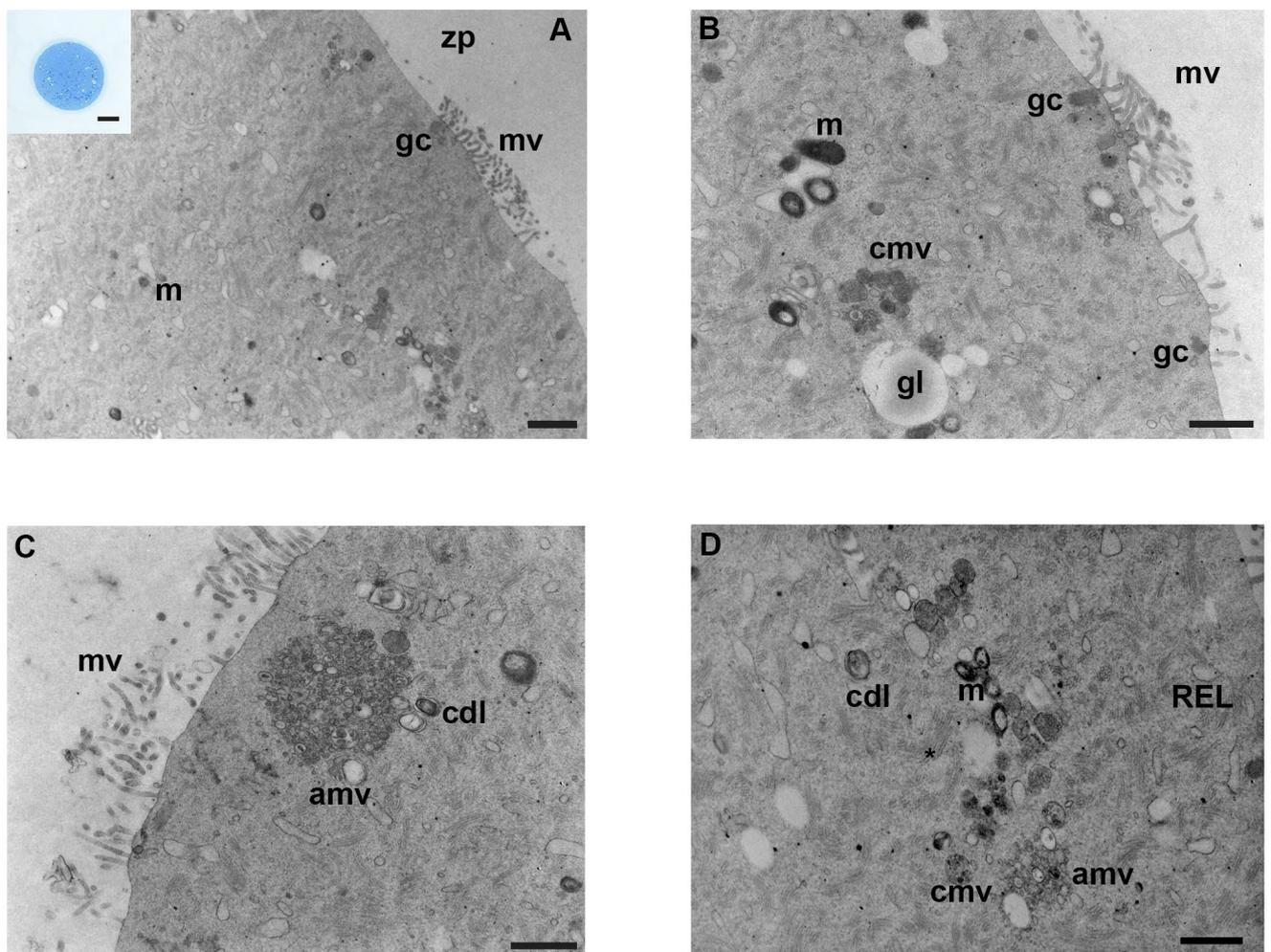
ridotta, mentre i microvilli apparivano più piccoli e più corti nell'oolemma (Figura 5.4 B). Nello spazio perivitellino erano presenti materiale extracellulare e detriti (Figura 5.4 C), mentre la zona pellucida appariva sottile e densa. La Tabella 5.1 mostra una sintesi dei principali risultati.

5.5 Mancozeb 1 µg/ml

Alle concentrazioni più elevate di mancozeb, gli ovociti presentavano segni di danno ultrastrutturale. Tramite il MO, gli ovociti apparivano con forma rotonda, talvolta l'ooplasma mostrava organelli condensati in un polo (Figura 5.5 A, riquadro).

La valutazione al MET ha rivelato un basso rapporto citoplasma/organelli e una distribuzione disomogenea degli organelli, che apparivano ridotti in alcune aree dell'ooplasma, rispetto ai gruppi precedenti (Figura 5.5 A). I mitocondri erano meno numerosi, dalla forma rotondeggiante e ovoidale, talvolta vacuolati. Le membrane mitocondriali esterne apparivano molto dense di elettroni (Figura 5.5 B). Occasionalmente, vi erano gruppi di mitocondri non vacuolati, isolati (Figura 5.5 B, riquadro). Il lattice citoplasmatico era identificabile nell'ooplasma tramite le tipiche strutture fibrillari; erano visibili i corpi multivescicolari ed i corpi densi lamellari (Figura 5.5C-D). In alcune porzioni al di sotto dell'oolemma era possibile notare aree in cui gli organuli cellulari erano assenti, in particolare i granuli corticali risultavano rari (Figura 5.5 A-B). I microvilli apparivano per lo più corti, piccoli, appiattiti e poco numerosi, anche se in alcune zone dell'oolemma erano più lunghi. Talvolta, nello spazio perivitellino, sono stati trovati materiali extracellulari, come vescicole extracellulari e frammenti cellulari (Figura 5.5 B-D). La zona pellucida appariva sottile e densa (Figura 5.5 C-D). Nella Tabella 5.1 sono stati riportati i principali risultati.

5.6 Pannelli di figure



Controlli

Figura 5.1. Ultrastruttura di ovociti di topo del gruppo di controllo. Micrografia rappresentativa al MET che mostra in (A) la morfologia generale della regione corticale degli ovociti di topo in MII, la microtopografia degli organelli intracellulari ed i microvilli. Sono visibili mitocondri rotondi/ovoidali (m), corpi multivesicolari (cmv) e granuli corticali (gc); zp: zona pellucida; mv: microvilli (MET, barra: 1 μ m). Nel riquadro in A: immagine rappresentativa di una sezione semifine di ovocita di topo (MO, Mag: 40x). (B)

Ad alto ingrandimento, nella parte corticale degli ovociti di topo sono evidenziati ammassi di mitocondri (m), goccioline lipidiche (gl), corpi multivescicolari (cmv), granuli corticali (gc) ed i microvilli distribuiti regolarmente (mv) lungo l'olemma (MET, barra: 800 nm). (C) Gli aggregati multivescicolari (mva) sono visibili nella parte corticale, con corpi densi lamellari (cdl), ad alto ingrandimento. Si notano i lunghi e sottili microvilli (mv) (MET, barra: 800 nm). (D) Porzione di ooplasma che mostra gli organelli cellulari: mitocondri (m) con le creste elettron-dense, accompagnati da corpi multivescicolari (cmv), aggregati multivescicolari (amv). Si osservano corpi densi lamellari(cdl), REL e l'estesa struttura fibrillare del lattice citoplasmatico (*) (MET, barra: 600 nm).

Mancozeb 0.001 µg/ml

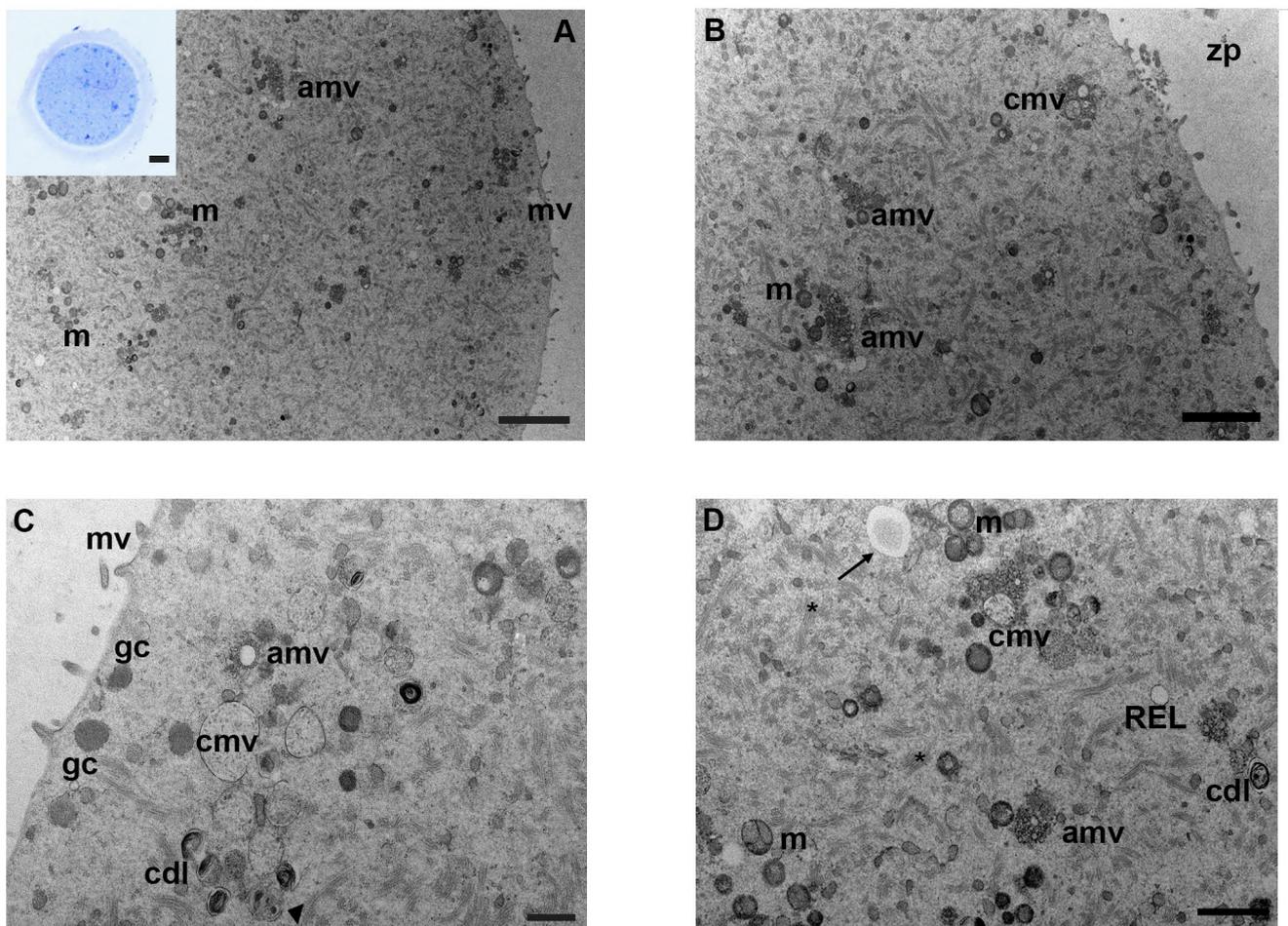


Figura 5.2. Ultrastruttura degli ovociti di topo del gruppo mancozeb 0.001 µg/ml. (A) Le micrografie al MET a basso ingrandimento di ovociti di topo in MII mostrano un'elevata conservazione degli organelli cellulari, omogeneamente distribuiti nel citoplasma. Sono visibili mitocondri raggruppati (m) e numerosi aggregati multivescicolari (amv); mv: microvilli; zp: zona pellucida (MET, barra: 2 µm). Nel riquadro in A: sezione semifina rappresentativa di un ovocita di topo (MO, Mag: 40x). (B) Immagine MET rappresentativa della regione corticale degli ovociti di topo. Sono visibili ammassi di mitocondri (m), con le creste dense di elettroni, accompagnati da aggregati multivescicolari (amv) e corpi multivescicolari (cmv). zp: zona pellucida (MET, barra: 500 nm). (C) Ad alto ingrandimento, una piccola porzione della regione corticale dell'ovocita evidenzia i corpi multivescicolari (cmv), insieme con i corpi

densi lamellari (cdl) e gli aggregati multivescicolari (amv). I granuli corticali (gc) sono disposti linearmente sotto l'olemma. Si noti che i corpi multivescicolari (cmv) ed i corpi densi lamellari (cdl) sono in stretta associazione con una vescicola di tipo autofagico (punta della freccia). Si osservano microvilli corti e spessi (mv) (MET, barra: 500 nm). (D) Micrografie dell'ultrastruttura citoplasmatica dell'ovocita di topo. L'immagine mostra diverse strutture citoplasmatiche come mitocondri (m), con forma rotonda o ovale e doppia membrana visibile, corpi multivescicolari (cmv) e aggregati multivescicolari (amv), corpi densi lamellari (cdl) e la matrice fibrillare del lattice citoplasmatico (*). È visibile una vescicola immatura di tipo autofagico delimitata da una doppia membrana e da un lume più ampio (freccia). È visibile anche il REL, con piccole vescicole (MET, barra: 1 µm).

Mancozeb 0.01 µg/ml

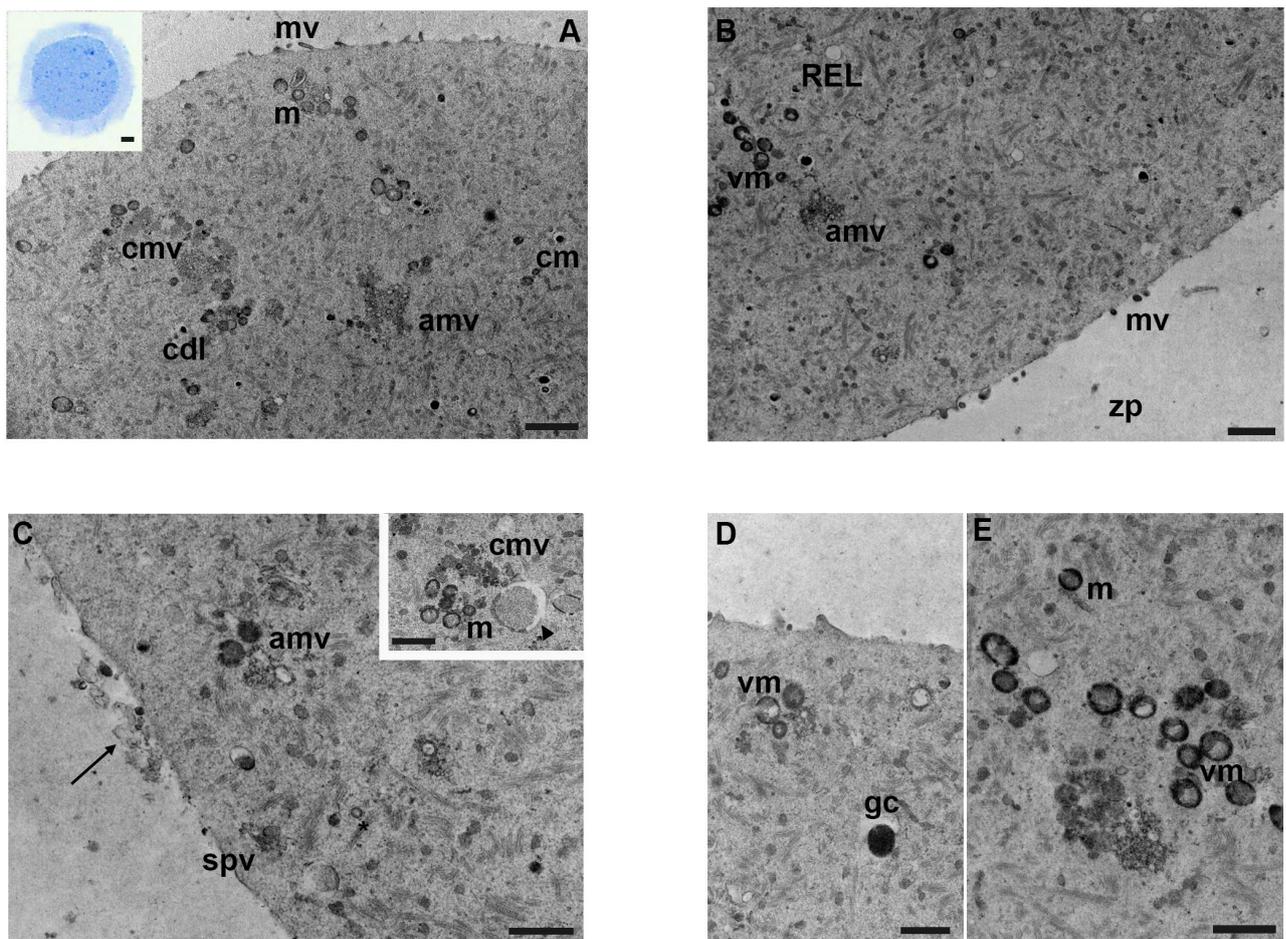


Figura 5.3. Ultrastruttura di ovociti di topo del gruppo mancozeb 0.01 µg/ml. Micrografia al MET rappresentativa di un ovocita di topo che mostra in (A) una distribuzione disomogenea degli organelli intracellulari. Si notano numerosi corpi densi lamellari (cdl), corpi multivescicolari (cmv), aggregati multivescicolari (amv) e mitocondri (m); mv: microvilli (MET, barra: 1 µm). In (A): sezione semifina rappresentativa di un ovocita di topo (MO, Mag: 40×). (B) Una porzione di organuli liberi nella regione corticale. Si osservano ammassi di mitocondri vacuolati (vm), aggregati multivescicolari (amv) e REL. I granuli corticali sono meno visibili. Sono presenti meno microvilli (mv), corti e più spessi. zp: zona pellucida (MET, barra: 1 µm). (C) Alto ingrandimento della regione corticale in ovociti in MII, che mostra pochi organuli. Si notano, nello spazio perivitellino (spv), materiale extracellulare e detriti (freccia); amv: aggregati multivescicolari; (*): lattice citoplasmatico (MET, barra: 800 nm). Riquadro in (C): ammassi di mitocondri

(m), corpi multivescicolari (cmv) e vescicole autofagiche immature (punta della freccia) delimitati da una doppia membrana, con materiale riconoscibile derivato da organelli citoplasmatici (MET, barra: 800 nm). (D) Granulo corticale isolato (gc) visibile sotto l'oolemma; mitocondri vacuolati (vm) (MET, barra: 800 nm). (E) Gruppi di mitocondri vacuolati (vm) e mitocondri (m) ad alto ingrandimento (MET, barra: 800 nm).

Mancozeb 0.1 µg/ml

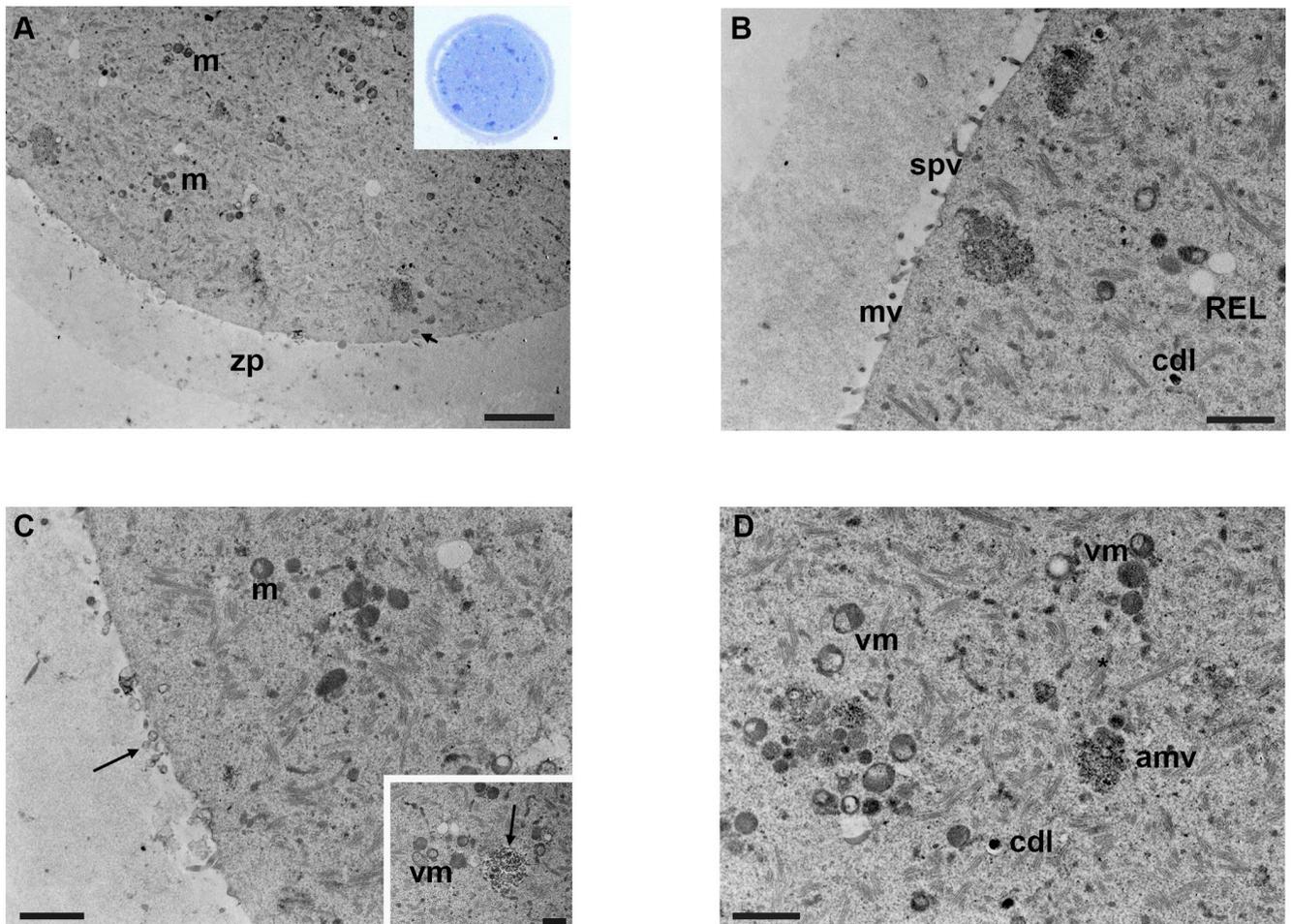


Figura 5.4. Ultrastruttura degli ovociti di topo nel gruppo mancozeb 0.1 µg/ml. (A) Micrografia al MET che mostra la morfologia generale dell'ovocita in MII. Nel citoplasma sono visibili pochi organelli; m: mitocondri; zp: zona pellucida. Sono visibili rari granuli corticali (freccia) (MET, barra: 2 µm). In (A): semifina di ovocita di topo (MO, Mag: 40×). (B) Porzione della regione corticale che mostra microvilli (mv) corti e non omogenei sporgenti nello spazio perivitellino (spv), REL e corpi lamellari densi (cdl) (MET, barra: 1 µm). (C) Porzioni della cortex di ovociti di topo con pochi organelli, sporadici ammassi di mitocondri (m). Si noti la presenza di materiali extracellulari e detriti (freccia) nello spazio perivitellino. (MET, barra: 1 µm). Riquadro in (C): Vescicole mature di tipo autofagico (freccia) racchiuse in una singola membrana, contenenti materiale di origine non riconoscibile e mitocondri vacuolati (vm) (MET, barra 600 nm). (D) Immagine MET dell'ooplasma che mostra mitocondri vacuolati (vm), corpi densi lamellari (cdl), aggregati multivescicolari (amv) e abbondante lattice citoplasmatico (*) (MET, barra: 1 µm).

Mancozeb 1 µg/ml

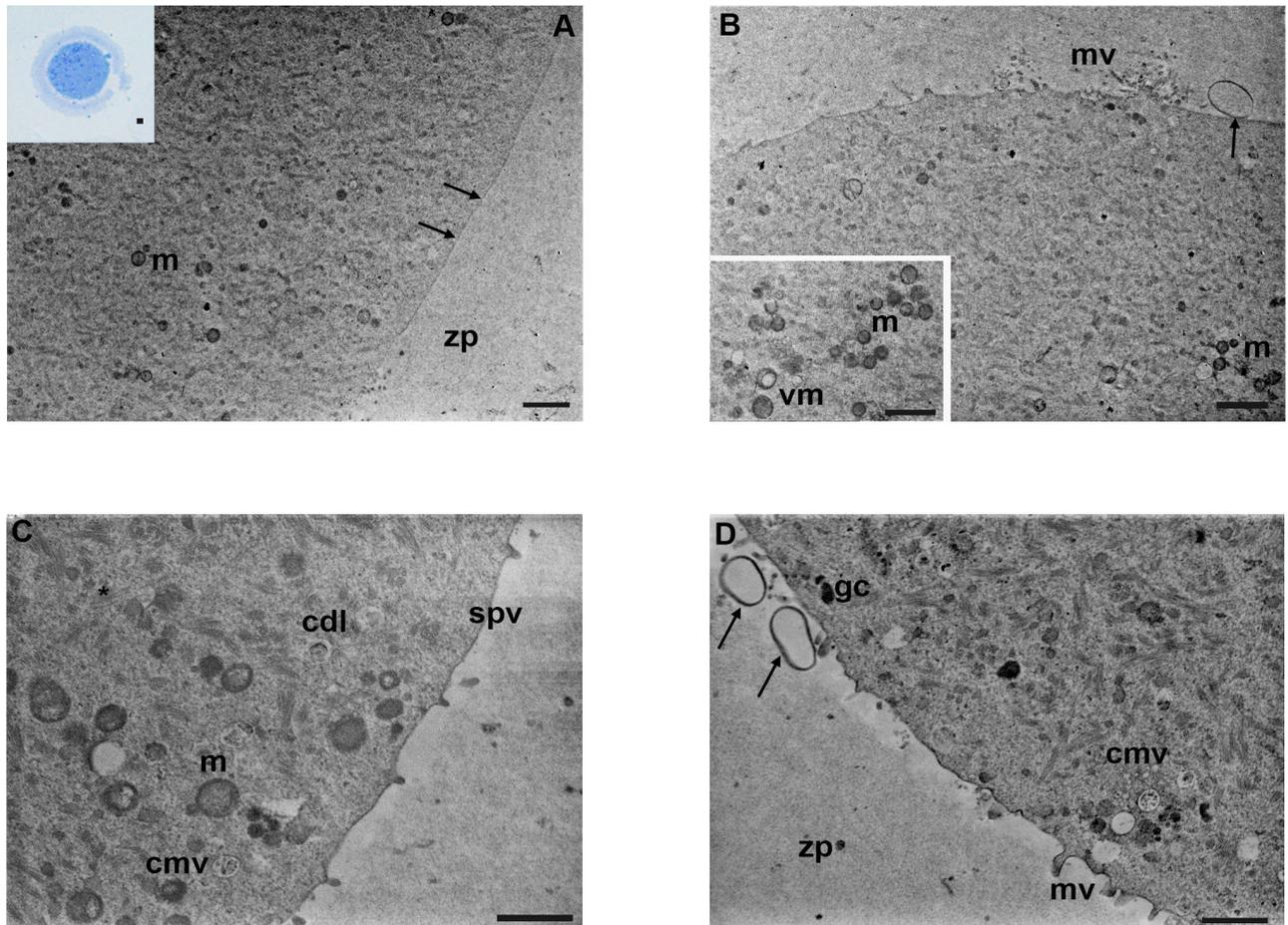


Figura 5.5. Ultrastruttura di ovociti di topo nel gruppo mancozeb 1 µg/ml. (A) Micrografia al MET rappresentativa della regione corticale che mostra una bassa densità di organuli cellulari. Sono visibili pochi mitocondri (m); i granuli corticali sono assenti. Si noti la mancanza di microvilli (freccia) sull'oolemma; zp: zona pellucida (MET, barra: 2 µm). Riquadro in (A): sezione semifina di ovociti di topo, con gli organuli condensati in un polo (MO, Mag: 40×). (B) Una porzione della regione corticale con una distribuzione non omogenea di organuli sotto l'oolemma e microvilli corti e spessi (mv). Nello spazio perivitellino sono visibili vescicole esocitotiche (freccia); mitocondri (m) (MET, barra: 1 µm). Riquadro in (B): gruppi di mitocondri (m) e mitocondri vacuolati (vm) (MET, barra: 1 µm). (C) Alto ingrandimento della regione corticale con più organelli presenti; mitocondri (m) con creste più evidenti, corpi lamellari densi (cdl) e corpi multivesicolari (cmv); spv: spazio perivitellino; (*): lattice citoplasmatico; (MET, barra: 1 µm). (D) Micrografie MET rappresentative della regione corticale dell'ovocita di topo. Sono visibili i corpi multivesicolari (cmv). Sono presenti pochi granuli corticali (gc). I microvilli (mv) sono corti e distribuiti irregolarmente sull'oolemma. Nello spazio perivitellino sono presenti materiale extracellulare, esosomi e detriti (freccia); zp: zona pellucida; (MET, barra: 1 µm).

<i>Mancozeb</i>					
	<i>Controlli</i>	<i>0.001 µg/ml</i>	<i>0.01 µg/ml</i>	<i>0.1 µg/ml</i>	<i>1 µg/ml</i>
<i>Lattice citoplasmatico</i>	Distribuito uniformemente				
<i>Mitocondri</i>	Rotondi, ovoidali, matrice densa	Rotondi, ovoidali	Incremento delle forme vacuolate	Incremento delle forme vacuolate	Prevalenza delle forme vacuolate
<i>Granuli corticali</i>	Rotondi, scuri ed elettron-densi				
<i>Microvilli</i>	Lunghi e sottili	Più spessi	Corti e spessi	Corti e spessi	Piatti
<i>Zona pellucida</i>	Densa	Densa	Densa	Sottile e densa	Sottile e densa

Tabella 5.1: Sintesi dei dati qualitativi ottenuti mediante analisi al MET riguardo le principali caratteristiche ultrastrutturali in ovociti non esposti (controlli) ed esposti a concentrazioni crescenti di mancozeb (0.001-1 µg/ml).

5.7 Analisi morfometrica

L'analisi morfometrica ha evidenziato una tendenza alla diminuzione della densità numerica dei mitocondri, dal controllo alle concentrazioni crescenti di mancozeb (C: 28 ± 7.131 ; 0.001 µg/ml: 24.13 ± 5.436 ; 0.01 µg/ml: 23.38 ± 8.684 ; 0.1 µg/ml: 21.13 ± 4.794 ; 1 µg/ml: 18.25 ± 5.175). Tuttavia, una diminuzione significativa è stata rilevata principalmente tra il gruppo esposto alla concentrazione di mancozeb pari a 1 µg/ml ed i controlli (18.25 ± 5.17 vs 28 ± 7.131 ; $p < 0.05$) (Tabella 5.2). La densità dei corpi multivescicolari, dei corpi densi lamellari e degli elementi vescicolari/tubulari REL non ha mostrato differenze significative tra i vari gruppi ($p > 0.05$) (Tabella 5.2), ad eccezione delle vescicole autofagiche che hanno

mostrato una tendenza all'aumento in relazione all'incremento delle concentrazioni di mancozeb, seppur non significativa.

La valutazione morfometrica dei granuli corticali ha rilevato che il gruppo di controllo e il gruppo esposto alla dose di mancozeb dello 0.001 µg/ml presentavano un numero significativamente inferiore per 10 µm rispetto al gruppo mancozeb 1 µg/ml (3 ± 0.7 e 3.2 ± 0.8 vs 0.8 ± 0.8 , rispettivamente; $p < 0.05$), con una tendenza generale alla diminuzione, come si è visto per i mitocondri (Tabella 5.2). Il numero di microvilli per 10 µm risultava diminuito a concentrazioni crescenti del pesticida, rispetto ai controlli (15.6 ± 2.408), con una differenza altamente significativa nel gruppo esposto alla concentrazione di 1 µg/ml (6 ± 2.449 ; $p < 0.001$) (Tabella 5.2).

	<i>Mancozeb</i>				
	<i>Controlli</i>	<i>0.001 µg/ml</i>	<i>0.01 µg/ml</i>	<i>0.1 µg/ml</i>	<i>1 µg/ml</i>
<i>Mitocondri (50 µm²)</i>	28 ± 7.131^a	$24.13 \pm 5.436^{a,b}$	$23.38 \pm 8.684^{a,b}$	$21.13 \pm 4.794^{a,b}$	18.5 ± 5.175^b
<i>Corpi multivescicolari e corpi densi lamellari (50 µm²)</i>	7 ± 1.581	8.6 ± 1.517	7.4 ± 1.517	7.2 ± 0.836	7.4 ± 1.14
<i>Vescicole autofagiche (50 µm²)</i>	0.6 ± 0.547	0.8 ± 0.836	1.4 ± 0.547	1.6 ± 0.547	1.8 ± 0.836
<i>REL (50 µm²)</i>	3 ± 1	2.8 ± 1.789	2.4 ± 1.14	1.8 ± 0.836	0.8 ± 0.836
<i>Granuli corticali/10 µm</i>	3 ± 0.707^a	$3.2 \pm 0.837^{a,b}$	$1.6 \pm 0.894^{a,c}$	$1.6 \pm 1.14^{a,c}$	0.8 ± 0.837^c
<i>Microvilli/10 µm</i>	15.6 ± 2.408^a	$14.4 \pm 2.702^{a,b}$	11 ± 2.345^b	$11.4 \pm 1.517^{a,b}$	6 ± 2.449^c

Tabella 5.2: Valutazione morfometrica (espressa come media ± deviazione standard) degli organelli nei gruppi di controllo ed esposti al mancozeb (0.001-1 µg/ml). La morfometria è stata eseguita utilizzando l'ANOVA a una via con analisi post-hoc HSD di Tukey. I diversi apici indicano una differenza significativa ($p < 0.05$).

Capitolo Sei

Discussione e conclusione

I risultati presentati in questo studio hanno descritto gli effetti di dosi crescenti di mancozeb sull'ultrastruttura degli ovociti di topo, mettendo in evidenza una buona preservazione morfologica generale degli ovociti esposti alle concentrazioni che vanno da 0.001 a 0.1 $\mu\text{g/ml}$, diversamente da quanto osservato negli ovociti esposti alla più alta concentrazione di fungicida testato (1 $\mu\text{g/ml}$), in cui sono stati individuati cambiamenti morfologici che hanno interessato principalmente la forma degli organelli, la loro densità numerica e la membrana plasmatica.

Il mancozeb è un fungicida ampiamente utilizzato in agricoltura fin dagli anni '50 (Colosio *et al.*, 2002). Sebbene sia stato bandito dall'EFSA nel dicembre 2020, giungono ancora oggi in Italia ed in Europa prodotti trattati con il mancozeb a causa dell'importazione di merci da parte di Paesi, in cui il suo utilizzo è ancora permesso. È un composto chimico di sintesi caratterizzato da una bassa tossicità acuta, e da una lunga persistenza sulle foglie. La sua tossicità è strettamente correlata a fenomeni metabolici con formazione di etilentiourea e bioaccumulo nei tessuti e nei fluidi biologici, anche a concentrazioni molto basse.

Il mancozeb è classificato anche come interferente endocrino; determina una riduzione dei livelli di tiroxina (T4) nelle femmine di ratto, effetti negativi sul tubo neurale (Nordby *et al.*, 2005; Axelstad *et al.*, 2011) ed effetti genotossici nell'uomo (Runkle *et al.*, 2017). Alterazioni patologiche nelle ovaie di topo e del ciclo estrale hanno indicato anche la tossicità riproduttiva del mancozeb *in vivo* (Baligar e Kaliwal, 2004). È inoltre responsabile della diminuzione del numero di follicoli sani e di un aumento del numero di follicoli atrofici (Rossi *et al.*, 2006b; Baligar e Kaliwal, 2001). Questi dati sono stati ulteriormente confermati *in vitro*, in cui dosi crescenti di mancozeb (0.001-1 $\mu\text{g/ml}$) hanno determinato una riduzione del tasso di fecondazione e un'alterazione della morfologia del fuso meiotico degli ovociti (Rossi *et al.*, 2006a).

Alle concentrazioni più basse di mancozeb analizzate (0.001-0.01 $\mu\text{g/ml}$), i risultati morfologici emersi da questo lavoro hanno indicato una buona conservazione generale

dell'ultrastruttura dell'ovocita; non sono state rilevate alterazioni specifiche sui mitocondri, sui granuli corticali e sui microvilli. Nell'ooplasma di tutti i gruppi esaminati, la presenza del "lattice citoplasmatico", formato da una matrice proteica fibrillare, era abbondante (Esposito *et al.*, 2007; Yurttas *et al.*, 2008). Queste strutture fibrillari svolgerebbero un ruolo regolatore nella maturazione dell'oocita, agendo come sito di stoccaggio dei ribosomi e dell'RNA ribosomiale materno durante le prime fasi dello sviluppo embrionale (Longo *et al.*, 2018; Bebbere *et al.*, 2021). Recentemente, il lattice citoplasmatico è stato associato al complesso materno subcorticale (SCMC), un complesso multiproteico situato nella sotto corteccia cellulare ed ereditato dalla madre. L'interazione tra lattice citoplasmatico e SCMC sembra essere fondamentale per la transizione ovocita-embrione, in particolare per la formazione e il posizionamento del fuso meiotico, per la regolazione della traduzione, la redistribuzione degli organelli e la riprogrammazione epigenetica (Bebbere *et al.*, 2021).

Segni più evidenti di alterazioni ultrastrutturali sono emersi invece negli ovociti trattati con dosi più elevate di mancozeb. I nostri dati morfologici hanno mostrato il riarrangiamento e la riduzione degli organelli cellulari nell'ooplasma, in relazione alla dose di esposizione, negli ovociti trattati con le concentrazioni allo 0.1 ed 1 µg/ml di mancozeb.

Questo pattern di distribuzione non omogeneo degli organuli potrebbe essere indice di immaturità dell'ovocita o essere associato alla perdita della sua vitalità, almeno nel topo, come dimostrato da studi precedenti (Motta *et al.*, 2003; Pepling *et al.*, 2007; Nottola *et al.*, 2008). L'analisi MET in particolare ha rivelato una riduzione della densità numerica dei mitocondri negli ovociti di topo trattati con mancozeb 1 µg/ml rispetto ai controlli. Inoltre, in questo gruppo sperimentale, i mitocondri apparivano per lo più vacuolati. I mitocondri vacuolati rappresentano un aspetto peculiare degli ovociti di topo. Questi organelli cellulari, infatti, possono presentare uno o due vacuoli bianchi nella loro matrice (Dvorák, 1989), ma il loro ruolo resta poco chiaro. Alcuni autori hanno ipotizzato che possano rappresentare una forma immatura di limitazione dei ROS (Makabe *et al.*, 2006; Crocco *et al.*, 2011). Altri, invece, ritengono che questa specifica morfologia mitocondriale possa

essere associata ad un aumento della superficie dovuto all'espansione delle membrane esterne e interne (Dadarwal *et al.*, 2015). I mitocondri vacuolati potrebbero anche comportare una riduzione del loro potenziale di membrana ed una conseguente minore efficienza nelle loro funzionalità (Belli *et al.*, 2020). Infatti, mitocondri con questa tipologia ultrastrutturale sono stati ritrovati in studi in cui sono stati analizzati differenti stati patologici, come segno di una loro disfunzione e/o indice di attivazione di fenomeni apoptotici (Belli *et al.*, 2021).

In linea con ciò, la diminuzione della densità numerica dei mitocondri alla massima concentrazione di fungicida ed una maggiore prevalenza della loro morfologia vacuolata possono essere correlate ad alterazioni dell'attività respiratoria e del metabolismo energetico o condizioni di stress ossidativo. Un'ulteriore considerazione da fare, è che i mitocondri vengono ereditati per via materna, quindi anomalie genetiche, funzionali, strutturali e numeriche nell'ovocita, associate a difetti metabolici, potrebbero compromettere la capacità degli embrioni di superare gli stadi di preimpianto. Infatti, difetti mitocondriali, come l'alterazione del potenziale di membrana, l'alterazione dell'espressione del DNA mitocondriale e le anomalie strutturali, potrebbero condurre a malfunzionamenti dell'embrione preimpianto irrecuperabili (Babayev e Seli, 2015).

Dall'analisi ultrastrutturale è emersa una significativa riduzione della densità lineare dei granuli corticali principalmente nel gruppo esposto a concentrazione pari a 1 µg/ml di mancozeb, rispetto ai gruppi di controllo e ad a quello esposto alla concentrazione di 0.001 µg/ml. I granuli corticali sono piccoli organuli, regolarmente presenti, stratificati in una-tre file nella regione corticale degli ovociti. Rappresentano un prodotto del complesso di Golgi e si presentano elettrone-densi; nel topo, possono apparire chiari o scuri, come osservato da Nicosia e collaboratori (1977), a seconda dello stadio di maturazione in cui si trovano, ed hanno un ruolo fondamentale nella fecondazione (Sathanathan *et al.*, 1982a; Motta *et al.*, 1988; Familiari *et al.*, 2006). Infatti, i granuli corticali sono coinvolti nel meccanismo di blocco della polispermia, attraverso l'esocitosi del loro contenuto (glicosaminoglicani, proteasi, fosfatasi acide e perossidasi) nello spazio perivitellino, un processo conosciuto con il nome di "reazione corticale" (Sathanathan *et al.*, 2006). La

riduzione e/o l'assenza di questi organelli, come mostrato dai nostri risultati, potrebbe essere un segnale di esocitosi prematura del loro contenuto e potrebbe essere indicativa di un'incapacità dell'ovocita di interagire con gli spermatozoi, portando a una fecondazione non monospermica ed alla produzione di un embrione con un assetto cromosomico non idoneo e/o non disposto correttamente (Cappa *et al.*, 2018; De Paola *et al.*, 2019).

Inoltre, i dati ottenuti nel presente lavoro riportano una distribuzione irregolare e ridotta dei microvilli, altamente significativa alle concentrazioni di 1 µg/ml. Essi appaiono corti e talvolta appiattiti, alla concentrazione più elevata di mancozeb, rispetto ai controlli e agli altri gruppi esaminati. I microvilli sono strutture dinamiche dell'oolemma, e sono noti per il loro ruolo nella fusione delle membrane tra ovocita e spermatozoo, durante la fecondazione (Yaganimachi, 1978; Wilson e Snell, 1988). Alcuni autori suggeriscono che essi agiscano come una vera e propria piattaforma, che concentra le proteine di adesione/fusione e/o fornisce una sporgenza membranosa con un leggero raggio di curvatura, facilitando l'interazione tra gli spermatozoi e l'ovocita, al momento della fecondazione (Wilson e Snell, 1988; Runge *et al.*, 2007; Bennamar *et al.*, 2017). Pertanto, le alterazioni della morfologia dei microvilli, emerse dalle nostre osservazioni, potrebbero rappresentare l'incapacità dell'ovocita di facilitare l'ingresso degli spermatozoi, riducendo in questo modo il tasso di fecondazione.

In tutti i gruppi studiati è stata rilevata la presenza di corpi multivescicolari, che caratterizzano il citoplasma degli ovociti di topo. Queste strutture sono grandi vacuoli sferici chiari contenenti vescicole arrotondate e rappresentano una varietà di lisosomi.

I corpi multivescicolari si comportano come vacuoli autofagici o autolisosomi e digeriscono materiale endogeno come i granuli secretori, regolando così i processi di secrezione all'interno di alcune cellule (Ghadially, 1997). Tuttavia, queste strutture, i corpi lamellari densi e le strutture simili a fagofori, nelle diverse fasi di maturazione, possono segnalare la presenza di fenomeni autofagici, che potrebbero essere associati a condizioni di stress cellulare, come riportato in studi precedenti (Uchiyama *et al.*, 2008; De Paola *et al.*, 2019;). Inoltre, i materiali extracellulari, le vescicole esosomiali ed i detriti notati nello spazio perivitellino potrebbero essere compatibili con diversi processi, come l'esocitosi di

corpi residui o l'esocitosi autofagica. Questi dati evidenziano la presenza di cambiamenti degenerativi legati al processo apoptotico o all'invecchiamento dell'ovocita (Yi e Tang, 1995; Morelli *et al.*, 2014) a causa dell'accumulo di vescicole autofagiche o degradative nel citoplasma.

Un precedente studio *in vitro* del nostro gruppo di ricerca ha dimostrato una tossicità dose-correlata di concentrazioni crescenti di mancozeb (da 0.001 a 1 µg/ml) sull'ultrastruttura delle cellule della granulosa di topo, con conseguenti alterazioni dei contatti intercellulari, irregolarità della membrana nucleare, marginalizzazione e condensazione della cromatina, blebbing della membrana e segni di apoptosi (Palmerini *et al.*, 2018; Bianchi *et al.*, 2020). Recentemente, è stato scoperto che il mancozeb sopprime la vitalità delle cellule della granulosa e ne modifica la morfologia, ma induce le cellule della granulosa a secernere più progesterone, il quale a sua volta potrebbe inibire la produzione di LH e sopprimere l'ovulazione (Dinisri *et al.*, 2021).

Poiché le cellule della granulosa contribuiscono allo sviluppo e alla maturazione degli ovociti, le loro alterazioni possono essere associate ad una riduzione delle capacità fecondanti dell'ovocita e conseguente sterilità (Kidder *et al.*, 2010; Canipari *et al.*, 2012; Dumesic *et al.*, 2015). Tuttavia, nei risultati ottenuti da questo studio, non è stata riscontrata alcuna tossicità dose-dipendente del mancozeb sull'ultrastruttura degli ovociti di topo. D'altra parte, i dati emersi invece hanno mostrato alcuni cambiamenti ultrastrutturali alla massima concentrazione, correlabili al fungicida, ma senza indicare alterazioni graduali in base alla dose di esposizione. Ciò potrebbe essere collegato ad una delle diverse funzioni svolte dalle cellule del cumulo, ovvero il ruolo protettivo che sono in grado di esercitare nei confronti dell'ovocita, come precedentemente dimostrato in altri lavori (Pocar *et al.*, 2005; Campen *et al.*, 2017).

Nel nostro modello sperimentale, le cellule del cumulo hanno esercitato una protezione piuttosto efficiente a basse concentrazioni di mancozeb, visto che non sono state evidenziate alterazioni significative. Tale ruolo protettivo però, sembra essere diventato inefficace alla dose pari a 1 µg/ml di mancozeb.

In conclusione, i cambiamenti ultrastrutturali nell'ovocita di topo sono emersi principalmente nei campioni esposti alla concentrazione più alta di mancozeb, indicando la localizzazione morfologica delle alterazioni ed i singoli compartimenti alterati, e spiegando e confermando in questo modo i suoi effetti tossici sulla salute riproduttiva femminile.

L'aspetto particolare di questo studio è che gli effetti dannosi sull'ultrastruttura degli ovociti di topo indotti dal mancozeb, visibili solo alla concentrazione più alta (1 µg/ml), potrebbero essere indicativi della protezione esercitata dalle cellule del cumulo nei confronti dell'ovocita stesso, alle dosi minori. Infatti, la protezione da parte delle cellule del cumulo sembra venire meno solo a dosi elevate di mancozeb, essendo responsabili dell'assorbimento del fungicida da parte dell'ovocita, come dimostrato dalla presenza delle modificazioni morfologiche riscontrate. Questi risultati si rendono ancor più interessanti per gli studi sulla preservazione della fertilità ed in generale sull'infertilità, soprattutto perché l'uso di ovociti maturati *in vitro* fornisce un modello sperimentale di tossicità riproduttiva facile e utile per studiare gli effetti nocivi dei pesticidi, con risultati potenzialmente trasferibili anche a specie superiori, incluso l'uomo. I dati morfologici ottenuti da questo lavoro, quindi, hanno aggiunto informazioni sull'impatto potenzialmente tossico che il mancozeb può indurre sull'ultrastruttura dell'ovocita dei mammiferi, permettendo di chiarire e dimostrare l'entità della sua tossicità riproduttiva.

Bibliografia

- Akthar, I.; Wang, Z.; Wijayagunawardane, M.P.B.; Ratnayake, C.J.; Siriweera, E. H.; Lee, K. F.; Kodithuwakku, S. P. In vitro and in vivo impairment of embryo implantation by commonly used fungicide Mancozeb. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 527(1), 42–48.
- Aprèa, C.; Betta, A.; Catenacci, G.; Lotti, A.; Minoia, C.; Passini, W.; Pavan, I.; Saverio, F.; Roggi, C.; Ruggeri, R.; Soave, C.; Sciarra, G.; Vannini, P.; Vitalone, V. Reference values of urinary ethylenethiourea in four regions of Italy (multicentric study). *Sci Total Environ*, 1996, 192(1):83-93.
- Archer, E.; Van Wyk, J.H. The potential anti-androgenic effect of agricultural pesticides used in the Western Cape: In vitro investigation of mixture effects. *Water SA* [online]. 2015, Volume. 41, n.1, pp.129-138. ISSN 1816-7950.
- Axelstad, M.; Boberg, J.; Nellemann, C.; Kiergaard, M.; Jacobsen, P.R.; Christiansen, S.; Hougaard, K.S.; Hass, U. Exposure to the widely used fungicide mancozeb causes thyroid hormone disruption in rat dams but no behavioral effects in the offspring. *Toxicol Sci*, 2011, 120:439-446.
- Babayev, E.; Seli, E. Oocyte mitochondrial function and reproduction. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2015, 27(3):175-81.
- Balduini, W., Costa, L. *Tossicologia generale e applicata ai farmaci*. Edra, 2015.
- Baligar, P.N.; Kaliwal, B.B. Induction of gonadal toxicity to female rats after chronic exposure to mancozeb. *Ind Health*, 2001, 39(3):235-43.
- Baligar, P.N.; Kaliwal, B.B. Morphometric analysis of follicular growth and biochemical constituents in albino rats exposed to mancozeb. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*, 2004, 15(3-4):241-262.
- Bao, J.; Zhang, Y.; Wen, R.; Zhang, L.; Wang, X. Low level of mancozeb exposure affects ovary in mice. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2022, 239:113670.

- Bebbere, D.; Albertini, D.F.; Coticchio, G.; Borini, A.; Ledda, S. The subcortical maternal complex: emerging roles and novel perspectives. *Mol Hum Reprod*, 2021, 27(7).
- Belli, M.; Palmerini, M.G.; Bianchi, S.; Bernardi, S.; Khalili, M.A.; Nottola, S.A.; Macchiarelli, G. Ultrastructure of mitochondria of human oocytes in different clinical conditions during assisted reproduction. *Arch Biochem Biophys*, 2021, 703:108854.
- Belli, M.; Rinaudo, P.; Palmerini, M.G.; Ruggeri, E.; Antonouli, S.; Nottola, S.A.; Macchiarelli, G. Pre-Implantation Mouse Embryos Cultured In Vitro under Different Oxygen Concentrations Show Altered Ultrastructures. *Int J Environ Res Public Health*, 2020, 17(10):3384.
- Belpoggi, F.; Soffritti, M.; Guarino, M.; Lambertini, L.; Cevolani, D.; Maltoni, C. Results of long-term experimental studies on the carcinogenicity of ethylene-bisdithiocarbamate (Mancozeb) in rats. *Ann N Y Acad Sci*, 2002; 982:123-36.
- Benammar, A.; Ziyat, A.; Lefèvre, B.; Wolf, J.P. Tetraspanins and Mouse Oocyte Microvilli Related to Fertilizing Ability. *Reprod Sci*, 2017, 24(7):1062-1069.
- Bianchi, S.; Nottola, S.A.; Torge, D.; Palmerini, M.G.; Necozone, S.; Macchiarelli, G. Association between Female Reproductive Health and Mancozeb: Systematic Review of Experimental Models. *Int J Environ Res Public Health*, 2020, 17(7):2580.
- Bianchi, V.; Macchiarelli, G.; Borini, A.; Lappi, M.; Cecconi, S.; Miglietta, S.; Familiari, G.; Nottola, S.A. Fine morphological assessment of quality of human mature oocytes after slow freezing or vitrification with a closed device: a comparative analysis. *Reprod Biol Endocrinol*, 2014; 12:110.
- Bolumar, F.; Olsen, J.; Rebagliato, M.; Bisanti, L. European Study Group on Infertility and Subfecundity. Caffeine intake and delayed conception: a European multicenter study on infertility and subfecundity. *American journal of epidemiology*, 1997. 145(4), 324-334.
- Buccione, R.; Vanderhyden, B.C.; Caron, P.J.; Eppig, J.J. FSH-induced expansion of the mouse cumulus oophorus in vitro is dependent upon a specific factor(s) secreted by the oocyte. *Dev Biol*. 1990;138(1):16-25.

- Campan, K.A.; McNatty, K.P.; Pitman, J.L. A protective role of cumulus cells after short-term exposure of rat cumulus cell-oocyte complexes to lifestyle or environmental contaminants. *Reprod Toxicol*, 2017, 69:19-33.
- Canipari, R.; Cellini, V.; Cecconi, S. The ovary feels fine when paracrine and autocrine networks cooperate with gonadotropins in the regulation of folliculogenesis. *Curr Pharm Des*, 2012, 18:245-255.
- Canipari, R.; De Santis, L.; Cecconi, S. Female Fertility and Environmental Pollution. *Int J Environ Res Public Health*. 2020;17(23):8802.
- Cappa, A.I.; De Paola, M.; Wetten, P.; De Blas, G.A.; Michaut, M.A. Live imaging of cortical granule exocytosis reveals that in vitro matured mouse oocytes are not fully competent to secrete their content. *Biol Open*, 2018, 7(12):bio031872.
- Cecconi, S.; Paro, R.; Rossi, G.; Macchiarelli, G. The effects of the endocrine disruptors dithiocarbamates on the mammalian ovary with particular regard to mancozeb. *Curr Pharm Des*, 2007, 13(29), 2989–3004.
- Chang, H.; Brown, C.W.; Matzuk, M.M. Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily. *Endocr Rev*. 2002;23(6):787-823.
- Cohn, B.A et al. DDT and breast cancer in young women: new data on the significance of age at exposure *Environ Health Perspect*. 2007; 115:1406-1414
- Colosio, C.; Fustinoni, S.; Birindelli, S.; Bonomi, I.; De Paschale, G.; Mammone, T.; Tiramani, M.; Vercelli, F.; Visentin, S.; Maroni, M. Ethylenethiourea in urine as an indicator of exposure to mancozeb in vineyard workers. *Toxicol Lett*. 2002, 134(1-3):133-40.
- Collotta, M.; Bertazzi, P.A.; Bollati, V. Epigenetics and pesticides. *Toxicology*. 2013, 10;307:35-41.
- Coticchio, G.; Dal Canto, M.; Mignini Renzini, M.; Guglielmo, M.C.; Brambillasca, F.; Turchi, D.; et al. Oocyte maturation: gamete-somatic cells interactions, meiotic resumption, cytoskeletal dynamics and cytoplasmic reorganization. *Hum Reprod Update*. 2015;21(4):427–454.

- Coticchio, G.; Dal Canto, M.; Fadini, R.; Mignini Renzini, M.; Guglielmo, M.C.; Miglietta, S.; Palmerini, M.G.; Macchiarelli, G.; Nottola, S.A. Ultrastructure of human oocytes after in vitro maturation. *Mol Hum Reprod*, 2016, 22: 110–118.
- Crocco, M.; Alberio, R.H.; Lauria, L.; Mariano, M.I. Effect of serum on the mitochondrial active area on developmental days 1 to 4 in in vitro-produced bovine embryos. *Zygote*, 2011, 19:297–306.
- Da Broi, M.G.; Giorgi, V.S.I.; Wang, F.; Keefe, D.L.; Albertini, D.; Navarro, P.A. Influence of follicular fluid and cumulus cells on oocyte quality: clinical implications. *J Assist Reprod Genet*. 2018;35(5):735-751.
- Dadarwal, D.; Adams, G.P.; Hyttel, P.; Brogliatti, G.M.; Caldwell, S.; Singh, J. Organelle reorganization in bovine oocytes during dominant follicle-growth and regression. *Reprod Biol Endocrinol*, 2015, 13:124.
- Damalas, C.A.; Eleftherohorinos, I.G. Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators. *Int J Environ Res Public Health* 2011, 8:1402–1419
- De Paola, M.; Miró, M.P.; Ratto, M.; Bátiz, L.F.; Michaut, M.A. Pleiotropic effects of alpha-SNAP M105I mutation on oocyte biology: ultrastructural and cellular changes that adversely affect female fertility in mice. *Sci Rep*, 2019, 9(1):17374.
- Den Hond, E.; Tournaye, H.; De Sutter, P.; Ombelet, W.; Baeyens, W.; Covaci, A.; Cox, B.; Nawrot, T.S.; Van Larebeke, N.; D'Hooghe, T. Human exposure to endocrine disrupting chemicals and fertility: A case-control study in male subfertility patients. *Environ Int*, 2015 Nov; 84:154-60.
- Dinisri, I.; Kodikara, S.; Prasadani, M.; Pathirana, I.; Rathnayake, C.; Alexander, B.; Lee, K. F.; Kodithuwakku, S. P. Impairment of caprine oocyte maturation in vitro and alteration of granulosa cells functions by widely used fungicide mancozeb. *Trop anim health prod*, 2021, 53(3) 406.
- Domico, L.M.; Cooper, K.R.; Bernard, L.P.; Zeevalk, G.D. Reactive oxygen species generation by the ethylene-bis-dithiocarbamate (EBDC) fungicide mancozeb and its contribution to neuronal toxicity in mesencephalic cells. *Neurotoxicology*, 2007, 28, 1079-1091.

- Domico, L.M.; Zeevalk, G.D.; Bernard, L.P.; Cooper, K.R. Acute neurotoxic effects of mancozeb and maneb in mesencephalic neuronal cultures are associated with mitochondrial dysfunction. *Neurotoxicology*, 2006, 27,816-825.
- Dong, J.; Albertini, D.F.; Nishimori, K.; Kumar, T.R., Lu, N.; Matzuk, M.M. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature*. 1996; 383(6600):531-5.
- Dumesic, D.A.; Meldrum, D.R; Katz-Jaffe, M.G.; Krisher, R.L.; Schoolcraft, W.B. Oocytes environment: follicular fluid and cumulus cells are critical for oocyte health. *Fertil Steril*, 2015, 103:3030-316.
- Dvorák, M. Ultrastructure and quantitative analysis of mouse and human oocytes. *Prog Clin Biol Res*, 1989, 296:273-80.
- Edson, M.A.; Nagaraja, A.K., Matzuk, M.M. The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocr Rev*. 2009, 30(6):624-712.
- EEA 2022 (European Environment Agency), <https://www.eea.europa.eu/ims/pesticides-in-rivers-lakes-and>
- Eppig, J.J.; Schultz, R.M.; O'Brien, M.; Chesnel, F. Relationship between the developmental programs controlling nuclear and cytoplasmic maturation of mouse oocytes. *Dev Biol*. 1994;164(1):1-9.
- Eppig, J.J.; Wigglesworth, K.; Pendola, F.L. The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99:2890-2894.
- Eskenazi, B.; Kogut, K.; Huen, K.; Harley, K.G.; Bouchard, M.; Bradman, A.; Boyd-Barr, D.; Johnson, C.; Holland, N. Organophosphate pesticide exposure, PON1, and neurodevelopment in school-age children from the CHAMACOS study. *Environ Res*. 2014; 134:149-57.
- Esposito, G.; Vitale, A.M.; Leijten, F.P.; Strik, A.M.; Koonen-Reemst, A.M.; Yurttas, P.; Robben, T.J.; Coonrod, S.; Gossen, J.A. Peptidylarginine deiminase (PAD) 6 is essential for oocyte cytoskeletal sheet formation and female fertility. *Mol Cell Endocrinol*, 2007, 273(1-2):25-31.7.

- European Food Safety Authority (EFSA); Abdourahime, H.; Anastassiadou, M.; Arena ,M.; Auteri, D.; Barmaz, S.; Brancato, A.; Bura, L.; Carrasco Cabrera, L.; Chaideftou, E.; Chiusolo, A.; Court Marques, D.; Crivellente, F.; De Lentdecker, C.; Egsmose, M.; Fait, G.; Ferreira, L.; Gatto, V.; Greco, L.; Ippolito, A.; Istace, F.; Jarrah, S.; Kardassi, D.; Leuschner, R.; Lostia, A.; Lythgo, C.; Messinetti, S.; Miron, I.; Molnar, T.; Padovani, L.; Parra Morte, J.M.; Pedersen, R; Raczzyk, M.; Reich, H.; Ruocco, S; Saari, K.E.; Santos, M.; Serafimova, R.; Sharp, R.; Stanek, A.; Streissl, F.; Sturma, J.; Szentes, C.; Terron, A.; Tiramani, M.; Vagenende, B.; Vainovska, P.; Villamar-Bouza, L. Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance mancozeb. *EFSA J*, 2020, 18(12):e05755
- European Food Safety Authority (EFSA), 2021. The 2019 European Union report on pesticide residues in food Carrasco Cabrera L. and Medina Pastor P. *EFSA Journal* 2021;19(4):6491, 89 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6491> 277
- Eurostat 2021, <https://ec.europa.eu/eurostat/en/web/products-eurostat-news/-/ddn-20220502-1>
- Familiari, G., *Anatomia microscopica - Atlante di microscopia ottica ed elettronica - Fondato da Pietro Motta (Piccin Editore)*, 2016.
- Familiari, G.; Heyn, R.; Relucenti, M.; Nottola, S.A.; Sathanathan A.H. Ultrastructural dynamics of human reproduction, from ovulation to fertilization and early embryo development. *Int Rev Cytol*, 2006, 249:53-141.
- Fortune, J.E.; Cushman, R.A., Wahl, C.M.; Kito, S. The primordial to primary follicle transition. *Mol Cell Endocrinol*. 2000, 163:53-60
- Freitas, C.; Neto, A.C.; Matos, L.; Silva, E.; Ribeiro, Â.; Silva-Carvalho, J.L.; Almeida, H. Follicular fluid redox involvement for ovarian follicle growth. *J Ovarian Res* 10: 1–10, 2017.
- Ghadially F.N. *Ultrastructural Pathology of the Cell and Matrix*. 3rd ed. Volume 2. Butterworths; Oxford, UK: 1997. Chapter 7: Lysosomes, pp 602-608.
- Gilbert, S.F. *Biologia dello sviluppo*; Zanichelli (2016)
- Gilchrist, R.B.; Lane, M.; Thompson, J.G. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Hum Reprod Update*. 2008;14(2):159–177.

- Greenlee, A.R.; Ellis, T.M.; Berg, R.L. Low-dose agrochemicals and lawn-care pesticides induce developmental toxicity in murine preimplantation embryos. *Environ Health Perspect*, 2004, 112:703-709.
- Greve, T. and Callesen, H. Rendez-vous in the oviduct: implications for superovulation and embryo transfer. *Reprod Nutr Dev*. 2001, 41(5):451-9.
- Gullino, M.L.; Tinivella, F.; Garibaldi, A. Mancozeb: past, present, future. *Plant Disease*, 2010; 94(9):1076-87.
- Hanumantharaju, T.H. and Awasthi, M.D. Persistence and degradation of metalaxyl, mancozeb fungicides and its metabolite ethylenethiourea in soils. *J Environ Sci Eng*. 2004;46(4):312–21.
- Hass, U.; Boberg, J.; Christiansen, S.; Jacobsen, P.R.; Vinggaard, A.M.; Taxvig, C.; Poulsen, M.E.; Herrmann, S.S.; Jensen, B.H.; Petersen, A.; Clemmensen, L.H.; Axelstad, M. Adverse effects on sexual development in rat offspring after low dose exposure to a mixture of endocrine disrupting pesticides. *Reprod Toxicol*, 2012, 34: 261–274.
- HBM4EU, 2022 https://www.hbm4eu.eu/wp-content/uploads/2022/07/HBM4EU_Policy-Brief-Pesticides.pdf
- Hoffman, L.; Trombetta, L.; Hardej, D. Ethylene bisdithiocarbamate pesticides Maneb and Mancozeb cause metal overload in human colon cells. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2015; 41:78-88.
- Huber, C.; Nijssen, R.; Mol, H.; Antignac, J.P.; Krauss, M.; Brack, W.; Wagner, K.; Debrauwer, L.; Vitale, C.M.; Price, E.J.; Klanova, J.; Molina, B.G.; Leon N.; Pardo, Fernández S.F.; Szigeti, T.; Középesy, S.; et al. A large scale multi-laboratory suspect screening of pesticide metabolites in human biomonitoring: From tentative annotations to verified occurrences. *Environment International*, 2022, 168, 107452.
- International Agency for Research on Cancer Advisory Group Report of the Advisory Group to Recommend Priorities for the IARC Monographs during 2020–2024. [(accessed on 2 July 2022)]. Available online: <https://www.iarc.who.int/news-events/report-of-the-advisory-group-to-recommend-priorities-for-the-iarc-monographs-during-2020-2024/>

- Iorio, R.; Castellucci, A.; Rossi, G.; Cinque, B.; Cifone, M.G.; Macchiarelli, G., Cecconi, S. Mancozeb affects mitochondrial activity, redox status and ATP production in mouse granulosa cells. *Toxicology in Vitro*, 2015; 30:438-45.
- ISPRA edizione 2022, <https://www.isprambiente.gov.it/it/pubblicazioni/rapporti/rapporto-nazionale-pesticidi-nelle-acque-dati-2019-2020>
- Jacobsen, P.R.; Axelstad, M.; Boberg, J.; Isling, L.K.; Christiansen, S.; Mandrup, K.R.; Berthelsen, L.O.; Vinggaard, A.M.; Hass, U. Persistent developmental toxicity in rat offspring after low dose exposure to a mixture of endocrine disrupting pesticides. *Reprod Toxicol*, 2012, 34: 237–250.
- Khalili, M.A.; Maione, M.; Palmerini, M.G.; Bianchi, S.; Macchiarelli, G.; Nottola, S.A. Ultrastructure of human mature oocytes after vitrification. *Eur J Histochem*. 2012, 56:e38.
- Khan DA, Shabbir S, Majid M, Ahad K, Naqvi TA, Khan FA. Risk assessment of pesticide exposure on health of Pakistani tobacco farmers. *J Expo Sci Environ Epidemiol*. 2010;20(2):196–204.
- Knight PG, Satchell L, Glister C. Intra-ovarian roles of activins and inhibins. *Mol Cell Endocrinol*. 2012; 359:53–65.
- Kidder GM, Mhawi AA. Gap junctions and ovarian folliculogenesis. *Reproduction*. 2002;123(5):613–620.
- Kidder GM, Vanderhyden BC. Bidirectional communication between oocytes and follicle cells: ensuring oocyte developmental competence. *Can J Physiol Pharmacol*. 2010;88(4):399–413.
- Kollman, W.S. Summary of assembly bill 1807/3219, pesticide air monitoring results. 1995, Department of Pesticide Regulation, Sacramento, CA.
- Leemans M, Couderq S, Demeneix B, Fini JB. Pesticides with Potential Thyroid Hormone-Disrupting Effects: A Review of Recent Data. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019, 9;10:743.

- Legambiente, 2021. Dossier STOP pesticidi 2021. Analisi dei residui dei fitofarmaci negli alimenti e buone pratiche agricole. 80 pp. <https://www.legambiente.it/wp-content/uploads/2021/11/Stop-Pesticidi-2021.pdf>
- Leoni, G.G.; Palmerini, M.G.; Satta, V.; Succu, S.; Pasciu, V.; Zinellu, A.; Carru, C.; Macchiarelli, G.; Nottola, S.A.; Naitana, S.; Berlinguer, F. Differences in the kinetic of the first meiotic division and in active mitochondrial distribution between pre-pubertal and adult oocytes mirror differences in their developmental competence in a sheep model. *PLoS One*, 2015, 10:e0124911.
- Liu K., Rajareddy S, Liu L et al. Control of mammalian oocyte growth and early follicular development by the oocyte PI3 kinase pathway: new roles for an old timer. *Dev Biol*. 1006; 299:1–11.
- Liu C., Peng J, Matzuk MM, Yao HH-C. Lineage specification of ovarian theca cells requires multicellular interactions via oocyte and granulosa cells. *Nat Commun*. 2015; 6:6934.
- Longo, M.; Boiani, M.; Redi, C.; Monti, M. Cytoplasmic lattices are not linked to mouse 2-cell embryos developmental arrest. *Eur J Histochem*, 2018, 62(4):2972.
- Magoffin, D.A. Ovarian theca cell. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005; 37:1344–1349.
- Makabe, S.; Naguro, T.; Nottola, S.A.; Van Blerkom, J. Atlas of human female reproductive function: ovarian development to early embryogenesis after in vitro fertilization. London; New York: Taylor & Francis. 2006
- Mandic-Rajcevic, S.; Rubino, F.M.; Ariano, E.; Cottica, D.; Neri, S.; Colosio, C. Environmental and biological monitoring for the identification of main exposure determinants in vineyard mancozeb applicators. *J Expo Sci Environ Epidemiol*, 2018, 28(3):289-296.
- Mlynarcikova, A., Fickova, M., Scsukova, S. Impact of endocrine disruptors on ovarian steroidogenesis. *Endocr Regul*, 2014; 48(4):201-24.
- Modonesi, C.; Panizza, C. Pesticidi, pratiche agricole, ambiente e salute. *Isde Italia*, 2015; 1-15.

- Monniaux D. Driving folliculogenesis by the oocyte-somatic cell dialog: lessons from genetic models. *Theriogenology*. 2016;86(1):41–53.
- Montes-Grajales, D.; Bernardes, G.J., Olivero-Verbel, J. Urban Endocrine Disruptors Targeting Breast Cancer Proteins. *Chem Res Toxicol*, 2016. 15; 29(2):150-61.
- Morelli, E.; Ginefra, P.; Mastrodonato, V.; Beznoussenko, G.V.; Rusten, T.E.; Bilder, D.; Stenmark, H.; Mironov, A.A.; Vaccari, T. Multiple functions of the SNARE protein Snap29 in autophagy, endocytic, and exocytic trafficking during epithelial formation in *Drosophila*. *Autophagy*, 2014, 10(12):2251-68.
- Mostafalou, S.; Abdollahi, M. Pesticides and human chronic diseases: evidences, mechanisms, and perspectives. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2013; 268(2):157-77.
- Motta, P.M.; Nottola, S.A.; Familiari, G.; Makabe, S.; Stallone, T.; Macchiarelli, G. Morphodynamics of the follicular-luteal complex during early ovarian development and reproductive life. *Int Rev Cytol*, 2003, 223:177-288.
- Motta, P.M.; Nottola, S.A.; Micara, G.; Familiari, G. Ultrastructure of human unfertilized oocytes and polyspermic embryos in an IVF-ET program. *Ann N Y Acad. Sci*, 1988, 541:367-383.
- Nicosia, S.V.; Wolf, D.P.; Inoue, M. Cortical granule distribution and cell surface characteristics in mouse eggs. *Dev Biol*, 1977, 57(1):56-74.
- Nordby, K.C.; Andersen, A.; Irgens, L.M.; Kristensen, P. Indicators of mancozeb exposure in relation to thyroid cancer and neural tube defects in farmers' families. *Scand J Work Environ Health*, 2005, 31(2):89-96.
- Nottola, S.A.; Coticchio, G.; De Santis, L.; Macchiarelli, G.; Maione, M.; Bianchi, S.; Iaccarino, M.; Flamigni, C.; Borini, A. Ul-trastructure of human mature oocytes after slow cooling cryopreservation with ethylene glycol. *Reprod Biomed Online*, 2008, 17(3):368-77.
- Nottola, S.A.; Macchiarelli, G.; Coticchio, G.; Bianchi, S.; Cecconi, S.; De Santis, L.; Scaravelli, G.; Flamigni, C.; Borini, A. Ul-trastructure of human mature oocytes after slow cooling cryopreservation using different sucrose concentrations. *Hum Reprod*, 2007, 22:1123–1133.

- Palmerini, M.G.; Belli, M.; Nottola, S.A.; Miglietta, S.; Bianchi, S.; Bernardi, S.; Antonouli, S.; Cecconi S.; Familiari G.; Macchiarelli G. Mancozeb impairs the ultrastructure of mouse granulosa cells in a dose-dependent manner. *J Reprod Dev*, 2018, 64(1):75-82.
- Palmerini, M.G.; Zhurabekova, G.; Balmagambetova, A.; Nottola, S.A.; Miglietta, S.; Belli, M.; Bianchi, S.; Cecconi, S.; Di Nisio, V.; Familiari, G.; Macchiarelli, G. The pesticide Lindane induces dose-dependent damage to granulosa cells in an in vitro culture. *Reprod Biol*, 2017, 17(4):349-356.
- Palmerini, M.G.; Antonouli, S.; Macchiarelli, G.; Cecconi, S.; Bianchi, S.; Khalili, M.A.; Nottola, S.A. Ultrastructural Evaluation of the Human Oocyte at the Germinal Vesicle Stage during the Application of Assisted Reproductive Technologies. *Cells*. 2022. 13;11(10):1636.
- Paro, R.; Tiboni, G.M.; Buccione, R.; Rossi, G.; Cellini, V.; Canipari, R.; Cecconi, S. The fungicide mancozeb induces toxic effects on mammalian granulosa cells. *Toxicol Appl Pharm*. 2012, 260:155–161.
- Pepling, M.E. From primordial germ cell to primordial follicle: mammalian female germ cell development. *Genesis*. 2006;44(12):622-32.
- Pepling, M.E.; Wilhelm, J.E.; O'Hara, A.L.; Gephardt, G.W.; Spradling, A.C. Mouse oocytes within germ cell cysts and primordial follicles contain a Balbiani body. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007, 104:187-192.
- Peters, H.; Byskov, A.G.; Himmelstein-Braw, R.; Faber, M. Follicular growth: the basic event in the mouse and human ovary. *J Reprod Fertil*. 1975, 45:559-66.
- Picton, H.M.; Harris, S.E.; Muruvi, W.; Chambers, E.L. The in vitro growth and maturation of follicles. *Reproduction*. 2008, 136:703-15.
- Pocar, P.; Nestler, D.; Risch, M.; Fischer, B. Apoptosis in bovine cumulus-oocyte complex, after exposure to polychlorinated biphenyl mixtures during in vitro maturation. *Reproduction*. 2005, 130(6):857-68.
- Rajmohan, K.S., Chandrasekaran, R. & Varjani, S. A Review on Occurrence of Pesticides in Environment and Current Technologies for Their Remediation and Management. *Indian J Microbiol* 60, 125–138 (2020).

- Rattan S, Zhou C, Chiang C, Mahalingam S, Brehm E, Flaws JA. Exposure to endocrine disruptors during adulthood: consequences for female fertility. *J Endocrinol.* 2017;233(3):R109-R129.
- Rattan, S., Flaws, J.A. The epigenetic impacts of endocrine disruptors on female reproduction across generations†. *Biol Reprod.* 2019;101(3):635-644.
- Report Pesticidi WWF 2022, <https://www.wwf.it/uploads/Report-Pesticidi-salute-2022.pdf>
- Robker, R.L.; Hennebold, J.D.; Russell, D.L. Coordination of Ovulation and Oocyte Maturation: A Good Egg at the Right Time. *Endocrinology.* 2018;159(9):3209-3218.
- Rossi, G.; Buccione, R.; Baldassarre, M.; Macchiarelli, G.; Palmerini, M.G.; Cecconi, S. Mancozeb exposure in vivo impairs mouse oocyte fertilizability. *Reprod toxicol.* 2006b, 21:216–219.
- Rossi, G.; Palmerini, M.G.; Macchiarelli, G.; Buccione, R.; Cecconi, S. Mancozeb adversely affects meiotic spindle organization and fertilization in mouse oocytes. *Reprod toxicol.* 2006a, 22:51–55.
- Runge, K.E.; Evans, J.E.; He, Z.Y.; Gupta, S.; McDonald, K.L.; Stahlberg, H.; Primakoff, P.; Myles, D.G. Oocyte CD9 is enriched on the microvillar membrane and required for normal microvillar shape and distribution. *Dev Biol.* 2007, 304(1):317-325.
- Runkle, J.; Flocks, J.; Economos, J.; Dunlop A.L. A systematic review of Mancozeb as a reproductive and developmental hazard. *Environ Int.* 2017, 99:29-42.
- Sathanathan, A.H.; Selvaraj, K.; Girijashankar, M.L.; Ganesh, V.; Selvaraj, P.; Trounson, A.O. From oogonia to mature oocytes: inactivation of the maternal centrosome in humans. *Microsc Res Tech.* 2006, 69(6):396-407.
- Sathanathan, A.H.; Trounson, A.O. Ultrastructure of cortical granule release and zona interaction in monospermic and polyspermic human ova fertilized in vitro. *Gamete Res.* 1982a, 6:225-234.
- Sathanathan. A.H.; Trounson, A.O. Ultrastructural observations on cortical granules in human follicular oocytes cultured in vitro. *Gamete Res.* 1982b, 5:191-198.

- Shaeib, F.; Khan, S.N.; Ali, I.; Thakur, M.; Saed, M.G.; Dai, J.; et al. The defensive role of cumulus cells against reactive oxygen species insult in metaphase II mouse oocytes. *Reprod Sci.* 2016;23(4):498–507.
- Silva V., Mol H.G.J., Zomer P., Tienstra M., Ritsema C.J., Geissen V., Pesticide residues in European agricultural soils – A hidden reality unfolded, *Science of The Total Environment*, 2019, 653, 1532-1545.
- Skalny, A.; Aschner, M.; Paoliello, M.; Santamaria, A.; Nikitina, N.; Rejniuk, V.; Jiang, Y.; Rocha, J.; Tinkov, A. Endocrine-disrupting activity of mancozeb. *Arh Farm (Belgr)*, 2021, 71(6):491-507.
- Smith, C.G., Besch, N.F.; Smith, R.G., Besch, P.K. Effect of tetrahydrocannabinol on the hypothalamic-pituitary axis in the ovariectomized rhesus monkey. *Fertil Steril.* 1979;31(3):335-9.
- Sou, I.F., Pryce, R.M., Tee, W.W.; McClurg, U.L. Meiosis initiation: a story of two sexes in all creatures great and small. *Biochem J.* 2021;478(20):3791-3805.
- Souter I, Smith KW, Dimitriadis I, Ehrlich S, Williams PL, Calafat AM, Hauser R. The association of bisphenol-A urinary concentrations with antral follicle counts and other measures of ovarian reserve in women undergoing infertility treatments. *Reprod Toxicol.* 2013;42:224-31.
- Srivastava, A.K.; Ali, W.; Singh, R.; Bhui, K.; Tyagi, S.; Al-Khedhairi, A.A.; Srivastava, P.K.; Musarrat, J.; Shukla Y. Mancozeb-induced genotoxicity and apoptosis in cultured human lymphocytes. *Life Sci*, 2012, 90:815–824.
- Stocco, C.; Telleria, C.; Gibori, G. The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. *Endocr Rev.* 2007;28(1):117-49.
- Su, Y.Q.; Sugiura, K.; Eppig, J.J. Mouse oocyte control of granulosa cell development and function: paracrine regulation of cumulus cell metabolism. *Semin Reprod Med.* 2009;27(1):32-42.
- Tatemoto, H.; Sakurai, N.; Muto, N. Protection of porcine oocytes against apoptotic cell death caused by oxidative stress during In vitro maturation: role of cumulus cells. *Biol Reprod* 63: 805–810, 2000.

- Thomas, F.H., Vanderhyden, B.C. Oocyte-granulosa cell interactions during mouse follicular development: regulation of kit ligand expression and its role in oocyte growth. *Reprod Biol Endocrinol.* 2006;4:19
- U.S. EPA/OPP (U.S. Environmental Protection Agency/Office of Pesticide Programs). 2013, Registration Review: Conventional Cases Schedule: 2012-2015. Document dated July 9, 2013. http://www.epa.gov/oppsrrd1/registration_review/schedule.htm.
- Uchiyama, Y.; Shibata, M.; Koike, M.; Yoshimura, K.; Sasaki, M. Autophagy-physiology and pathophysiology. *Histochem Cell Biol*, 2008, 129:407–420.
- Valerón, P.F.; Pestano, J.J.; Luzardo, O.P.; Zumbado, M.L.; Almeida, M.; Boada, L.D. Differential effects exerted on human mammary epithelial cells by environmentally relevant organochlorine pesticides either individually or in combination. *Chem Biol Interact*, 2009; 180(3):485-91.
- Van den Hurk R.; Zhao J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*. 2005, 63:1717-51.
- Van Maele-Fabry, G.; Willems, J.L. Occupation related pesticide exposure and cancer of the prostate: a meta-analysis. *Occup Environ Med*, 2003 Sep; 60(9):634-42.
- Wang, X.; Pepling, M.E. Regulation of Meiotic Prophase One in Mammalian Oocytes. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:667306.
- Wang, Y.; Yu, Z.; Fan, Z.; Fang, Y.; He, L.; Peng, M.; Chen, Y.; Hu, Z.; Zhao, K.; Zhang, H.; Liu, C. Cardiac developmental toxicity and transcriptome analyses of zebrafish (*Danio rerio*) embryos exposed to Mancozeb. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2021, 226:112798.
- Wang, Z.; Kottawatta, K. S. A.; Kodithuwakku, S. P.; Fernando, T.S.; Lee, Y.L.; Ng, E.H.Y.; Yeung, W.S.B.; Lee, K.F. The fungicide Mancozeb reduces spheroid attachment onto endometrial epithelial cells through downregulation of estrogen receptor β and integrin $\beta 3$ in Ishikawa cells. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2021, 208, 111606.
- WHO, 1988. Dithiocarbamates Pesticides Ethylenethiourea, and Propylenethiourea: A General Introduction. *Environ Health Criteria* 78 Geneva. World Health Organization. 17-02.

- WWF Italia, Report Pesticidi salute, 2022. <https://www.wwf.it/uploads/Report-Pesticidi-salute-2022.pdf>
- Wilson N.F.; Snell W.J. Microvilli and cell-cell fusion during fertilization. *Trends Cell Biol*, 1998, 8(3):93-6.
- Winterhager, E.; Kidder, G.M. Gap junction connexins in female reproductive organs: implications for women's reproductive health. *Hum Reprod Update*. 2015;21(3):340-352.
- Yan, C., Wang, P.; DeMayo, J.; DeMayo, F.J.; Elvin, J.A.; Carino, C.; Prasad, S.V.; Skinner, S.S., Dunbar, B.S.; Dube, J.L.; Celeste, A.J.; Matzuk, M.M. Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. *Mol Endocrinol*. 2001;15(6):854-66.
- Yanagimachi, R. Sperm-egg association in animals. *Curr Top Dev Biol*, 1978, 12:83-105.
- Yesildaglar, N.; Yildirim, G.; Attar, R.; Karateke, A.; Ficioglu, C.; Yilmaz, B. Exposure to industrially polluted water resulted in regressed endometriotic lesions and enhanced adhesion formation in a rat endometriosis model: a preliminary study. *Fertil Steril*. 2010;93(5):1722-4.
- Yi, J.; Tang, X.M. Functional implication of autophagy in steroid-secreting cells of the rat. *Anat. Rec*, 1995, 242:137-146.
- Yilmaz, B.; Terekeci, H.; Sandal, S.; Kelestimur F. Endocrine disrupting chemicals: exposure, effects on human health, mechanism of action, models for testing and strategies for prevention. *Rev Endocr Metab Disord*. 2020;21(1):127-147.
- Yurttas, P.; Vitale, A.M.; Fitzhenry, R.J.; Cohen-Gould, L.; Wu, W.; Gossen, J.A.; Coonrod, S.A. Role for PADI6 and the cyto-plasmic lattices in ribosomal storage in oocytes and translational control in the early mouse embryo. *Development*, 2008, 135(15):2627.

