

UNIVERSITA' DI PISA

Facoltà di Medicina e Chirurgia
Scuola di Specializzazione in Farmacologia

Tesi di Specializzazione

Studio del ruolo dell'inositolo nella riproduzione assistita

Relatore

Specializzando

Chiar.mo Prof. Corrado Blandizzi

Dott.ssa Cecilia Monacci

Anno Accademico 2010/2011

INDICE

PARTE GENERALE	4
INOSITOLO: FORME BIOLOGICAMENTE ATTIVE.....	5
METABOLISMO DELL'INOSITOLO	11
BIOSINTESI	11
INCORPORAZIONE NEI FOSFOLIPIDI.....	15
CATABOLISMO	19
FUNZIONI BIOCHIMICHE E FISILOGICHE DELL'INOSITOLO LIBERO	21
ASSUNZIONE DELL'INOSITOLO CON LA DIETA	24
DIGESTIONE E ASSORBIMENTO	24
DIETE DEFICITARIE IN INOSITOLO: CONSEGUENZE IN FEGATO, INTESTINO E POLMONE.....	29
RUOLO NUTRIZIONALE DELL'INOSITOLO NEGLI STATI PATOLOGICI.....	32
DIABETE.....	32
MALATTIE RENALI.....	33
PARTE SPECIALE	35
OBIETTIVO DELLA TESI.....	36
INOSITOLO E SINDROME DELL'OVAIO POLICISTICO.....	37
RUOLO DELL'INOSITOLO NELLA RIPRODUZIONE UMANA.....	46
ORGANI RIPRODUTTIVI MASCHILI.....	46
ORGANI RIPRODUTTIVI FEMMINILI.....	47
SVILUPPO EMBRIONALE E FETALE.....	48
GRAVIDANZA: INTERAZIONE TRA INOSITOLO E GLUCOSIO..	53

NEONATI PREMATURI: SINDROME DA DISTRESS RESPIRATORIO.....	57
FERTILITA' E RIPRODUZIONE ASSISTITA.....	59
EFFETTI DELL' INOSITOLE SULLA RISPOSTA OVARICA E SULLA QUALITA' OVOCITARIA NELLE PAZIENTI CON SINDROME DELL'OVAIO POLICISTICO SOTTOPOSTE A INDUZIONE DELL'OVULAZIONE ED INSEMINAZIONE OVOCITARIA TRAMITE INIEZIONE INTRACITOPLASMATICA DELLO SPERMATOZOO (ICSI).....	67
CONCLUSIONI	71
BIBLIOGRAFIA	72

PARTE GENERALE

INOSITOLO: FORME BIOLOGICAMENTE ATTIVE

L'inositolo o cicloesano-1,2,3,4,5,6-esolo è un polialcool a sei atomi di carbonio con struttura ciclica e con formula $C_6H_{12}O_6$ o $(-CHOH-)_6$. Esso presenta analogie con gli zuccheri, ma non è dotato di proprietà riducenti. E' molto diffuso nell'organismo animale ed entra nella costituzione di alcuni biocomposti del gruppo dei fosfolipidi (inositol-cefaline) (Bruni. 1999) L'inositolo è presente in natura sotto forma di nove possibili isomeri (Fig. 1). Tra questi il mioinositolo è presente in quantità preponderante nei sistemi biologici e rappresenta la forma di primario interesse dal punto di vista biologico e metabolico (Synonyms in PubChem, Synonyms in Commonchemistry.org) (Fig. 2).

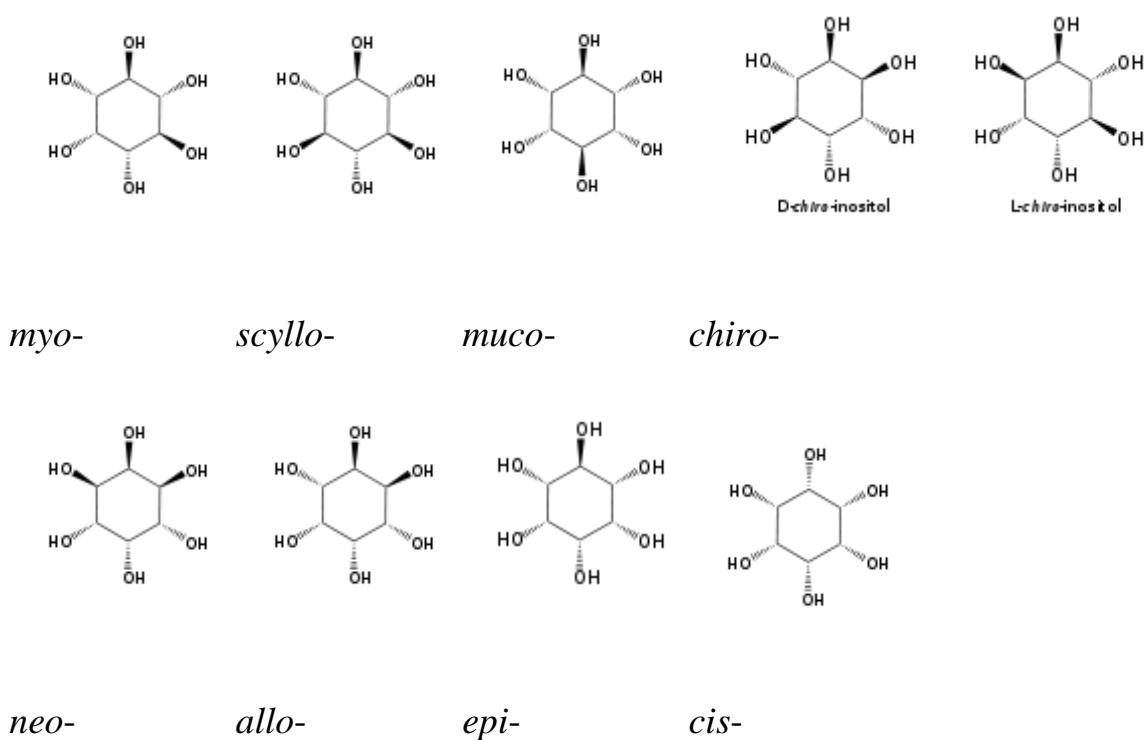


Figura 1. Isomeri dell'inositolo

L'isomero mioinositolo è un meso-composto che quindi risulta otticamente inattivo. Gli altri stereoisomeri sono: *scyllo-*, *muco-*, *D-chiro-* e *neo-inositolo*. Infine gli altri possibili isomeri sono: *allo-*, *epi-*, e *cis-inositolo*. Come si può dedurre dal loro nome, i due *chiro*-inositoli sono l'unica coppia di enantiomeri.

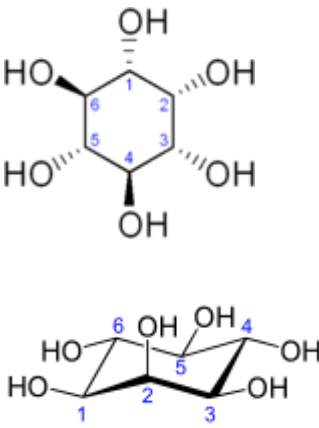
Mioinositolo	
	
Nomenclatura IUPAC	
<i>cis</i> -1,2,3,5- <i>trans</i> -4,6-Cyclohexanehexol	
Proprietà	
Formula Molecolare	$C_6H_{12}O_6$
Peso Molecolare	$180.16 \text{ g mol}^{-1}$
Densità	1.752 g/cm^3
Temperatura di ebollizione	$225\text{-}227 \text{ }^\circ\text{C}$

Figura 2. Proprietà chimico-fisiche del mioinositolo

Il mioinositolo è classificato come un componente del complesso vitaminico B (riferendosi ad esso come B8) ed è sintetizzato dall'organismo. La Fig. 3 mostra la conformazione del mioinositolo.

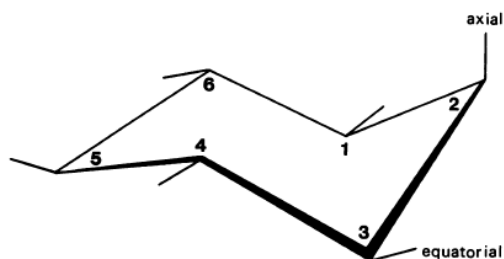


Figura 3. Conformazione del mioinositolo (Parthasarathy & Eisenberg. 1986)

Dalla figura è possibile apprezzare la linea spezzata che collega i centri di ciascun tetraedro e che traccia la forma a sedia caratteristica degli inositoli (Parthasarathy & Eisenberg. 1986).

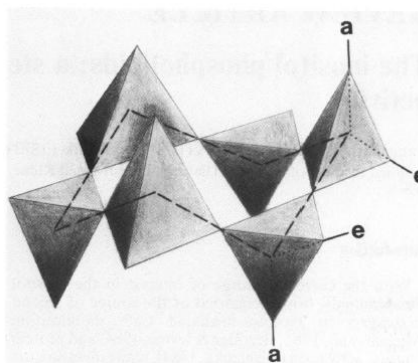


Figura 4. Rappresentazione della forma a sedia degli inositoli (Parthasarathy & Eisenberg. 1986)

Per analizzare la stereochimica del mioinositolo è utile fare riferimento alla Fig. 4, nella quale è possibile osservare il diagramma di una disposizione termodinamicamente favorevole di un anello tetraedrico a sei atomi di carbonio (Parthasarathy & Eisenberg. 1986), che è la struttura base dei cicloesanioli, comunemente noti come inositoli.

Nelle configurazioni “a sedia” non planari, energeticamente favorite, i sostituenti possono disporsi in posizione assiale oppure equatoriale, nella quale sono più stabili: per questo le molecole di inositolo tendono ad avere la conformazione in cui il maggior numero di gruppi OH sono in tale posizione di legame. Uno o più gruppi ossidrilici

possono essere sostituiti da gruppi fosfato, ma i composti con numero di sostituzioni inferiore a sei sono presenti in natura solo come intermedi di reazioni biochimiche o come prodotti di idrolisi.

L'inositolo fa parte dei ciclitoli, che sono poli-idrossi-cicloalcani (Bruni, 1999). La nomenclatura dei ciclitoli è stata per lungo tempo molto imprecisa tanto che solo dal 1977 la commissione internazionale IUPAC-IUB ha attribuito nomi ufficiali ai fosfolipidi contenenti inositolo. Tuttavia, nomi errati di questi fosfolipidi continuano ad apparire su libri di testo e riviste (Parthasarathy & Eisenberg, 1986; Baillargeon & al., 2010).

In natura l'inositolo si trova comunemente nella sua forma libera, legato a fosfolipidi (fosfolipidi di inositolo) e come acido fitico (inositolo esafosfato) (Baillargeon & al., 2010). Il fosfatidilinositolo (PI), fosfolipide nel quale l'inositolo è legato al fosfato, è la principale forma di inositolo presente nelle cellule dei mammiferi e nelle membrane subcellulari. Esso rappresenta il 2-12% dei fosfolipidi totali contenuti nei tessuti dei mammiferi (Baillargeon & al., 2010). È il precursore di importanti composti fosforilati di membrana: fosfatidilinositolo-monofosfati (PI-3-P, PI-4-P [PIP], PI-5-P); fosfatidilinositolo-bifosfati (PI_{3,4}-P₂, PI_{4,5}-P₂ [PIP₂], PI_{3,5}-P₂); fosfatidilinositolo-trifosfato (PI_{3,4,5}-P₃ [PIP₃]). PIP e PIP₂ sono i più abbondanti, dal momento che costituiscono circa il 60% del totale dei fosfatidilinositol-fosfati. PI_{4,5}-trifosfato, un secondo messaggero solubile prodotto dalle fosfolipasi C (PLC), interagisce con varie proteine di membrana modulandone la funzione. I polifosfoinositidi, fosfatidilinositolo 4-fosfato (PIP, difosfoinositide), e fosfatidilinositolo 4,5-bifosfato (PIP₂, trifosfoinositide), sono presenti in tracce in numerosi tessuti, sebbene le loro concentrazioni tendano ad essere più elevate nel sistema nervoso (Baillargeon & al., 2010).

Il mioinositolo, essendo il precursore della sintesi dei fosfoinosidi, costituisce il sistema di trasduzione del segnale del PI che è noto per essere coinvolto nella regolazione di diverse funzioni cellulari, compresa la proliferazione cellulare. Inoltre, numerosi studi hanno suggerito che il mioinositolo svolga un ruolo importante nella crescita, morfogenesi e citogenesi cellulare, nella sintesi dei lipidi e nella struttura delle membrane cellulari (Baillargeon & al., 2010).

Negli ultimi anni è sempre più studiata l'importanza dell'attivazione del ciclo del PI nella trasduzione di diversi tipi di stimolazioni attraverso la membrana plasmatica, che è

attivata in risposta a stimoli ormonali o di altri mediatori e coinvolge un'idrolisi recettore-dipendente di un precursore lipidico dell'inositolo al fine di generare l'1,4,5-trifosfato inositolo (IP₃) (Clements & Darnell. 1980).

Di considerevole interesse risulta l'inositolo sotto forma di fitato, che è un componente comunemente presente in molte piante di uso alimentare, e la cui conformazione chimica è inositolo esakis (diidrogenofosfato). L'acido fitico costituisce la forma più abbondante di fosforo in natura e di inositolo nei semi, ma viene anche accumulato in altri tessuti vegetali e organi quali polline, radici e tuberi (Cosgrove. 1980; Ruby. 1997; Honke & al., 1998). Il fitato costituisce circa il 4-5% del peso secco dei semi e circa il 60-80% delle riserve di fosfato in essi presente. La maggior parte dell'acido fitico presente nei semi è accumulato sotto forma di fitati ed è depositato in inclusioni dei corpi proteici dette globoidi (Lott. 1984; Reddy & al., 1982; Raboy. 1990; Ruby. 1997). Sono disponibili numerosi dati riguardo al contenuto di fitati in diversi prodotti di origine vegetale, che può rappresentare fino al 75% del fosforo totale presente nei semi di cereali (Baillargeon & al., 2010).

In soggetti umani normali a digiuno, la concentrazione plasmatica di inositolo varia tra 10 e 50 µmol/L. E' stato stimato che il latte umano contenga circa 0,6 millimoli al 3°-7° mese di lattazione. E' stato stabilito inoltre che un bambino di 6 mesi, che pesa 7,5 Kg e viene allattato al seno, assume quasi 130 mg di inositolo al giorno (Baillargeon & al., 2010).

Per quanto concerne il mioinositolo, è stato calcolato che, approssimativamente, l'ammontare della quantità di questo composto presente in una dieta da 2500 Kcal di un americano medio sia approssimativamente di 900 mg, dei quali il 56% legato a fosfolipidi (Clements & Reynertson. 1977). Quasi tutto il mioinositolo ingerito (99,8%) è assorbito dal tratto gastrointestinale. Infatti la concentrazione di mioinositolo nel plasma è circa 30 µmol, con un'emivita di 22 minuti (Clements & Reynertson. 1977).

In contrasto con la bassa concentrazione di mio-inositolo nel plasma, la sua concentrazione nel sistema nervoso periferico è molto alta (approssimativamente 3.0 nmi nel ratto) (Greene & al., 1975). Inoltre, anche i livelli di inositolo libero misurati nel cervello, nel liquido cerebrospinale e nel plesso coroideo sono più elevati rispetto al plasma (Baillargeon & al., 2010).

Per quanto riguarda l'apparato riproduttivo maschile, già a partire dagli anni '60 si era a conoscenza degli elevati quantitativi di inositolo libero presenti in questo distretto.

Infatti, concentrazioni elevate sono state misurate nei testicoli e nei fluidi prostatici dell'epididimo e vescicolari (Hinton & al., 1980). Il liquido seminale dei mammiferi è quindi una delle fonti più ricche di inositolo sia libero che legato a fosfolipidi (IP₃), con una concentrazione più elevata rispetto al sangue (Baillargeon & al., 2010; Walensky & Snyder. 1995).

Una delle funzioni importanti che l'IP₃ potrebbe svolgere nell'apparato riproduttivo maschile è la mobilitazione del calcio che, a sua volta, attiva la fusione nucleare delle vescicole in vitro (Sullivan & al., 1993). Di conseguenza, la liberazione del calcio dall'acrosoma potrebbe svolgere un ruolo importante nel promuovere la fusione delle membrane e quindi l'esocitosi (Walensky & Snyder. 1995).

Anche il mioinositolo regola diversi tipi di processi cellulari, modulando la mobilitazione intracellulare del calcio in molteplici sistemi cellulari (Michell & al., 1981; Berridge & Irvine. 1984). Sebbene molti di questi dati derivino da studi condotti su cellule somatiche, si sta accumulando un'evidenza clinica crescente a sostegno del fatto che questi processi siano correlati anche allo sviluppo dei gameti, compresa la maturazione oocitaria e spermatica, la fecondazione e il primo sviluppo embrionale (Baillargeon & al., 2010).

E' stato infine ipotizzato che possa esistere una relazione tra la concentrazione del mioinositolo all'interno del fluido follicolare e la qualità oocitaria, sia poiché i fosfolipidi a base di inositolo (di cui il mioinositolo è precursore) sono ritenuti responsabili di importanti segnali intracellulari essenziali per lo sviluppo degli ovociti, sia perché il mioinositolo sembra migliorare la maturazione in vitro degli ovociti (Baillargeon & al., 2010).

METABOLISMO DELL'INOSITOLO

BIOSINTESI

La famiglia dei fosfolipidi inositolici ha la caratteristica di essere localizzata, a differenza di altri, nello strato profondo della membrana cellulare (lato citoplasmatico), in corrispondenza del quale è chiamata a svolgere importanti funzioni sia come componente di lipidi strutturali, che come molecola coinvolta nella trasmissione di “segnali” biologici (Bolognani & Volpi. 1999).

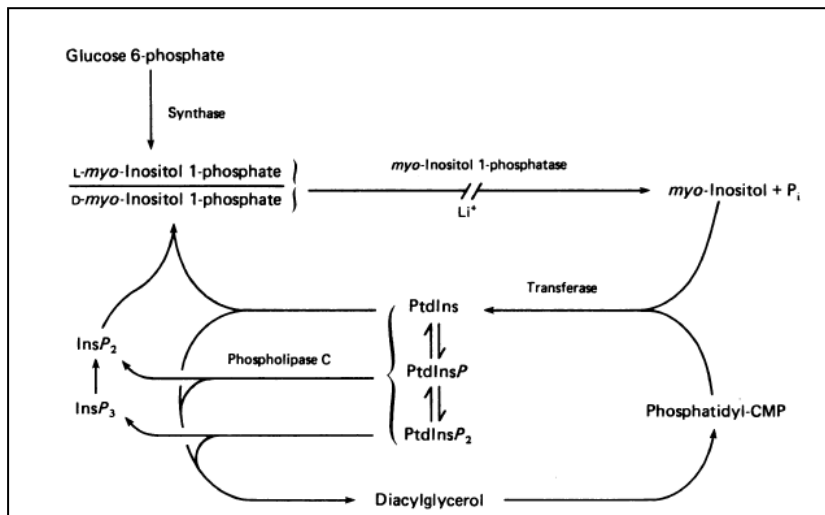


Figura 5. Biosintesi de novo del mioinositolo e ciclo del fosfatidilinositolo (Parthasarathy & Eisenberg. 1986)

In Fig. 5 sono illustrate le due maggiori vie del metabolismo dell'inositolo: la biosintesi irreversibile del mioinositolo libero dal glucosio-6-fosfato (G-6-P) (Eisenberg. 1967), che è la via di maggiore produzione del mioinositolo nell'organismo, ed il ciclo del PI (Agranoff & al., 1958; Paulus & Kennedy. 1960; Hawthorne & al., 1960; Parthasarathy & Eisenberg. 1986). Nel primo caso il mioinositolo è sintetizzato dal glucosio-6-fosfato in due tappe. Inizialmente, il G-6-P è isomerizzato dalla inositolo-3-fosfato sintetasi 1 (ISYNA1) a mioinositolo-1-fosfato, che è poi

defosforilato dalla mioinositolo 1 fosfatasi (IMPasi1) formando il mioinositolo libero (Bolognani & Volpi. 1999).

Nel ciclo del PI, la biogenesi inizia dall'acido fosfatidico, indicato come 1,2-diacilglicerolo-3-fosfato. Questo composto viene trasformato in forma attiva reagendo con CTP (citidin-trifosfato, un composto di natura nucleotidica). Il CTP cede acido citilidico (CMP) e perde pirofosfato. Si forma il CDP-diacilglicerolo. Questo cede il diacilglicerolo fosfato sul mioinositolo: si forma il PI. Questo può essere fosforilato sull'OH dell'inositolo (donatore di ATP) formando il fosfatidilinositolo-4-fosfato (PIP). Un'ulteriore fosforilazione (sempre con ATP) porta alla formazione del PIP₂ (Bolognani & Volpi. 1999). Vari sono i destini di questo composto a seconda delle esigenze funzionali:

- a) un attacco idrolasico lo scinde generando da un lato il diacilglicerolo e dall'altro l'IP₃. Il diacilglicerolo potrà essere fosforilato rigenerando così il diacilglicerolo fosfato (acido fosfatidico). L'inositolo IP₃ potrà seguire un processo di defosforilazione generando prima l'inositolo 1,4 difosfato, poi l'inositolo 1 fosfato ed infine il mioinositolo (Bolognani & Volpi. 1999).
- b) una via diversa "a ritroso" defosforila inizialmente l'IP₃ generando il PIP e, successivamente, un'altra defosforilazione idrolasica porta al PI.

Queste vie metaboliche hanno lo scopo di recuperare, con processo ciclico, le unità fondamentali che portano al fosfatidilglicerolo, e precisamente il diacilglicerolo fosfato da un lato e il mioinositolo dall'altro (Bolognani & Volpi. 1999).

Nonostante il mioinositolo-1-fosfato sia l'intermedio comune alle due vie, sono prodotte due differenti forme di composti: l'enantiomero L dalla via di sintesi e l'enantiomero D dalla via ciclica, che è presente nella maggior parte dei microorganismi (con un idrossile assiale in posizione 2 ed il resto in posizione equatoriale). In ciascuna via il mioinositolo-1-fosfato è l'immediato precursore del mioinositolo libero in una reazione catalizzata dalla specifica mioinositolo-1-fosfatasi (Eisenberg. 1967). Purtroppo, dal momento che si forma un prodotto comune, è praticamente impossibile valutare le relative attività dei due percorsi in vivo (Parthasarathy & Eisenberg. 1986).

Da quando Fisher scoprì il rapporto tra glucosio e inositolo (Hauser & Finelli. 1963; Fischer. 1944-45), è stato osservato che sono in grado di convertire il glucosio in inositolo i lieviti (Charalampous. 1957), le piante (Fernandez & Martinez. 1944) ed i mammiferi (Dughaday & al., 1955; Halliday & Anderson. 1955; Hauser. 1963).

Il pionieristico lavoro di Eisenberg & Bolden (Holub. 1986) e di Eisenberg & Finelli (Hauser & Finelli. 1963) mostra la capacità biosintetica dei testicoli, cervello, rene e fegato di sintetizzare inositolo a partire dal glucosio. Clements & Diethelm (Clements & Diethelm. 1979) hanno valutato la percentuale di biosintesi di inositolo nel rene umano. Il tasso di sintesi endogena di un rene umano normale è stato stimato approssimativamente in 2 g/giorno, con una disponibilità di 4 g al giorno, che è nettamente superiore alla quota ingerita quotidianamente. E' stato anche calcolato che una dieta mista di tipo nord-americano può fornire all'adulto circa 1 g di inositolo al giorno (Baillargeon & al., 2010; Clements & Darnell. 1980). Altri studi hanno suggerito che anche i tessuti extrarenali possono contribuire alla produzione endogena di inositolo (Holub. 1986). Spector e Lorenzo (Spector & Lorenzo. 1975) hanno stimato che circa la metà dell'inositolo non associato a fosfolipidi nel cervello di coniglio viene sintetizzata a partire dal glucosio in situ, mentre il resto è trasportato nel cervello attraverso il sangue. La conversione di glucosio-6-fosfato in inositolo-1-fosfato da parte dell'inositolo sintetasi 1-fosfato, seguita da una reazione di defosforilazione catalizzata dall'inositolo 1-fosfatasi (Eisenberg. 1967), prevede infatti la biosintesi enzimatica di inositolo.

Il rene svolge un importante ruolo nel metabolismo dell'inositolo. Infatti è l'unico organo che lo catabolizza oltreché sintetizzarlo. E' stata inoltre riscontrata una notevole concentrazione di inositolo nella midollare esterna. La coesistenza di una significativa sintesi, catabolizzazione e presenza di un'alta concentrazione di inositolo libero è un fenomeno molto interessante, ma il suo significato biologico rimane purtroppo sconosciuto (Troyer & al., 1986).

Uno studio ha analizzato l'incorporazione di ^{14}C nel mioinositolo libero e legato a fosfolipidi in cervello, fegato e sangue dopo iniezione di glucosio [$^{14}\text{C}_6$] e altre sostanze radioattive in ratti giovani ed adulti (Hauser. 1963). La più alta attività specifica è stata riscontrata per l'inositolo libero plasmatico. Nel cervello, in seguito all'iniezione di [$^{14}\text{C}_6$], è apparsa la radioattività nell'inositolo libero e legato a fosfolipidi in fosfatidi (Hauser. 1963). Nel fegato e nel rene sono presenti sia l'inositolo libero che legato a fosfatidi in presenza di [$^{14}\text{C}_6$], con un'alta concentrazione di inositolo libero (Hauser. 1963).

Questi risultati sono stati confermati da ulteriori studi. Uno tra questi ha analizzato porzioni di rene, cervello e fegato di mammifero, incubate con glucosio marcato, che

hanno mostrato la capacità di utilizzare il carbonio del glucosio per la biosintesi del mioinositolo. E' stato inoltre osservato che il rene incorpora la maggior percentuale della radioattività dell'inositolo libero (Hauser & Finelli. 1963).

Per quanto riguarda altri organi, si è scoperto che nel testicolo esiste un sistema di sintesi dell'inositolo molto attivo che parte dal glucosio e che è stato evidenziato utilizzando il glucosio [^{14}C] (Baillargeon & al., 2010).

E' interessante notare che si trova una scarsa concentrazione di inositolo nei testicoli, dove esiste una grande capacità di sintesi, mentre negli organi con capacità trascurabile di sintesi si tende ad avere maggiori concentrazioni di inositolo. La capacità di sintesi dell'inositolo da parte dell'apparato riproduttivo maschile, ad esempio, è presente in ordine decrescente a partire dai testicoli, epididimo e vescicole seminali, mentre i livelli di inositolo nei tessuti seguono una sequenza inversa e una carenza minima di proteine non altera la biosintesi in questi comparti (Baillargeon & al., 2010).

La biosintesi enzimatica di inositolo, come studiato approfonditamente nei testicoli di topo, coinvolge la conversione del glucosio 6-fosfato a inositolo 1-fosfato da parte dell'inositolo 1-fosfato sintetasi, seguita da una reazione di defosforilazione catalizzata attraverso l'attività dell'inositolo 1-fosfatasi (Baillargeon & al., 2010).

Livelli di glucosio-6-fosfato ciclastasi (mioinositolo 1 fosfato sintetasi) e mioinositolo 1 fosfato fosfatasi sono stati analizzati in testicoli di ratto e, specificatamente, in cellule del Sertoli, cellule germinali ed epididimo. La specifica attività della ciclastasi è risultata approssimativamente 1/10 rispetto a quella della fosfatasi. Tra le cellule del testicolo esaminate, le cellule del Sertoli mostrano la concentrazione enzimatica più alta richiesta per la biosintesi dell'inositolo dal glucosio, mentre gli spermatozoi e gli spermatozoidi non mostrano tale attività. Anche negli spermatozoi dell'epididimo non è stata rilevata alcuna attività di questi enzimi (Robinson & Fritz. 1979). Studiando colture primarie di cellule del Sertoli, mantenute in un medium senza inositolo, è stato osservato che queste liberano inositolo nel medium dopo 24 ore (Robinson & Fritz. 1979). Questi risultati indicano che l'inositolo nei tubuli seminiferi è molto probabilmente generato dalle cellule del Sertoli, che sintetizzano inositolo dal glucosio. Ulteriore inositolo nel fluido dei tubuli seminiferi potrebbe essere generato dal metabolismo del glucosio nelle cellule epiteliali (Robinson & Fritz. 1979).

La sintetasi e la fosfatasi sono state isolate e parzialmente purificate dalla ghiandola mammaria in esperimenti in vivo (Naccarato & al., 1974). Un incremento dell'attività di

entrambi gli enzimi si è registrato nella via di biosintesi dell'inositolo nella ghiandola mammaria, in stretto accordo con il contenuto di inositolo nel latte (Baillargeon & al., 2010). Una concentrazione elevata di mioinositolo-1-fosfato è stata misurata, come intermedio, nella reazione di sintesi (Baillargeon & al., 2010).

INCORPORAZIONE NEI FOSFOLIPIDI

Il fosfatidilinositolo (PI) è un lipide biologicamente molto importante, sia come componente chiave della membrana cellulare che come mediatore essenziale di tutti i processi metabolici delle piante e degli animali, alla cui regolazione partecipa in maniera diretta o tramite suoi metaboliti. Si tratta di un fosfolipide acido (anionico) costituito da una struttura fosfatidica alla quale l'inositolo è collegato tramite il proprio gruppo fosfato (Holub. 1986). In Figura 6 è illustrato l'1-stearoil,2-arachidonil-fosfatidilinositolo, di notevole importanza biologica.

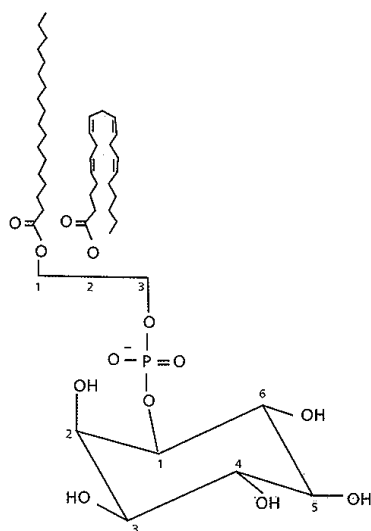


Figura 6. Struttura chimica dell'1-stearoil-2-arachidonil-fosfatidilinositolo (Baillargeon & al., 2010)

Un'ampia analisi delle specie molecolari ha rivelato che l'1-stearoil-2-arachidonil predomina sia nel PI del fegato di ratto (Holub & Kuksis. 1971), del cervello bovino (Holub & al., 1970) e delle piastrine umane (Mahadevappa & Holub. 1982), che nel PIP e PIP2 (Holub & al., 1970) del cervello bovino (Tab. 1).

Phospholipid	Source	Mol % of phospholipid	Ref.
Phosphatidylinositol	rat liver	77	102
Phosphatidylcholine	rat liver	21	102
Phosphatidylethanolamine	rat liver	35	102
Phosphatidylinositol	bovine brain	60	105
Phosphatidylinositol 4-phosphate	bovine brain	43	105
Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate	bovine brain	42	105
Phosphatidylinositol	human platelets	71	145
Phosphatidylcholine	human platelets	10	145
Phosphatidylethanolamine	human platelets	47	145
Phosphatidylserine	human platelets	41	145

Tabella 1. Livelli tissutali di 1-stearoil,2-arachidonil-fosfatidilinositolo (Holub. 1986)

Studi in vivo hanno evidenziato che l'inositolo radiomarcato viene prontamente incorporato nei lipidi in tutti gli organi animali studiati, dando origine appunto ai composti a base di PI.

Tra i composti derivati dal PI importanza notevole ricopre il PIP₂ (Fig. 7) che viene sintetizzato a partire dal fosfato inorganico, e che è stato studiato mediante marcatura radioattiva del fosfato [³²P].

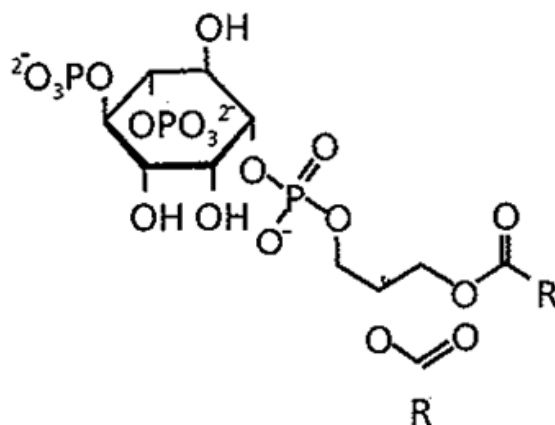


Figura 7. Fosfatidilinositolo 4,5-bifosfato (Baillargeon & al., 2010)

I due meccanismi biochimici (Fig. 8) noti, tramite i quali l'inositolo può legarsi ai lipidi formando il PI tissutale, sono i seguenti:

- l'inositolo libero può entrare nella biosintesi “de novo” del PI per reazione con il liponucleotide, citosina 5'-difosfato diacilglicerolo (CDP diacilglicerolo), in presenza dell'enzima CDP-diacilglicerolinositol fosfatidiltransferasi (Paulus & Kennedy. 1960). Questo enzima, che risiede principalmente nella frazione microsomiale, è stato solubilizzato e purificato da cervello e fegato di ratto (Rao & Strickland. 1974; Takenawa & Egawa. 1977). Recentemente Ghalayini &

Eichberg (Ghalayini & Eichberg. 1985) lo hanno purificato anche da omogenato del cervello del ratto;

- in alternativa, l'inositolo libero può reagire con i fosfolipidi endogeni e diventare PI grazie alla stimolazione da parte del Mn^{2+} , all'interno dei microsomi epatici (Holub. 1974; Paulus & Kennedy. 1960). La reazione di scambio viene accelerata aggiungendo citosina 5'-trifosfato (CTP) oppure CDP-colina.

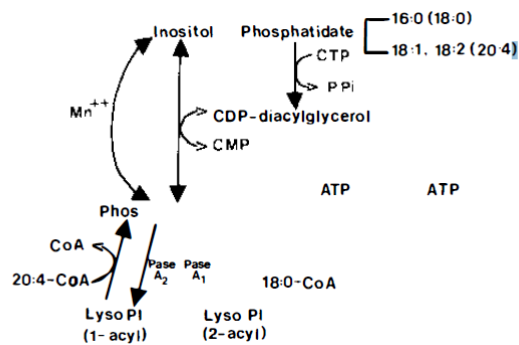


Figura 8. Vie metaboliche per l'incorporazione del mioinositolo nei fosfoinositidi (Holub. 1986)

Esperimenti in vivo e in vitro, basati sull'impiego di [³H]inositolo, hanno suggerito che in condizioni fisiologiche la maggior parte di inositolo libero entri nel PI epatico attraverso la via CDP-diacylglicerolinositol fosfatidiltransferasi e non tramite il Mn^{2+} . Un esempio è rappresentato da studi effettuati sull'enzima attivo nella reazione di scambio, parzialmente purificato dal fegato di ratto (Takenawa & Egawa. 1980), che hanno indicato che i fosfolipidi contenenti colina e etanolamina non svolgono un ruolo come accettori per l'enzima di scambio. Infatti la k_m apparente per l'incorporazione di inositolo libero in PI, stimolata da Mn^{2+} , nei microsomi di fegato di ratto, per la reazione di scambio è risultata pari a di 0,024 mm (Holub. 1974), e quindi prossima al valore di 0,04 mm della K_m caratteristica dell'enzima di scambio parzialmente purificato (Takenawa & Egawa. 1980).

In presenza di citosina 5'-monofosfato (CMP), la PI sintetasi può operare in direzione inversa, formando CDP-diacylglicerolo e inositolo a partire dal PI (Baker & Chang. 1985; Bleasdale & al., 1979; Hokin-Neaverson & al., 1977). In molti tessuti, il PI viene convertito attraverso fosforilazione in fosfoinositidi che si trovano come costituenti minori nel pool fosfolipidico cellulare. La formazione di difosfoinositide e

trifosfoinositide viene catalizzata da ATP: PI 4-fosfotransferasi (Cooper & Hawthorne. 1976). Alcuni studi hanno rilevato che gli enzimi coinvolti nel metabolismo del polifosfoinositide sono stati localizzati sulla superficie citoplasmatica nella membrana degli eritrociti umani (Garrett & Redman. 1975). Inoltre, il PI sintetizzato nel reticolo endoplasmatico di cellule eucariotiche può essere trasferito ad altre membrane cellulari dalle proteine di scambio del PI che risiedono nel citoplasma (Baillargeon & al., 2010). Per quanto concerne la distribuzione di PI nel versante citoplasmatico del reticolo endoplasmatico, essa è molto limitata, e circa l'85% risulta localizzata sul versante luminale.

Alcuni studi hanno dimostrato che le fosfomonoesterasi (fosfatasi) (Dawson & Thompson. 1964; Mack & Palmer. 1984; Smith & Wells. 1984) possono idrolizzare il PI 4,5-bisfosfato (PIP_2) e il PI 4-fosfato (PIP) cedendo PIP e PI, rispettivamente. Le composizioni e distribuzioni del PI, PIP e PIP_2 negli acidi grassi sono piuttosto singolari rispetto agli altri fosfolipidi contenuti nella maggior parte dei tessuti e cellule di mammifero che tendono ad essere più ricchi di acido stearico e arachidonico (Holub. 1978; Holub & al., 1970).

Le specie molecolari di PI che si formano nel fegato e nel cervello attraverso una sintesi "de novo" dalla reazione di inositolo con CDP-diacilglicerolo non possono essere stimate per la grande quantità di acido arachidonico legato al PI in questi tessuti. E' stato valutato che approssimativamente metà dell'arachidonato legato al PI epatico derivi dal CDP-diacilglicerolinositol fosfatidiltransferasi, mentre l'altra può avere origine dall'acilazione di 1-acil-sn-glicero-3- fosforilinositolo (Andersen & Holub. 1976; Holub & al., 1970; Thompson. 1969).

CATABOLISMO

L'inositolo è stato identificato come un importante costituente nella dieta e regolatore della fisiologia cellulare. Le funzioni biochimiche del PI nelle membrane cellulari comprendono la regolazione delle risposte cellulari agli stimoli esterni. Nei mammiferi l'inositolo esiste, come già detto, sia in forma fosforilata che libera. Il catabolismo del PI può avvenire attraverso deacilazione catalizzata da fosfolipasi che produce glicerofosforilinositolo, oppure da fosfolipasi C che rilascia inositolo 1,2-ciclofosfato oppure inositolo 1-fosfato. Gli enzimi presenti nei tessuti dei mammiferi sono responsabili del rilascio di inositolo monofosfato e inositolo libero da glicerilfosforilinositolo e dell'idrolisi di inositolo 1,2-ciclofosfato a inositolo 1-fosfato. Inoltre, in alcuni tessuti dei mammiferi sono presenti entrambe le forme, solubile e particolata, di fosfodiesterasi che degradano il trifosfoinositide e il difosfoinositide a 1,2-diacilglicerolo libero con rilascio rispettivamente di IP₃ e inositolo difosfato. Il prodotto finale di ciascuna via è l'inositolo, che è successivamente 'riciclato' come componente del PI (Colodny & al., 1998).

Negli animali, la prima importante tappa del metabolismo dell'inositolo si svolge esclusivamente nel rene e coinvolge la scissione dell'anello per produrre acido D-glucuronico (Howar & Anderson. 1967). Attraverso successivi passaggi metabolici viene prodotto il D-xilosio-5-fosfato che entra nel ciclo dei pentoso fosfati. L'inositolo disponibile viene quindi convertito in D-glucosio e D-glucuronolattone, oppure completamente ossidato a CO₂ e acqua (Howard & Anderson., 1967; Stetten & Stetten. 1946; Baillargeon & al., 2010). Inizialmente si riteneva che il rene non fosse l'unico organo preposto al catabolismo dell'inositolo, ma che in altre sedi esistesse un processo catabolico di trasformazione di inositolo a CO₂ respiratoria (Baillargeon & al., 2010).

Il primo studio di Howard & Anderson (Howard & Anderson. 1967) ha suggerito che il rene fosse l'unico organo importante per il catabolismo dell'inositolo, dal momento che il [2-¹⁴C inositolo] non veniva degradato a ¹⁴CO₂ respiratorio in ratti nefrectomizzati. A conferma dei risultati di questo primo studio, Lewin e colleghi (Lewin & al., 1976) hanno osservato che ratti nefrectomizzati bilateralmente sono sostanzialmente incapaci di convertire inositolo in CO₂ in confronto ai controlli, che catabolizzano il 16% dell'inositolo [2-¹⁴C] in 5 ore in ¹⁴CO₂. Poiché meno dell'1% dell'inositolo radioattivo somministrato è stato eliminato nelle urine, il catabolismo

dell'inositolo da parte del rene è risultato quantitativamente più significativo della sua escrezione urinaria (Clements & Diethelm. 1979).

E' stato osservato che omogenati di rene di topo siano in grado di convertire almeno 4,7 μmoli di mioinositolo-2- ^{14}C in $^{14}\text{CO}_2/\text{mg}$ di tessuto all'ora alla concentrazione di 12 mM o più (nel mezzo di incubazione). Questi risultati sono stati ottenuti con omogenati, ma i valori calcolati sono probabilmente inferiori rispetto alla reale capacità catabolica del tessuto. La corteccia, la midollare e i tubuli renali della corteccia forniscono circa le stesse percentuali (attraverso la via dell'acido glucuronico e il ciclo dei pentoso-fosfati) (Baillargeon & al., 2010)

I valori stimati indicano che, in una dieta giornaliera media, come già anticipato, il rene di ratto può catabolizzare tutto l'inositolo ingerito (Colodny & al., 1998). Infatti il catabolismo renale dell'inositolo è risultato più significativo della sua escrezione urinaria. E' chiaro perciò che il rene sia verosimilmente il regolatore primario della concentrazione di inositolo plasmatico nell'uomo (Baillargeon & al., 1986).

FUNZIONI BIOCHIMICHE E FISIOLOGICHE DELL'INOSITOLO LIBERO

Negli ultimi anni, si è sviluppato un considerevole interesse per le possibili funzioni cellulari dell'inositolo libero, dato che esso, in molti tessuti, è presente in concentrazione superiore rispetto all'inositolo legato a fosfolipidi.

Gli organi riproduttivi maschili sono particolarmente ricchi di inositolo libero (Eisenberg & Bolden. 1964). Sono state riscontrate infatti concentrazioni elevate di questo composto nel testicolo, nell'epididimo e nei fluidi prostatici del ratto (Ghafoorunissa. 1975., Lewin & Beer. 1973; Voglmayr & Amann. 1973; Hinton & al., 1980). Alcuni studi hanno dimostrato inoltre che l'inositolo presente nel fluido seminale sia sintetizzato nel testicolo a partire dal glucosio ematico (Voglmayr & Amann. 1973). Il liquido seminale dei mammiferi è quindi una fonte ricca di inositolo libero e, a conferma di quanto asserito, il plasma seminale mostra concentrazioni molto maggiori rispetto al sangue (Holub. 1986, Ghafoorunissa. 1975.). L'epididimo in particolare possiede una concentrazione di inositolo superiore a quella rilevata nei testicoli.

Sulla base delle osservazioni suddette è stato ipotizzato che l'inositolo possa svolgere un ruolo importante nella maturazione degli spermatozoi e nella loro migrazione dall'epididimo (Voglmayr & Amann. 1973; Eisenberg. 1967). Studi recenti affermano che la concentrazione di inositolo nel fluido testicolare dell'ariete sia positivamente correlato con l'attività di spermatogenesi (Setchell & al., 1971). Inoltre, poiché è stato dimostrato che l'inositolo può essere sintetizzato in vitro dagli spermatozoi testicolari (Voglmayr & White. 1971), è stato ipotizzato che la maggior parte dell'inositolo testicolare si formi all'interno dei tubuli seminiferi. La presenza di un sistema enzimatico attivo per la sintesi di inositolo nei tubuli seminiferi suggerisce che la sintesi de novo di questo composto potrebbe riflettere una richiesta metabolica per la normale progressione della spermatogenesi (Morris & Collins. 1971). La biosintesi di inositolo a partire da D-glucosio è stata misurata nei testicoli di ratti criptorchidi e trattati con trietilenemelamina (TEM), evidenziando che una riduzione significativa della biosintesi di inositolo è accompagnata dalla scomparsa di spermatidi e spermatozoi sia negli animali criptorchidi che TEM-trattati (Morris & Collins. 1971).

La traslocazione dei testicoli nella cavità addominale e il trattamento con TEM rappresentano due modi di alterare, in modo prevedibile, la popolazione cellulare del

testicolo. I risultati derivati dal criptorchidismo artificiale mostrano una rapida perdita di spermatozoi e spermatidi (Niemi & Korman. 1965), mentre la somministrazione di TEM causa una perdita iniziale di spermatogoni di tipo A, seguita da una graduale deplezione di spermatociti, spermatidi e spermatozoi (Steinberger. 1962).

Esiste quindi la possibilità che la biosintesi di inositolo possa essere essenziale per il normale metabolismo dell'epitelio germinale. Studi su disturbi metabolici indotti nella linea cellulare KB, coltivata in un mezzo con carenza di inositolo, suggeriscono una possibile funzione metabolica dell'inositolo nei tessuti dei mammiferi. In queste condizioni, la sintesi di precursori di acidi nucleici diminuisce significativamente (Charalampous & al., 1961; Tsukagoshi & al., 1966; Lembach & Charalampous. 1966), così come si riduce l'assorbimento di amminoacidi precursori per la biosintesi delle proteine e degli acidi nucleici (Lembach & Charalampous. 1967a; Lembach & Charalampous. 1967b). La richiesta metabolica di precursori del DNA ed RNA potrebbe quindi essere particolarmente importante nella proliferazione dell'epitelio germinale, ed inoltre, la sintesi de novo di inositolo potrebbe rendersi necessaria per mantenere adeguati i livelli intracellulari di questi precursori essenziali per il mantenimento dell'integrità nelle cellule epiteliali adulte (Morris & Collins. 1971). A sostegno di queste affermazioni, alcuni dati mostrano che concentrazioni elevate di mioinositolo sono importanti anche per l'osmoregolazione dell'epitelio seminifero (Chauvin & Griswold. 2004).

E' stato ipotizzato che il mioinositolo possa essere sintetizzato anche dalle cellule del Sertoli allo scopo di creare lo speciale microambiente nel tubulo seminifero che è indispensabile per lo sviluppo della cellula germinale. Robinson & Fritz hanno infatti dimostrato che le cellule del Sertoli, oltre a possedere l'enzima necessario per la biosintesi del mioinositolo a partire dal glucosio, sono anche capaci di produrre inositolo (Robinson & Fritz. 1979).

In merito agli enzimi deputati alla sintesi di inositolo, si ritiene che le cellule del Sertoli siano le principali responsabili della produzione intratesticolare. Elevati livelli di sintetasi e fosfatasi sono presenti nelle cellule epididimarie, capaci di sintetizzare inositolo in maniera dipendente da glucosio 6-fosfato (Robinson & Fritz. 1979).

I livelli intracellulari relativamente elevati di inositolo libero, riscontrati nel tessuto nervoso, che è ricco di microtubuli, suggeriscono un ruolo per questa sostanza nel controllo degli stati funzionali dei microtubuli. La struttura dell'assonema, saldamente

conservata durante la filogenesi, è caratterizzata da nove coppie esterne di microtubuli che circondano una coppia interna composta da dimeri di tubulina, determinando la cosiddetta configurazione 9+2. Da ciascuna coppia di microtubuli esterni si proiettano, all'interno e all'esterno, le molecole di dineina che interagiscono con le coppie adiacenti per produrre un avvolgimento del cilio. E' stato osservato un legame preferenziale dell'inositolo per la stabilizzazione di oligomeri formanti la tubulina e una funzione protettiva dei microtubuli da parte dell'inositolo contro la depolimerizzazione indotta dal freddo e dal caldo. L'inositolo serve quindi a stabilizzare sia i microtubuli che le specie oligomeriche intermedie di tubulina, con le quali si trova in equilibrio dinamico (Kirazov & Lagnado. 1977).

ASSUNZIONE DELL'INOSITOLO CON LA DIETA

DIGESTIONE E ASSORBIMENTO

L'inositolo è presente nei prodotti alimentari di origine vegetale sotto forma di fitato (Baillargeon & al., 2010) e si trova in molti alimenti: in particolare nei cereali, nelle noci, nella frutta e specialmente in meloni ed arance (Clements & Darnell. 1980; Salway. 2004). Sono anche disponibili dati relativi al contenuto di inositolo in prodotti di origine animale come carne, pollame, pesci e latticini (Clements & Darnell. 1980; Salway. 2004).

Sono stati identificati molti enzimi rilevanti per la biosintesi dell'acido fitico e i geni che li codificano (Shi & al., 2005; Shi & al., 2003; Hitz & al., 2002). La biosintesi dell'acido fitico è principalmente citoplasmatica ed avviene a partire dall'inositolo attraverso una serie di passaggi fosforilativi. La degradazione avviene durante la germinazione del seme ad opera di uno specifico gruppo di enzimi denominati fitasi (Loewus & Murthy. 2000).

Le fitasi (mioinositolo esafosfato fosfoidrolasi) sono enzimi in grado di idrolizzare l'acido fitico formando intermedi fosforilati dell'inositolo e fosfato inorganico; sono inoltre in grado di rilasciare i metalli divalenti chelati dal fitato. Le fitasi sono enzimi ampiamente diffusi in natura. Esse sono state infatti identificate in piante, microrganismi, e in alcuni tessuti animali come il sangue di uccelli, rettili e pesci (Rapoport & al., 1941) e nell'intestino tenue dei topi (Yang & al., 1991). Tra le fitasi vegetali isolate e caratterizzate vi sono quelle di frumento, grano, riso, avena, orzo, mais, soia, lupini e pomodoro (Nakano & al., 2000; Konietzny & al., 1995; Greiner & al., 1998; Greiner & Alminger. 1999; Greiner & al., 2000; Laboure & al., 1993; Hegeman & Grabau. 2001; Greiner. 2002; Li & al., 1997).

Gli animali poligastrici sono in grado di metabolizzare il fitato grazie ai microrganismi del rumine che posseggono gli enzimi atti alla sua degradazione ovvero le fitasi. Diversamente, gli animali monogastrici quali polli, maiali e pesci, nei quali l'attività fitasica nel tratto digerente è limitata o quasi assente, non sono in grado di utilizzare il fitato come fonte di fosfato (Maenz & Classen. 1998; Boiling & al., 2000).

Non è ancora stato stabilito quale sia la quantità di fitati che, assunti con la dieta, possano essere assorbiti direttamente, oppure se siano i polifosfati dell'inositolo, prodotti dall'attività dell'enzima fitasi e presenti a livello intestinale, ad entrare nel circolo plasmatico (Baillargeon & al., 2010).

Numerosi studi hanno evidenziato che la somministrazione di acido fitico alimentare può ridurre la biodisponibilità e la conseguente utilizzazione di calcio (Holub. 1986). Nahapetian & Young (Nahapetian & Young. 1980) hanno confrontato l'effetto causato dall'assunzione di basse ed alte dosi di calcio in ratti ai quali erano state somministrate dosi orali di fitato [^{14}C] o inositolo [^{14}C]. I risultati mostrano che una dieta ricca di calcio, in seguito alla somministrazione di fitati [^{14}C], influenza significativamente la perdita della radioattività nelle feci e la riduzione della comparsa della radioattività nell'aria espirata e nei tessuti. Invece, per quanto riguarda l'assunzione di [^{14}C] inositolo, alte dosi di calcio non ne hanno influenzato la diminuzione della radioattività. Gli autori hanno inoltre ipotizzato che i fitati o i loro derivati siano quasi completamente assorbiti nel caso in cui l'assunzione di calcio sia bassa (Holub. 1986).

Per quanto concerne l'assorbimento dell'inositolo libero a livello intestinale, studi su segmenti di intestino tenue di criceto (Caspary & Crane. 1970.) hanno mostrato che esso dipende da un trasporto attivo. La captazione e l'accumulo avvengono secondo un gradiente di concentrazione negativo e sono dipendenti dall'energia e dalla concentrazione di Na^+ e mostrano saturazione cinetica (Hauser. 1969; Takenawa & al., 1986).

Il mioinositolo favorisce il ripristino dell'osmolarità in tessuti specifici, come nel cervello e nella midollare renale, dove variazioni possono alterare la normale funzionalità cellulare. In risposta ad un aumento dell'osmolarità, la concentrazione intracellulare di mioinositolo potrebbe aumentare di 500 volte rispetto a quella plasmatica (Clements & Diethelm. 1979; Dawson & Freinkel. 1961; Dolhofer & Wieland. 1987), prevenendo in questo modo gli effetti negativi causati dall'accumulo di alte concentrazioni ioniche, come la degradazione del DNA (Dmitrieva & Burg, 2007). Studi sul cervello hanno mostrato un incremento dei livelli di mioinositolo in seguito ad eventi come traumi (Pascual & al., 2007), edemi e ipersodiemie (Lien & al., 1991; Malo & Berteloot. 1991), confermando quanto sopra discusso e dimostrando che, per

raggiungere concentrazioni così elevate di mioinositolo, è richiesto un trasporto secondario attivo (Aouameur & al., 2007).

Sono stati identificati tre sistemi di cotrasportatori del mioinositolo: due sono sodio-dipendenti (SMIT1 e SMIT2), mentre il terzo è protone-dipendente (HMIT) (Wood & Trayhurn. 2003). SMIT1, il primo trasportatore di mioinositolo ad essere identificato, è espresso principalmente nel cervello e nella midollare renale (Kwon & al., 1992). Nel rene, questa proteina è localizzata a livello delle membrane basolaterali delle cellule epiteliali (Bissonnette & al., 2004; Yamauchi & al., 1991) e la sua attività è strettamente regolata dalle variazioni osmotiche (Handler & Kwon. 1993; Ibsen & Strange. 1996).

Sebbene molti tessuti animali ed alimenti siano ricchi di fosfolipidi contenenti inositolo, la modalità di digestione e assorbimento del PI non sono note. Si ritiene, comunque che questi processi siano in parte mediati da un meccanismo analogo a quello proposto per la fosfatidilcolina (Baillargeon & al., 2010).

L'esistenza di un sistema specifico di trasporto per il mioinositolo è stato dimostrato in modelli sperimentali di membrane plasmatiche ottenute dal rene e intestino di ratto, dotati di cellule con orletto a spazzola (Takenawa & Tsumita. 1974a,b; Scalera & al., 1991). E' stato dimostrato che il mioinositolo è trasportato nelle vescicole tramite un processo attivo secondario, che utilizza specificamente il gradiente di sodio come forza trainante (Scalera & al., 1991; Takenawa & al., 1977).

L'assorbimento di inositolo da parte della membrana cellulare è risultato dipendente dalla temperatura, sensibile al pH, ed inibito dalla florizina (Scalera & al., 1991). La florizina interagisce competitivamente con l'inositolo il quale si lega con un'affinità 10-100 volte inferiore con il sito del glucosio, suggerendo che il percorso attraverso il quale l'inositolo attraversa l'orletto a spazzola della membrana cellulare non sia esattamente lo stesso del D-glucosio. I risultati hanno anche dimostrato che l'assorbimento di inositolo è dovuto all'entrata negli spazi intravescicolari piuttosto che al legame con la membrana. Studi successivi hanno evidenziato che sia il legame che il trasporto di inositolo attraverso il bordo a spazzola delle membrane del rene di topo dipende dalla concentrazione di sodio (Scalera & al., 1991).

Nonostante il fatto che una parte considerevole dell'inositolo ingerito venga convertita in PI, pochi studi hanno analizzato la sua digestione e assorbimento (Holub. 1986). Se il meccanismo per la digestione del PI fosse analogo a quello della

fosfatidilcolina esogena (Le Kim & Betzing. 1976), il PI esogeno potrebbe essere idrolizzato nel lume intestinale da una fosfolipasi A pancreatica (Holub. 1986), portando alla formazione di liso-fosfatidilinositolo, che sarebbe quindi riacilato attraverso l'aciltransferasi, oppure ulteriormente idrolizzato (con conseguente formazione di glicosfingolipidi) e assorbito dalla mucosa (Akiba & Sato. 2004; Kim & al., 2008; Holub. 1986). L'inositolo libero viene trasportato nel plasma umano ad una concentrazione di circa 29 μM (Holub. 1986; Holub. 1984). Studiando l'assorbimento in vivo di inositolo radioattivo (Lewin & al., 1976), dopo iniezione intraperitoneale, in alcuni organi di soggetti maschi nefrectomizzati, cinque ore dopo l'iniezione, è stato osservato che il fegato e il rene contenevano rispettivamente il 10 e l'8% della dose somministrata; il 16% era stato eliminato con la CO_2 espirata e meno dell'1% con le urine (Holub. 1986). Il fegato, la milza, l'ipofisi, il rene e, in modo particolare, la tiroide e i testicoli, sono gli organi in cui l'inositolo marcato si accumula in concentrazione maggiore (Holub. 1986). I vasi deferenti, l'epididimo, le vescicole seminali e la prostata accumulano concentrazioni di inositolo marcato dal 8 a 28 volte superiori a quelle riscontrate nel plasma (Holub. 1986). La concentrazione di inositolo marcato riscontrata nel cervello risulta solo moderatamente più elevata di quella plasmatica, suggerendo una limitata capacità di trasferimento di inositolo dal sangue al cervello (Shetty & al., 1996; Folch & Woolley. 1942; Holub. 1986).

Nella maggior parte degli organi, la maggiore quantità di inositolo radioattivo è stato trovato sotto forma di acido tricloroacetico solubile, al contrario del fegato dove la maggiore radioattività era associata a inositolo lipidico. Nell'acido tricloroacetico estratto da tutti gli organi studiati, la quantità di inositolo radioattivo, sotto forma di inositolo libero, è di gran lunga superiore a quella dei suoi metaboliti (Lewin & Sulimovici. 1975; Baillargeon & al., 2010). L'inositolo radioattivo è stato ritrovato soprattutto nei testicoli, nella prostata e nelle vescicole seminali, legato in particolare a microsomi e mitocondri (Lewin & Sulimovici. 1975).

L'assorbimento di inositolo è stato ampiamente studiato anche nel cervello dei mammiferi, poiché in questo distretto l'inositolo è presente a elevata concentrazione. Tramite esperimenti in vivo è stato stimato che approssimativamente metà dell'inositolo libero nel cervello del coniglio proviene dall'inositolo plasmatico attraverso un sistema di trasporto saturo. Il plesso coroideo è stato considerato come il sistema più importante per il trasporto di inositolo dal plasma al fluido cerebrospinale. Spector (Spector. 1976),

usando sezioni isolate di cervello, ha evidenziato un sistema saturabile di assorbimento per l'inositolo che è stato considerato come un sistema di trasporto attivo, potenzialmente in grado di spiegare la notevole differenza di concentrazione dell'inositolo tra cervello e liquido cerebrospinale.

Al contrario, Warfield & al. (Warfield & al., 1978) hanno dimostrato che l'assorbimento di inositolo dai sinaptosomi al cervello avviene attraverso processi non saturabili. Il sistema di assorbimento evidenziato nelle diverse parti del cervello può riflettere una specifica differenza di assorbimento nelle diverse regioni cerebrali oltre che nei neuroni (Holub. 1986).

DIETE DEFICITARIE IN INOSITOLO: CONSEGUENZE IN FEGATO, INTESTINO E POLMONE

Burton & al. (Burton & al., 1976) hanno studiato gli effetti che diete deficitarie di inositolo (I.D.D.) causano sui tessuti di ratti neonati e in via di sviluppo. Il livello di inositolo libero in tutti i tessuti studiati (testicoli, fegato, plasma, cuore, cristallino, polmoni, reni e intestino tenue), con l'eccezione del cervello e del cervelletto, è risultato notevolmente ridotto nei ratti alimentati con I.D.D., rispetto ai controlli. Il fegato, inoltre, è stato l'unico tessuto nel quale il livello di inositolo presente nei fosfolipidi risultava minore rispetto ai livelli di inositolo libero.

Burton & Wells (Burton & Wells. 1976) hanno studiato anche l'effetto causato dalla carenza di inositolo sul livello del ciclitolo, sia in circolo che nei tessuti, nella prole fetale e postnatale, osservando una stretta correlazione tra il contenuto di inositolo libero nella dieta e nel latte. All'ottavo giorno di allattamento, i livelli di inositolo liberi, nella ghiandola mammaria e nel latte, sono risultati molto più elevati negli animali ai quali veniva somministrata la dieta completa di inositolo rispetto a quelli alimentati con la dieta carente. Inoltre, i livelli di inositolo libero nel plasma, fegato, reni ed intestino dei controlli aumentavano significativamente. Chu & Geyer (Chu & Geyer. 1983), utilizzando il gerbillo femmina come modello sperimentale, hanno evidenziato che gli animali alimentati con I.D.D. per tre settimane mostrano diminuzioni significative, nell'intestino e nel fegato, sia dei livelli di inositolo libero che legato a fosfolipidi. Rene e pancreas mostrano solo una diminuzione di inositolo libero dello 0,1% rispetto ai controlli, e per quanto riguarda il cervello non è stata rilevata alcuna differenza. Somministrazioni orali di inositolo possono altresì aumentare, in modo significativo, le concentrazioni plasmatiche di inositolo nei soggetti umani (Clements & Reynertson. 1977), nonostante la capacità di alcuni tessuti di sintetizzare questo ciclitolo. Sarebbe interessante conoscere gli effetti che i livelli di inositolo esogeno esercitano sulle concentrazioni e composizioni molecolari dei polifosfoinositidi (PIP e PIP₂) in tessuti e cellule dei mammiferi, e sul loro turnover in seguito a stimolazione cellulare. Tuttavia, non sono ancora disponibili molti studi in merito (Holub. 1986).

Gavin & McHenry (Gavin & McHenry. 1941) hanno ipotizzato che l'inositolo possa essere un fattore lipotropo, e a questo riguardo Hayashi e colleghi (Hayashi & al., 1974) hanno studiato gli effetti di una dieta carente di inositolo, ma contenente ftalilsulfatazolo, che ha determinato una risposta inositolo-mediata con accumulo di triacilgliceroli nel fegato di ratto. Uno studio successivo (Andersen & Holub. 1976) ha mostrato che nel ratto una dieta ricca di trigliceridi può influenzare la funzionalità lipotropa dell'inositolo esogeno, con una correlazione non direttamente legata al grado di saturazione dell'acido grasso. Burton & Wells (Burton & Wells. 1976), impiegando ratti in fase di allattamento come modello animale, hanno osservato che le femmine alimentate con I.D.D sviluppano una grave steatosi epatica che può essere migliorata somministrando inositolo o interrompendo l'allattamento.

Nel corso degli ultimi anni l'attenzione di alcuni ricercatori si è focalizzata sullo studio delle basi metaboliche che causano l'accumulo dei triacilgliceroli nel fegato di animali alimentati con I.D.D. I primi lavori di Hasan e colleghi (Hasan & al., 1970; Hasan & al., 1974a) hanno suggerito che il trasporto delle lipoproteine contenenti triacilglicerolo dal fegato al plasma sia ostacolato dalla mancanza di inositolo, il quale, se presente, promuove la sintesi del PI, con conseguente aumento della sintesi e secrezione delle lipoproteine nel fegato.

Poiché l'attività degli enzimi lipogenici del fegato di ratto subisce notevoli alterazioni in conseguenza delle modificazioni nutrizionali, Beach e Flick (Beach & Flick. 1982) hanno studiato l'effetto di I.D.D (Hayashi & al., 1974) sulle attività dell'acido grasso sintetasi e acetil-CoA carbossilasi. Le attività specifiche di questi due enzimi risultano raddoppiate nel gruppo alimentato con I.D.D rispetto ai controlli entro 3-4 giorni dalla somministrazione delle diete sperimentali. Questi autori hanno inoltre suggerito che la lipodistrofia epatica, osservata negli animali alimentati con I.D.D, possa essere in gran parte dovuta all'aumento della concentrazione degli enzimi lipogenici durante le prime fasi dello sviluppo. Il relativo contributo quantitativo dei diversi meccanismi biochimici all'accumulo di triacilglicerolo epatico nel deficit di inositolo deve essere ancora approfondito.

Per quanto riguarda gli effetti che le I.D.D svolgono sull'intestino, alcuni studi (Hegsted & al., 1973; Chu & Geyer. 1981; Chu & Hegsted. 1980) hanno documentato l'elevata sensibilità dei gerbilli verso lo sviluppo di una marcata lipodistrofia intestinale (caratterizzata da un accumulo di grasso nelle cellule della mucosa intestinale). Lo

sviluppo della sindrome si può però prevenire aggiungendo inositolo alla dieta. E' stata inoltre osservata una minore suscettibilità dei gerbilli maschi verso la carenza di inositolo. Questa differenza è stata attribuita alla biosintesi testicolare di inositolo, come dimostrato dai risultati differenti ottenuti negli animali integri rispetto a quelli castrati (Chu & Geyer. 1983).

Per quanto riguarda gli effetti indotti dalle I.D.D sul polmone, è stato dimostrato che l'inositolo extracellulare influenza il metabolismo delle cellule polmonari di tipo II. Hallman (Hallman. 1984) ha studiato la capacità dell'inositolo di promuovere la differenziazione e la crescita di queste cellule.

RUOLO NUTRIZIONALE DELL'INOSITOLO NEGLI STATI PATOLOGICI

DIABETE

Recentemente l'attenzione dei ricercatori si è rivolta alla relazione tra l'inositolo e alcune malattie metaboliche, come ad esempio il diabete. I diabetici soffrono spesso di una ridotta velocità di conduzione nervosa periferica, sensoriale e motoria, con o senza evidenza di polineuropatie.

Greene e colleghi (Greene & al., 1975) hanno studiato la relazione fra l'inositolo e le alterazioni funzionali del sistema nervoso periferico in ratti affetti da diabete acuto (indotto da streptozotocina). In questi modelli è stata evidenziata una riduzione sia della concentrazione di inositolo nel sistema nervoso periferico, che della velocità di conduzione nervosa, nonostante il fatto che i livelli plasmatici di inositolo libero siano simili a quelli degli individui normali.

Un'integrazione alimentare con inositolo, che aumenta i livelli plasmatici di inositolo, ha migliorato la velocità di conduzione motoria nei ratti affetti da diabete acuto indotto da streptozotocina (Greene & al., 1982). E' importante aggiungere inoltre che un aumento eccessivo dei livelli di inositolo nel sangue, causato dall'integrazione con 3% di inositolo esogeno (anziché dell'1%), causa la riduzione della velocità di conduzione nervosa motoria, sia nei soggetti normali che in quelli diabetici (Greene & al., 1975.).

Per quanto concerne il trattamento con insulina è stato osservato che essa invece previene la diminuzione dei livelli di inositolo nel sistema nervoso e la riduzione della velocità di conduzione nervosa nei ratti diabetici (Greene & al., 1982).

Clements & Reynertson (Clements & Reynertson. 1977) hanno suggerito che l'iperglicemia dei soggetti umani diabetici possa impedire il trasporto dell'inositolo, causandone una deficienza intracellulare diffusa. Infatti, è stato osservato che l'inositoluria, presente in caso di diabete umano, può aumentare principalmente a causa dell'effetto inibitore del glucosio sul riassorbimento tubulare renale dell'inositolo. Di conseguenza, l'escrezione urinaria di inositolo nel diabetico non trattato con insulina potrebbe rappresentare una frazione significativa dell'inositolo esogeno ingerito con la

dieta. A conferma di ciò, l'escrezione urinaria di inositolo in soggetti diabetici diminuisce, avvicinandosi ai livelli normali, con la somministrazione di insulina (Clements & Reynertson. 1977).

L'attività dell'inositolo-ossigenasi renale, che catabolizza l'inositolo, è marcatamente diminuita nei soggetti diabetici. Ciò può contribuire all'elevata concentrazione di inositolo nel rene diabetico e quindi all'aumentata clearance dell'inositolo (Palmano & al., 1977; Whiting & al., 1979).

Infine, Clements & Reynertson (Clements & Reynertson. 1977) hanno dimostrato che la somministrazione orale di inositolo per 3 giorni potrebbe aumentare in modo significativo le concentrazioni plasmatiche di inositolo in soggetti umani, e i diabetici mostrano una risposta più significativa. Questi e altri studi hanno suggerito che la somministrazione di inositolo per via orale potrebbe essere utile nella prevenzione e nel trattamento di alcune complicanze (come ad esempio, la neuropatia diabetica) associate al diabete mellito umano (Clements & Reynertson. 1977; Salway & al., 1978).

MALATTIE RENALI

Nell'insufficienza renale umana sono state osservate notevoli alterazioni nel metabolismo dell'inositolo, che si manifestano come aumento delle concentrazioni plasmatiche di inositolo (iperinositolemia) (Clements & al., 1973; Lewin & al., 1974; Pitkanen. 1976). In particolare, i pazienti con insufficienza renale cronica mostrano livelli di inositolo 7 volte maggiori rispetto ai controlli (240 μ M contro 33 μ M) (Holub. 1984). Poiché il rene è la principale sede del catabolismo dell'inositolo, è stato suggerito che la compromissione dell'ossidazione renale dell'inositolo a D-glucuronato possa contribuire ad alzare in maniera abnorme i livelli plasmatici di inositolo nei pazienti uremici (Clements & al., 1973). E' stato inoltre osservato che nelle forme avanzate di glomerulonefrite si riducono sia la velocità di filtrazione glomerulare che il riassorbimento dell'inositolo (Pitkanen. 1976). Di conseguenza, l'analisi dei livelli sierici ed urinari di inositolo potrebbe contribuire alla valutazione della funzionalità renale (Holub. 1986).

Alcuni studi hanno anche ipotizzato che l'iperinositolemia possa contribuire alla patogenesi della polineuropatia uremica nei soggetti con insufficienza renale cronica (Dejesus & al., 1974; Clements & Diethelm. 1979; Yagi & Kotaki. 1969; Hasan & al.,

1974b). Le conoscenze in questo campo possono essere ampliate con l'impiego di modelli animali utili allo studio delle anomalie della interrelazione tra inositolo e metabolismo dei fosfolipidi a base di inositolo e disturbi renali cronici (Holub. 1986).

PARTE SPECIALE

OBIETTIVO DELLA TESI

Il mioinositolo è un isomero dello zucchero alcolico C6 appartenente alle vitamine del gruppo B. Numerosi studi hanno suggerito che il mioinositolo svolga un ruolo importante nella morfogenesi e citogenesi cellulare, nella sintesi dei lipidi, nella struttura delle membrane cellulari e nella crescita cellulare. In particolare, è stato dimostrato che il mioinositolo sia il precursore della sintesi dei fosfoinosidi. Esso è quindi alla base del sistema di trasduzione del fosfatidilinositolo, noto per essere coinvolto nella regolazione di diverse funzioni cellulari, compresa la proliferazione cellulare.

La presenza del mioinositolo nei fluidi corporei umani, il suo ruolo quale precursore dei fosfolipidi a base di inositolo, responsabili di segnali intracellulari essenziali per lo sviluppo degli ovociti, e il suo effetto nel migliorare la maturazione degli ovociti ha suggerito che possa esistere una relazione tra la concentrazione del mioinositolo nel fluido follicolare e la qualità degli ovociti che possono essere prodotti.

Sulla base di queste premesse, l'obiettivo della presente tesi è quello di illustrare e discutere i progressi compiuti di recente in merito all'impiego del mioinositolo nella fecondazione assistita ed in special modo gli effetti che esso induce sulla risposta ovarica e sulla qualità ovocitaria nelle pazienti affette da sindrome dell'ovaio policistico e sottoposte a induzione dell'ovulazione ed inseminazione in vitro tramite l'iniezione intracitoplasmatica dello spermatozoo (ICSI).

INOSITOLO E SINDROME DELL'OVAIO POLICISTICO

La sindrome dell'ovaio policistico (PCOS) è una delle malattie endocrine più comuni nelle donne in età riproduttiva (Azziz. 2004; Goudas & Dumesic. 1997; Ovalle & Azziz. 2002). La sua eziologia è tuttavia sconosciuta e la sua incidenza si aggira intorno all' 8-10% della popolazione femminile in età riproduttiva (Baillargeon & al., 2010; Strauss. 2003; Badawy & Elnashar. 2011).

La PCOS può essere descritta come una malattia multifattoriale, dove la genetica e l'ambiente interagiscono tra loro nello sviluppo della sindrome. L'eterogeneità della PCOS è risultata evidente sin dalla sua descrizione del 1935 (Stein & Leventhal. 1935). La definizione di PCOS è stata modificata più volte e la prima volta è stato nel 1844 ad opera di Chereau (Chereau. 1844) e Rokitanski (Rokitansky. 1844). La descrizione della PCOS utilizzata ai giorni nostri è stata sviluppata inizialmente nell'Aprile del 1990 in una conferenza organizzata dal National Institute of Health (NIH) americano che portò alla pubblicazione dei criteri NIH (Zawadzki & Dunaif. 1992) che comprendevano l'oligo-ovulazione, l'iperandrogenismo clinico o biochimico e l'esclusione di altre malattie quali la sindrome di Cushing e l'iperplasia congenita (Dunaif. 1997).

Successivamente, nel 2003, il Rotterdam ESHRE/ASRM PCOS Consensus Workshop Group (Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group Revised 2003; Rotterdam 9, ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group Revised 2003) ha rivisitato ed ampliato la definizione di PCOS, cercando di delineare criteri semplici, che consistono in:

-oligo-anovularietà

-segni clinici e biochimici di iperandrogenismo, che possono essere associati con irsutismo

-riscontro ecografico di almeno un ovaio policistico

La presenza di almeno due di questi criteri permette di fare diagnosi di PCOS (Badawy & Elnashar. 2011).

Altre caratteristiche della sindrome dell'ovaio policistico sono: acne, seborrea, obesità (Gjonnaess. 1989), iperandrogenismo, insulino-resistenza, ridotta tolleranza al glucosio e diabete mellito (Ehrmann & al., 1999a) di tipo 2, dislipidemia (Mather & al., 2000),

malattie cardiovascolari (coronaropatie), sindrome X o sindrome metabolica, ipertensione (Holte & al., 1996) ed infertilità.

Come per i criteri NIH, per una corretta diagnosi della sindrome è importante escludere la presenza di altre malattie quali la sindrome di Cushing, le neoplasie androgeno-secerenti e le disfunzioni tiroidee, che possono portare ad alterazioni ovulatorie-mestruali e/o quadri di iperandrogenismo (Baillargeon & al., 2010).

L'assenza o l'alterata attività ovulatoria delle pazienti con PCOS comportano sia alterazioni mestruali quali oligomenorrea o amenorrea, che una conseguente riduzione della fertilità (Baillargeon & al., 2010). Inoltre, le disfunzioni ovariche tipiche della PCOS inducono sia l'accumulo eccessivo di tessuto endometriale che la carenza di progesterone, causando quindi una stimolazione estrogenica cronica non bilanciata dal progesterone e determinando una maggiore predisposizione allo sviluppo di iperpalsia endometriale che, se non adeguatamente trattata, può portare allo sviluppo del carcinoma endometriale (Papaioannou & Tzafettas. 2010).

I segni clinici più frequenti dell'iperandrogenismo di origine ovarica comprendono irsutismo ed acne, che di solito si manifestano già in età-prepuberale (Barry & al., 2011).

Oltre alla disfunzione ovulatoria e all'iperandrogenismo, la sindrome dell'ovaio policistico (PCOS) è caratterizzata da alterazioni endocrine e metaboliche, con valori elevati di LH, e ridotti di FSH e con un conseguente rapporto LH/FSH elevato (Banaszewska & al., 2003; Blank & al., 2007). Le anomalie neuroendocrine della PCOS sono inoltre caratterizzate da elevate concentrazioni sieriche di testosterone, insulina e prolattina che possono comportare profonde implicazioni a lungo termine per la salute delle pazienti (Costantino & al., 2009).

Uno studio ha rivisitato i criteri per la diagnosi ecografica della PCOS, analizzando la correlazione tra le principali caratteristiche ormonali e metaboliche della PCOS e il numero di follicoli per ovaio. La conclusione di questo lavoro è stata la proposta di modificare la definizione di ovaio policistico aggiungendo la presenza di un numero maggiore di 12 follicoli (nelle due ovaie) con diametro compreso tra 2 e 9 mm di diametro. I risultati di questo studio rafforzano l'ipotesi che l'iperandrogenismo intraovarico promuova la crescita follicolare iniziale, ma che la successiva progressione non possa procedere normalmente a causa dell'iperinsulinemia e/o di altri fattori metabolici legati all'obesità (Jonard & Dewailly. 2004; Jonard & al., 2003), che si

verifica in genere più precocemente (dal terzo al quarto decennio) rispetto alle donne sane (Dunaif & al., 1987). Sebbene la PCOS non sia sempre associata all'obesità, le donne (sia magre che obese) affette dalla suddetta sindrome presentano una maggiore incidenza di insulino-resistenza rispetto ai controlli. Esse sono inoltre soggette ad un alto rischio di sviluppare il diabete in età più avanzata (Chang & al., 1983).

Uno studio (Cupisti & al., 2008) ha valutato l'associazione tra l'indice di massa corporea (BMI) $\geq 25 \text{ kg/m}^2$ e cambiamenti metabolici. Un elevato BMI è difatti considerato come un fattore di rischio per la salute, soprattutto tra le pazienti con sindrome metabolica o insulino-resistenza (Meigs & al., 2006). I risultati nel campione di popolazione analizzato mostrano che l'incidenza di BMI $\geq 25 \text{ kg/m}^2$ ed amenorrea (utilizzato come marker di anovulazione cronica, che è la forma più grave di disturbo nella funzione ovarica (Norman & al., 2007)) è stata associata solo con minori od assenti variazioni dei parametri metabolici nelle donne affette da PCOS (Baillargeon & al., 2010).

E' stato dimostrato che l'insulino-resistenza si presenta con una frequenza dal 30 al 40% nella popolazione delle giovani pazienti affette da PCOS (Ehrmann & al., 1999b). Essa è stata difatti descritta come un fattore intrinseco alla sindrome. Ulteriori studi hanno dimostrato che l'insulino-resistenza, nella PCOS, potrebbe essere legata alla anormale steroidogenesi ovarica a causa di un'alterata trasduzione del segnale insulinico (Dunaif & al., 1995; Nestler & al., 1991).

L'insulino-resistenza e la conseguente iperinsulinemia concorrono allo sviluppo dell'iperandrogenismo sia direttamente che indirettamente. L'insulina difatti stimola direttamente le cellule della teca dell'ovaio a produrre una maggior quantità di androgeni, sensibilizzandole (Badawy & Elnashar. 2011). Essa inoltre, determina indirettamente un aumento della quota di androgeni liberi inibendo la sintesi epatica della proteina di trasporto degli ormoni sessuali (SHBG), che è considerata un marker predittivo dell'insulino-resistenza (Kajaia & al., 2007).

L'iperinsulinemia quindi, stimola la produzione ovarica di androgeni che agiscono direttamente sui tessuti periferici promuovendo l'insulino-resistenza. Mentre non vi è alcun dubbio che l'iperinsulinemia e l'iperandrogenia siano fortemente correlati con la PCOS, vi è un dibattito sulla natura della loro interazione. Le ipotesi sono due: la prima suppone che alti livelli di insulina potrebbero causare iperandrogenismo, mentre la seconda ipotizza che elevati livelli di androgeni potrebbero promuovere essi stessi

l'insulino-resistenza. Tra le due ipotesi, la prima sembra essere la più realistica, tanto più che in alcuni studi è stato mostrato che l'insulino-resistenza causa l'innalzamento dei livelli di androgeni (Poretsky. 1991; Norman & al., 1995). E' inoltre probabile che in alcune pazienti con sindrome dell'ovaio policistico siano presenti specifici difetti biochimici che le rendano suscettibili all'iperandrogenismo (Zhang & al., 1995; Takayama & al., 1988; Dunaif. 1997; Nestler & al. 1989). Non è però ancora chiaro come l'iperinsulinemia induca l'insorgenza dell'iperandrogenismo nelle pazienti con sindrome dell'ovaio policistico, ma non riesca a stimolare la produzione androgenica nelle pazienti con diabete di tipo I trattate con insulina esogena (Zacur. 2001).

Uno studio nel quale pazienti con la sindrome dell'ovaio policistico sono state trattate con l'antidiuretico spironolattone (che possiede anche proprietà antiandrogene) ha presentato un abbassamento dei livelli di androgeni e un miglioramento della sensibilità all'insulina (Buffington & Kitabchi. 1994). E' probabile quindi che entrambi i processi si possano verificare in vivo, creando un circolo vizioso concernente sia l'incremento nella produzione di androgeni che l'insulino-resistenza (Polderman & al., 1994). Questo circolo vizioso spiegherebbe la coesistenza di iperinsulinemia ed iperandrogenismo, e la tendenza alla progressione temporale verso la PCOS.

Il trattamento dell'iperandrogenismo, come già accennato, può prevenire la progressione della sindrome dell'ovaio policistico, nonché la progressione della resistenza insulinica associata, in modo da ridurre il rischio di malattia coronarica e diabete di tipo II e migliorare la fertilità. Inoltre, l'iperinsulinemia può indurre essa stessa insulino resistenza (Thomson & al., 1997), rendendo difficoltosa la valutazione della misura con cui l'iperandrogenia può contribuire all'instaurarsi dell'insulino resistenza. Alcuni lavori mostrano che le basi molecolari dell'insulino resistenza coinvolgono: la riduzione dell'autofosforilazione dei recettori insulinici, una ridotta espressione e traslocazione dei trasportatori del glucosio insulino-sensibili e l'alterazione della via di segnalazione insulinica. Gli agenti insulino-sensibilizzanti (metformina, tiazolinedioni, D-chiro-inositolo, mioinositolo) possono invertire molti degli effetti dell'insulino-resistenza e potrebbero essere utilizzati in futuro nel trattamento della sindrome dell'ovaio policistico e delle altre condizioni associate con l'insulino-resistenza indotta da steroidi. Difatti, il riconoscimento dell'insulino-resistenza ed il conseguente trattamento associato a steroidi sessuali durante la fase iniziale, può ridurre il rischio di sviluppare il diabete mellito di tipo II (non insulino-

dipendente), l'ipertensione e la dislipidemia, migliorando inoltre la fertilità e riducendo il rischio cardiovascolare. Esistono studi sulla riduzione dell'autofosforilazione del recettore insulinico nelle ovaie di pazienti con sindrome dell'ovaio policistico. Inoltre lavori su fibroblasti di donne con PCOS hanno dimostrato che l'autofosforilazione del recettore dell'insulina è ridotta a circa la metà della sindrome dell'ovaio policistico (Moran & al. 2001; Dunaif & al. 1995.; Kahn & al. 1993; Livingstone & Collison. 2002) (Fig. 9).

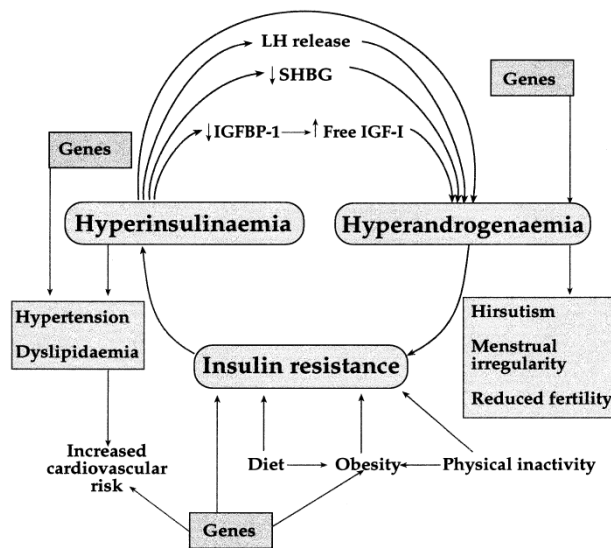


Figura 9. Correlazione tra i livelli di androgeni e l'insulino-resistenza nella PCOS

La figura n. 9 riassume sia i fattori che causano insulino-resistenza, che quelli che portano all'iperandrogenismo in pazienti con PCOS. Nella sindrome dell'ovaio policistico, gli alti livelli di insulina in circolo (causati dall'insulino-resistenza) stimolano la produzione ovarica di androgeni, sia attraverso un'azione diretta sull'ovaio che stimolando la liberazione dell'ormone luteinizzante (LH). L'iperinsulinemia, tramite due differenti percorsi, può anche migliorare la biodisponibilità degli androgeni: essa difatti riduce la biosintesi sia di SHBG (aumentando così il livello di androgeni liberi) che di IGFBP-1 (elevando i livelli di IGF-I libero che, come l'insulina, stimola la produzione ovarica di androgeni). L'iperandrogenia inoltre causa sia anomalie mestruali che irtsutismo associati a PCOS. A sua volta l'iperandrogenia può aumentare l'insulino-resistenza nel tessuto adiposo e nel muscolo scheletrico, creando potenzialmente un circolo vizioso consistente in livelli crescenti di androgeni e peggioramento dell'insulino-resistenza. L'iperinsulinemia e l'insulino-resistenza possono anche portare

ad ipertensione e dislipidemia, aumentando quindi il rischio cardiovascolare nelle pazienti con sindrome dell'ovaio policistico. Questo ciclo può potenzialmente essere interrotto dagli agenti insulino-sensibilizzanti che diminuiscono la secrezione di androgeni, con un conseguente aumento della fertilità e riduzione del rischio cardiovascolare (Livingstone & Collison. 2002).

La terapia della PCOS si prefigge diversi obiettivi:

- terapia delle irregolarità mestruali e protezione dell'endometrio
- terapia dell'ipersecrezione androgenica
- terapia dell'iperinsulinemia e dell'insulino-resistenza
- terapia dell'anovularietà e della sterilità

I contraccettivi orali (OCP) sono una componente fondamentale del trattamento cronico della PCOS. Essi diminuiscono l'elevato livello di androgeni e regolano i cicli mestruali. (Yildiz. 2008). Nelle pazienti che presentano controindicazioni all'assunzione dell'E/P si opta per l'utilizzo del solo progesterone (medrossiprogesterone acetato). Esiste inoltre un nuovo contraccettivo orale (OCPs) contenente ciproterone acetato, un antiandrogeno. L'OCPs è comunemente utilizzato per la gestione dei pazienti con sindrome dell'ovaio policistico. Esso regolarizza il ciclo mestruale, riduce la secrezione dell'ormone luteinizzante (LH), diminuendo anche la produzione di androgeni ovarici. Inoltre il componente estrogeno aumenta la globulina legante gli ormoni sessuali, riducendo così gli androgeni liberi (Ehrmann. 2005). Il componente progestinico invece protegge l'endometrio dall'iperplasia, riducendo il rischio di tumore dell'endometrio che nelle PCOS risulta maggiore rispetto ai controlli (Balen. 2001). Inoltre, entro 3-6 mesi di trattamento con OCPs, l'acne infiammatorio è ridotto del 30-60% con un miglioramento nel 50-90% dei pazienti (James. 2005). Le pazienti trattate con OCPs mostrano anche una minore incidenza di cisti ovariche ed una diminuzione dell'irsutismo (Nader & Diamanti-Kandarakis. 2007).

Per quanto concerne la terapia dell'iperinsulinemia e dell'insulino resistenza i farmaci utilizzati sono la metformina e i tiazolidinedioni (es. troglitazone). La metformina migliora l'insulino-sensibilità, riducendo i livelli androgenici (testosterone, testosterone libero, androstenedione e il deidroepiandrosterone solfato (DHEAS)) (Velazquez & al., 1994; Pryor & al., 2000). Ciò determina una regolarizzazione del ciclo mestruale, ed un conseguente miglioramento della fertilità. Essa diminuisce inoltre il rischio di sindrome metabolica (Norman & al., 2001). I tiazolidinedioni invece svolgono un ruolo

importante nel ridurre l'insulino-resistenza associata al diabete di tipo II e nel trattamento di varie malattie metaboliche associate con la PCOS (Livingstone & Collison. 2002).

In passato la terapia di scelta per indurre l'ovulazione nelle donne affette da PCOS era l'asportazione laparotomica di un cuneo di tessuto ovarico. Negli anni '80 si passò ad altri tipi di interventi chirurgici come la resezione della corticale ovarica, la coagulazione multipla della capsula ovarica (drilling ovarico), la vaporizzazione della capsula ovarica con laser e la crioterapia. (Farquhar & al., 2000; Baillargeon & al., 2010). Attualmente la prima linea di trattamento per la sindrome dell'ovaio policistico consiste nella riduzione del peso corporeo: un trattamento che migliora la sensibilità all'insulina contribuendo alla riduzione dei livelli di androgeni (Kelly & al., 2000) ed al conseguente ripristino della funzionalità ovarica e della fertilità.

Oltre alla riduzione del peso corporeo, altre terapie sono state studiate per indurre l'ovulazione nelle pazienti con PCOS. Il farmaco di prima scelta è a tutt'oggi il clomifene citrato (CC). Il trattamento con CC in donne anovulatorie con PCOS è correlato ad un tasso di ovulazione del 60-85% e un tasso di gravidanza del 30-40% (Hughes & al., 2000). L'esatta spiegazione per la discrepanza tra i tassi di ovulazione e di gravidanza è ancora sconosciuta, ma alcuni dei meccanismi proposti sono: gli effetti antiestrogenici sull'endometrio e la qualità e maturità ovocitaria (Palomba & al., 2004; Kousta & al., 1997; Palomba & al., 2005). L'utilizzo del CC è quindi indicato nelle pazienti con sindrome dell'ovaio policistico, anovulazione e con livelli normali di FSH. Esso presenta tuttavia alcuni limiti nelle pazienti con un età > di 30 anni e un BMI alto (>30) (Legro & al., 2007). Il clomifene, inoltre consente di ottenere risultati migliori nell'induzione dell'ovulazione e nel tasso di gravidanze rispetto alla metformina (Palomba & al., 2007). Gli effetti collaterali dei due farmaci, acidosi lattica, tossicità epatica, nausea o vomito, nonché di altri disturbi a carico del tratto gastro-intestinale ne limitano però l'impiego clinico (Maeda. 2001; Letter May & al., 2002; Strowig & Raskin. 2005; Tang & al., 2010; Badawy & Elnashar 2011; Papaleo & al., 2007).

Anche l'utilizzazione di analoghi dell'ormone che stimola la liberazione di gonadotropine (GnRh) ha mostrato di poter abbassare i livelli di androgeni nella PCOS, con un conseguente miglioramento della sensibilità all'insulina nelle pazienti con bassi livelli di insulino-resistenza. Purtroppo, poichè la PCOS è una sindrome eterogenea, che mostra sia diversi livelli di sensibilità all'insulina che diversi meccanismi di insulino-

resistenza, il suddetto effetto non si verifica nelle pazienti con livelli elevati di insulino resistenza (Dunaif. 1993; Elkind-Hirsch & al., 1993). Per di più, le pazienti con sindrome dell'ovaio policistico trattate con gonadotropine hanno spesso una risposta polifollicolare e sono esposte ai rischi della sindrome da iperstimolazione ovarica (OHSS) e di gravidanze multiple (Farquhar & al., 2000). Quindi, visto l'alto rischio di iperstimolazione ovarica, il rischio di gravidanze multiple e l'assenza di un significativo aumento nel tasso di gravidanze, la somministrazione di gonadotropine (GnRh) esogene o di analoghi del GnRh non giustifica l'utilizzo di questi farmaci di routine e viene riservata solo alle pazienti clomifene-resistenti.

Recentemente anche il mioinositolo è stato studiato ed introdotto con successo nella pratica clinica ginecologica. Uno studio clinico in doppio cieco ha mostrato gli effetti del trattamento con mioinositolo (in associazione ad acido folico o acido folico da solo come placebo) in pazienti affette da PCOS. I risultati hanno evidenziato una diminuzione dei livelli di insulina e del testosterone sierico totale, nonché un miglioramento dei fattori metabolici sull'insulina circolante, sulla tolleranza al glucosio, sull'ovulazione e sulle concentrazioni sieriche di androgeni. Il mioinositolo quindi rappresenta un'efficace terapia di prima linea per l'induzione dell'ovulazione in donne affette da sindrome dell'ovaio policistico (Costantino & al., 2009). A supporto di tale teoria un ulteriore studio (Papaleo & al., 2009a) ha analizzato 51 donne in età fertile affette da PCOS, amenorroiche e oligomenorroiche nelle quali il disturbo ovulatorio sembrava apparentemente costituire l'unica causa dell'infertilità, e alle quali è stato somministrato mioinositolo in associazione con acido folico in dosi pari a 2 g due volte al giorno, in somministrazione continua. I risultati ottenuti, se confrontati con i dati forniti dalla letteratura scientifica, suggeriscono che il mioinositolo costituisca un trattamento semplice e sicuro in grado di ripristinare l'attività ovarica spontanea e conseguentemente la fertilità nella maggior parte delle pazienti affette da sindrome dell'ovaio policistico, senza causare gravidanze multiple.

Una percentuale compresa tra il 30 e il 40% di donne affette da sindrome dell'ovaio policistico presenta una ridotta tolleranza al glucosio; allo stesso tempo, un difetto nella trasduzione del segnale insulinico (mediatori inositolfosfoglicani - IPG) sembra essere implicato nella patogenesi della resistenza insulinica. Uno studio ha infatti individuato un difetto intracellulare di mioinositolo alla base dell'iperinsulinismo delle pazienti con micropolicistosi ovarica (Baillargeon & al., 2008). In particolar modo è stato mostrato

che l'inositolo controlla, tramite vie di trasduzione del segnale, la secrezione di alcune ghiandole esocrine come il pancreas e altri organi tra cui l'ovaio. A livello ovarico le suddette vie di segnalazione intracellulari sono coinvolte nel rilascio di granuli corticali, nel blocco della polispermia, nel completamento della meiosi o nell'attivazione del ciclo cellulare che successivamente determina lo sviluppo embrionale.

Come già descritto, il mioinositolo ed il D-chiro inositolo sono due isoforme dell'inositolo. Difetti di disponibilità tissutale o nel metabolismo della molecola D-chiro-inositolo sembrano svolgere un ruolo importante nello sviluppo dell'insulino-resistenza (Baillargeon & al. 2003; Baillargeon & al. 2006). Infatti, numerosi studi hanno mostrato come, in pazienti con PCOS, anche la somministrazione di D-chiro-inositolo sia in grado di ridurre l'insulino-resistenza, la quota di androgeni e testosterone circolanti, ripristinando in alcuni casi anche un'attività ovulatoria spontanea e prevenendo il rischio di iperstimolazione ovarica (Nestler & al., 1999; Iuorno & al., 2002; Ciotta & al., 2010).

Uno studio ha mostrato che la somministrazione di D-chiro-inositolo in donne con sindrome dell'ovaio policistico causa una diminuzione della risposta insulinica al glucosio somministrato per via orale. Questo calo è stato probabilmente dovuto ad un miglioramento della sensibilità periferica all'insulina (Ortmeyer & al., 1993a; Craig & al., 1994; Asplin & al., 1993; Ortmeyer & al., 1993b). E' stato inoltre osservato che nelle donne con una ridotta tolleranza al glucosio, questa condizione migliora. Contemporaneamente alla riduzione della secrezione di insulina, le donne trattate con D-chiro-inositolo mostrano un notevole miglioramento nella funzione ovulatoria: nello studio suddetto la percentuale di donne che ha ovulato è stata dell'86% rispetto al 27% delle pazienti alle quali è stato somministrato il placebo. Le concentrazioni di androgeni nel siero sono diminuite nelle donne trattate con D-chiro-inositolo. Esse hanno infine mostrato una diminuzione sia della pressione sistolica che diastolica, che delle concentrazioni di trigliceridi plasmatici (Nestler & al., 1999).

Sulla base di questi studi sembra quindi ben delineato il ruolo dell'inositolo nella fisiopatologia dell'insulino-resistenza e di conseguenza le alterazioni ormonali e metaboliche delle pazienti affette da PCOS. E' inoltre evidente un possibile ruolo dell'inositolo nella maturazione ovocitaria nelle donne infertili, ma questo argomento sarà trattato in modo più dettagliato nel capitolo successivo.

RUOLO DELL'INOSITOLO NELLA RIPRODUZIONE UMANA

ORGANI RIPRODUTTIVI MASCHILI

Gli organi riproduttivi maschili sono particolarmente ricchi di inositolo libero (Eisenberg & Bolden. 1964). Alte concentrazioni sono state riscontrate nel testicolo nell'epididimo, e nei fluidi prostatici del ratto (Ghafoorunissa. 1975; Lewin & al., 1973; Hinton & al., 1980).

Il liquido seminale dei mammiferi è quindi una ricca fonte di inositolo libero e, a conferma di ciò, il plasma seminale mostra concentrazioni superiori rispetto al sangue (Holub. 1986; Ghafoorunissa. 1975). L'epididimo, in particolare, presenta una concentrazione di inositolo superiore a quella rilevabile nei testicoli. La capacità di sintesi dell'inositolo da parte dell'apparato riproduttivo maschile è rappresentata in ordine decrescente a partire dai testicoli, epididimo e vescicole seminali (Baillargeon & al., 2010).

E' stato ipotizzato che l'inositolo possa svolgere un ruolo importante nella maturazione degli spermatozoi e nella loro migrazione dall'epididimo (Voglmayr & Amann. 1973; Eisenberg. 1967; Morris & Collins. 1971). Poiché inoltre è stato dimostrato che l'inositolo può essere sintetizzato in vitro dagli spermatozoi testicolari (Voglmayr & White. 1971), è possibile ipotizzare che la maggior parte dell'inositolo testicolare si formi all'interno dei tubuli seminiferi. Uno studio ha mostrato che l'inositolo presente nei tubuli seminiferi sia molto probabilmente generato dalle cellule del Sertoli, che lo sintetizzano dal glucosio, allo scopo di creare quello speciale microambiente nel tubulo seminifero indispensabile per lo sviluppo della cellula germinale (Robinson & Fritz. 1979). Gli stessi autori hanno ipotizzato inoltre che le cellule del Sertoli siano le principali responsabili della produzione intratesticolare di inositolo.

L'inositolo presente nel fluido dei tubuli seminiferi potrebbe essere generato dal metabolismo del glucosio delle cellule epiteliali (Robinson & Fritz. 1979). Alcuni studi ipotizzano inoltre che la biosintesi di inositolo potrebbe essere essenziale per il normale metabolismo dell'epitelio germinale, poiché la sintesi de novo di inositolo potrebbe rendersi necessaria per il mantenimento di adeguati livelli intracellulari dei precursori

nucleotidici essenziali per il mantenimento dell'integrità nelle cellule epiteliali adulte (Morris & Collins. 1971; Charalampous & al., 1961; Tsukagoshi & al., 1966; Lembach & Charalampous. 1966). Alcuni studi mostrano che alte concentrazioni di mioinositolo siano importanti anche per l'osmoregolazione dell'epitelio seminifero (Chauvin & Griswold. 2004).

Per quanto concerne l'inositolo legato a fosfolipidi, una delle importanti funzioni che l'IP₃ potrebbe svolgere nell'apparato riproduttivo maschile è la mobilitazione del calcio che è stato dimostrato attivare la fusione nucleare delle vescicole in vitro (Sullivan & al., 1993). Quindi, il rilascio di calcio dall'acrosoma potrebbe svolgere un importante ruolo nel promuovere la fusione delle membrane e quindi l'esocitosi (Walensky & Snyder. 1995). Infine, la sintesi dell'inositolo a livello testicolare e la sua concentrazione non vengono influenzate dalla presenza di inositolo nella dieta o dalla diminuzione del contenuto di proteine nella dieta (dal 18% al 7%). Apparentemente, persino in situazioni di malnutrizione, la sintesi dell'inositolo negli organi riproduttivi non viene influenzata, avvalorando perciò l'ipotesi che l'inositolo abbia un ruolo significativo nella riproduzione maschile (Baillargeon & al., 2010).

ORGANI RIPRODUTTIVI FEMMINILI

L'inositolo controlla, tramite vie di trasduzione del segnale, la secrezione di alcune ghiandole esocrine come il pancreas ed altri organi tra cui le ovaie. A livello ovarico le suddette vie di trasduzione intracellulari sono coinvolte nel rilascio di granuli corticali, nel blocco della polispermia, nel completamento della meiosi o nell'attivazione del ciclo cellulare che successivamente determina lo sviluppo embrionale (Baillargeon & al., 2010).

Studi recenti mostrano che i recettori dell'IP₃ (InsP₃Rs) svolgono, negli ovociti di mammifero, un ruolo di primaria importanza nella trasduzione del segnale del calcio che, è stato ipotizzato, possa rivestire un importante funzione nella maturazione degli ovociti e nei primi stadi della fertilizzazione (Chun & Santella. 2007). Durante l'oogenesi il processo di rilascio del calcio è sottoposto a modificazioni che culminano nella fase finale della maturazione ovocitaria, dove viene raggiunta la massima sensibilità recettoriale (Sardet & al., 2002). Ovociti di mammifero adulto allo stadio di

vescicole germinali (GV) presentano oscillazioni spontanee intracellulari di calcio, che possono causarne anche la rottura.

Uno studio ha mostrato che un'integrazione con il mioinositolo può aiutare la maturazione di questi ovociti. E' stato per di più dimostrato che deplezioni di inositolo, attraverso una minore attivazione della via di trasduzione del segnale del calcio, possono influire negativamente sulla maturazione ovocitaria nei mammiferi (Berridge & Irvine. 1989). E' stato quindi ipotizzato che possa esistere una relazione tra la concentrazione del mioinositolo all'interno del fluido follicolare e la qualità ovocitaria, sia perchè i fosfolipidi di inositolo (di cui il mioinositolo è precursore) sono ritenuti responsabili di importanti segnali intracellulari essenziali per lo sviluppo degli ovociti, sia perché il mioinositolo sembra migliorare la maturazione in vitro degli ovociti (Baillargeon & al., 2010; Papaleo & al., 2009a).

Gli effetti del mioinositolo, oltre ad essere stati studiati come marker predittivi della qualità ovocitaria e quindi della fertilità femminile, sono stati analizzati anche in pazienti affette da sindrome metabolica, dopo la menopausa. Uno studio ha infatti mostrato che una dieta integrata con mioinositolo può aiutare a migliorare significativamente la pressione arteriosa sistolica e diastolica, il colesterolo ed i livelli sierici di trigliceridi, diventando quindi un'opzione affidabile nel trattamento della sindrome metabolica nelle donne in postmenopausa. E' inoltre importante aggiungere che in queste pazienti la produzione endogena risulta ridotta, e di conseguenza esse possono trarre maggiore beneficio da una supplementazione di inositolo rispetto ad altre pazienti. (Giordano & al., 2011)

SVILUPPO EMBRIONALE E FETALE

L'inositolo e i suoi derivati sono distribuiti nei tessuti di tutti i mammiferi in maniera ubiquitaria. Nell'uomo adulto la concentrazione plasmatica è simile nei maschi e nelle femmine ed è di circa 24.5 μM . Nei neonati, fino a due settimane dopo il parto, la concentrazione è più elevata rispetto all'adulto (Battaglia & al., 1961). Nella vita intrauterina i livelli ematici fetali di inositolo aumentano durante la prima parte della gravidanza raggiungendo valori di 125 μM (Beemster & al., 2002); successivamente decrescono all'aumentare dell'età gestazionale (Toh & al., 1987; Brachet. 1973).

Un aspetto importante dello sviluppo embrionale e fetale è la regolazione cellulare. L'elevato interesse per il ruolo dell'inositolo nella regolazione cellulare ha diverse motivazioni (Michell. 1989). In primo luogo, l'inositolo è un componente essenziale del ciclo del fosfatidilinositolo, che sembra essere un sistema di controllo per la proliferazione cellulare in una vasta gamma di cellule, sia normali che tumorali (Berridge. 1987). In secondo luogo, l'inositolo è un precursore del glicosilfosfatidilinositolo (GPI) che funge da ancoraggio per molte proteine di membrana (Low & Saltiel. 1988), alle quali potrebbe conferire un veloce rilascio tramite fosfolipasi specifiche. E' quindi ipotizzabile che l'inositolo svolga funzioni modulatorie sulle giunzioni intercellulari. In terzo luogo, è stato osservato che molti tipi di cellule, sia animali che vegetali, contengono un complesso sistema di polifosfati di inositolo, alcuni dei quali sono presenti in concentrazioni estremamente alte (Downes & MacPhee. 1990). Infine, è stato ampiamente dimostrato che l'inositolo svolge un'attività di controllo sul volume e sulla osmolarità cellulare e regola sia il potenziale di membrana che la permeabilità cellulare durante lo sviluppo embrionale, permettendo quindi alle cellule di interagire correttamente tra di loro. (Li & Foote. 1995; Kleinzeller & Ziyadeh. 1990; McConnell & Goldstein. 1990; Strange & al., 1991). Infatti, donne poliabortive al momento dell'impianto presentano valori di inositolo minori rispetto alle plurigravide (Chiu & Tam. 1992).

In studi nutrizionali su embrioni in cultura, è stato dimostrato che l'inositolo risulta essenziale per la crescita delle blastocisti di coniglio e l'hatching delle blastocisti di criceto (Kane. 1988; Kane & Bavister. 1988). Tuttavia alcuni dati mostrano che l'inositolo esogeno non è necessario per lo sviluppo delle blastocisti di topo, ma ciò non significa che esso sia coinvolto nello sviluppo embrionale del topo per il quale l'inositolo endogeno potrebbe essere sufficiente (Kane & al., 1992).

Analizzando i risultati ottenuti in uno studio sulla captazione dell'inositolo da parte di embrioni di topo, si possono trarre alcune considerazioni (Kane & al., 1992). La prima riguarda l'aumento della captazione fino allo stadio di blastocisti, dove l'inositolo raggiunge i massimi livelli analizzabili. La seconda riguarda sia la dipendenza dal tempo e la temperatura della captazione, che la stimolazione sodica e l'inibizione glucosidica del processo di trasporto (che sembra sia saturabile anche in presenza di concentrazioni elevate di inositolo nel mezzo di coltura). La terza ipotizza che una

considerevole percentuale (circa l'8%), dell' inositolo trasportato venga incorporato nel PI.

Tra tutte le considerazioni suddette, la dipendenza della captazione dallo stadio di sviluppo dell'embrione risulta particolarmente interessante. L'aumento della captazione, in proporzione, è risultato maggiore (di circa 12 volte) dallo stadio di zigote (Fig. 10) alla prima divisione cellulare. Ciò non sembra sia dovuto ad un aumento della concentrazione di proteine (poiché il contenuto proteico dell'embrione di topo rimane relativamente immutato dalla fase di due cellule alla quella di blastocisti) (Brinster. 1967), nè può essere causato da un aumento della superficie cellulare (in quanto, in tal caso, dovrebbe aumentare solo del 26% dallo stadio di zigote alla formazione di due blastomeri) (Kane & al., 1992.). L'incremento della captazione dell'inositolo potrebbe quindi essere causato da un aumento della permeabilità della membrana all'inositolo o da una maggiore sintesi (o attivazione) delle proteine trasportatrici dell'inositolo.



Figura 10. Zigote

Un altro studio ha mostrato che, negli embrioni di topo allo stadio di due cellule (Fig. 11), l'assorbimento dell'inositolo non è sodio-dipendente, e può essere inibito dalla florizina. Gli autori hanno inoltre ipotizzato che la completa abolizione della captazione sodio-dipendente del mioinositolo sia causata dall'attivazione dei geni zigotici (Higgins & Kane. 2003).



Figura 11. Embrione allo stadio di due cellule

E' stato anche dimostrato che la deplezione del mioinositolo nei tessuti embrionali durante l'organogenesi assume un ruolo importante nell'iperglicemia indotta dall'embriopatia (Akashi & al., 1991).

Per quanto concerne l'importanza dell'inositolo nello stadio successivo a quello embrionale, ovvero lo stadio fetale, uno studio ha evidenziato la presenza del mioinositolo anche nei tessuti fetali, oltre che embrionali, suggerendo la sua importanza biologica sia nello sviluppo umano precoce che nella crescita e nello sviluppo perinatale (Jauniaux & al., 2005; Battaglia & al., 1961). L'importanza dell'inositolo nello sviluppo del sistema nervoso è stata sottolineata da Kok e colleghi in uno studio che mostra come in feti affetti da idrocefalia i valori di inositolo siano marcatamente inferiori rispetto al normale (Kok & al., 2003). E' stato anche dimostrato che l'inositolo sia implicato nel danno cellulare alla base della retinopatia e della neuropatia periferica diabetica (Jedziniak & al., 1981; Lee & Chung. 1999). Inoltre, i livelli di mioinositolo, glucosio e zinco materni sono associati con il rischio di spina bifida nei nati (Groenen & al., 2003a). Il mioinositolo infatti svolge un ruolo chiave in importanti vie di trasduzione del segnalazione intracellulare ed un metabolismo non equilibrato per il mioinositolo è stato associato con difetti del tubo neurale (Groenen & al., 2003b).

Per quanto riguarda la prevenzione dei difetti del tubo neurale (DTN), è ampiamente utilizzata l'integrazione della dieta delle pazienti in gravidanza con acido folico (Wald & al., 1991; Czeizel & al., 1992). Tuttavia non tutti i casi di DTN sembrano rispondere positivamente all'acido folico (Seller. 1994). Una potenziale nuova terapia per i casi di DTN folato-resistenti è stata suggerita dai risultati di uno studio nel quale per prevenire la maggior parte dei casi di DTN, alle femmine gravide di topo veniva somministrato mioinositolo (Greene & Copp. 1997). A sostegno di questo

lavoro, un'ulteriore studio ha dimostrato che la somministrazione dell'inositolo alimentare riduce la frequenza dei difetti del tubo neurale anche nei ratti diabetici (Reese & al., 1997). Quindi, per la prima volta, è stato somministrato, sin dal periodo periconcezionale, mioinositolo alimentare in una coppia di pazienti con due precedenti gravidanze in cui il feto aveva sviluppato difetti del tubo neurale nonostante la somministrazione di acido folico. I risultati sono stati ottimi in quanto la gravidanza non ha evidenziato alcun tipo di anomalie e la somministrazione di inositolo non ha causato né tossicità (né alla madre né al feto), né contrazioni uterine anomale. Considerati quindi sia la forte funzione preventiva al NTD che l'inositolo assume nei topi che il buon esito della gravidanza umana appena descritta, potrebbero sussistere i presupposti alla valutazione dell'inositolo come terapia aggiuntiva all'acido folico per prevenire lo sviluppo della NTD folato resistenza (Cavalli & Copp. 2002).

GRAVIDANZA: INTERAZIONE TRA INOSITOLE E GLUCOSIO

Il glucosio è il principale substrato metabolico del feto ed è conosciuto sia il suo meccanismo di passaggio attraverso la placenta che il suo ruolo nella crescita fetale in condizioni normali e patologiche (Bozzetti & al., 1988; Marconi & al., 1996)

Il glucosio è il principale nutrimento per il feto e il suo trasporto attraverso la placenta è stato oggetto di numerosi studi in gravidanze portate a termine senza complicazioni ed in gravidanze ad alto rischio. Tutto il glucosio fetale deriva dal sangue materno e, solo in minima parte, dalla gluco-genesi fetale e placentare (Marconi & al., 1993).

La necessità fetale di glucosio aumenta esponenzialmente durante tutta la gravidanza. Questa richiesta è soddisfatta da un aumento del gradiente materno-fetale per il glucosio e da un aumento dei trasportatori. Infatti, la concentrazione ematica materna di glucosio è maggiore nel secondo trimestre rispetto al primo per via di un' aumentata insulino-resistenza. Di conseguenza è stato dimostrato che all' aumentare dell'epoca gestazionale la concentrazione del glucosio nella vena ombelicale diminuisce significativamente e, poiché la concentrazione nelle arterie uterine non varia, vi è un aumentato passaggio di glucosio tra madre e feto. Uno studio ha anche mostrato che il rapporto tra la concentrazione materna e fetale è lineare e significativo in gravidanze senza complicazioni (Fig. 12) (Marconi & al., 1996).

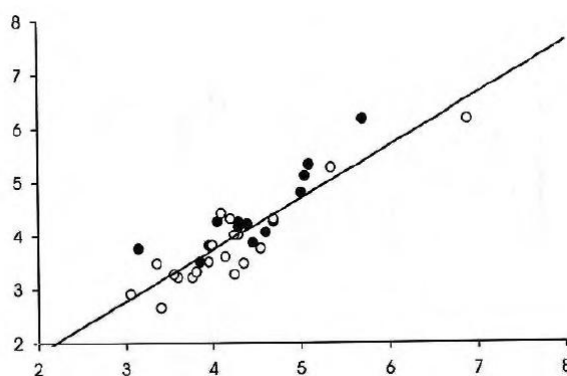


Figura 12. Relazione tra glicemia fetale e materna. Sono indicate le concentrazioni del glucosio espresse in mM nell'arteria materna (ascissa) e nella vena ombelicale (ordinata) in feti il cui peso è appropriato all'età gestazionale compreso tra il 10° e il 90° percentile (•) (Appropriate for Gestational Age, AGA) e ritardo di crescita fetale (IUGR) (o) (Marconi & al., 1996).

Ancora poco studiati sono altri carboidrati, chiamati “alternativi”, e coinvolti nel metabolismo materno e fetale tra i quali inositolo, sorbitolo e mannitolo. La recente disponibilità della High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ha permesso di analizzare le concentrazioni materne e fetali di questi metaboliti. E' stato così possibile dimostrare che nelle gravidanze umane portate a termine senza complicazioni l'inositolo è prodotto dal feto, il sorbitolo è prodotto dalla placenta, e che vi sia un significativo uptake ombelicale di mannosio dalla circolazione materna (Brusati & al., 2005).

Un recente studio ha dimostrato che la concentrazione di inositolo è significativamente più elevata nel sangue venoso ed arterioso ombelicale ($p < 0.001$), rispetto a quello materno: il rapporto UA/M è di 4.10. I suoi livelli sono maggiori nell'arteria rispetto alla vena ombelicale, e per questo la differenza veno-arteriosa ombelicale risulta significativamente ($p < 0.005$) negativa (Fig. 13). Inoltre esiste una relazione inversamente proporzionale tra differenza veno-arteriosa ombelicale e concentrazione arteriosa ombelicale. Questi dati suggeriscono quindi una produzione di inositolo nel compartimento fetale (Brusati & al., 2005).

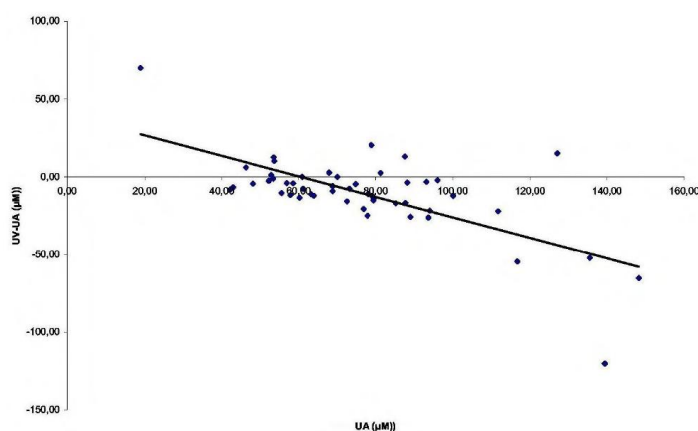


Figura 13. Relazione inversa tra la differenza veno-arteriosa ombelicale e la concentrazione nell'arteria ombelicale di inositolo (Brusati & al., 2005).

L'inositolo, come detto in precedenza, è presente in forma libera in tutti i tessuti umani, ma la sua concentrazione è particolarmente elevata nelle prime fasi dello sviluppo (Jauniaux & al., 2005). L'enzima richiesto per la sua sintesi a partire dal glucosio (glucosio-6-P ciclasi) è stato trovato sia nella placenta umana che nel cordone ombelicale. È stato osservato che il glucosio inibisce competitivamente anche il

trasporto di inositolo all'interno delle cellule (Akashi & al., 1991). Inoltre, é stata dimostrata un'interessante correlazione tra bassi livelli di inositolo e un aumento delle malformazioni fetali in donne affette da diabete in quanto l'iperglicemia materna provoca un'inibizione nell'uptake cellulare dell'inositolo (Groenen & al., 2003; Akashi & al., 1991; Weigensberg & al., 1990).

La crescita ed il benessere fetale nella gravidanza diabetica dipendono da diversi fattori, tra i quali il controllo metabolico glucidico materno che sembra rivestire un ruolo cardine (Raychaudhuri & Maresh. 2000). Il figlio di una donna diabetica presenta un diverso rapporto massa magra / massa grassa rispetto al figlio di una donna con gravidanza fisiologica di pari peso alla nascita (Catalano & al., 2003). Pertanto appare chiaro che la valutazione del solo peso alla nascita, come termine di paragone tra neonati, non rappresenti un parametro di univoca interpretazione. Inoltre, la tendenza alla crescita eccessiva del feto della donna diabetica sembra essere maggiormente associata alla eccessiva crescita dei tessuti insulino-sensibili, come il tessuto adiposo. La misurazione ecografica dei parametri biometrici fetali permette una stima della crescita ossea, parenchimale viscerale e del tessuto adiposo fetale. Parretti et al. (2003) hanno osservato che la crescita della massa magra e della massa grassa dei feti di donne con intolleranza glucidica ma non diabetiche era diversa da feti di donne con tolleranza glucidica normale. In uno studio è stato dimostrato che la tendenza alla crescita eccessiva in caso di gravidanza diabetica inizia a manifestarsi già intorno alla 24[°] settimana di gestazione, indipendentemente dal controllo glicemico (periferico) materno (Greco & al., 2003a). Questo dato indica che i tessuti insulino-sensibili (adipe e muscolo) possano subire uno stimolo alla crescita (fattori endocrini) superiore a quello che avviene nei tessuti di feto di donna con gravidanza fisiologica anche in assenza di un cattivo controllo metabolico materno.

Diversi studi hanno dimostrato che l'ecografia può essere utilizzata come metodica elettiva (poiché non invasiva e altamente riproducibile) per la valutazione della crescita fetale (Greco & al., 2003; Greco & al., 2003b; Larciprete & al., 2003). Schaefer-Graf & al. (2004) non hanno tuttavia osservato modificazioni degli esiti di gravidanze diabetiche trattate in base sia alla glicemia materna postprandiale che ai dati ecografici, rispetto agli esiti rilevati in gravidanze diabetiche nelle quali era monitorata solo la glicemia materna. Il coinvolgimento di fattori endocrino/paracrini sembra rivestire pertanto un ruolo chiave nello sviluppo eccessivo di tessuto adiposo in feti di madre

diabetica. Negli ultimi anni è stato dimostrato che una famiglia di secondi messaggeri dell'insulina, gli inositolo fosfoglicani, svolge azioni interessanti nel diabete e nella gravidanza nell'uomo. In studi in vitro e in vivo due principali classi, l'inositolo fosfoglicano di tipo P e di tipo A (rispettivamente P-IPG e A-IPG), hanno mostrato la capacità di svolgere effetti insulino-simili anche in assenza di insulina (Varela-Nieto & al., 1996). Ciascuna classe sembra svolgere effetti specifici: P-IPG è essenzialmente legato al metabolismo glucidico, mentre la classe A (A-IPG) è coinvolta in maniera specifica nella stimolazione della lipogenesi (Varela-Nieto & al., 1996). Alcuni studi hanno recentemente mostrato come la concentrazione di P-IPG aumenti fisiologicamente in gravidanza (Scioscia & al., 2006a), soprattutto nel compartimento fetale (Scioscia & al., 2007a). Inoltre nella placenta umana (di pazienti non diabetiche) è stata evidenziata una diretta correlazione tra la via di segnale insulinica ed il P-IPG (Scioscia & al., 2006b). Inoltre le urine di donne con diabete gestazionale presentano una riduzione dell'A-IPG, che potrebbe giustificare l'alterata produzione di tessuto adiposo nel diabete (Scioscia & al., 2007c). Sembra pertanto ipotizzabile un rapporto tra i livelli di queste molecole e la crescita fetale (Scioscia & al., 2007b; Scioscia & al., 2006b; Scioscia & al., 2007b; Rademacher & al., 2007). Infine, è stato ipotizzato che l'integrazione con inositolo nelle pazienti affette da diabete gestazionale potrebbe migliorarne l'insulino-resistenza. Uno studio ha osservato quindi gli effetti causati dalla somministrazione, in pazienti affette da diabete gestazionale, di mioinositolo (4 g al giorno) più acido folico (400 mg al giorno), rispetto ai controlli (ai quali veniva somministrato solo acido folico). I risultati mostrano che l'utilizzo dell'inositolo in pazienti affette da diabete gestazionale migliora gli indici di insulino-resistenza e l'esito materno-fetale (Corrado & al., 2011).

NEONATI PREMATURI: SINDROME DA DISTRESS RESPIRATORIO

L'inositolo è un nutriente essenziale necessario per la crescita e la sopravvivenza di cellule umane in coltura (Eagle & al., 1957). Sono stati condotti numerosi studi sulla capacità dell'inositolo di promuovere la differenziazione fetale e lo sviluppo polmonare, perché è stato dimostrato che la disponibilità di inositolo può controllare la formazione dei fosfolipidi surfattanti nei tessuti polmonari immaturi (Howlett & Ohlsson. 2003; Hallman & Epstein. 1980; Hallman. 1984). Inoltre, la sua diminuzione al termine della gravidanza permette l'aumento di fosfatidil-glicerolo poche settimane prima della nascita. Questo spiegherebbe in parte perché i feti nati prima del termine o da madri diabetiche siano a maggior rischio di sviluppare la sindrome da distress respiratorio (RDS) (Cunningham & al., 1978).

In uno studio condotto su neonati prematuri affetti da sindrome da distress respiratorio è stata somministrata una quantità di inositolo di 40 mg/Kg ogni 6 ore a partire da 48 ore e fino a 10 giorni dopo la nascita. Tale dose di inositolo è pari a quella che i nati pretermine ricevono dal latte materno. Infatti nei neonati prematuri i livelli sierici di inositolo sono circa 20 volte più alti rispetto a quelli presenti nel siero materno (Lewin & al., 1978; Bromberger & Hallmann. 1986; Burton & Wells. 1974; Howlett & Ohlsson. 2003). I risultati mostrano, tra il secondo ed il terzo giorno, un aumento della concentrazione sierica di inositolo (che invece decresce nei controlli), che perdura fino al sedicesimo giorno. I risultati hanno mostrato inoltre che, 5 giorni dopo la nascita, l'integrazione con inositolo porta sia ad un aumento significativo della fosfatidilcolina e del fosfatidilinositolo, che ad una importante diminuzione della sfingomieline e della fosfatidilserina nell'esperto tracheale dimostrando (come già accennato) che la sintesi del surfattante e la sua secrezione vengono influenzati dall'inositolo (Hallman & al., 1987; Hallman & al., 1992). Inoltre, una diminuzione nei livelli di inositolo nei bambini con sindrome da distress respiratorio, può essere un segno di aggravamento della malattia (Hallman & al., 1985). Infatti integrando con inositolo la dieta dei neonati prematuri che soffrono di distress respiratorio, è possibile ridurre la mortalità e le complicanze polmonari. (Howlett & Ohlsson. 2003).

Oltre alla RDS, un'altra patologia che ha un maggior rischio di incidenza nei neonati prematuri è la retinopatia. Alcuni dati hanno mostrato che il trattamento con inositolo diminuisce anche la gravità di tale patologia. (Howlett & Ohlsson. 2003; Hallman & al., 1986; Hallman & al., 1990; Hallman & al., 1992).

In conclusione, si può affermare che l'apporto supplementare di inositolo porta a riduzioni statisticamente significativamente e clinicamente importanti di rilevanti esiti neonatali sfavorevoli a breve termine. Questa probabilmente è la ragione per la quale il latte materno contiene alte concentrazioni di inositolo (Howlett & Ohlsson. 2003).

FERTILITA' E RIPRODUZIONE ASSISTITA

La fecondazione in vitro (IVF) viene impiegata come procedura di riproduzione assistita nelle coppie con problemi legati all'infertilità. Alcuni studi hanno suggerito che il mioinositolo svolga un ruolo importante nella morfogenesi cellulare e citogenesi, nella sintesi dei lipidi, nella formazione delle membrane cellulari e nella crescita cellulare (Berridge. 1987; Downes. 1989). E' inoltre noto il ruolo dell'inositolo come precursore dei fosfolipidi responsabili della generazione di importanti segnali intracellulari per lo sviluppo degli ovociti di mammifero (Lewin & al., 1973; Indyk & Woollard. 1994; Downes 1989; Fujiwara & al., 1993). La presenza del mioinositolo nei fluidi corporei umani e il suo effetto sulla maturazione degli ovociti di topo in vitro (Pesty & al., 1994) hanno portato Chiu & al. a studiare il ruolo dell'inositolo nella riproduzione assistita (Chiu & al., 2002). I dati raccolti da Chiu & al. hanno dimostrato, per la prima volta, la presenza del mioinositolo nel fluido follicolare umano (Chiu & al., 2002). I risultati del suddetto studio hanno inoltre evidenziato una differenza significativa tra la concentrazione del mioinositolo nel fluido follicolare e nel siero (Chiu & al., 2002). Questi dati sono in linea con altri studi che hanno dimostrato variazioni tra le concentrazioni di mioinositolo in fluidi corporei diversi (Lewin & al., 1973).

La valutazione della maturità degli ovociti, durante il loro recupero in cicli di IVF, viene eseguita tramite la valutazione morfologica della complesso cumulo-ovocita, e la successiva decoronizzazione ovocitaria tramite procedure sia enzimatiche che meccaniche (Imthurn & al., 1996; Rattanachaiyanont & al., 1999). Gli ovociti raccolti durante il recupero ovocitario in IVF possono trovarsi nello stadio di vescicola germinale (Fig. 14) (VG, è uno stato di immaturità ovocitaria, caratterizzato da un nucleo prominente denominato vescicola germinale, che contiene la cromatina decondensata), metafase I (Fig. 15) (MI, in risposta a stimoli ormonali la vescicola germinale si rompe (GVBD) e l'ovocita progredisce in metafase I) e metafase II (Fig.16) (MII, l'ovocita è pronto per essere inseminato) (Tosti. 2006).



Figura 14. Ovocita allo stadio di vescicola germinale



Figura 15. Ovocita allo stadio di metafase I



Figura 16. Ovocita allo stadio di metafase II

Durante l'induzione dell'ovulazione in un ciclo di fecondazione assistita i due parametri che vengono monitorati sono: la concentrazione dell'estradiolo e la grandezza ed il numero dei follicoli. L'incremento dei suddetti parametri è stato correlato anche

con un elevato livello di mioinositolo nel fluido follicolare (Chiu & al., 2002). Chiu & al. hanno inoltre evidenziato che la concentrazione del mioinositolo è significativamente più elevata nei follicoli contenenti ovociti di buona qualità rispetto ai follicoli contenenti ovociti di scarsa qualità (Fig. 17) (Chiu & al., 2002).

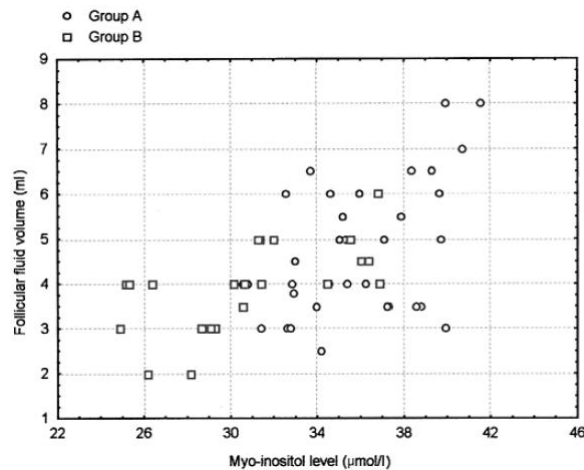


Figura 17. Correlazione tra il volume del liquido follicolare (FF) e mioinositolo contenuto nel fluido follicolare nei campioni ottenuti da pazienti IVF durante il recupero degli ovociti. ○ = Gruppo A: i follicoli hanno prodotto ovociti maturi che sono stati successivamente fertilizzati ($r = 0,471$, $p < 0,01$), e □ = Gruppo B: follicoli che avevano prodotto ovociti immaturi e che non hanno successivamente fertilizzato ($r = 0,613$, $p < 0,01$) (Chiu & al., 2002).

E' stato osservato che il mioinositolo, grazie alla sua capacità di aumentare la sensibilità all'insulina, contribuisce anche a migliorare la qualità ovocitaria e ad aumentare il numero di ovociti raccolti dopo stimolazione ovarica in pazienti affette da PCOS (Ciotta & al., 2010). Infatti Ciotta & al. hanno mostrato che il numero dei follicoli di diametro maggiore a 15 mm e il numero degli ovociti recuperati al momento del recupero ovocitario sono risultati significativamente maggiori nelle pazienti affette da PCOS trattate con mioinositolo, così come il numero medio e la qualità degli embrioni trasferiti, rispetto ai controlli (pazienti affette da PCOS trattate in assenza di mioinositolo). E' stata osservata anche una significativa riduzione del numero medio degli ovociti immaturi (vescicole germinali e ovociti degenerati).

Gli ovociti immaturi, raccolti al momento del recupero ovocitario, possono essere maturati in vitro (IVM). Studi sull'IVM di ovociti umani hanno dimostrato che la maggior parte degli ovociti maturati con la IVM risultano incompetenti, forse a causa di un'incompleta maturazione citoplasmatica (Trounson & al., 1998; Mikkelsen &

Lindenberg., 2001). Tale scarso risultato dell' IVM può essere collegato alla mancanza di una metodologia di valutazione della maturazione citoplasmatica in vitro (Rutherford. 1998; Chiu & al., 2003).

La meiosi negli ovociti di mammiferi inizia nell'ovaio fetale e progredisce attraverso la maggior parte della profase I, prima di arrestarsi allo stadio diplotene formando i follicoli primordiali (Chiu & al., 2003). Dopo la nascita, i follicoli primordiali entrano in una fase di sviluppo che è indipendente dalle concentrazioni di gonadotropine (Chiu & al., 2003). Gli ovociti si allargano e si formano diversi strati di cellule della granulosa che li circondano. Hartshorne & al. ha mostrato che quando i follicoli di topo raggiungono la grandezza di 140 micron, il fluido inizia a riempire l'antro e, da questo momento in poi, l'ulteriore sviluppo di questi follicoli diventa gonadotropine-dipendente (Hartshorne & al., 1994).

E' stato ipotizzato che la ripresa della maturazione meiotica sia controllata sia dalla perdita di input inibitorio che dalla generazione di segnali di stimolazione (Downs. 1995). E' ormai stabilito in molte specie che l'isolamento degli ovociti dai loro follicoli possa indurre la ripresa della meiosi in vitro, probabilmente a causa della rimozione dei naturali stimoli inibitori dei follicoli (Eppig & al., 1994;. Brzyski & al., 1999;. Smith & al., 2000). Tuttavia, i tassi di gravidanza complessivi da ovociti maturati in vitro rimangono molto bassi nella maggior parte dei primati, inclusi gli esseri umani. Questo calo nella vitalità dell'embrione può essere collegato alla scadente qualità ovocitaria in seguito alla maturazione in vitro (Gomez & al., 1993; Schramm & Bavister. 1995; Smitz & Cortvrindt. 1999).

Le condizioni ambientali per la maturazione degli ovociti in vitro restano infatti inferiori rispetto allo sviluppo in vivo per ragioni che ancora non sono pienamente comprese. L'integrazione dei diversi terreni di maturazione con fattori di crescita e gonadotropine ha fornito piccoli miglioramenti nei risultati dell'IVM in animali e ovociti umani (Gomez & al., 1993;. Boland & Gosden. 1994; Smitz & Cortvrindt. 1999).

L'importanza dell'attivazione del ciclo del PI nella generazione dei segnali di stimolazione per lo sviluppo ovocitario è diventata ancora più evidente negli ultimi anni (Downes. 1989; Berridge & Irvine. 1989; Fujiwara & al., 1993;. Fissore & al., 1999). L'attivazione del ciclo del PI può derivare da stimoli ormonali o da fattori di crescita, e

coinvolge una idrolisi recettore-dipendente del PI da fosfolipasi C per generare due secondi messaggeri: l'inositolo 1,4,5- trisfosfato e il diacilglicerolo (Chiu & al., 2003). L'elemento che ha inoltre mostrato svolgere un ruolo fondamentale nella maturazione ovocitaria nei mammiferi è il calcio (Gudermann & al., 1992; Mehlmann & Kline. 1994).

Alcuni autori hanno suggerito che la via del PI sia di primaria importanza nella mobilitazione del calcio intracellulare (Downes. 1989; Berridge. 1993; Berridge & Irvine. 1989; Downes & Macphee. 1990; Fujiwara & al., 1993).

Il calcio è un segnale intracellulare ubiquitario che svolge un ruolo fondamentale nella regolazione di diverse funzioni cellulari (Berridge. 1993). Infatti alcuni autori hanno suggerito che la trasduzione del segnale del calcio possa aiutare la ripresa meiotica in ovociti di mammiferi (Lefevre & al., 1995; Berridge. 1993;. Fujiwara & al., 1993; Mehlmann & Kline. 1994; Pesty & al., 1998).

Poichè il mioinositolo è un precursore dei fosfoinositidi, è possibile ipotizzare che il mioinositolo contenuto nel fluido follicolare possa essere sottoposto al metabolismo del PI durante il processo di maturazione degli ovociti umani (Chiu & al., 2002; Downes & Macphee. 1990). Alcuni autori, suggeriscono infatti che il mioinositolo, l'IP₃ ed i suoi recettori possano svolgere, nel fluido follicolare, un importante ruolo durante la maturazione dell'ovocita negli esseri umani. Le concentrazioni più elevate di mioinositolo nel fluido follicolare contenente ovociti di buona qualità potrebbero anche indicare che sia necessario un trasporto attivo di mioinositolo per mantenerne l'omeostasi (Chiu & al., 2002).

E' stato inoltre osservato che gli ovociti a cui è stato somministrato mioinositolo presentano una maggiore frequenza nella rottura della vescicola germinale rispetto ai controlli (ovociti incubati in un terreno in assenza di mioinositolo) (Chiu & al., 2003) (Fig. 18).

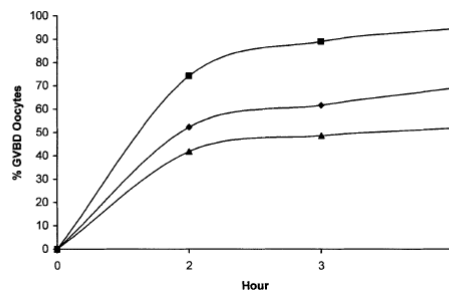


Figura 18. Cinetica della rottura della vescicola germinale. Terreno di coltura degli ovociti senza mioinositolo, contenente una concentrazione di 30 mmoli/l di inositolo, o 50 mmol/l per un periodo di 4 ore (Chiu & al., 2003).

Il suddetto studio ha inoltre osservato che le correnti transitorie spontanee indotte dall'attivazione dei canali del calcio sono dirette nella regione nucleare e poi si diffondono a livello globale verso l'area corticale negli ovociti GV in fase di maturazione in vitro (Chiu & al., 2003). Il trattamento degli ovociti GV con una dose ottimale di mioinositolo è in grado di produrre un ulteriore aumento del calcio intracellulare, che è seguito da un pattern di oscillazioni spontanee di calcio, come è stato osservato nei controlli (ovociti GV non trattati con mioinositolo) (Chiu & al., 2003).

Nell'insieme questi risultati forniscono un ulteriore supporto all'ipotesi che il mioinositolo possa favorire un miglioramento nella maturazione meiotica attraverso l'induzione della trasduzione del segnale intracellulare del calcio (Chiu & al., 2003). Una completa maturazione meiotica richiede cambiamenti intracellulari associati sia alle componenti nucleari che citoplasmatiche (Chiu & al., 2003). Anche se la maggior parte dei cambiamenti morfologici e biochimici durante la maturazione dell'ovocita sono ben documentati, l'identificazione dei fattori specifici che determinano questi cambiamenti è incompleta (Fulka & al., 1998).

La fecondabilità degli ovociti, la loro capacità di iniziare la divisione embrionale, ed il successivo sviluppo preimpianto sono attualmente considerate come parte integrante di una corretta valutazione della maturazione citoplasmatica (Vitt & al., 2001). Il fallimento della fertilizzazione, osservato in ovociti incompetenti, è spesso associato con la penetrazione degli spermatozoi nell'ovocita, ma col successivo fallimento nella formazione dei due pronuclei (Chiu & al., 2003). Chiu & al. hanno osservato che un'elevata percentuale degli ovociti non fertilizzati, non erano stati

incubati con terreni contenenti mioinositolo durante l'IVM (Chiu & al., 2003). L'incapacità degli ovociti maturati in vitro a fertilizzare dopo la penetrazione del liquido seminale può quindi essere correlata alla loro incompleta maturazione citoplasmatica (Fulka & al., 1998).

Chiu & al. hanno anche osservato che lo sviluppo dei gameti, la maturazione degli ovociti, la fertilizzazione, ed il primo sviluppo embrionale (Mehlmann & Kline. 1994; Jones & al., 1995a; Stachecki & Armant. 1996) sono significativamente più elevati negli ovociti GV messi in coltura con un terreno contenente mioinositolo rispetto agli ovociti GV messi in coltura con un terreno di controllo (Chiu & al., 2003).

Sulla base dei suddetti studi è ipotizzabile che il mioinositolo potrebbe aumentare il tasso di maturazione meiotica e il potenziale successivo sviluppo della maturazione ovocitaria attraverso la prematura attivazione delle correnti transienti indotte dall'attivazione dei canali del calcio che, a loro volta, potrebbe accelerare il ciclo cellulare di sintesi e / o attività proteica (Chiu & al., 2003).

Gli stessi autori hanno infine evidenziato la diretta proporzionalità tra la quantità del mioinositolo nel fluido follicolare e sia il numero di blastomeri che la qualità morfologica degli embrioni sviluppati. (Chiu & al., 2002) (Fig. 19).

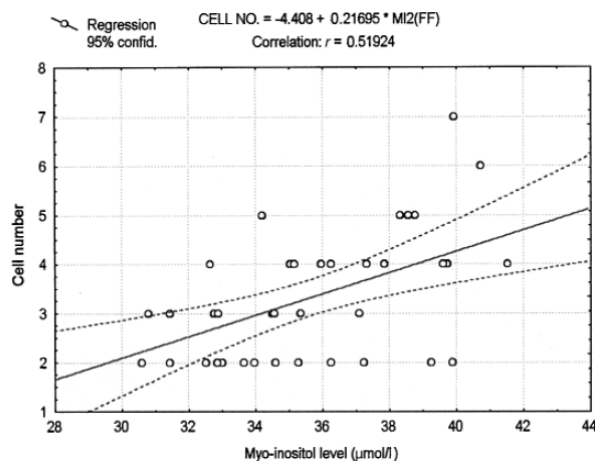


Figura 19. Correlazione tra lo stadio di sviluppo embrionale e il livello di mioinositolo nel fluido follicolare. La retta mostra una correlazione positiva tra le variabili ($r:0,519$, $p:<0,01$). L'asse verticale rappresenta lo stadio di sviluppo embrionale in termini di numeri di blastomeri (1-8) e l'asse orizzontale rappresenta la concentrazione ($\mu\text{mol/l}$) del mioinositolo nel fluido follicolare (Chiu & al., 2002)

L'inositolo inoltre ha dimostrato svolgere un importante ruolo nel successo della gravidanza: bassi livelli di inositolo corrispondono ad un più alto rischio di aborto spontaneo: questo suggerisce che i livelli di inositolo possono essere associati al tasso di gravidanza.

In conclusione quindi, l'alta concentrazione di inositolo presente negli organi maschili e femminili, negli embrioni durante l'embriogenesi e nel siero delle donne in gravidanza suggerisce che esso svolga un ruolo importante nella fertilità, e di conseguenza nella riproduzione assistita.

EFFETTI DELL' INOSITOLO SULLA RISPOSTA OVARICA E SULLA QUALITÀ OVOCITARIA NELLE PAZIENTI CON SINDROME DELL'OVAIO POLICISTICO SOTTOPOSTE A INDUZIONE DELL'OVULAZIONE ED INSEMINAZIONE OVOCITARIA TRAMITE INIEZIONE INTRACITOPLASMATICA DELLO SPERMATOZOO (ICSI)

La ICSI (Fig. 20) è ampiamente utilizzata nell'uomo per il trattamento dell'infertilità maschile grave (Palermo & al., 1992; Van Steirteghem & al., 1993).



Figura 20. Iniezione intracitoplasmatica dello Spermatozoo (ICSI)

Poiché nella ICSI risultano assenti sia la selezione naturale degli spermatozoi, che le naturali interazioni fisiologiche tra l'ovocita e lo spermatozoo, sono state espresse preoccupazioni in merito alla sicurezza di impiego di questa tecnica (Schultz & Williams. 2002). Tuttavia l'esito clinico, in termini di bambini nati sani dopo trattamento con ICSI, è stato rassicurante (Bonduelle & al., 1996; Tarlatzis &

Grimbizis. 1999; Sutcliffe & al., 2001); anche se alcuni studi hanno evidenziato una diminuzione nello sviluppo degli embrioni (Shoukir & al., 1998; Dumoulin & al., 2000; Bhattacharya & al., 2001), una incidenza di alterazioni del cariotipo leggermente più alta (Macas & al., 2001.), e altre anomalie congenite nei bambini concepiti tramite ICSI (Bowen & al., 1998; Wennerholm & al., 2000). Non è chiaro se questi difetti siano legati alla procedura ICSI di per sé o piuttosto ad anomalie del liquido seminale dei partner infertili. Nei mammiferi l'attivazione ovocitaria induce oscillazioni intracitoplasmatiche di ioni calcio che iniziano quando l'ovocita viene penetrato dallo spermatozoo (Cuthbertson & Cobbold. 1985; Kline & Kline. 1992; Miyazaki & al., 1986; Taylor & al., 1993; Ozil & al., 2005; Jędrusik & al., 2007), e possono protrarsi per diverse ore fino alla formazione dei due pronuclei (Jones & al., 1995b; Miyazaki & al., 1993; Schultz & Kopf. 1995). Alcuni studi suggeriscono che esista un fattore prodotto dallo spermatozoo fecondante, il fattore spermatico (SF), che è responsabile dell'induzione di queste oscillazioni dei livelli di calcio (Dale & al., 1985; Stice & Robl. 1990; Swann. 1990; Swann & Lai. 1997; Dale & al., 1985; Stice & Robl. 1990; Swann. 1990; Fissore & al., 1998).

La capacità dell'ovocita di essere attivato dallo spermatozoo fecondante si sviluppa durante la maturazione meiotica (Jędrusik & al., 2007). Anche se la descrizione delle oscillazioni del calcio indotte da SF non è stata completamente caratterizzata, alcuni studi suggeriscono che essa possa essere stimolata dal turnover del PI e dalla produzione di IP₃ (Jones & al., 1998; Wu & al., 2001; Saunders & al., 2002; Jellerette & al., 2000; Miyazaki & al., 1993; Miyazaki & al., 1992; Parrington & al., 1998), verso cui l'ovocita sviluppa sensibilità durante la sua maturazione (Mehlmann & Kline. 1994; Jones & al., 1995a; Fujiwara & al., 1993). Anche il cambiamento nell'organizzazione del reticolo endoplasmatico durante la maturazione ovocitaria potrebbe contribuire allo sviluppo della suddetta sensibilità (Jędrusik & al., 2007). E' stato infatti dimostrato che, nella maturazione dell'ovocita murino, il reticolo endoplasmatico subisce una riorganizzazione e che nell'ovocita maturo si posiziona all'interno della regione corticale (Mehlmann & al., 1995). Questi cambiamenti coincidono con la redistribuzione e l'aumento del numero di recettori IP₃ (Mehlmann & al., 1996).

In relazione agli studi sopracitati, la ICSI (Nakano & al., 1997) ha mostrato di generare oscillazioni del calcio molto simili a quelle indotte dalla fecondazione naturale (Wu & al., 1997; Wu & al., 1998; Swann & Parrington. 1999). E' stato tuttavia

ipotizzato che la ICSI potrebbe avere un impatto negativo sullo sviluppo embrionale influenzando il rilascio di SF, che potrebbe dar luogo all'induzione di un anormale stimolo di attivazione (Kurokawa & Fissore. 2003). E' inoltre utile evidenziare che studi sulla ICSI hanno rivelato che l'immobilizzazione dello spermatozoo, che presumibilmente provoca la rottura della membrana plasmatica dello spermatozoo in modo da facilitare il rilascio di SF, è necessaria per ottenere alti tassi di fertilizzazione (Palermo & al., 1996; Vanderzwalmen & al., 1996; Yanagimachi. 1998).

La ICSI è utilizzata come tecnica di fecondazione assistita in pazienti affette da PCOS, poiché, come è già stato descritto, la sindrome dell'ovaio policistico è la causa più frequente di infertilità da anovulazione cronica nella donna in periodo fertile. Una percentuale compresa tra il 30 e il 40% di donne affette da sindrome dell'ovaio policistico (PCOS) presenta inoltre una ridotta tolleranza al glucosio e, allo stesso tempo, un difetto nei meccanismi di trasduzione del segnale insulinico sembra essere implicato nella patogenesi della resistenza insulinica (Ciotta & al., 2010).

Il ruolo biologico dell'inositolo comprende una specifica attività di controllo del metabolismo dei grassi e degli zuccheri e delle funzionalità cellulari del sistema nervoso. Nei casi di insulino-resistenza o di diabete di tipo II, l'inositolo contribuisce a migliorare il quadro clinico complessivo. In questo contesto l'inositolo può quindi risultare utile per prevenire e correggere i meccanismi fisiopatologici alla base delle alterazioni metaboliche e riproduttive connesse alla sindrome dell'ovaio policistico (Ciotta & al., 2010).

Uno studio ha valutato gli effetti del mioinositolo sulla qualità degli ovociti nella sindrome dell'ovaio policistico (PCOS) in pazienti sottoposti a iniezione intracitoplasmatica dello spermatozoo (ICSI) (Papaleo & al., 2009b). Le pazienti prescelte per questo studio, oltre che essere affette da PCO, dovevano essere normopeso ed avere un partner affetto da infertilità. Le pazienti sono state suddivise in due gruppi: al primo gruppo è stato somministrato mioinositolo combinato con acido folico mentre al gruppo di controllo è stato somministrato il solo acido folico.

I risultati mostrano che nelle pazienti con PCOS, il trattamento con mioinositolo e acido folico, rispetto all'assunzione di solo acido folico, riduce il numero di vescicole germinali e di ovociti degenerati al momento del pick-up ovocitario, senza compromettere il numero totale degli ovociti recuperati. Anche il numero degli embrioni sviluppati dopo la ICSI risulta maggiore rispetto ai controlli, ed anche in

questo caso senza compromettere la qualità morfologica dell'embrione. E' stato riscontrato inoltre anche un leggero aumento del numero di gravidanze. (Papaleo & al., 2009b). Questi risultati sono in linea con quelli riscontrati in altri studi, suggerendo l'effetto positivo che il mioinositolo svolge nello sviluppo degli ovociti (Ciotta & al., 2010).

In conclusione, confrontando i risultati con i dati forniti dalla letteratura scientifica, si può evincere che il mioinositolo costituisce un trattamento semplice e sicuro in grado di ripristinare l'attività ovarica spontanea e conseguentemente la fertilità nella maggior parte delle pazienti affette da sindrome dell'ovaio policistico (Papaleo & al., 2009b).

CONCLUSIONI

L'inositolo e i suoi derivati sono variamente distribuiti in tutti i tessuti di tutti i mammiferi, con un'elevata concentrazione negli organi riproduttivi maschili e femminili. L'inositolo è altresì presente sia nell'embrione che nel feto, dove svolge un importante ruolo nella regolazione cellulare. Inoltre, l'inositolo è una componente essenziale del ciclo del fosfatidilinositolo che sembra essere un sistema di controllo per la proliferazione cellulare in una vasta gamma di cellule, sia normali che tumorali. Infine, è stato ampiamente dimostrato che esso svolga un'attività di controllo sul volume e sulla osmolarità cellulare. Esso regola inoltre il potenziale di membrana e la permeabilità cellulare durante lo sviluppo embrionale, permettendo quindi alle cellule di interagire correttamente tra loro.

Per quanto concerne la fecondazione assistita, è stato dimostrato che il trattamento con mioinositolo in pazienti affette da PCOS riduce l'insulino-resistenza garantendo il ripristino dell'ovulazione, e riducendo il rischio di iperstimolazione ovarica. Inoltre concentrazioni elevate di mioinositolo nel fluido follicolare umano sono state descritte come marcatori di buona qualità ovocitaria. L'integrazione con mioinositolo nelle pazienti che si sottopongono a cicli IVF è anche positivamente correlata alla maturità ovocitaria ed alla progressione meiotica. Inoltre è stato dimostrato che nelle pazienti con PCOS il trattamento con mioinositolo e acido folico riduce il numero di vescicole germinali, di ovociti degenerati al prelievo ovocitario e garantisce una buona qualità negli embrioni sviluppati dopo l'inseminazione. E' stato riscontrato anche un leggero aumento del numero di gravidanze. Nell'insieme queste osservazioni confermano l'importanza del ruolo che l'inositolo svolge sia nella preservazione della fertilità che nella riproduzione assistita.

BIBLIOGRAFIA

Agranoff B.W., Bradley R.M., Brady R.O. 1958. The enzymatic synthesis of inositol phosphatide. *J. Biol.Chem.*, 233, 1077-1083

Akashi M., Akazawa S., Akazawa M., Trocino R., Hashimoto M., Maeda Y., Yamamoto H., Kawasaki E., Takino H., Yokota A., et al. 1991. Effects of insulin and myo-inositol on embryo growth and development during early organogenesis in streptozocin-induced diabetic rats. *Diabetes.*, 40, 1574-9

Akiba S., Sato T. 2004. Cellular function of calcium-independent phospholipase A2. Review. *Biol. Pharm. Bull.*, 27, 1174-78

Andersen D.B., Holub B. J. 1976. The influence of dietary inositol on glyceride composition and synthesis in livers of rats fed different fats. *J. Nutr.*, 106, 529-36

Asplin I., Galasko G., Lerner J. 1993. Chiro-inositol deficiency and insulin resistance: a comparison of the chiro-inositol- and the myo-inositol-containing insulin mediators isolated from urine, hemodialysate, and muscle of control and type II diabetic subjects. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 90, 5924-8

Aouameur R., Da Cal S., Bissonnette P., Coady M.J., Lapointe J.Y. 2007. SMI2 mediates all myo-inositol uptake in apical membranes of rat small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*, 293,G1300-7

Azziz R. 2004. PCOS: a diagnostic challenge. *Reprod Biomed Online.*, 8, 644-648

Badawy A., Elnashar A. 2011. Treatment options for polycystic ovary syndrome *Int J Womens Health.*, 3, 25-35

Baker R.R., Chang H.-Y. 1985. The CMP-stimulated production of diacylglycerol and CDP-diacylglycerol in neuronal nuclei labelled with radioactive arachidonate. *Biochim. Biophys. Acta.*, 835, 221-30

Baillargeon J.P., Iuorno M.J., Nestler J.E. 2003. Insulin sensitizers for polycystic ovary syndrome. *Clin Obstet Gynecol.*, 46, 325-40;

Baillargeon J.P., Diamanti-Kandarakis E., Ostlund R.E. Jr, Apridonidze T., Iuorno M.J., Nestler J.E. 2006. Altered D-Chiro-Inositol Urinary Clearance in women with Polycystic ovary syndrome. *Diabetes Care.*, 29, 300-305

Baillargeon J.P., Nestler J.E., Ostlund R.E., Apridonidze T., Diamanti-Kandarakis E. 2008. Greek hyperinsulinemic women, with or without polycystic ovary syndrome, display altered inositols metabolism. *Hum Reprod.*, 23, 1439-46

Baillargeon J.P., Chiu T.Y.T., Papaleo E., Unfer V. 2010. *Il mioinositolo nella pratica clinica ostetrica-ginecologica*. Verduci Editore

Banaszewska B., Spaczyński R.Z., Pelesz M., Pawelczyk L. 2003. Incidence of elevated LH/FSH ratio in polycystic ovary syndrome women with normo- and hyperinsulinemia. *Rocz. Akad. Med. Białymst.*, 48, 131-4

Barry J.A., Hardiman P.J., Saxby B.K., Kuczmierczyk A.J. 2011. Testosterone and mood dysfunction in women with polycystic ovarian syndrome compared to subfertile controls. *Psychosom Obstet Gynaecol.*, Epub ahead of print

Battaglia F.C., Meschia G., Blechner J.N., Barron D.H. 1961. The free myo-inositol concentration of adult and fetal tissues of several species. *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci.*, 46, 188-93

Beach D.C., Flick P.K. 1982. Early effect of myo-inositol deficiency on fatty acid synthetic enzymes of rat liver. *Biochim . Biophys. Acta.*, 711, 452-59

- Beemster P., Groenen P., Steegers-Teunissen R. 2002. Involvement of inositol in reproduction. *Nutrition Reviews.*, 60, 80-85
- Berridge M.J., Irvine R.F. 1984. Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature (London).*, 312, 315-321
- Berridge M.J. 1987. Inositol lipids and cell proliferation. *Biochimica et Biophysica Acta.*, 907, 33-45
- Berridge M.J, Irvine R.F. 1989. Inositol phosphate and cell signaling. *Nature.*, 306, 197-205
- Berridge M.J. 1993. Inositol triphosphate and calcium signalling. *Nature.* 361, 315-325
- Bhattacharya S., Hamilton M.P.R., Shaaban M., Khalaf Y., Seddler M., Ghobara T., Braude P., Kennedy R., Rutherford A., Hartshorne G. & al. 2001. Conventional in-vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection for the treatment of non-male-factor infertility: a randomized control trial. *Lancet.*, 357, 2075-2079
- Bissonnette P., Coady M.J., Lapointe J.Y. 2004. Expression of the sodium-myo-inositol cotransporter SMIT2 at the apical membrane of Madin-Darby canine kidney cells. *J Physiol.*, 558, 759–768.
- Blank S.K., McCartney C.R., Helm K.D., Marshall J.C. 2007. Neuroendocrine effects of androgens in adult polycystic ovary syndrome and female puberty. *Semin Reprod Med. Sep.*, 25, 352-9
- Bleasdale J.E., Wallis P., MacDonald P.C., Johnston J.M. 1979. Characterization of the forward and reverse reactions catalyzed by CDP-diacylglycerol: inositol transferase in rabbit lung tissue. *Biochim. Biophys. Acta.*, 575, 135-47

Boiling S.D., Douglas M.W., Shirley R.B., Parsons C.M., Koelkebeck K.W. 2000. The effects of various dietary levels of phytase and available phosphorus on performance of laying hens. *Poult. Sci.*, 79, 535-538.

Boland N.I., Gosden R.G. 1994. Effects of epidermal growth factor on the growth and differentiation of cultured mouse ovarian follicles. *J. Reprod. Fertil.*, 101, 369-374

Bolognani L, Volpi N. 1998. *Tavole metaboliche*. Piccin-Nuova Libreria., 91-2-3.

Bonduelle M., Wilikens A., Buysse A., Van Assche E., Wisanto A., Devroey P., Van Steirteghem A.C. and Liebaers I. 1996. Prospective follow-up study of 877 children born after intracytoplasmic sperm injection (ICSI), with ejaculated epididymal and testicular spermatozoa and after replacement of cryopreserved embryos obtained after ICSI. *Hum. Reprod.*, 11, 131-159

Bowen J.R., Gibson F.L., Leslie G.I., Saunders D.M. 1998. Medical and developmental outcome at 1 year for children conceived by intracytoplasmic sperm injection. *Lancet.*, 351, 1529-1534

Bozzetti P., Ferrari M.M., Marconi A.M., Ferrazzi E., Pardi G., Makowski E.L., Battaglia F.C. 1988. The relationship between maternal and fetal glucose concentrations in the human from midgestation until term. *Metabolism.*, 37, 358-363;

Brachet E.A. 1973. Presence of complete sorbitol pathway in the human normal umbilical cord tissue. *Biol Neonate.*, 23, 314-323

Brinster R.L. 1967. Protein content of the mouse embryo during the first five days of development. *Journal of Reproduction and Fertility.*, 13, 413-420

Bromberger P., Hallman M. 1986. Myoinositol in small preterm infants: Relationship between intake and serum concentration. *J Pediatr Gastroenterol.*, 5, 455-8

Brzyski R.G., Leland M.M. and Eddy C.A. 1999. In vitro maturation of baboon oocytes retrieved at the time of cesarean section. *Fertil. Steril.*, 71, 1153-1156.

Bruni A. 1999. *Farmacognosia generale e applicata: i farmaci naturali.*, 166-167.

Brusati V., Jozwik M., Jozwik M., Teng C., Paolini C.L., Marconi A.M., Battaglia F.C. 2005. Fetal and maternal nonglucose carbohydrate and polyol concentrations in normal human pregnancies at term. *Pediatric Res.*, 58,1-5

Buffington C.K., Kitabchi A.E. 1994. Evidence for a defect in insulin metabolism in hyperandrogenic women with polycystic ovarian syndrome. *Metab. Clin. Exp.*, 43, 1367-1372

Burton L.E., Wells W.W. 1974. Studies on the development pattern of the enzymes converting glucose-6-phosphate to myo-inositol in the rat. *Dev Biol.*, 37, 35-42

Burton L.E., Wells W.W. 1976. MyoInositol metabolism during lactation and development in the rat. The prevention of lactation-induced fatty liver by dietary myo-inositol. *J. Nutr.* 106: 16 17-28

Burton L.E., Ray R.E., Bradford J.R., Orr J.P., Nickerson J.A., Wells W.W. 1976. Myo-Inositol metabolism in the neonatal and developing rat fed a myo-inositol-free diet. *J. Nutr.*, 106, 1610-16

Caspary W.F., Crane R.K. 1970. Active transport of myo-inositol and its relation to the sugar transport system in hamster small intestine. *Biochim . Biophys. Acta.*, 203, 308-16

Catalano P.M., Thomas A., Huston-Presley L., Amini S.B. 2003. Increased fetal adiposity: a very sensitive marker of abnormal in utero development. *Am J Obstet Gynecol.*, 189, 1698-1704

Cavalli P., Copp A J. 2002. Inositol and folate resistant neural tube defects. *J Med Genet.*, 39, E5

Chang R.J., Nakamura R.M., Judd H.L., Kaplan S.A. 1983. Insulin resistance in non-obese patients with polycystic ovarian disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 57, 356-359

Charalampous F.C. 1957. Biochemical studies on inositol. III. Biosynthesis of inositol by yeast. *Biol. Chem.*, 225, 595-605

Charalampous F.C., Wahl M., Ferguson L. 1961. Metabolic functions of myo-inositol. II. Effect of inositol deficiency on the metabolism of nucleic acids of mammalian cells in tissue culture. *J. Biol. Chem.*, 236, 2552-6

Chauvin T.R., Griswold M.D. 2004. Characterization of the Expression and Regulation of Genes Necessary for myo-Inositol Biosynthesis and Transport in the Seminiferous Epithelium. *Biology of reproduction.*, 70, 744-751

Chereau A. 1844. Mémoire pur Servir a l'Etude des Maladies des Ovaries. Paris: Fortin, Masson.

Chiu T.T.Y., Tam P.P.L. 1992. A correlation of the outcome of clinical in vitro fertilisation with the inositol content and embryotrophic properties of human serum. *J Assist Reprod.*, 9, 524-530

Chiu T.T.Y.; Rogers M.S., Law E.L.K., Briton-Jones C.M., Cheung L.P., Haines C.J. 2002. Follicular fluid and serum concentrations of myo-inositol in patients undergoing IVF: relationship with oocyte quality. *Hum Reprod.*, 17, 1591–1596

Chiu T., Chiu T.T., Rogers M.S., Briton-Jones C., Haines C. 2003. Effects of myo-inositol on the in-vitro maturation and subsequent development of mouse oocytes. *Human Reprod.*, 18, 408-416

Chu S.W., Hegsted D.M. 1980. Myo-inositol deficiency in gerbils: comparative study of the intestinal lipodystrophy in *Meriones unguiculatus* and *Meriones libycus*. *J. Nutr.*, 110, 1209-16

Chu S.W., Geyer R.P. 1981 . Myo-inositol action on gerbil intestine. Reversal of a diet-induced lipodystrophy and change in microsomal lipase activity. *Biochim. Biophys. Acta.*, 664, 89-97

Chu S.W., Geyer R.P. 1983. Tissue content and metabolism of myo-inositol in normal and lipodystrophic gerbils. *J. Nutr.*, 113, 293-303

Chun J.T., Santella L. 2007. Role of calcium signaling during fertilization. In: J.Krebs & M.Michalak (eds) *Calcium, A Matter of Life or Death*. Elsevier BV, Amsterdam, the Netherlands., 425–470.

Ciotta L., Stracquadiano M., Pagano I., Carbonaro A., Palumbo M., Gulino F. 2010. Effects of inositol on oocyte quality in patients affected with polycystic ovary syndrome. *Minerva Ginecol.*, 62. 525-31

Clements R.S.Jr., Dejesus P.V.Jr., Winegrad A.I. 1973. Raised plasmamyoinositol levels in uremia and experimental neuropathy. *Lancet.*, 26,1137-41

Clements R.S.Jr., Reynertson R. 1977. Myo-Inositol metabolism in diabetes mellitus: effect of insulin treatment. *Diabetes.*, 26, 215-21

Clements R.S.Jr, Diethelm A.G. 1979. The metabolism of myo-inositol by the human kidney. *J Lab Clin Med.*, 93, 210-219.

Clements R.S.Jr, Darnell B. 1980. Myo-inositol content of common foods: development of a high-myo-inositol diet. *American journal of clinical nutrition.*, 33, 1954-1967

Colodny L., Pharm D., Hoffman R.L. 1998. Inositol - Clinical Applications for Exogenous Use. *Altern Med Rev.*, 3, 432-447

Cooper P.H., Hawthorne J.N. 1976. Phosphatidylinositol kinase and diphosphoinositide kinase of rat kidney cortex. *Biochem. J.*, 160, 97-105

Corrado F., D'anna R., Di Vieste G., Giordano D., Pintaudi B., Santamaria A., Di Benedetto. 2011. The effect of myoinositol supplementation on insulin resistance in patients with gestational diabetes. *Diabet Med.* Epub ahead of print

Cosgrove D.J. 1980. Inositolhexakisphosphates. In: D.J. Cosgrove, Editor, *Inositol phosphates. Their Chemistry, Biochemistry and Physiology*, Elsevier Scientific Publishing Company, Netherlands., 26-43

Costantino D., Minozzi G., Minozzi F., Guaraldi C. 2009. Metabolic and hormonal effects of myo-inositol in women with polycystic ovary syndrome: a double-blind trial. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.*, 13, 105-110

Craig J.W., Larner J., Asplin C.M. 1994. Chiro-inositol deficiency and insulin resistance. In: Draznin B, LeRoith D, eds. *Molecular biology of diabetes. Part 2.* Totowa N.J. Humana Press., 343-62

Cunningham M.D., Desai N.S., Thompson S.A. 1978. Amniotic fluid phosphatidylglycerol in diabetic pregnancies. *Am J Obstet Gynecol.*, 131, 719-24

Cupisti S., Kajaia N., Dittrich R., Duezenli H., Beckmann M.W., Mueller A. 2008. Body mass index and ovarian function are associated with endocrine and metabolic abnormalities in women with hyperandrogenic syndrome. *European Journal of Endocrinology.*, 158, 711-719

Cuthbertson K.S., Cobbold P.H. 1985. Phorbol ester and sperm activate mouse oocytes by inducing sustained oscillations in cell Ca^{2+} *Nature.*, 316, 541-542;

Czeizel A.E., Dudás I. 1992. Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N Engl J Med.*, 327, 1832-5

Dahlgren E., Johansson S., Lindstedt G., Knutsson F., Odén A., Janson P.O., Mattson L.A., Crona N., Lundberg P.A. 1992. Women with polycystic ovary syndrome wedge resected in 1956 to 1965: a long-term follow-up focusing on natural history and circulating hormones. *Fertility and Sterility.*, 57, 505-513

Dale B., DeFelice L.J., Ehrenstein G. 1985. Injection of a soluble sperm fraction into sea-urchin eggs triggers the cortical reaction. *Experientia.*, 41, 1068-70

Dawson R.M., Freinkel N. 1961. The distribution of free mesoinositol in mammalian tissues, including some observations on the lactating rat. *Biochem J.*, 78, 606-10

Dawson R.M.C., Thompson W. 1964. The triphosphoinositide phosphomonoesterase of brain tissue. *Biochem. J.*, 91, 244-50

Dejesus P.V.Jr., Clements R.S.Jr., Winegard A.I. 1974. Hypennyoinositolemic polyneuropathy in rats: A possible mechanism for uremic polyneuropathy. *J. Neurol. Sci.*, 21, 237-49

Dmitrieva N.I., Burg M.B. 2007. Osmotic stress and DNA damage. *Methods Enzymol.*, 428, 241-52

Dolhofer R., Wieland O.H. 1987. Enzymatic assay of myo-inositol in serum. *J Clin Chem Clin Biochem.*, 25, 733-36

Downes C.P. 1989. The cellular function of myo-inositol. *Biochem. Soc. Trans.*, 17, 259-68.

Downes C.P., Macphee C.H. 1990. Review: myo-inositol metabolites as cellular signals. *Eur. J. Biochem.*, 193, 1-18

Downs S.M. 1995. Ovulation 2: Control of the resumption of meiotic maturation in mammalian oocytes. In Grudzinskas, J.G. and Yovich, J.L. (eds), *Gametes: The Oocyte*. Cambridge University Press, Cambridge., 150–192

Dughaday W.H., Larner J., Hartnett C.J. 1955. The synthesis of inositol in the immature rat and chick embryo. *Biol Chem.*, 212, 869-75

Dumoulin J.C.M., Coonen E., Bras M., Van Wissen L.C.P., Ignoul-Vanvuchelen R., Bergers-Jansses J.M., Derhaag J.G., Geraedts J.P.M., Evers J.L.H. 2000. Comparison of in-vitro development of embryos originating from either conventional in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.*, 15, 402-09

Dunaif A., Graf M., Mandeli J., Laumas V., Dobrjansky A. 1987. Characterization of groups of hyperandrogenic women with acanthosis nigricans, impaired glucose tolerance and/or hyperinsulinaemia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 65, 499-507

Dunaif A. 1993. Insulin resistance in polycystic ovary syndrome. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 687, 63-64

Dunaif A., Xia J., Book C.B., Schenker E., Tang Z. 1995. Excessive insulin receptor serine phosphorylation in cultured fibroblasts and skeletal muscle. A potential mechanism for insulin resistance in the polycystic ovary syndrome (PCOS). *J. Clin. Invest.*, 96, 801-810

Dunaif A. 1997. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. *Endocr Rev.*; 18, 774-800

Eagle H., Oyama V.I., Levy M., Freeman A.E. 1957. Myo-inositol as an essential growth factor for normal and malignant human cells in tissue culture. *J Biol Chem.*, 266, 191-205

Ehrmann D.A., Cavaghan M.K., Barnes R.B., Imperial J., Rosenfield R.L. 1999a. Prevalence of impaired glucose tolerance and diabetes in women with polycystic ovary syndrome. *Diabetes Care.*, 22, 141-6

Ehrmann D.A., Barnes R.B., Rosenfield R.L., Cavaghan M.K., Imperial J. 1999b. Prevalence of impaired glucose tolerance and diabetes in women with polycystic ovary syndrome. *Diabetes Care.*, 22, 141-46

Eichb J., Gates J., Hauser G. 1979. The mechanism of modification by propranolol of the metabolism of phosphatidyl-cmp (cdp-diacylglycerol) and other lipids in the rat pineal gland. *Biochim Biophys Acta.*, 573, 90-106

Eisenberg F.Jr., Bolden A.H. 1964. Reproductive tract as site of synthesis and secretion of inositol in the male rat. *Nature.*, 202, 599-60

Eisenberg F.Jr., 1967. D- myoinositol 1-phosphate as product of cyclization of glucose 6-phosphate and substrate for a specific phosphatase in rat testis. *J. Biol. Chem.*, 242, 1375-82

Elkind-Hirsch K.E., Valdes C.T., Malinak L.R. 1993. Insulin resistance improves in hyperandrogenic women treated with Lupron. *Fertil. Steril.*, 63, 634-41

Eppig J.L., Schultz R.M., O'Brien M., Chesnel F. 1994. Relationship between the developmental programs controlling nuclear and cytoplasmic maturation of mouse oocytes. *Dev. Biol.*, 164, 1-9

Farquhar C., Vandekerckhove P., Arnot M., Lilford R. 2000. Laparoscopic "drilling" by diathermy or laser for ovulation induction in anovulatory polycystic ovary syndrome. *Cochrane Database Syst Rev.*, 2, CD001122

Fernandez O.I.G., Martinez E. 1944. Biological origin of rubber cyclases. *Farm.*

- Fischer, H.O.L. 1944-5. Chemical and biological relationships between hexoses and inositols. Harvey Lectures., 40, 156
- Fissore RA, Gordo AC, Wu H. 1998. Activation of development in mammals: is there a role for a sperm cytosolic factor?. Theriogenology., 49, 43-52
- Fissore R.A., Longo F.J., Anderson E., Parys J.B., Ducibella T. 1999. Differential distribution of inositol trisphosphate receptor isoforms in mouse oocytes. Biol. Reprod., 60, 49-57
- Folch J., Woolley D.W. 1942. Inositol, a constituent of a brain phosphatide. J Biol Chem; 142, 963-64
- Fulka J.J., First N.L., Moor R.M. 1998. Nuclear and cytoplasmic determinants involved in the regulation of mammalian oocyte maturation. Mol. Hum. Reprod., 4, 41-9
- Fujiwara T., Nakada K., Shirakawa H., Miyazaki S. 1993. Development of inositol trisphosphate-induced calcium release mechanism during maturation of hamster oocytes. Dev Biol., 156, 69-79
- Garrett R.J., Redman C.M. 1975. Localization of enzymes involved in polyphosphoinositide metabolism on the cytoplasmic surface of the human erythrocyte membrane. Biochim. Biophys. Acta., 382, 58-64
- Gavin G., McHenry E.W. 1941. Inositol: a lipotropic factor. J. Bioi. Chem., 139, 485
- Ghafoorunissa. 1975. Effect of dietary protein on the biosynthesis of inositol in rat testes. J. Reprod. Fertil., 42, 233-38
- Ghalayini A., Eichberg J. 1985. Purification of phosphatidylinositol synthetase from rat brain by CDPdiacylglycerol affinity chromatography and properties of the purified enzyme. J. Neurochem., 44, 175-82

Giordano D., Corrado F., Santamaria A., Quattrone S., Pintaudi B., Di Benedetto A., D'Anna R. 2011. Effects of myo-inositol supplementation in postmenopausal woman with metabolic syndrome: a perspective, randomized, placebo-controlled study *Menopause.*, 18, 102-4

Gjonnaess H. 1989. The course and outcome of pregnancy after ovarian electro-cautery in women with polycystic ovarian syndrome: the influence of body weight. *Br J Obstet Gynaecol.*, 96, 714-9

Gomez E., De los Santos M.J., Ruiz A., Tarin J.J., Remohi J., Pellicer A. 1993. Effects of epidermal growth factors in the final stages of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in humans. *Hum. Reprod.*, 8, 691-4

Goudas V.T., Dumesic D.A. 1997. Polycystic ovary syndrome.. *Endocrinol Metab Clin North Am.*, 26, 893-912

Greco P., Vimercati A., Scioscia M., Rossi A.C., Giorgino F., Selvaggi L. 2003a. Timing of fetal growth acceleration in women with insulindependent diabetes. *Fetal Diagn Ther.*, 18, 437-41

Greco P., Vimercati A., Hyett J., Rossit C., Scoiscia M., Giorgino F. 2003b. The ultrasound assessment of adipose tissue deposition in fetuses of "well controlled" insulindependent diabetic pregnancies. *Diabet Med.*, 20, 858-62

Greene D.A., Dejesus P.V.Jr., Winegrad A.I. 1975. Effects of insulin and dietary myo-inositol on impaired peripheral motor nerve conduction velocity in acute streptozotocin diabetes. *J. Clin. Invest.*, 55, 326-36

Greene D.A., Lewis R.A., Lattimer S.A., Brown M.J. 1982. Selective effects of myo-inositol administration on sciatic and tibial motor nerve conduction parameters in the streptozotocin-diabetic rat. *Diabetes.*, 31, 573-8

Greene N.D.E., Copp A.J. 1997. Inositol prevents folate-resistant neural tube defects in the mouse. *Nat Med.*, 3, 60-6

Greiner R., Konietzny U., Jany K.D. 1998. Purification and properties of a phytase from rye. *J. Food Biochem.*, 22, 143-61

Greiner R., Larsson Alminger M. 1999. Purification and characterization of a phytate-degrading enzyme from germinated oat (*Avena sativa*). *J. Sci. Food Agric.*, 79, 1453-60

Greiner R., Jany K.D., Larsson Alminger M. 2000. Identification and properties of myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases (phytases) from Barley (*Hordeum vulgare*). *J. Cer. Sci.*, 31, 127-139

Greiner R. 2002. Purification and characterization of three phytases from germinated lupine seeds (*Lupinus albus* var. *Amiga*). *J. Agric. Food Chem.*, 50, 6858-64

Groenen P.M., Peer P.G., Wevers R.A., Swinkels D.W., Franke B., Mariman E.C., Steegers-Theunissen R.P. 2003a. Maternal myo-inositol, glucose, and zinc status is associated with the risk of offspring with spina bifida. *Am J Obstet Gynecol.*, 189, 1713-9

Groenen P.M., Merkus H.M., Sweep F.C., Wevers R.A., Janssen F.S., Steegers-Theunissen R.P. 2003b. Kinetics of myo-inositol loading in women of reproductive age. *Ann Clin Biochem.*, 40, 79-85

Gudermann T., Nichols C., Levy F.O., Birnbaumer M., Birnbaumer L. 1992. Ca^{2+} mobilization by the LH receptor expressed in *Xenopus* oocytes independent of 3', 5'-cyclic adenosine-monophosphate formation – evidence for parallel activation of 2 signaling pathways. *Mol. Endocrinol.*, 6, 272-78

Halliday J.W., Anderson L.J. 1955. The synthesis of myo-inositol in the rat. *Biol Chem.*, 217, 797-802

Hallman M., Epstein B.L. 1980. Role of myo-inositol in the synthesis of phosphatidylglycerol and phosphatidylinositol in the lung. *Bioch Biophys Res Comm.*, 92, 1151-9

Hallman M. 1984. Effect of extracellular myo-inositol on surfactant phospholipid synthesis in the fetal rabbit lung. *Biochim. Biophys. Acta.*, 795, 67-78

Hallman M., Saugstad O.D., Porreco R.P., Epstein B.L., Gluck L. 1985. Role of myo-inositol in regulation of surfactant phospholipids in the newborn. *Early Human Dev.*, 10, 245-54

Hallman M., Jarvanpaa A.L., Pohjavuori M. 1986. Respiratory distress syndrome and inositol supplementation in preterm infants. *Arch Dis Child.*, 61, 1076-83

Hallman M., Arjomaa P., Hoppu K. 1987. Inositol supplementation in respiratory distress syndrome: Relationship between serum concentration, renal excretion, and lung effluent phospholipids. *J Pediatr.*, 110, 604-10

Hallman M., Pohjavuori M., Bry K. 1990. Inositol supplementation in respiratory distress syndrome. *Lung.*, 168, 877-82

Hallman M., Bry K., Hoppu K., Lappi M., Pohjavuori M. 1992. Inositol supplementation in premature infants with respiratory distress syndrome. *New Engl J Med.*, 326, 1233-9

Handler J.S., Kwon H.M. 1993. Regulation of renal cell organic osmolyte transport by tonicity. *Am J Physiol Cell Physiol.*, 265, C1449–C1455

Hartshorne G.M., Sargent I.L., Barlow D.H. 1994. Growth rates and antrum formation of mouse ovarian follicles in vitro in response to follicle-stimulating hormone, relaxin, cyclic AMP and hypoxanthine. *Hum. Reprod.*, 9, 1103–1012

Hasan S.H., Kotaki A., Yagi K. 1970. Studies on myoinositol. VI. Effect of myoinositol on plasma lipoprotein metabolism of rats suffering from fatty liver. *J. Vitaminol.*, 16, 144-48

Hasan S.H., Nakagawa Y., Nishigaki I., Yagi K. 1974a. Studies on myoinositol. VIII. The incorporation of ³H-myoinositol into phosphatidylinositol of fatty liver. *J. Vitaminol.*, 17, 159-62

Hasan S.H., Nishigaki I., Tsutsui Y., Yagi K. 1974b. Studies on myoinositol. IX. Morphological examination of the effect of massive doses of myoinositol on the liver and kidney of rat. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 20, 55-58

Hauser G. 1963. The formation of free and lipid myo-inositol in the intact rat. *Biochim Biophys Acta.*, 18, 278-89.

Hauser G., Finelli V.N. 1963. The Biosynthesis of Free and Phosphatide Myo-inositol from Glucose by Mammalian Tissue Slices. *TnmJoumu of biological chemistry.*, 238, 3224-8

Hauser O. 1969. Myo-Inositol transport in slices of rat kidney cortex. II. Effect of the ionic- composition of the medium. *Biophys. Acta.*, 173, 267-76

Hawthorne J.N., Kemp P., Ellis, R.B. 1960. Phosphoinositides. 2. The inositol 1-phosphate structure in liver phosphatidylinositol. *Biochem. J.*, 75, 501-4

Hayashi E., Maeda T., Tomita T. 1974. The effect of myo-inositol deficiency on lipid metabolism in rats. I. The alteration of lipid metabolism in myo-inositol-deficient rats. *Biochim. Biophys. Acta.*, 360, 134-45

Hegeman C.E., Grabau E.A. 2001. A novel phytase with sequence similarity to purple acid phosphatases is expressed in cotyledons of germinating soybean seedlings. *Plant Physiol.*, 126, 1598-608

Hegsted D.M., Hayes K.C., Gallagher A., Hanford H. 1973. Inositol deficiency: an intestinal lipodystrophy in the gerbil. *J. Nutr.*, 103, 302-7

Higgins B.D., Kane M.T. 2003. Inositol transport in mouse oocytes and preimplantation embryos: effects of mouse strain, embryo stage, sodium and the hexose transport inhibitor, phloridzin. *Reproduction.*, 125, 111-8

Hinton B.T., White R.W., Setchell B.P. 1980. Concentrations of myo-inositol in the luminal fluid of the mammalian testis and epididymis. *Journal of Reproduction and Fertility.*, 58, 395-99

Hitz W.D., Carlson T.J., Kerr P.S., Sebastian S.A. 2002. Biochemical and Molecular Characterization of a Mutation That Confers a Decreased Raffinosaccharide and Phytic Acid Phenotype on Soybean Seeds. *Plant Physiol.*, 128, 650-60

Hokin-Neaverson M., Sadeghian K., Harris D.W., Merrin J.S. 1977. Synthesis of CDP-diglyceride from phosphatidylinositol and CMP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 78, 364-71

Holte J., Gennarelli G., Berne C., Bergh T., Lithell H. 1996. Elevated ambulatory daytime blood pressure in women with polycystic ovary syndrome: a sign of a pre-hypertensive state?. *Hum Reprod.*, 11, 23-8

Holub B.J., Kuksis A., Thompson W. 1970. Molecular species. of mono-, diand triphosphoinositides of bovine brain. *J. Lipid Res.*, 11, 558-64

Holub B.J., Kuksis A. 1971. Structural and metabolic interrelationships among glycerophosphatides of rat liver in vivo. *Can. J. Biochem.*, 49, 1347-56

Holub B.J. 1974. The Mn^{2+} -activated incorporation of inositol into molecular species of phosphatidylinositol in rat liver microsomes. *Biochim. Biophys. Acta.*, 369, 111-22

Holub B.J. 1978. Studies on the metabolic heterogeneity of different molecular species of phosphatidylinositols. In *Cyclitols and Phosphoinositides*, ed. W.W. Wells, F. Eisenberg Jr., 523-34

Holub B.J. 1984. Nutritional, biochemical, and clinical aspects of inositol and phosphatidylinositol metabolism. *Can.J. Physiol. Pharmacol.*, 62, 1-8

Holub B.J. 1986. Metabolism and function of myo-inositol and inositol phospholipids *Ann. Rev. Nutr.*, 6, 563-97

Honke J., Kozłowska H., Vidal-Valverde C., Frias J., Górecky R. 1998. Changes in quantities of inositol phosphates during maturation and germination of legume seeds. *Z. Lebensm. Unters. Forsch., A* 206, 279-83

Howard C.F.Jr, Anderson L. 1967. Metabolism of myo-inositol in animals. II. Complete catabolism of myo-inositol-14C by rat kidney slices. *Arch Biochem Biophys.*, 118, 332-9.

Howlett A., Ohlsson A. 2003. Inositol for respiratory distress syndrome in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev.*, 4, CD000366

Hughes E., Collins J., Vandekerckhove P., Lilford R. 2000. Clomiphene citrate for ovulation induction in women with oligo-amenorrhoea. *Cochrane Database Syst Rev.*, 2, CD000056

Ibsen L., Strange K. 1996. In situ localization and osmotic regulation of the Na⁺-myo-inositol cotransporter in rat brain. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol.*, 271, F877–F885

Imthurn B., Macas E., Rosselli M., Keller P.J. 1996. Nuclear maturity and oocyte morphology after stimulation with highly purified follicle stimulating hormone compared to human menopausal gonadotrophin. *Hum. Reprod.*, 11, 2387-91

Indyk H.E., Woollard D.C. 1994. Determination of free myo-inositol in milk and instant formula by high-performance liquid chromatography. *Analyst.*, 119, 397-402

Iuorno M.J., Jakubowicz D.J., Baillargeon J.P., Dillon P., Gunn R.D., Allan G., Nestler J.E. 2002. Effects of d-chiro-inositol in lean women with the polycystic ovary syndrome. *Endocr Pract.*, 8, 417-23

Jauniaux E., Hempstock J., Teng C., Battaglia F.C., Burton G.J. 2005. Polyol concentrations in the fluid compartments of the human conceptus during the first trimester of pregnancy: maintenance of redox potential in a low oxygen environment. *J Clin Endocrinol Metab.*, 90, 1171-75

Jędrusik A., Ajduk A., Pomorski P., Maleszewski M. 2007. Mouse oocytes fertilised by ICSI during in vitro maturation retain the ability to be activated after refertilisation in metaphase II and can generate Ca^{2+} oscillations. *BMC Dev Biol.*, 7, 72

Jedziniak J.A., Chylack L.T.jr, Cheng N.M., Gillis M.K., Kalustian A.A., Tung W.H. 1981. The sorbitol pathway in the human lens: aldose reductase and polyol dehydrogenase. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 20, 314-26

Jellerette T., He C.L., Wu H., Parys J.B., Fissore R.A. 2000. Down-regulation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in mouse eggs following fertilization or parthenogenetic activation. *Dev Biol.*, 223, 238–250;

Jonard S., Robert Y., Cortet Rudelli C., Pigny P., Decanter C., Dewailly D. 2003. Ultrasound examination of polycystic ovaries: is it worth counting the follicles?. *Human Reproduction.*, 18, 598-603

Jonard S., Dewailly D. 2004. The follicular excess in polycystic ovaries, due to intra-ovarian hyperandrogenism, may be the main culprit for the follicular arrest. *Hum Reprod Update.*, 10, 107-17

Jones K.T., Carroll J., Whittingham D.G. 1995a. Ionomycin, thapsigargin, ryanodine, and sperm induced Ca^{2+} release increase during meiotic maturation of mouse oocytes. *J. Biol. Chem.*, 270, 6671-77

Jones K.T., Carroll J., Merriman J.A., Whittingham D.G., Kono T. 1995b. Repetitive sperm-induced Ca^{2+} transients in mouse oocytes are cell cycle dependent. *Development.*, 121, 3259-66

Jones K.T., Cruttwell C., Parrington J., Swann K. 1998. A mammalian sperm cytosolic phospholipase C activity generates inositol trisphosphate and causes Ca^{2+} release in sea urchin egg homogenates. *FEBS Lett.*, 437, 297-300

Kahn C.R., White M.F., Shoelson S.E., Backer J.M., Araki E., Cheatham B., Csermely P., Folli F., Goldstein B.J., Huertas P. & al. 1993. The insulin receptor and its substrate: molecular determinants of early events in insulin action. *Recent Prog. Horm. Res.*, 48, 291-339

Kajaia N., Binder H., Dittrich R., Oppelt P.G., Flor B., Cupisti S., Beckmann M.W., Mueller A. 2007. Low sex hormone-binding globulin as a predictive marker for insulin resistance in women with hyperandrogenic syndrome. *European Journal of Endocrinology.*, 157, 499-507

Kane M.T. 1988. The effects of water soluble vitamins on the expansion of rabbit blastocysts. *Journal of Experimental Zoology.*, 245, 220-3

Kane M.T., Bavister B.D. 1988. Vitamin requirements for development of eight-cell hamster embryos to hatching blastocysts. *Biology of Reproduction.*, 39, 1137-43

Kane M.T., Norris M., Harrison R.A.P. 1992. Uptake and incorporation of inositol by preimplantation mouse embryos. *J. Reprod. Fert.*, 96, 617-25

Kelly C.J., Connell J.M., Cameron I.T., Gould G.W., Lyall H. 2000. The long term consequences of polycystic ovary syndrome. *Br. J. Obstet. Gynaecol.*, 107, 1327-38

- Kim C., Kim J.Y., Kim J.H. 2008. Cytosolic phospholipase A2, lipoxygenase metabolites and reactive oxygen species. Review. *BMB Reports.*, 41, 555-9
- Kirazov E.P., Lagnado J.R. 1977. Interactions of myo-inositol with brain microtubules. *FEBS Lett.*, 81, 173-8
- Kleinzeller A., Ziyadeh F.N: 1990. Cell volume regulation in epithelia with emphasis on the role of osmolytes and the cytoskeleton. *Comparative Physiol.*, 4, 59-86
- Kline D., Kline J.T. 1992. Repetitive calcium transients and the role of calcium in exocytosis and cell cycle activation in the mouse egg. *Dev Biol.*, 149, 80-9
- Kok R.D., Steegers-Theunissen R., Eskes T., Van den Berg P. 2003. Decreased relative brain tissue levels of inositol in fetal hydrocephalus. *Am J ObstetGynecol.*, 188, 978-80
- Konietzny U., Greiner R., Jany K.D.. 1995. Purification and characterization of phytase from spelt. *Journal of Food Biochemistry.*, 18, 165-183
- Kousta E., White D.M., Franks S. 1997. Modern use of clomiphene citrate in induction of ovulation. *Hum Reprod Update.*, 3, 359-65
- Kurokawa M., Fissore R.A. 2003. ICSI-generated mouse zygotes exhibit altered calcium oscillations, inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-1 down-regulation, and embryo development. *Mol. Hum. Reprod.*, 9, 523-33
- Kwon H.M., Yamauchi A., Uchida S., Preston A.S., Garcia-Perez A., Burg M.B., Handler J.S. 1992. Cloning of the cDNA for a Na⁺/myo-inositol cotransporter, a hypertonicity stress protein. *J Biol Chem.*, 267, 6297-301
- Laboure A.M., Gagnon J., Lescure A.M. 1993. Purification and characterization of a phytase (myo-inositol-hexakisphosphate phosphohydrolase) accumulated in maize (*Zea mays*) seedlings during germination. *Biochem J.*, 295, 413-9

Larciprete G., Valensise H., Vasapollo B., Novelli G.P., Parretti E., Altomare F., Di Pierro G., Menghini S., Barbati G., Mello G., Arduini D. 2003. Fetal subcutaneous tissue thickness (SCTT) in healthy and gestational diabetic pregnancies. *Ultrasound Obstet Gynecol.*, 22, 591-7

Le Kim D., Betzing H. 1976. Intestinal absorption of polyunsaturated phosphatidylcholine in the rat. *Hoppe-Seyler Z Physiol Chem.*, 357, 1321-31

Lee A.Y., Chung S.S. 1999. Contribution of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. *FASEB J.*, 13, 23-30

Lefevre B., Pesty A., Testart J. 1995. Cytoplasmic and nuclei calcium oscillations in immature mouse oocytes: evidence of wave polarization by confocal imaging. *Exp. Cell Res.*, 218, 166-73

Legro R.S., Barnhart H.X., Schlaff W.D., Carr B.R., Diamond M.P., Carson S.A., Steinkampf M.P., Coutifaris C., McGovern P.G., Cataldo N.A., Gosman G.G., Nestler J.E., Giudice L.C., Leppert P.C., Myers E.R. 2007. Clomiphene, metformin, or both for infertility in the polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med.*, 356, 551-66

Lembach K., Charalampous F.C. 1966. Metabolic functions of myo-inositol. IV. Temporal changes of the level of various enzyme activities during development of inositol deficiency. *J. biol. Chem.*, 241, 395-9

Lembach K., Charalampous F.C. 1967a . Metabolic functions of myo-inositol. V. Utilization of glycine and serine in nucleotide and nucleic acid biosynthesis by inositol-deficient KB cells. *J. biol. Chem.*, 242, 2599-605

Lembach K., Charalampous F.C. 1967b. Metabolic functions of myo-inositol. VI. Impairment of amino acid transport in KB cells caused by inositol deficiency. *J. biol. Chem.*, 242, 2606-14

Lewin L.M., Beer R. 1973. Prostatic secretion as the source of myo-inositol in human seminal fluid. *Fertil. Steril.*, 24, 666-70

Lewin L.M., Szeinberg A., Lepkifker E. 1973. Gas chromatographic measurement of myo-inositol in human blood, cerebrospinal fluid and seminal fluid. *Clinica Chimica Acta.*, 45, 361-8

Lewin L.M., Melmed S., Bank H. 1974. Rapid screening test for detection of elevated myo-inositol levels in human blood serum. *CUn. Chim. Acta.*, 54, 377-9

Lewin L.M., Yannai Y., Sulimovici S., Kraicer P.F. 1976. Studies on the metabolic role of myo-inositol. *Biochem.J.*, 156, 375-80

Lewin L.M., Melmed S., Passwell J.H., Yannai Y., Brish M., Orda S., Boichis H., Bank H. 1978. Myoinositol in human neonates: serum concentrations and renal handling. *Pediatr Res.*, 12, 3-6

Li J., Foote R.H. 1995. Effect of inositol and glycine with increasing sodium chloride and constant osmolality on development of rabbit embryos. *J Assist Reprod.*, 12, 141-6

Li J., Hegeman C.E., Hanlon R.W., Lacy G.H., Denbow M.D., Grabau E.A. 1997. Secretion of active recombinant phytase from soybean cell suspension cultures. *Plant Physiol.*, 114, 1103-11

Lien Y.H., Shapiro J.I., Chan L. 1990. Effects of hypernatremia on organic brain osmoles. *J Clin Invest.*, 85, 1427-35

Lien Y.H., Shapiro J.I., Chan L. 1991. Study of brain electrolytes and organic osmolytes during correction of chronic hyponatremia. Implications for the pathogenesis of central pontine myelinolysis. *J Clin Invest.*, 88, 303-9

Livingstone C., Collison M. 2002. Sex steroids and insulin resistance. *Clinical Science.*, 102, 151-166

- Loewus F.A., Murthy P.P.N. 2000. Myoinositol metabolism in plants. *Plant Sci.*, 150, 1-19
- Lott J.N.A. 1984. Accumulation of seed reserves of phosphorus and other minerals. *Seed Physiology* (Murray, D.R., ed.), 139-166
- Low M.G., Saltiel A.R. 1988. Structural and functional roles of glycosylphosphatidylinositol in membranes. *Science.*, 239, 268-75
- Macas E., Imthurn B., Keller P.J. 2001. Increased incidence of numerical chromosome abnormalities in spermatozoa injected into human oocytes by ICSI. *Hum. Reprod.*, 16, 115-20
- Mack S.E., Palmer F.B. 1984. Evidence for a specific phosphatidylinositol 4-phosphate phosphatase in human erythrocyte membranes. *J. Lipid Res.*, 25, 75-85
- Maeda K. 2001. Hepatocellular injury in a patient receiving pioglitazone. *Ann Intern Med.*, 135, 306
- Maenz D.D., Classen H.L. 1998. Phytase activity in the small intestinal brush border membrane of the chicken. *Poult Sci.*, 77, 557-63
- Mahadevappa V.G., Holub B.I. 1982. The molecular species composition of individual diacyl phospholipids in human platelets. *Biochim. Biophys. Acta.*, 713, 73-79
- Malo C., Berteloot A. 1991. Analysis of kinetic data in transport studies: new insights from kinetic studies of Na⁺-D-glucose cotransport in human intestinal brush-border membrane vesicles using a fast sampling, rapid filtration apparatus. *J Membr Biol.*, 122, 127-41
- Marconi A.M., Cetin I., Davoli E., Baggiani A.M., Fanelli R., Fennessey P.V., Battaglia F.C., Pardi G. 1993. An Evaluation of Fetal Glucogenesis in Intrauterine Growth-retarded Pregnancies. *Metabolism.*, 47, 860-64

Marconi A.M., Paolini C., Buscaglia M., Zerbe G., Battaglia F.C., Pardi G. 1996. The impact of gestational age on the maternal-fetal glucose concentration difference. *Obstet Gynecol.*, 87, 937-42

Mather K.J., Kwan F., Corenblum B. 2000. Hyperinsulinemia in polycystic ovary syndrome correlates with increased cardiovascular risk independent of obesity. *Fertil Steril.*, 73, 150-6

May L.D., Lefkowitz J.H., Kram M.T., Rubin DE. 2002. Mixed hepatocellular-cholestatic liver injury after pioglitazone therapy. *Ann Intern Med.*, 136, 449-52

McConnell F., Goldstein L. 1990. Volume regulation in elasmobranch red blood cells, in *Comparative Physiology* (R.K.H. Kinne, E. Kinne Saffron and K.W. Beyenbach, eds.) Vol. 4 pp.114-131. S. Karger, Basel

Mehlmann L.M., Kline D. 1994. Regulation of intracellular calcium in the mouse egg: calcium release in response to sperm or inositol triphosphate is enhanced after meiotic maturation. *Biol. Reprod.*, 51, 1088-98

Mehlmann L.M., Terasaki M., Jaffe L.A., Kline D. 1995. Reorganization of the endoplasmic reticulum during meiotic maturation of the mouse oocyte. *Dev Biol.*, 170, 607-615

Mehlmann L.M., Mikoshiba K., Kline D. 1996. Redistribution and increase in cortical inositol 1,4,5-trisphosphate receptors after meiotic maturation of the mouse oocyte. *Dev Biol.*, 180, 489-98

Meigs J.B., Wilson P.W., Fox C.S., Vasan R.S., Nathan D.M., Sullivan L.M., D'Agostino R.B. 2006. Body mass index, metabolic syndrome, and risk of type 2 diabetes or cardiovascular disease. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.*, 91, 2906-12

- Michell R.H., Kirk C.J., Jones L.M., Downes C.P., Creba J.A. 1981. The stimulation of inositol lipid metabolism that accompanies calcium mobilization in stimulated cells: defined characteristics and unanswered questions. *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B.*, 296, 123-37
- Michell R.H. 1989. Inositol lipids and phosphates in growing, stimulated and differentiating cells. *Biochemical Society Transactions.*, 17, 1-3
- Mikkelsen A.L., Lindenberg S. 2001. Morphology of in-vitro matured oocytes: impact on fertility potential and embryo quality. *Hum. Reprod.*, 16, 1714-18
- Miyazaki S., Hashimoto N., Yoshimoto Y., Kishimoto T., Igusa Y., Hiramoto Y. 1986. Temporal and spatial dynamics of the periodic increase in intracellular free calcium at fertilization of golden hamster eggs. *Dev Biol.*, 118, 259-67
- Miyazaki S., Yuzaki M., Nakada K., Shirakawa H., Nakanishi S., Nakade S., Mikoshiba K. 1992. Block of Ca^{2+} wave and Ca^{2+} oscillation by antibody to the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in fertilized hamster eggs. *Science.*, 257, 251-255
- Miyazaki S., Shirakawa H., Nakada K., Honda Y. 1993. Essential role of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/ Ca^{2+} release channel in Ca^{2+} waves and Ca^{2+} oscillations at fertilization of mammalian eggs. *Dev. Biol.*, 158, 62-78
- Moran C., Huerta L., Conway-Myers B. A., Hines G. A., Azziz R. 2001. Altered autophosphorylation of the insulin receptor in the ovary of a woman with polycystic ovarian syndrome. *Fertil. Steril.*, 75, 635-638
- Morris R.N., Collins A.C. 1971. Biosynthesis of myo-inositol by rat testis following surgically induced cryptorchidism or treatment with triethylenemelamine. *Journal of Reproduction and Fertility.*, , 201-10

- Naccarato W.F., Ray R.E., Wells W.W. 1974. Biosynthesis of myo-inositol in rat mammary gland. Isolation and properties of the enzymes. *Archives of Biochemistry and Biophysics.*, 164, 194-201
- Nader S., Diamanti-Kandarakis E. 2007. Polycystic ovary syndrome, oral contraceptives and metabolic issues: new perspectives and a unifying hypothesis. *Oxford Journals Medicine Human Reproduction.*, 22, 317-22
- Nahapetian A., Young V.R. 1980. Metabolism of ¹⁴C-phytate in rats: effect of low and high dietary calcium intakes. *J. Nutr.*, 110, 1458-72
- Nakano T.T., Joh T., Narita K., Hayakawa T. 2000. The pathway of dephosphorylation of myo-inositol hexakisphosphate by phytases from wheat bran of *Triticum aestivum* L. cv. Nourin #61. *Biosci Biotechnol Biochem.*, 64, 995-1003
- Nestler J.C., Barlascini C.O., Matt D.W., Steingold K.A., Plymate S.R., Clore J.N., Blackard W.G. 1989. Suppression of serum insulin by diazoxide reduces serum testosterone level in obese women with polycystic ovary syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 68, 1027-32
- Nestler J.E., Romero G., Huang L.C., Zhang C.G., Larner J. 1991. Insulin mediators are the signal transduction for insulin's action on human placental steroidogenesis. *Endocrinology.*, 129, 2951-56
- Nestler J.E., Jakubowicz D.J., Reamer P., Gunn R.D., Allan G. 1999. Ovulatory and Metabolic Effects of d-Chiro-Inositol in the Polycystic Ovary Syndrome. *N Engl J Med.*, 340, 1314-20
- Niemi M., Kormanio M. 1965. Response of the cycle of the seminiferous epithelium of the rat testis to artificial cryptorchidism. *Fert. Steril.*, 16, 236-42

Norman R.J., Hague W.M., Masters S.C., Wang X.J. 1995. Subjects with polycystic ovaries without hyperandrogenaemia exhibit similar disturbances in insulin and lipid profiles as those with polycystic ovary syndrome. *Hum. Reprod.*, 10, 2261-68

Norman R.J., Kidson W.J., Cuneo R.C., Zacharin M.R. 2001. Metformin and intervention in polycystic ovary syndrome. Endocrine Society of Australia, the Australian Diabetes Society and the Australian Paediatric Endocrine Group. *Med. J. Aust.*, 174, 580-3

Norman R.J., Dewailly D., Legro R.S., Hickey T.E. 2007. Polycystic ovary syndrome. *Lancet.*, 370, 685-97

Ortmeyer H.K., Bodkin N.L., Lilley K., Lerner J., Hansen B.C. 1993a. Chiroinositol deficiency and insulin resistance. I. Urinary excretion rate of chiroinositol is directly associated with insulin resistance in spontaneously diabetic rhesus monkeys. *Endocrinology.*, 132, 640-5

Ortmeyer H.K., Huang L.C., Zhang L., Hansen B.C., Lerner J. 1993b. Chiroinositol deficiency and insulin resistance. II. Acute effects of D-chiroinositol administration in streptozotocin-diabetic rats, normal rats given a glucose load, and spontaneously insulin-resistant rhesus monkeys. *Endocrinology.*, 132, 646-51

Ovalle F., Azziz R. 2002. Insulin resistance, polycystic ovary syndrome, and type 2 diabetes mellitus. *Fertil Steril.*, 77, 1095-105

Ozil J.P., Markoulaki S., Toth S., Matson S., Banrezes B., Knott J.G., Schultz R.M., Huneau D., Ducibella T. 2005. Egg activation events are regulated by the duration of a sustained $[Ca^{2+}]_{cyt}$ signal in the mouse. *Dev Biol.*, 282, 39-54

Palermo G., Joris H., Devroey P., Van Steirteghem A.C. 1992. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*, 340, 17-18

Palermo G.D., Schlegel P.N., Colombero L.T., Zaninovic N., Moy F., Rosenwaks Z. 1996. Aggressive sperm immobilization prior to intracytoplasmic sperm injection with immature spermatozoa improves fertilization and pregnancy rates. *Hum. Reprod.*, 11, 1023-29

Palmano K.P., Whiting P.H., Hawthorne I.N. 1977. Free and lipid myoinositol in tissues from rats with acute and less severe streptozotocin-induced diabetes. *Biochem. J.*, 167, 229-35

Palomba S., Orio Jr F., Russo T., Falbo A., Cascella T., Colao A., Lombardi G., Zullo F. 2004. Is ovulation induction still a therapeutic problem in patients with polycystic ovary syndrome? *J Endocrinol Invest.* 27, 796-805

Palomba S., Orio F. Jr., Falbo A., Manguso F., Russo T., Cascella T., Tolino A., Carmina E., Colao A. and Zullo F. 2005. Prospective Parallel Randomized, Double-Blind, Double-Dummy Controlled Clinical Trial Comparing Clomiphene Citrate and Metformin as the First-Line Treatment for Ovulation Induction in Nonobese Anovulatory Women with Polycystic Ovary Syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.*, 90, 4068-74

Palomba S, Orio F, Jr, Zullo F. 2007. What is the best first-step therapeutic approach in treating anovulatory infertility in patients with polycystic ovary syndrome? Questions that are still unanswered. *Gynecol Endocrinol.*, 23, 245-7

Papaoiannou S., Tzafettas J. 2010. Anovulation with or without PCO, hyperandrogenaemia and hyperinsulinaemia as promoters of endometrial and breast cancer. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.*, 24, 19-27

Papaleo E., Unfer V., Baillargeon J.P., De Santis L., Fusi F., Brigante C., Marelli G., Cino I., Redaelli A., Ferrari A. 2007. Myo-inositol in patients with polycystic ovary syndrome: a novel method for ovulation induction. *Gynecol Endocrinol.*, 23, 700-3

- Papaleo E., Unfer V., Baillargeon J.P., Chiu T.T. 2009a. Contribution of myo-inositol to reproduction. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.*, 147, 120-3
- Papaleo E., Unfer V., Baillargeon J.P., Fusi F., Occhi F., De Santis L. 2009b. Myo-inositol may improve oocyte quality in intracytoplasmic sperm injection cycles. A prospective, controlled, randomized trial. *Fertil Steril.*, 91, 1750-4
- Parretti E., Carignani L., Cioni R., Bartoli E., Borri P., La Torre P., Mecacci F., Martini E., Scarselli G., Mello G. 2003. Sonographic evaluation of fetal growth and body composition in women with different degrees of normal glucose metabolism. *Diabetes Care.*, 26, 2741-48
- Parrington J., Brind S., De Smedt H., Gangeswaran R., Lai F.A., Wojcikiewicz R., Carroll J. 1998. Expression of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in mouse oocytes and early embryos: the type I isoform is upregulated in oocytes and downregulated after fertilization. *Dev Biol.*, 203, 451-61
- Parthasarathy R., Eisenberg F.Jr. 1986. The inositol phospholipids: a stereochemical view of biological activity. *Biochem. J.*, 235, 313-22
- Pascual J.M., Solivera J., Prieto R., Barrios L., Lopez-Larrubia P., Cerdan S., Roda J.M. 2007. Time course of early metabolic changes following diffuse traumatic brain injury in rats as detected by (1)H NMR spectroscopy. *J Neurotrauma.*, 24, 944-59
- Paulus H., Kennedy E.P. 1960. The enzymatic synthesis of inositol monophosphatide J. *Biol. Chem.*, 235, 1303-11
- Pesty A., Lefevre B., Kubiak J., Gerand G., Tesarik J., Maro B. 1994. Mouse oocyte maturation is affected by lithium via the polyphosphoinositide metabolism and the microtubule network. *Mol. Reprod. Dev.*, 38, 187-99

- Pesty A., Avazeri N., Lefevre B. 1998. Nuclear calcium release by InsP3-receptor channels plays a role in meiosis reinitiation in the mouse oocyte. *Cell Calcium.*, 24, 239-51
- Pitkanen E. 1976. Changes in serum and urinary myo-inositol levels in chronic glomerulonephritis. *Clin. Chim. Acta.*, 71, 461-8
- Polderman K.H., Gooren L.J.G., Asscheman H., Bakker A., Heine R.J. 1994. Induction of insulin resistance by androgens and estrogens. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 79, 265-71
- Poretsky L. 1991. On the paradox of insulin-induced hyperandrogenism in insulin resistant states. *Endocr. Rev.*, 12, 3-13
- Pryor P.R., Liu S.C.H., Clark A.E., Yang J., Holman G.D., Tosh D. 2000. Chronic insulin effects on insulin signalling and GLUT4 endocytosis are reversed by metformin. *Biochem. J.*, 348, 83-91
- Raboy V. 1990. The biochemistry and genetics of phytic acid synthesis. In: Morre DJ, Boss W, Loewus FA (eds) *Inositol metabolism in plants*. Alan R. Liss, New York., 52-73
- Rademacher T.W., Gumaa K., Scioscia M. 2007. Preeclampsia, insulin signalling and immunological dysfunction: A fetal, maternal or placental disorder? *J Reprod Immunol.*, 76, 78-84
- Rao R.H., Strickland K.P. 1974. On the solubility, stability and partial purification of CDP-diacyl-sn-glycerol: inositol transferase from rat brain. *Biochim. Biophys. Acta.*, 348, 306-14
- Rapoport S., Leva E., Guest G.M.. 1941. Phytase in plasma and erythrocytes of vertebrates. *J Biol Chem.*, 139, 621-32

- Rattanachaiyanont M., Leader A., Leveille M.C. 1999. Lack of correlation between oocyte-corona-cumulus complex morphology and nuclear maturity of oocytes collected in stimulated cycles for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.*, 71, 937-40
- Raychaudhuri K., Maresh M.J. 2000. Glycemic control throughout pregnancy and fetal growth in insulin-dependent diabetes. *Obstet Gynecol.*, 95, 190-4
- Reese E.A., Khandelwal M., Wu Y.K., Borenstein M. 1997. Dietary intake of myoinositol and neural tube defects in offspring of diabetic rats. *Am J Obstet Gynecol.*, 176, 536-9
- Reddy N.R., Sathe S.K., Salunkhe D.K.. 1982. Phytates in legumes and cereals. *Adv. Food Res.*, 28, 1-92
- Robinson R., Fritz LB. 1979. Myoinositol biosynthesis by Sertoli cells, and levels of myoinositol biosynthetic enzymes in testis and epididymis. *Can. J. Biochem.*, 57, 962-7
- Rokitansky C. 1844. A manual of pathological anatomy, vol 2. Philadelphia: Blanchard & Lea, 1855, 246 (trans by Edward Sieveking from original German 1844 ed)
- Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. 2004. *Fertil Steril.*, 81, 19-25
- Rotterdam 9, ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). 2004. *Human Reproduction.*, 19, 41-7
- Ruby V. 1997. Accumulation and storage of phosphate and minerals. In: Larkins BA, Vasil IK (eds) *Cellular and molecular biology of plant seed development*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. 441-7

Rutherford A.J. 1998. The practical aspects of in vitro maturation of human oocytes. In Kempers, R.D., Cohen, J., Haney, A.F. and Younger, J.B. (eds). Fertility and Reproductive Medicine. 577-87

Salway J.G., Finnegan J.A., Barnett D., Whitehead L., Karunanayaka A., Payne R.B. 1978. Effect of myoinositol on peripheral-nerve function:in diabetes. Lancet., 2, 1282-84

Salway J.G. 2004. Metabolism at a glance (3rd ed.). Alden, Mass. : Blackwell Pub, 109-115

Sardet C., Prodon F., Dumollard R., Chang P., Chenevert J. 2002. Structure and Function of the Egg Cortex from Oogenesis through Fertilization. Review Developmental Biology., 241, 1-23

Saunders C.M., Larman M.G., Parrington J., Cox L.J., Royse J., Blayney L.M., Swann K., Lai F.A. 2002. PLC ζ : a sperm-specific trigger of Ca²⁺ oscillations in eggs and embryo development. Development., 129, 3533-44

Scalera V., Natuzzi D., Prezioso G. 1991. Myo-inositol transport in rat intestinal brush border membrane vesicles, and its inhibition by D-glucose. Biochim Biophys Acta., 1062, 187-92

Schaefer-Graf U.M., Kjos S.L., Fauzan O.H., Bühling K.J., Siebert G., Bühler C., Ladendorf B., Dudenhausen J.W., Vetter K. 2004. A randomized trial evaluating a predominantly fetal growth-based strategy to guide management of gestational diabetes in Caucasian women. Diabetes Care., 27, 297-302

Schramm R.D., Bavister B.D. 1995. Effects of granulosa cells and gonadotrophins on meiotic and developmental competence of oocytes in vitro in non-stimulated rhesus monkeys. Hum. Reprod., 10, 887-95

Schultz R.M., Kopf G.S. 1995. Molecular basis of mammalian egg activation. *Curr. Top. Dev. Biol.*, 30, 21-62

Schultz R.M., Williams C.J. 2002. The science of ART. *Science.*, 296, 2188-90

Scioscia M., Vimercati A., Selvaggi L.E., Rodeck C.H., Rademacher T.W. 2006a. Inositol phosphoglycan putative insulin mediator in human amniotic fluid. *J Matern Fetal Neonatal Med.*, 19, 9-12

Scioscia M., Gumaa K., Kunjara S., Paine M.A., Selvaggi L.E., Rodeck C.H., Rademacher T.W. 2006b. Insulin resistance in human preeclamptic placenta is mediated by serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 and -2. *J Clin Endocrinol Metab.*, 91, 709-17

Scioscia M., Gumaa K., Whitten M., Selvaggi L.E., Rodeck C.H., Rademacher T.W. 2007a. Inositol phosphoglycan P-type in healthy and preeclamptic pregnancies. *J Reprod Immunol.* 76, 85-90

Scioscia M., Kunjara S., Gumaa K., McLean P., Rodeck C.H., Rademacher T.W. 2007b. Urinary excretion of inositol phosphoglycan Ptype in gestational diabetes mellitus. *Dia Med. Diabet Med.*, 24, 1300-4

Scioscia M., Kunjara S., Gumaa K., Gomez Galan A.M., McLean P., Rodeck C.H., Rademacher T.W. 2007c. Altered urinary release of inositol phosphoglycan A-type in women with gestational diabetes mellitus. *Gynecol Obstet Invest.*, 64, 217-23

Seller M.J. 1994. Vitamins, folic acid and the cause and prevention of neural tube defects. In: Bock G, Marsh J, eds. *Neural tube defects (Ciba Foundation Symposium 181)*. Chichester: John Wiley & Sons, 161-73

Setchell B.P., Voglmayr J.K., Hines N.T. 1971. The effect of local heating on the flow and composition of rete testis fluid in the conscious ram. *J. Reprod. Fertil.*, 24, 81-9

Shepherd N.D., Taylor T.G. 1974. A re-assessment of the status of myoinositol as a vitamin. *Proc. Nutr. Soc.* 33, 63A-64A

Shetty H.U., Holloway H.W., Schapiro M.B. 1996. Cerebrospinal fluid and plasma distribution of myo-inositol and other polyols in Alzheimer disease. *Clinical Chemistry.*, 42, 298-302

Shi J., Wang H., Wu Y., Hazebroek J., Meeley R.B., Ertl D.S.. 2003. The Maize Low-Phytic Acid Mutant *lpa2* Is Caused by Mutation in an Inositol Phosphate Kinase. *Gene Plant Physiol.*, 131, 507-15

Shi J., Wang H., Hazebroek J., Ertl D.S., Harp T. 2005. The maize lowphytic acid 3 encodes a myo-inositol kinase that plays a role in phytic acid biosynthesis in developing seeds. *T. Plant J.*, 42, 708-19

Shoukir Y., Chardonens D., Campana A., Sakkas D. 1998. Blastocyst development from supernumerary embryos after intracytoplasmic sperm injection: a paternal influence? *Hum. Reprod.*, 13, 1632-37

Smith C.D., Wells W.W. 1984. Characterization of a phosphatidylinositol 4-phosphate-specific phosphomonoesterase in rat liver envelopes. *Arch. Biochem. Biophys.*, 235, 529-37

Smith S.D., Mikkelsen A.L., Lindenberg S. 2000. Development of human oocytes matured in vitro for 28 or 36 hours. *Fertil. Steril.*, 73, 541-4

Smitz J., Cortvrindt R. 1999. Oocyte in-vitro maturation and follicle culture: current clinical achievements and future directions. *Hum. Reprod. Update*, 14, 145-61

Spector R., Lorenzo A.V. 1975. The origin of myo-inositol in brain, cerebrospinal fluid and choroid plexus. *J.Neurochem.*, 25, 353-4

Spector R. 1976. Inositol accumulation by brain slices in vitro. *J. Neurochem.*, 27, 1273-6

Stachecki J.J., Armant D.R. 1996. Transient release of calcium from inositol, 1,4,5-triphosphate specific stores regulates mouse preimplantation development. *Development.*, 122, 2485-96

Stein I.F., Leventhal M.L. 1935. Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries. *American Journal of Obstetrics and Gynaecology.*, 29, 181-91

Steinberger E., 1962. A quantitative study of the effect of an alkylating agent (triethylene melamine) on the seminiferous epithelium of rats. *J. Reprod Fert.*, 3, 250

Stetten M.R., Stetten D.Jr. 1946. Biological conversion of inositol into glucose. *J Biol Chem.*, 164, 85-91

Stice S.L., Robl J.M. 1990. Activation of mammalian oocytes by a factor obtained from rabbit sperm. *Mol. Reprod. Dev.*, 25, 272-80

Strange K., Morrison R., Heilig C.W., DiPietro S., GuUans S.R. 1991. Upregulation of inositol transport mediates inositol accumulation in hyperosmolar brain cells. *American Journal of Physiology.*, 260, C784-C790

Strauss J.F. 2003. Some new thoughts on the pathophysiology and genetics of polycystic ovary syndrome. *Ann N Y Acad Sci.*, 997, 42-8

Strowig S.M., Raskin P. 2005. Combination therapy using metformin or thiazolidinediones and insulin in the treatment of diabetes mellitus. *Diabetes Obes Metab.*, 7, 633-41

Sullivan K.M.C., Busa W.B., Wilson K.L. 1993. Calcium mobilization is required for nuclear vesicle fusion in vitro: implications for membrane traffic and IP3 receptor function. *Cell.*, 73, 1411-22

Sutcliffe A.G., Taylor B., Saunders K., Thornton S., Lieberman B.A., Grudzinskas J.G. 2001. Outcome in the second year of life after in-vitro fertilization by intracytoplasmic sperm injection: a UK case-control study. *Lancet.*, 357, 2080-4

Swann K. 1990. A cytosolic sperm factor stimulates repetitive calcium increases and mimics fertilization in hamster eggs. *Development.*, 110, 1295-302

Swann K., Lai F.A. 1997. A novel signalling mechanism for generating Ca^{2+} oscillations at fertilization in mammals. *BioEssays.*, 19, 371-8

Swann K., Parrington J. 1999. Mechanism of Ca^{2+} release at fertilization in mammals. *J. Exp. Zool.*, 285, 267-75

Synonyms in Commonchemistry.org

Synonyms in PubChem

Takayama S., White M.F., Kahn C.R. 1988. Phorbol ester-induced serine phosphorylation of the insulin receptor decreases its tyrosine kinase activity. *J. Biol. Chem.*, 263, 3440-47

Takenawa T., Tsumita T. 1974a. Properties of scyllitol transport in rat kidney slices. *Biochim. Biophys. Acta.*, 373, 490-4

Takenawa T., Tsumita T. 1974b. MyoInositol transport in plasma membrane of rat kidney. *Biochim. Biophys. Acta.*, 303, 106-14

Takenawa T., Wada E., Tsumita T. 1977. Myo-Inositol binding and transport in brush border membranes of rat kidney. *Biochim. Biophys. Acta.*, 464, 108-17

Takenawa T., Egawa K. 1977. CDPdiglyceride: inositol transferase from rat liver. *J. Bioi. Chern.*, 252, 5419-23

- Takenawa T., Egawa K. 1980. Phosphatidylinositol: myo-inositol exchange enzyme from rat liver: partial purification and characterization. *Arch. Biochem. Biophys.*, 202, 601-7
- Tang T, Lord JM, Norman RJ, Yasmin E, Balen AH. 2010. Insulin-sensitising drugs (metformin, rosiglitazone, pioglitazone, D-chiro-inositol) for women with polycystic ovary syndrome, oligo amenorrhoea and subfertility. *Cochrane Database Syst Rev.* CD003053
- Tarlatzis B.C., Grimbizis G. 1999. Pregnancy and child outcome after assisted reproduction techniques. *Hum. Reprod.*, 14 (Suppl. 1), 231-42
- Taylor C.T., Lawrence Y.M., Kingsland C.R., Biljan M.M., Cuthbertson K.S. 1993. Oscillations in intracellular free calcium induced by spermatozoa in human oocytes at fertilization. *Hum Reprod.*, 8, 2174-9
- Thompson W. 1969. Positional distribution of fatty acids in brain polyphosphoinositides. *Biochim . Biophys. Acta.*, 187, 150-3
- Thomson M.J., Williams M.G., Frost S.C. 1997. Development of insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.*, 272, 7762-64
- Toh N., Inque T., Tamaka H., Kimoto E. 1987. Polyol accumulation in human placenta and umbilical cord. *Biol Res Pregnancy Perinatol.*, 8, 13-5
- Tosti E. 2006. Calcium ion currents mediating oocyte maturation events. *Reproductive Biology and Endocrinology.* 4, 26
- Trounson A., Anderiesz C., Jones G.M., Kausche A., Lolatgis N., Wood C. 1998. Oocyte maturation. *Hum. Reprod.*, 13 (Suppl. 3), 52-61
- Troyer D.A., Schwertz D.W., Kreisberg J.I., Venkatachalam M.A. 1986. Inositol phospholipid metabolism in the kidney. *Annu Rev Physiol.*, 48, 51-71

- Tsukagoshi S., Lembach, K., Charalampous F.C. 1966. Metabolic functions of myo-inositol. III. Utilization of purine bases and nucleosides for nucleic acid biosynthesis in inositol-deficient KB cells. *J. biol. Chem.*, 241, 388
- Van Steirteghem A.C., Nagy Z., Joris H., Liu J., Staessen C., Smith J., Wisanto A. and Devroey P. 1993. High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.*, 8, 1061-66
- Vanderzwalmen P., Bertin G., Lejeune B., Nijs M., Vandamme B., Schoysman R. 1996. Two essential steps for a successful intracytoplasmic sperm injection: injection of immobilized spermatozoa after rupture of the oolema. *Hum. Reprod.*, 11, 540-7
- Varela-Nieto I., Leon Y., Caro H.N. 1996. Cell signalling by inositol phosphoglycans from different species. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.*, 115, 223-41
- Velazquez E.M., Medoza S., Hamer T., Sosa F., Glueck C.J. 1994. Metformin therapy in polycystic ovary syndrome reduces hyperinsulinaemia, insulin resistance, hyperandrogenaemia and systolic blood pressure while facilitating normal menses and pregnancy. *Metab. Clin. Exp.*, 43, 647-654
- Vitt U.A., Nayudu P.L., Rose U.M., Kloosterboer H.J. 2001. Embryonic development after follicle culture is influenced by follicle-stimulating hormone isoelectric point range. *Biol. Reprod.*, 65, 1542-47
- Voglmayr. J.K., White I.G. 1971. Synthesis and metabolism of myo-inositol in testicular and ejaculated spermatozoa of the ram. *J. Reprod. Fertil.*, 24, 29-37
- Voglmayr J.K., Amann R.P. 1973. The distribution of free myo-inositol in fluids, spermatozoa, and tissues of the bull genital tract and observations on its uptake by the rabbit epididymis. *Biol. Reprod.*, 8, 504-13

- Wald N., Sneddon J., Densem J., Frost C., Stone R. 1991. Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. MRC Vitamin Study Research Group. MRC Vitamin Study Research Group. *Lancet.*, 338, 131-7
- Walensky L.D., Snyder S.H. 1995. Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptors Selectively Localized to the Acrosomes of Mammalian Sperm. *J Cell Biol.*, 130, 857-69
- Warfield A., Hwang S.M., Segal S. 1978. On the uptake of inositol by rat brain synaptosomes. *J. Neurochem.*, 31, 957-60
- Weigensberg M.J., Garcia-Palmer F.J., Freinkel N. 1990 Uptake of myo-inositol by early-somite rat conceptus. Transport kinetics and effects of hyperglycemia. *Diabetes.*, 39, 575-82
- Wennerholm U.B., Bergh C., Hamberger L., Lundin K., Nilsson L., Wikland M., Kallen B. 2000. Incidence of congenital malfunctions in children born after ICSI. *Hum. Reprod.*, 15, 944-8
- Whiting P. H., Palmano K. P., Hawthorne J. N. 1979. Enzymes of myoinositol lipid metabolism in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Biochem. J.* 179, 549-53
- Wood I.S., Trayhurn P. 2003. Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *Br J Nutr.*, 89, 3-9
- Wu H., He C.L., Fissore R.A. 1997. Injection of a porcine sperm factor triggers calcium oscillations in mouse oocytes and bovine eggs. *Mol. Reprod. Dev.*, 46, 176-189
- Wu H., He C.L., Jehn B., Black S.J, Fissore R.A. 1998. Partial characterization of the calcium-releasing activity of porcine sperm cytosolic extracts. *Dev. Biol.*, 203, 369-81
- Wu H., Smyth J., Luzzi V., Fukami K., Takenawa T., Black S.L., Allbritton N.L., Fissore R.A. 2001. Sperm factor induces intracellular free calcium oscillations by stimulating the phosphoinositide pathway. *Biol. Reprod.*, 64, 1338-49

- Yagi K., Kotaki A. 1969. The effect of massive doses of myo-inositol on hepatic phospholipid metabolism. *Ann. NY Acad. Sci.*, 165, 710-25
- Yamauchi A., Kwon H.M., Uchida S., Preston A.S., Handler J.S. 1991. Myo-inositol and betaine transporters regulated by tonicity are basolateral in MDCK cells. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol.*, 261, F197–F202
- Yanagimachi R. 1998. Intracytoplasmic sperm injection experiments using the mouse as a model. *Hum. Reprod.*, 13 (Suppl. 1), 87-98
- Yang W.J., Matsuda Y., Inomata M., Nakagawa H. 1991. Developmental and dietary induction of the 90K subunit of rat intestinal phytase. *Biochim Biophys Acta.*, 1075, 83-7
- Yildiz B.O. 2008. Oral contraceptives in polycystic ovary syndrome: risk-benefit assessment. *Semin Reprod Med.*, 26, 111-20
- Zacur H.A. 2001. Polycystic ovarian syndrome, hyperandrogenism and insulin resistance. *Obstet. Gynecol. Clin. North. Am.*, 28, 21-33
- Zawadzki J.K., Dunaif A. 1992. Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome: toward a rational approach. In: Dunaif A, Givens JR, Haseltine F, et al., eds. *Polycystic Ovary Syndrome*. Cambridge, MA: Blackwell Scientific., 377-84
- Zhang L.H., Rodriguez H., Ohno S. Miller W.L. 1995. Serine phosphorylation of human P450c17 increases 17,20 lyase activity : implications for adrenarche and the polycystic ovary syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 92, 10619-23