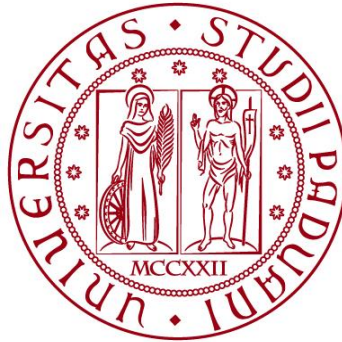


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea magistrale in Biologia Sanitaria



TESI DI LAUREA

**Effetto del fluido follicolare derivato da pazienti con o
senza endometriosi sulla morfologia e sullo sviluppo delle
cellule della granulosa in coltura**

**Relatore: Prof.ssa Ilaria Frasson
Dipartimento di Medicina Molecolare**

**Correlatore: Dott.ssa/Prof.ssa Alessandra Andrisani
Dott.ssa Luciana Bordin
Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino**

Laureanda: Silvia Garzarella

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

Sommario

ABSTRACT	3
1: INTRODUZIONE.....	5
1.1 Gametogenesi.....	5
1.2 Follicologenesi	6
1.2.1 Formazione del fluido follicolare.....	7
1.3 Regolazione ormonale.....	8
1.4 Comunicazione intercellulare giunzionale comunicante (GJIC)	9
1.5 Endometriosi	9
1.5.1 Classificazione dell’endometriosi	9
1.5.2 Trattamento dell’infertilità associata all’endometriosi	11
1.6 Procreazione medicalmente assistita (PMA) – Assisted reproductive technology (ART)	12
1.6.1 Tecniche di I livello	13
1.6.2 Tecniche di II e III livello	13
2: SCOPO.....	15
3: MATERIALI E METODI	17
3.1 Raccolta dei campioni	17
3.2 Purificazione delle cellule della granulosa (GCs) e dei fluidi follicolari....	18
3.3 Colture cellulari.....	18
3.4 Analisi morfologica.....	19
3.5 Analisi di apoptosi	20
3.6 Citometria a flusso (o citofluorimetria).....	21
3.7 Immunocitochimica.....	22
4: RISULTATI E DISCUSSIONE.....	23
4.1 Caratteristiche di fertilità delle pazienti del Gruppo “Controllo” e del Gruppo “Endometriosi”	23
4.3 Analisi di crescita e sopravvivenza	26
4.4 Effetto dei trattamenti sulla sopravvivenza e sulla morfologia delle GCs..	28
4.4.1 Sopravvivenza	28
4.4.2 Saggio di apoptosi	31
4.4.3 Morfologia cellulare.....	32
4.5 Effetto dei vari trattamenti sull’espressione del recettore per l’ormone follicolo stimolante (FSHR) come indicatore delle corrette caratteristiche delle GCs.....	37

4.6 Effetto dei vari trattamenti sull'espressione della proteina Connexina 43 (Cx43)	39
4.7 Identificazione e localizzazione di Cx43	43
5. CONCLUSIONE E PROSPETTIVE FUTURE.....	45
6. BIBLIOGRAFIA.....	47

ABSTRACT

In pazienti affette da endometriosi, una malattia ginecologica cronica infiammatoria che causa infertilità, i risultati dei cicli di procreazione medicalmente assistita (PMA) non sempre sono favorevoli nel garantire un positivo *outcome* finale.

Le cellule della granulosa (GCs), ottenute dai fluidi follicolari al momento del prelievo ovocitario, responsabili della qualità dell'ovocita, di difficile caratterizzazione, hanno una breve sopravvivenza in vitro.

Nel nostro studio abbiamo valutato le GCs e i fluidi follicolari (FF) provenienti da due gruppi di pazienti, "Controllo" (FFC) ed "Endometriosi" (FFENDO) per capire se ci fossero differenze di sopravvivenza e differenziamento.

I risultati ottenuti hanno indicato che la presenza di FF, in definita percentuale, garantisce accrescimento, differenziamento e sviluppo delle GCs.

Inoltre, è stato dimostrato che FFENDO rispetto a FFC è in grado di differenziare un maggior numero percentuale di GCs verso una morfologia di tipo *fibroblast like cells* e *chondroblast like cells*.

È stata inoltre dimostrata una maggior espressione della proteina Cx43 in presenza di FFENDO rispetto a FFC, che potrebbe essere alla base della diversa differenziazione evidenziata.

Questa espressione è risultata essere direttamente proporzionale al grado di confluenza delle cellule, con una localizzazione sulla membrana plasmatica in concomitanza dei punti di contatto con le cellule adiacenti.

1: INTRODUZIONE

1.1 Gametogenesi

La gametogenesi è il processo di origine dei gameti maturi a partire da cellule germinali primordiali che vanno incontro a mitosi, meiosi e citodifferenziamento. Tale processo prende il nome di oogenesi nelle donne e spermatogenesi negli uomini.

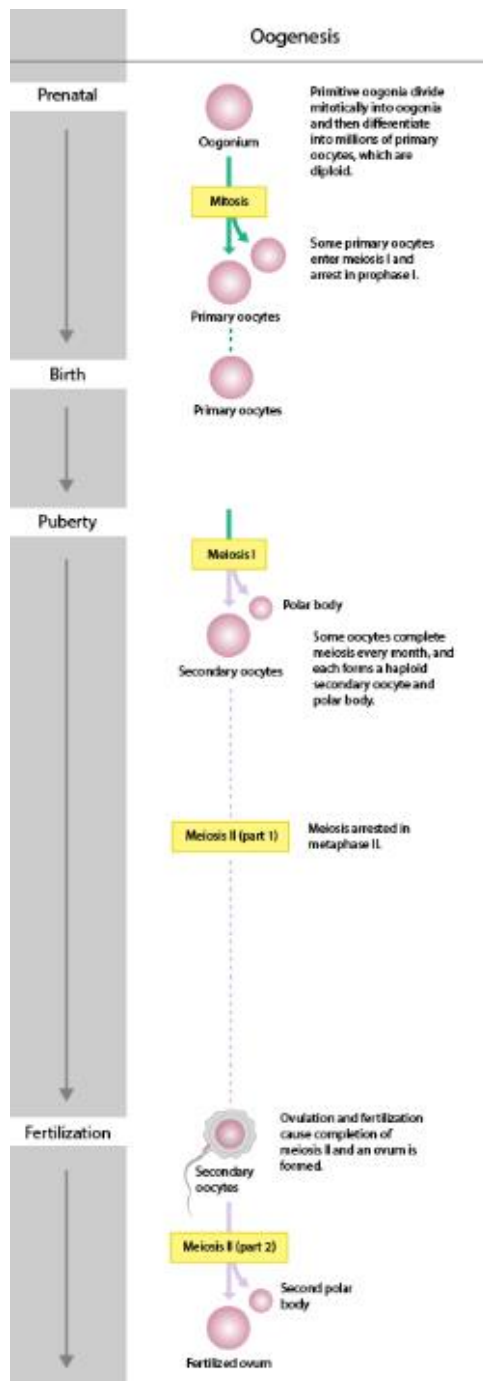


FIGURA 1. Stadi di maturazione dell'ovocita durante l'oogenesi. (Immagine tratta da McLaughlin J. Endocrinologia della riproduzione femminile [1])

In un feto femmina, gli ovociti originano da un numero finito di precursori noti come oogoni primordiali.

Questi diventano oogoni migrando dall'endoderma extraembrionale del sacco vitellino alla cresta genitale indifferenziata. Qui si differenziano in ovociti primari e vanno incontro a mitosi portando a circa 7 milioni di ovociti al 4° mese di gestazione. Dal 4° mese di gestazione, però una quota consistente di questi va incontro a un processo spontaneo detto atresia, un fenomeno fisiologico di degenerazione e riassorbimento che, alla fine, porterà alla perdita di circa il 99,9 % degli ovociti. Durante il 4° mese, inoltre, i restanti ovociti vanno incontro alla prima divisione meiotica che si arresta, però, allo stadio di diplotene, ultimo step della profase I.

Dalla nascita alla fase prepuberale gli ovociti rimarranno in stato quiescente in attesa di completare la maturazione.

In fase pre-ovulatoria e sotto lo stimolo dell'ormone luteinizzante (LH) alcuni ovociti completeranno la prima divisione meiotica con estrusione del primo globulo polare e formazione di ovocita secondario, iniziando la seconda divisione meiotica che però si blocca subito dopo la separazione dei cromatidi fratelli, in metafase II (MII). Quando avviene la fecondazione, l'ovocita secondario porta a termine la meiosi II dando origine all'ovotidio con l'estrusione

del secondo globulo polare [1].

1.2 Follicologenesi

La follicologenesi è il processo mediante il quale un follicolo primordiale cresce e si sviluppa nel follicolo di Graaf, anche detto follicolo terziario o preovulatorio, attraverso i seguenti eventi: reclutamento, sviluppo del follicolo preantrale, selezione e atresia.

- *Reclutamento*: all'interno del follicolo primordiale, l'ovocita, arrestato allo stadio diplotene della meiosi I, circondato da uno strato di cellule della granulosa (GCs) appiattite e dalla lamina basale [2], viene riattivato per riprendere lo sviluppo.
- *Sviluppo del follicolo preantrale*: lo sviluppo avviene tramite la formazione di un secondo strato di cellule della granulosa, mentre le cellule della teca vengono reclutate dal tessuto connettivo per circondare la lamina basale e formare poi, la teca interna e la teca esterna.

Si forma così il follicolo secondario, anche detto preantrale il quale contiene 5 distinte unità strutturali:

- un ovocita completamente cresciuto circondato dalla zona pellucida
- da 6 a 9 strati di cellule della granulosa
- una lamina basale
- una teca interna
- una teca esterna

In risposta ad uno stimolo intrinseco, inizia un processo noto come cavitazione o inizio della formazione dell'antro.

Inizia a formarsi una cavità ad un polo dell'ovocita in cui si accumula fluido tra le cellule della granulosa, in espansione fino a formare una vera e propria cavità interna.

Si forma così il follicolo terziario o follicolo di Graaf caratterizzato da 6 componenti istologiche:

- la teca esterna
- la teca interna
- la lamina basale
- le cellule della granulosa
- l'ovocita
- il fluido follicolare

In questo follicolo sono quattro gli strati o domini delle cellule della granulosa: la membrana granulosa, lo strato della granulosa periantrale, il cumulo ooforo o strato intermedio e infine la corona radiata, lo strato più vicino all'ovocita.

- *Selezione*: In ogni ciclo mestruale è solo uno il follicolo (follicolo dominante) che rilascerà poi, durante l'ovulazione, l'ovocita.

Durante tale fase le cellule della granulosa nel follicolo ‘selezionato’ continuano a dividersi velocemente, mentre la proliferazione rallenta nelle cellule della granulosa degli altri follicoli.

Come conseguenza di questo incremento della mitosi, il follicolo dominante continua a crescere rapidamente raggiungendo 6.9 ± 0.5 mm nei giorni da 1 a 5, 13.7 ± 1.2 mm nei giorni da 6 a 10 e 18.8 ± 0.5 mm nei giorni da 11 a 14.

- *Atresia*: I restanti follicoli vanno incontro ad atresia. Stessa sorte toccherà anche al follicolo dominante dopo aver rilasciato l’ovocita, portando alla formazione del corpo luteo [3].

1.2.1 Formazione del fluido follicolare

Ad oggi non è ancora stata definita una chiara origine sulla formazione del fluido follicolare all’interno dell’antro.

Una delle ipotesi fa derivare il fluido follicolare dal sangue che scorre attraverso i capillari tecali, che si sviluppano come una rete attorno ai follicoli nelle prime fasi antrali.

Il fluido si accumula nell’antro follicolare e, per farlo deve quindi essere trasportato dalla teca all’antro.

I cambiamenti nella permeabilità dei capillari tecali portano all’edema del tessuto tecale, ma sono necessari meccanismi aggiuntivi affinché il fluido possa attraversare l’endotelio, la lamina basale sub-endoteliale, la lamina basale follicolare e la membrana granulosa prima di poter giungere all’antro.

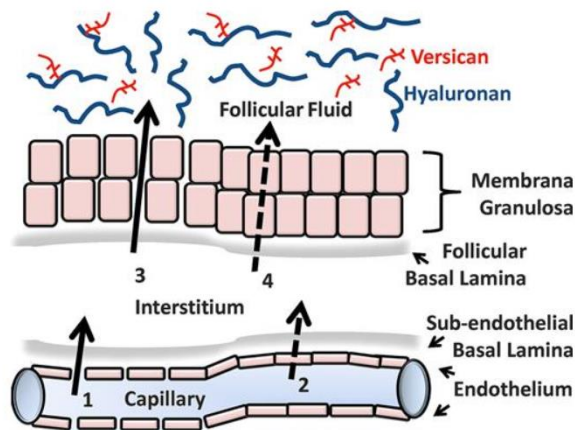


FIGURA 2 Disegno che illustra i percorsi che il fluido può seguire dal capillare tecale al fluido follicolare e le potenziali barriere dell’endotelio, della lamina basale sub-endoteliale, dell’interstizio, della lamina basale follicolare e della membrana granulosa.

I percorsi 1 e 3 mostrano il movimento del fluido tra le cellule (freccie piene) e i percorsi 2 e 4 mostrano percorsi transcellulari (freccie tratteggiate) che coinvolgono acquaporine o transitosi.

(Immagine tratta da Rodgers RJ, et al. 2010 [4]).

La composizione del fluido follicolare è simile al siero per le componenti a basso peso molecolare, come gli elettroliti; mentre tale composizione è diversa per il particolato di dimensioni superiori a 100 KDa, quali le proteine plasmatiche.

Ciò suggerisce l'esistenza di una 'barriera sangue-follicolo' che permette il passaggio di ioni e altri nutrienti con dimensioni inferiori a 100 KDa.

Allo stesso modo, molecole con dimensioni superiori a 100 KDa prodotte dagli ovociti e dalle cellule della granulosa non possono passare la membrana granulosa e la lamina basale follicolare per la presenza di tale 'barriera'.

Si forma così un potenziale gradiente osmotico che potrebbe essere responsabile del reclutamento del fluido al centro del follicolo.

Sono stati utilizzati enzimi specifici per degradare classi specifiche di molecole [5] osservando come la rimozione dei glicosamminoglicani, acido ialuronico, solfato di condroitina/solfato di dermatan e DNA dal fluido follicolare portava ad una riduzione della pressione osmotica.

Tali molecole, quindi, potrebbero contribuire al potenziale osmotico del fluido follicolare [4].

1.3 Regolazione ormonale

La crescita delle GCs è controllata dall'ormone follicolo stimolante (FSH) durante la follicologenesi.

Tale ormone è responsabile della proliferazione e del differenziamento delle cellule e, contribuisce allo stimolo per la formazione dell'antro follicolare con ioni e proteine caratteristici del fluido follicolare.

Gli ormoni follicolo stimolante (FSH) e luteinizzante (LH) sono i fattori primari per la maturazione dei follicoli ovarici [5].

La funzione di tali ormoni viene svolta tramite il legame con il rispettivo recettore affine: il recettore dell'ormone follicolo-stimolante (FSHR) e il recettore dell'ormone luteinizzante (LHR).

C'è una differenza nei livelli di espressione di FSHR e LHR con riduzione costante di FSHR man mano che il follicolo aumenta di dimensioni e, man mano che matura. I follicoli perdono quindi la reattività all'FSH man mano che progrediscono attraverso la fase follicolare e acquisiscono la reattività all'LH.

È stato dimostrato che piccole dosi di FSH aumentano i siti di legame per l'FSH; mentre alte dosi di FSH (come nel caso della stimolazione esogena dell'FSH) regolano negativamente i siti di legame dell'FSHR.

Al contrario, l'LHR è regolato positivamente appena prima dell'induzione dell'ovulazione, motivo per cui l'LH è importante nel guidare lo sviluppo follicolare nella seconda metà della fase follicolare.

Questo schema di espressione di FSHR e LHR è coerente con la regolazione ormonale della fase follicolare del ciclo mestruale dove FSH è importante nel reclutamento della crescita follicolare nei piccoli follicoli antrali (prima parte della fase follicolare); mentre LH subentra man mano che la selezione follicolare ha avuto luogo e progredisce nella fase preovulatoria (l'ultima parte della fase follicolare) [6].

1.4 Comunicazione intercellulare giunzionale comunicante (GJIC)

La comunicazione intercellulare giunzionale comunicante (GJIC) tra GCs e ovociti svolge un ruolo critico nella follicologenesi e nella maturazione degli ovociti.

La GJIC è responsabile del trasferimento di ioni, metaboliti e secondi messaggeri tra cellule vicine e svolge un ruolo importante nella regolazione della proliferazione cellulare, della differenziazione, del metabolismo, dell'apoptosi, della carcinogenesi, dell'infiammazione e della secrezione ormonale.

Pertanto, l'interruzione della comunicazione potrebbe causare la perdita dell'omeostasi e del controllo della crescita cellulare.

Le giunzioni comunicanti sono formate da due emicanali, ognuno dei quali contiene sei subunità proteiche di transmembrana denominate connesine (Cx).

Nelle ovaie, la principale Cx trovata nelle GJ delle GCs è la Connessina 43 (Cx43), che è presente in ogni fase della follicologenesi e svolge un ruolo fondamentale nella modulazione della follicologenesi stessa e della maturazione degli ovociti.

Per quanto riguarda il ruolo funzionale, è stato scoperto che alti livelli di Cx43 nelle GCs sono associati a una buona prognosi degli ovociti umani, mentre un livello ridotto di proteina Cx43 è associato ad atresia follicolare, supportando l'ipotesi che una perdita della GJIC svolga un ruolo di coordinamento nel processo di atresia.

Numerosi studi hanno dimostrato che gli ormoni steroidei come estrogeni, FSH, progesterone e androgeni potrebbero ridurre l'espressione di Cx43 e compromettere la crescita delle GCs [7,8].

1.5 Endometriosi

L'endometriosi è una malattia ginecologica cronica infiammatoria che colpisce circa il 10% delle donne in età riproduttiva [9].

Si caratterizza per la presenza di ghiandole endometriali e stroma in sedi extrauterine o sedi ectopiche coinvolgendo principalmente il peritoneo pelvico, le ovaie e il setto rettovaginale causando una morbilità sostanziale, tra cui, dismenorrea, dispareunia, dolore pelvico cronico, sanguinamento uterino irregolare e/o infertilità [10].

1.5.1 Classificazione dell'endometriosi

Per una diagnosi di endometriosi solitamente si procede con una laparoscopia e verifica istologica mediante biopsia delle lesioni sospette.

Per la comunicazione tra i medici, ma soprattutto per standardizzare la strategia di trattamento, è necessario un sistema di classificazione dell'endometriosi riproducibile e ben organizzato che deve essere in grado di spiegare l'estensione della malattia, prevedere il dolore e la fertilità, fornire informazioni accurate ai pazienti e riflettere le caratteristiche anatomiche.

Tuttavia, ad oggi, purtroppo, non è ancora stato identificato tale sistema ideale.

A seguire i quattro sistemi di classificazione disponibili:

- Classificazione rivista dell'American Society for Reproductive Medicine (rASRM)
- Classificazione ENZIAN
- Indice di fertilità dell'endometriosi (EFI)

- Classificazione dell'American Association of Gynecological Laparoscopists (AAGL)

Nessun singolo sistema di classificazione dei precedenti classifica adeguatamente l'endometriosi, ma la classificazione rASRM è la più ampiamente utilizzata ed è utile ai medici per spiegare la gravità dell'endometriosi in termini semplici alle pazienti.

Classificazione rASRM

L'American Fertility Society (AFS) ha ideato il punteggio AFS nel 1979.

Lo stadio dell'endometriosi viene definito da un punteggio cumulativo valutato sulla base delle dimensioni delle lesioni endometriosiche nelle ovaie, nel peritoneo e nelle tube di Falloppio e sulla base alla gravità dell'aderenza in ciascuno dei siti sopra menzionati.

Il sistema di stadiazione è stato suddiviso in quattro stadi:

- I (da 1 a 5 punti, lieve)
- II (da 6 a 15 punti, moderato)
- III (da 16 a 30 punti, grave)
- IV (da 31 a 54 punti, esteso)

Un problema di questo sistema di classificazione era però la mancanza di una relazione tra lo stadio della malattia e i sintomi clinici di dolore e infertilità.

Nel 1985 infatti, tale sistema è stato rivisto portando ai seguenti quattro stadi:

- I (da 1 a 5 punti, minimo)
- II (da 6 a 15 punti, lieve)
- III (da 16 a 40 punti, moderato)
- IV (> 40 punti, grave)

Nel 1996, questo sistema di punteggio è stato rinominato:

'Classificazione rivista dell'American Society for Reproductive Medicine' (rASRM).

Tale sistema di classificazione ha il vantaggio di essere stato accettato a livello globale e, al tempo stesso, di essere facile da usare e utile per i medici per spiegare il grado di endometriosi in termini semplici alle pazienti.

Tuttavia, ci sono diversi svantaggi: la riproducibilità del punteggio è scarsa, la gravità del dolore e dell'infertilità non sono correlate allo stadio e non viene considerata la presenza di endometriosi infiltrante (DIE) in siti quali i legamenti uterosacrali, la vescica, la vagina e l'intestino [11].

1.5.2 Trattamento dell'infertilità associata all'endometriosi

Il trattamento dell'infertilità associata all'endometriosi si basa su tre modalità: trattamento medico, intervento chirurgico e riproduzione assistita.

Il trattamento medico prevede somministrazione di analgesici (di solito FANS) e contraccettivi ormonali.

Se questi sono inefficaci, alle pazienti viene consigliato di procedere con un trattamento farmacologico più intensivo (analoghi del GnRH, inibitori dell'aromatasi o danazolo).

Per il trattamento chirurgico è necessario tener conto dello stadio della malattia (minimo/lieve, moderato/grave ed endometriomi).

Nell'endometriosi minima/lieve senza anatomia dirompente, l'obiettivo dell'intervento chirurgico è distruggere o rimuovere tutti o la maggior parte degli impianti endometriosisi.

Nell'endometriosi moderata/grave, l'obiettivo dell'intervento chirurgico è ripristinare la normale anatomia del bacino e rimuovere gli endometriomi di grandi dimensioni.

La tecnologia di riproduzione assistita (ART) comprende diverse modalità di trattamento che combinano un qualche tipo di stimolazione follicolare ormonale con la preparazione e la gestione dei gameti per aggirare le barriere patologiche della riproduzione [12].

1.6 Procreazione medicalmente assistita (PMA) – Assisted reproductive technology (ART)

Per comprendere le procedure ART, è necessaria una conoscenza di base dello sviluppo embrionale e fetale.

La fusione iniziale dell'ovocita e dello spermatozoo dà origine a uno zigote diploide (Figura 4).

Le divisioni di scissione dello zigote avvengono ogni 12-24 ore, con le singole cellule denominate in questa fase blastomero.

Il giorno successivo dello stadio a otto cellule, lo zigote diventa una morula, momento in cui tutte le cellule sono totipotenti.

La morula si sviluppa successivamente, il giorno 5, in una blastocisti.

L'impianto naturale avviene durante i giorni 8-9 [13].

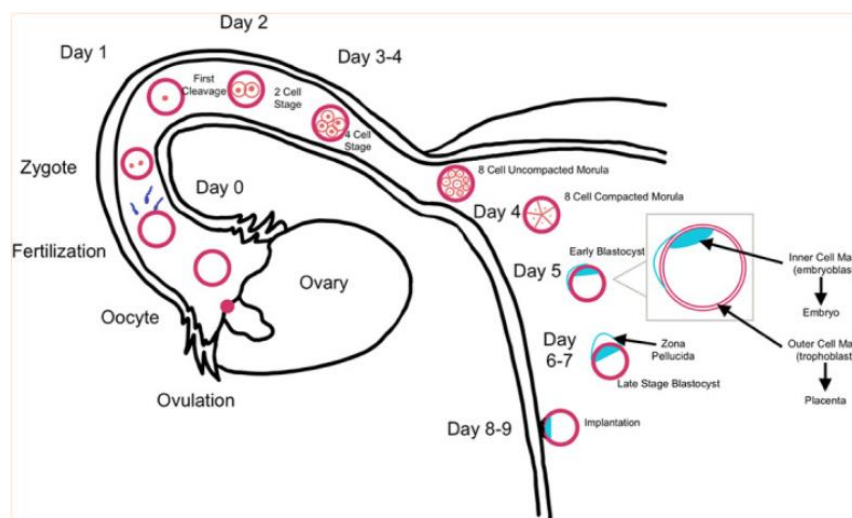


Figura 4. Embriologia. Dopo l'ovulazione e la fecondazione, l'ovocita si sviluppa in uno zigote che si impianta nella parete uterina. Dopo l'impianto, lo zigote continuerà a svilupparsi fino al parto. (Immagine tratta da Graham ME, et al. 2023 [13]).

La procreazione medicalmente assistita (PMA) è l'insieme delle tecniche utilizzate per aiutare il concepimento in tutte le coppie, nei casi in cui il concepimento spontaneo sia impossibile o estremamente remoto.

La PMA si avvale di diversi tipi di tecniche (ART) suddivise in I, II e III livello in base alla complessità e al grado di invasività.

- Metodiche di I livello sono semplici, poco invasive e caratterizzate dal fatto che la fecondazione si realizza all'interno dell'apparato genitale femminile.
- Tecniche di II e III livello sono invece più complesse, invasive e prevedono la fecondazione in vitro

Le linee guida sulla PMA, previste dalla legge 40/2004, indicano l'utilizzo in prima istanza delle opzioni terapeutiche più semplici e meno invasive [14].

1.6.1 Tecniche di I livello

Le tecniche di I livello [15] prevedono il monitoraggio dell'ovulazione, la stimolazione delle ovaie e l'inseminazione.

Gli spermatozoi possono essere depositati nella vagina (inseminazione intravaginale, IVI) nel canale cervicale (inseminazione cervicale, ICI), nelle tube (inseminazione intratubarica, ITI) o nell'addome (inseminazione intraperitoneale, IPI). La tecnica più usata prevede che gli spermatozoi, presenti nel liquido seminale, siano immessi, per mezzo di un piccolo tubo di plastica detto catetere, direttamente nell'utero della donna per facilitare l'incontro con l'ovocita (inseminazione intrauterina, IUI).

Questa tecnica può essere proposta nei casi di:

- Sterilità 'inspiegata': l'infertilità di coppia non riconducibile ad alcuna causa evidente
- Infertilità maschile di grado lieve o moderato
- Ripetuti insuccessi nell'ottenere una gravidanza, sia tramite stimolazione delle ovaie, sia con rapporti sessuali mirati durante i giorni della probabile ovulazione della donna. Nelle persone con un ciclo mestruale regolare di 28 giorni, il periodo fertile è compreso tra il 12° e 14° giorno, considerando come primo giorno quello che coincide con l'inizio del ciclo mestruale.
- Presenza di malattie sessuali, che rendono difficile o impossibile avere un rapporto sessuale completo
- Alterazioni del muco-cervicale
- Presenza di anticorpi anti-spermatozoi

1.6.2 Tecniche di II e III livello

Le tecniche di procreazione medicalmente assistita di II e III livello [15] sono quelle più complesse, invasive e che richiedono un'anestesia locale o generale.

Le più utilizzate sono la fecondazione in vitro e trasferimento dell'embrione nell'utero della donna (FIVET) e l'iniezione dello spermatozoo nel citoplasma dell'ovocita (ICSI).

FIVET

È una tecnica di riproduzione assistita che permette di fecondare, all'esterno del corpo femminile, l'ovocita della donna con lo spermatozoo dell'uomo.

Di frequente, prima di eseguire questa procedura, la donna è sottoposta a una cura ormonale, per stimolare maggiormente le ovaie da cui, sotto controllo ecografico e in anestesia locale e/o in sedazione profonda, saranno prelevati gli ovociti. All'uomo, invece, viene chiesto di produrre un campione del proprio liquido seminale da cui, dopo un'attenta analisi e valutazione, saranno selezionati gli spermatozoi più adatti per la riproduzione.

Dopo la fecondazione in vitro l'embrione/gli embrioni viene/vengono trasferiti, tramite un catetere, nell'utero della donna.

Il numero degli embrioni da trasferire nell'utero, strettamente necessario a ottenere una gravidanza, è deciso di volta in volta per ogni coppia tenendo conto dell'età della donna e della sua storia riproduttiva.

La FIVET è consigliata in caso di:

- Fallimento di trattamenti medico-chirurgici o precedenti inseminazioni intrauterine di I livello
- Tube di Falloppio ostruite (organi dell'apparato genitale femminile che collegano le ovaie all'utero) che bloccano il naturale passaggio dell'ovocita verso l'utero
- Quantità insufficienti di spermatozoi (oligozoospermia), con un'infertilità maschile di grado moderato
- Particolari malattie dell'utero (endometriosi di III o IV grado)

ICSI

Scoperta in Italia negli anni '90, prevede, come nella FIVET che l'incontro di ovocita e spermatozoo avvenga all'esterno del corpo della donna.

In questa procedura, però, la fecondazione è ulteriormente aiutata: la fecondazione dell'ovocita avviene con un'iniezione diretta di un singolo spermatozoo all'interno del citoplasma dell'ovocita mediante l'utilizzo di un micromanipolatore.

Dopo l'avvenuta fecondazione, si procede al trasferimento dell'embrione nell'utero della donna seguendo una procedura simile a quella utilizzata per la FIVET.

È utilizzata per risolvere tutti quei casi di grave infertilità maschile in cui, a causa della mancanza di un numero sufficiente di spermatozoi (meno di 1.500.000 per millilitro di liquido seminale) o della loro ridotta capacità di movimento, non può avvenire una fecondazione spontanea. Nei casi più gravi, azoospermia, si può tentare il prelievo direttamente dal testicolo.

La ICSI è quindi consigliata nei casi di:

- Infertilità maschile di grado severo
- Mancanza di spermatozoi nel liquido seminale (azoospermia)
- Numero ridotto di ovociti



2: SCOPO

Nel campo della fecondazione in vitro umana (IVF), la selezione degli ovociti migliori rimane un obiettivo importante nella pratica clinica. Sebbene diverse tecniche siano e siano state utilizzate per questo obiettivo, i risultati non sempre sono favorevoli e la stessa complessità dell'intera procedura può ulteriormente contribuire alla riduzione di un positivo *outcome* finale.

È per questo necessario poter riuscire a far riferimento a marcatori di qualità degli ovociti senza ricorrere a metodologie particolarmente invasive e/o potenzialmente deleterie, ma che, comunque, siano in grado di evidenziare ovociti di alta qualità. Gli ovociti, contenuti nei rispettivi follicoli, sono protetti e nutriti dalle cellule somatiche circostanti, tra cui le cellule del cumulo (CCs) e le cellule della granulosa (GCs).

Obiettivi di questo progetto di tesi sono stati:

- Confrontare il diverso potenziale proliferativo delle cellule della granulosa derivate dal fluido follicolare delle pazienti prese in esame per comprendere e, potenzialmente, arrestare o ridurre i possibili meccanismi che portano all'apoptosi di tali cellule.
- Valutare la presenza e l'entità delle comunicazioni tra GCs confrontando l'espressione di Cx43 per supportarne il potenziale ruolo come marcatore predittivo.

3: MATERIALI E METODI

3.1 Raccolta dei campioni

Il fluido follicolare e le cellule della granulosa sono ottenuti da pazienti che intraprendono un percorso di PMA presso l’Ospedale di Padova.

Le pazienti vengono classificate in diversi gruppi sub-fertili quali: endometriosi, sindrome dell’ovaio policistico (PCOS), ridotta riserva ovarica (POR), fattori endocrini in generale, fattori oncologici o sconosciuti (idiopatici).

Tra queste pazienti, sono state prese in considerazione, per il seguente studio, pazienti affette da endometriosi.

Nel gruppo di controllo, invece, rientrano tutte quelle pazienti che presentano infertilità legata al fattore maschile o propria dell’età.

Per ciascun gruppo sono stati riportati dati relativi l’età, l’indice di massa corporea (BMI), il fumo e precedenti cicli (Tabella 1) per avere un quadro chiaro delle pazienti.

Parametro	Controllo (n=21)	Endometriosi (n=19)
Età	37.23 ± 3.5	33.10 ± 3.4
BMI	22.9 ± 3.3	22.7 ± 3.6
Fumo	15	8
Precedenti cicli	8	14

Tabella 1: Confronto tra il gruppo “Controllo” e il gruppo “Endometriosi” di parametri quali età, BMI, fumo e precedenti cicli.

Tutte le pazienti ricevono una stimolazione ovarica mediante utilizzo di gonadotropine.

La somministrazione degli ormoni follicolo-stimolante (FSH), gonadotropina corionica umana (HCG) e luteinizzante (LH) viene stabilita caso per caso secondo la normale prassi clinica.

Il prelievo, o *pick up*, degli ovociti presenti nei follicoli maturi, avviene mediante aspirazione ecoguidata del fluido contenuto nei follicoli.

Tale fluido viene messo in provette che vengono setacciate per recuperare gli ovociti presenti, che seguiranno il percorso di fecondazione assistita.

La rimanente parte dei fluidi follicolari, oggetto di scarto, viene ricollocata nelle provette di provenienza e, processata in laboratorio.

Esclusi dall’analisi sono i campioni visibilmente contaminati con la soluzione di lavaggio (*flushing solution*) o con sangue [16].

Al momento dell’arrivo dei campioni, è stato assegnato un codice identificativo numerico alla paziente e inserita, sulla base della patologia, nel gruppo “Controllo” o gruppo “Endometriosi”.

3.2 Purificazione delle cellule della granulosa (GCs) e dei fluidi follicolari

Il fluido follicolare, privato degli ovociti, è stato centrifugato a 300 rpm per 10 minuti.

Il surnatante è stato recuperato a parte; mentre, il pellet lavato mediante centrifugazione a 300 rpm per 10 minuti ottenendo così le cellule della granulosa.

Il surnatante precedentemente messo da parte, è stato ulteriormente centrifugato a 4500 rpm per 10 minuti e congelato a -20°C fino all'utilizzo; in alcuni casi, è stato filtrato con filtri Millex 0.22 Micron, prima di essere congelato a -20°C fino all'utilizzo.

3.3 Colture cellulari

Il processo di purificazione cellulare, precedentemente descritto, ha permesso di isolare le cellule della granulosa (GCs) dal fluido follicolare.

Per ciascuna singola paziente, le cellule presenti nella falcon, dopo il lavaggio, sono state risospese e trasferite in una flask T25 per coltura cellulare (Nunc™ EasYFlask™ Cell Culture Flasks) con aggiunta del Medium di Coltura (MC) composto da: Dulbecco's phosphate-buffered saline (DMEM/F12), 10% di siero fetale bovino (FBS), 100 mg/ml di Penicillina e 100 mg/ml di Streptomicina.

Sono state poi incubate a 37°C, 5% di CO₂.

Le colture sono state monitorate costantemente dopo 24,48 e 72 h, mediante osservazione al microscopio per due fondamentali motivi:

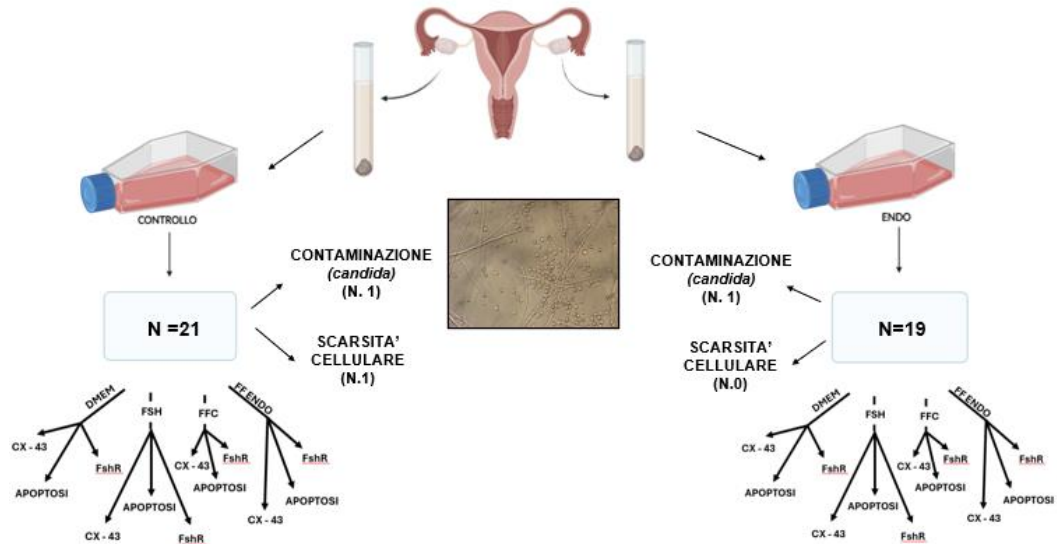
- *Contaminazione*: la paziente può essere affetta da infezioni vaginali di origine micotica, batterica o virale.
L'osservazione di tale contaminazione nella rispettiva coltura cellulare porta all'eliminazione del campione e del rispettivo fluido follicolare congelato.
- *Scarsità cellulare*: le cellule adese sono del tutto assenti o poche per cui si procede eliminando il campione.

Nel gruppo "Controllo", delle 21 pazienti avute, 1 è stata scartata per contaminazione da candida (*Candida albicans*), 1 per scarsità cellulare.

Nel gruppo "Endometriosi", invece, delle 19 pazienti totali, solamente 1 è stata scartata per contaminazione da candida.

In entrambi i gruppi, le cellule recuperate da ciascuna paziente, sono state sottoposte ai seguenti trattamenti:

- Ormone follicolo stimolante (FSH)
- Concentrazioni crescenti di fluido follicolare



Schema esplicativo che mostra il percorso delle cellule della granulosa (GCs): dal prelievo alla rilevazione dei marcatori di interesse.

3.4 Analisi morfologica

L'analisi morfologica delle cellule della granulosa (GCs) è stata eseguita mediante l'utilizzo di un microscopio invertito (Nikon TE2000) che, rende possibile l'osservazione delle cellule evitando l'utilizzo di coloranti e fissativi non utilizzabili nelle tecniche di coltura cellulare.

È stata valutata la loro dimensione, il diverso sviluppo e la loro crescita nei diversi giorni in coltura sulla base dei diversi trattamenti a cui le cellule sono state sottoposte.

3.5 Analisi di apoptosi

Nell'apoptosi la singola cellula svolge un ruolo attivo nella propria distruzione. Il processo è controllato e può essere innescato da un orologio interno o da agenti extracellulari come ormoni, citochine e da agenti chimici, fisici o virali. Da un punto di vista biochimico, una delle caratteristiche più importanti del processo apoptotico è la perdita dell'asimmetria fosfolipidica della membrana plasmatica: la morte cellulare apoptotica è accompagnata da un cambiamento nella struttura della membrana plasmatica per esposizione superficiale della fosfatidilserina (PS), mentre l'integrità della membrana resta incontestata. La PS, esposta in superficie, può essere rilevata grazie alla sua affinità per l'Annexina V, una proteina legante i fosfolipidi [17].

Dall'analisi morfologica sono state identificate, grazie alle fonti bibliografiche, cellule in apoptosi (Figura 5 e 6).

Per confermare l'apoptosi le GCs sono state trattate con il kit dell'annexina V-FITC che, consente il rilevamento, per fluorescenza, dell'annexina V legata alle cellule apoptotiche e la determinazione quantitativa tramite citometria a flusso.

Il kit usa l'annexina V coniugata con isotiocinato di fluoresceina (FITC) per marcare i siti della fosfatidilserina presenti sulla superficie della membrana. Include, inoltre, lo ioduro di propidio (PI) per marcare il DNA cellulare nelle cellule in cui la membrana cellulare è stata completamente compromessa [18].

Questa combinazione consente quindi di differenziare le cellule nel seguente modo:

- Cellule in fase apoptotica precoce: positive all'annexina V, negative al PI
- Cellule in fase apoptotica finale: positive all'annexina V, positive al PI
- Cellule vitali: negative all'annexina V, negative al PI

Le cellule della granulosa, presenti nelle flasks sono state staccate mediante utilizzo di TrypLE Express (TrypLE™ Express Enzyme (1X)):

è stato rimosso il Medium di coltura (MC), aggiunti 1000 µl di TrypLE Express e incubato per 10 minuti a 37°C.

L'azione dell'enzima è stata bloccata risospendendo le cellule in MC.

Le cellule sono state trasferite in falcon da 15 ml e centrifugate a 1500 rpm per 5 minuti.

Le cellule sedimentate nel pellet sono state, poi, trattate con tampone (*binding buffer*), Annexina V-FITC, PI per 15 minuti; risospese con *binding buffer* e, lette con il citofluorimetro [16].

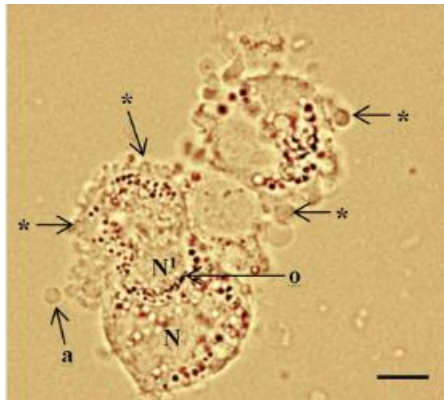


FIGURA 5

Le cellule della granulosa si caratterizzano per la presenza di organelli attorno al nucleo (N). Estrusioni citoplasmatiche o *blebbing* (*) indicano apoptosi tardiva. Corpi apoptotici (a). Organelli raggruppati attorno al nucleo (o). Una cellula della granulosa sana (N) senza *blebbing* (*) sta inglobando il nucleo della cellula granulosa apoptotica vicina (N1) tramite fagocitosi. (Immagine tratta da Regan SLP et al. 2018 [17]).

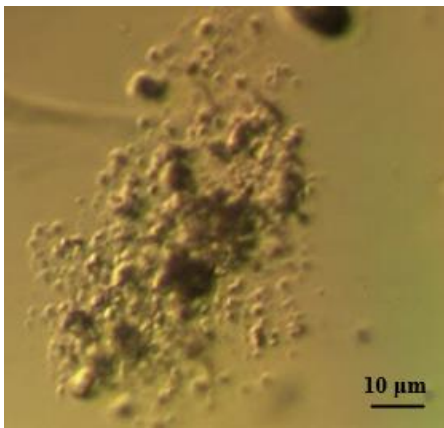


FIGURA 6

Esempio di cellula GC in coltura in apoptosi. Immagine ottenuta mediante microscopio invertito (Nikon TE2000).

3.6 Citometria a flusso (o citofluorimetria)

Al termine di ciascun trattamento le cellule in coltura sono state staccate dalle flasks con TrypLE Express, come descritto precedentemente.

Le cellule sedimentate nel pellet sono state processate nel seguente modo: sono stati aggiunti 100 μ l di Fissante/Reagente A (*Fixation Medium/Medium A*) per 15 minuti a temperatura ambiente.

Le cellule sono state poi lavate con PBS+FBS mediante centrifugazione a 1500 rpm per 5 minuti.

Al pellet sono stati poi aggiunti 100 μ l di Permeabilizzante/Reagente B (*Permeabilization Medium/Medium B*) e 100 μ l del mix contenente l'anticorpo primario e PBS seguendo quanto riportato dal relativo foglio illustrativo.

Le cellule vengono così incubate per 45 minuti a temperatura ambiente.

È stato poi fatto un lavaggio con PBS+FBS mediante centrifugazione a 1500 rpm per 5 minuti.

Infine, sono stati aggiunti 100 μ l del mix contenente l'anticorpo secondario fluorescente e PBS seguendo quanto riportato dal relativo foglio illustrativo e incubato 20 minuti a temperatura ambiente, al buio.

Le cellule vengono lavate nuovamente con la stessa procedura sopra descritta e, poi risospese in 300 ml di PBS.

La finale analisi citofluorimetrica ha permesso la valutazione quantitativa di interesse.

3.7 Immunocitochimica

Per la valutazione qualitativa le cellule presenti nelle flasks sono state monitorate mediante osservazione al microscopio.

Per l'analisi, le cellule vengono seminate su vetrino secondo i trattamenti previsti e poi processate nel seguente modo:

aggiunti 100 μ l di Permeabilizzante/Reagente B (*Permeabilization Medium/Medium B*) e 100 μ l del mix contenente l'anticorpo primario e PBS seguendo quanto riportato dal relativo foglio illustrativo.

Le cellule vengono così incubate per 45 minuti a temperatura ambiente.

È stato fatto un lavaggio con PBS+FBS e, successivamente sono stati aggiunti 100 μ l del mix contenente l'anticorpo secondario fluorescente e PBS seguendo quanto riportato dal relativo foglio illustrativo e incubato 20 minuti a temperatura ambiente, al buio.

Lavate nuovamente con PBS+FBS e incubate con l'intercalante nucleare (DAPI).

Dopo il lavaggio finale i rispettivi vetrini sono stati rimossi dalla piastra a 12 pozzetti, posizionati su vetrini portaoggetto con montante e osservati con microscopio confocale.

4: RISULTATI E DISCUSSIONE

Il nostro studio parte dal presupposto che le pazienti con endometriosi abbiano una difficoltà superiore rispetto alle pazienti controllo nell'ottenere una gravidanza. I dati bibliografici riportano, infatti, che ben il 10% delle donne in età riproduttiva soffrono di endometriosi e, circa 1/3 di queste, trovano un'enorme difficoltà nell'ottenere una gravidanza. Per contro, nel 50% delle donne infertili è stata riscontrata questa patologia, a sottolineare una diretta correlazione con l'infertilità. Abbiamo quindi analizzato i dati clinici relativi al gruppo "Controllo" ed "Endometriosi" di tutte le pazienti che si sono rivolte al centro di PMA dell'Ospedale di Padova dal 01 Febbraio 2024 al 01 Luglio 2024.

4.1 Caratteristiche di fertilità delle pazienti del Gruppo "Controllo" e del Gruppo "Endometriosi"

Per mettere in evidenza le potenziali differenze tra il gruppo "Controllo" e il gruppo "Endometriosi" sono stati messi a confronto gli esiti dei trattamenti di fecondazione in vitro (IVF) a cui sono state sottoposte le pazienti (Tabella 2 e Figura 7).

In particolare, per ciascuna paziente sono stati valutati i seguenti dati:

- Numero di follicoli maturi
- Numero di ovociti recuperati
- Numero di ovociti maturi (MII)
- Numero di ovociti fecondati

Parametro	Controllo (n=21)	Endometriosi (n=19)
Follicoli	6.5 ± 3.5	6.0 ± 4.9
OR	7.8 ± 5.6	6.2 ± 4.2
OM	6.1 ± 4.3	5.9 ± 4.6
OF	3.9 ± 3.0	3.2 ± 2.4

Tabella 2: Esiti del trattamento IVF nelle pazienti del gruppo "Controllo" e del gruppo "Endometriosi"

Follicoli = numero di follicoli maturi; OR = numero di ovociti recuperati; OM = numero di ovociti maturi; OF = numero di ovociti fecondati.

I dati dei parametri sono espressi come media ± deviazione standard (DS).

I dati emersi non mostrano grandi differenze tra le medie nel numero di follicoli maturi tra i due gruppi, pur evidenziandone un'estrema variabilità che dimostra la soggettività delle pazienti nel loro percorso di PMA. Infatti, la risposta ai trattamenti ormonali a cui le pazienti sono sottoposte è del tutto soggettiva e può variare in maniera imprevedibile in funzione della loro sensibilità al trattamento stesso portando sia ad una diversa maturazione dei follicoli all'interno dell'ovaio, che ad una diversa numerosità di ovociti all'interno di ciascun follicolo.

Sebbene nel gruppo di controllo siano presenti un numero maggiore di ovociti recuperati, gli ovociti maturi sono poi invece molto simili tra i due gruppi. Per quanto riguarda il parametro relativo al numero degli ovociti fecondati, pur essendo molto simile tra i due gruppi, non è significativo nella nostra ricerca in quanto coinvolge anche una seconda incognita che è relativa alla fertilità maschile.

Per avere un'idea più precisa abbiamo organizzato i dati della Tabella 2 in Figura 7 per vedere la distribuzione di ciascun parametro nei due gruppi.

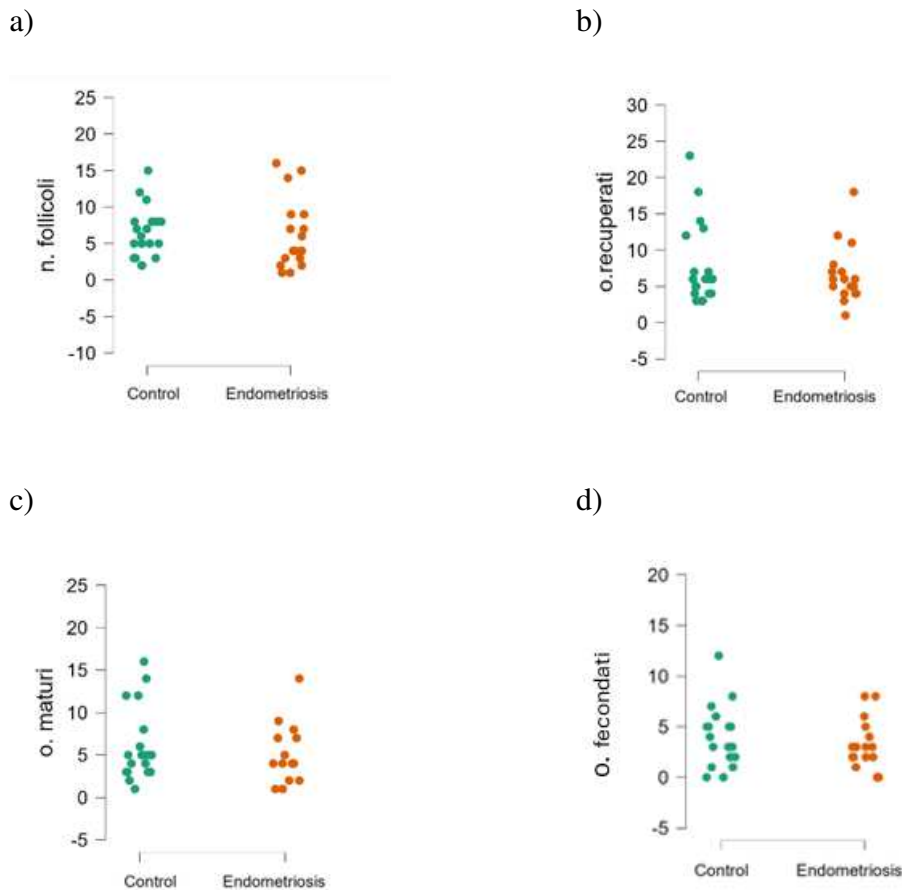


Figura 7: Confronto della qualità e della quantità degli ovociti tra gruppo “Controllo” e gruppo “Endometriosi”.

In figura vengono riportati i grafici a punti della distribuzione degli ovociti nei due gruppi di pazienti (“Controllo” ed “Endometriosi”):

- a) Numero di follicoli maturi
- b) Numero di ovociti recuperati
- c) Numero di ovociti maturi
- d) Numero di ovociti fecondati

I dati della distribuzione dei parametri nei due gruppi evidenziano che non vi sono significative differenze tra le pazienti dei due gruppi.

Questo potrebbe essere dovuto al fatto che le pazienti appartenenti al gruppo “Controllo” sono comunque giunte a sostenere il ciclo di PMA a causa di una loro impossibilità ad ottenere naturalmente una gravidanza principalmente a causa dell’età, che supera i 35 anni, ma anche a causa di altri fattori che le hanno portate a sostenere più di un ciclo.

Tutto questo può aver contribuito a diminuire le differenze di *outcome* positivi con il gruppo “Endometriosi”.

Infatti, analizzando il tasso di fertilità (Tabella 3) come rapporto tra il numero di ovociti fecondati sul numero di ovociti totali recuperati, le difficoltà nel produrre ovociti maturi e, quindi, pronti per la fecondazione, viene ulteriormente confermata in entrambi i gruppi.

Parametro	Controllo (n=21)	Endometriosi (n=19)
Tasso di fertilità	0.51± 0.29	0.54 ± 0.32

Tabella 3: Confronto del tasso di fertilità tra gruppo “Controllo” e gruppo “Endometriosi”.

Il tasso di fertilità ottenuto come rapporto tra numero di ovociti fecondati/numero di ovociti totali recuperati è riportato come media ± DS.

Poiché la patologia dell’endometriosi influenza non soltanto la formazione potenzialmente ridotta di ovociti maturi, ma potrebbe determinare una maggior difficoltà nel portare correttamente a termine una gravidanza, abbiamo analizzato il numero di gravidanze portate a termine dalle pazienti rispetto al numero totale di embrioni trasferiti al termine del ciclo di PMA (Figura 8).

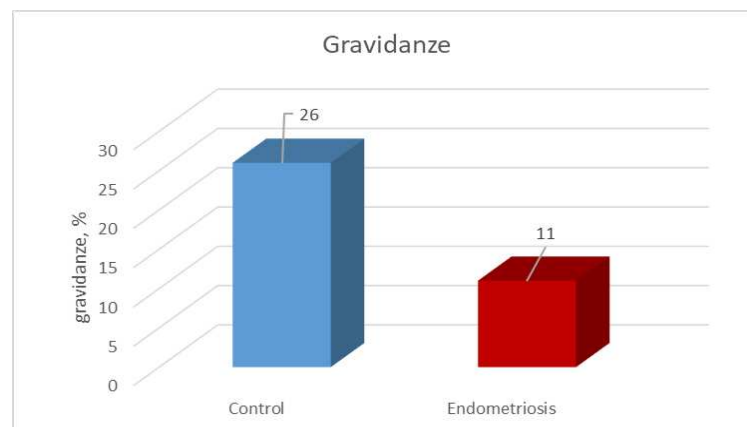


Figura 8: Confronto percentuale del numero di gravidanze portate a termine rispetto al numero di embrioni trasferiti nei gruppi “Controllo” (blu) ed “Endometriosi” (rosso). I valori sono espressi come numero di gravidanze portate a termine/numero di embrioni trasferiti x 100.

Dal grafico si nota che l'esito positivo di gravidanza è nettamente superiore nel gruppo "Controllo" rispetto al gruppo "Endometriosi".

Nonostante le pazienti dei due gruppi condividano inizialmente gli stessi parametri quali numero di follicoli maturi e numero di ovociti maturi, gli esiti delle gravidanze si discostano ampiamente, con una riduzione maggiore del 65% nel gruppo "Endometriosi" rispetto al gruppo "Controllo".

Per approfondire lo studio e trovare una potenziale causa di questa enorme differenza tra i due gruppi, abbiamo studiato le cellule della granulosa (GCs) ottenute dal prelievo ovocitario o *pick up*.

4.3 Analisi di crescita e sopravvivenza

L'incremento dell'ormone luteinizzante (LH), al termine della stimolazione ormonale a cui sono sottoposte le pazienti durante il ciclo di PMA, determina la fase finale dello sviluppo follicolare e induce le GCs a differenziarsi in cellule luteinizzanti.

Queste cellule luteinizzanti regrediscono riducendo la produzione di estradiolo, ormone che supporta la crescita e lo sviluppo delle GCs.

Contemporaneamente aumenta l'espressione del recettore dell'ormone LH (LHR) che, in assenza di una gravidanza, riduce la sopravvivenza delle cellule comportandone l'apoptosi [19,20].

Al momento del *pick up*, quindi, le cellule presenti nel fluido follicolare sono cellule luteinizzanti con una potenziale ridotta sopravvivenza in coltura.

Per constatare l'effettiva capacità di sopravvivenza in coltura, le GCs del gruppo "Controllo" (n=7) e del gruppo "Endometriosi" (n=5) sono state incubate in flasks T25 al tempo 0 (giorno del prelievo ovocitario) in MC.

Abbiamo monitorato l'evoluzione di tali colture, soffermandoci principalmente sulla crescita, in termini di dimensioni, e sulla loro sopravvivenza (Tabella 4 e Figura 9) ottenendo le seguenti caratteristiche:

- Le GCs il primo giorno risultavano essere ben adese.
- Dal secondo al settimo giorno hanno mostrato una crescita esponenziale in diametro e l'emissione di prolungamenti mediante i quali sembravano avvicinarsi tra loro.
- Al settimo giorno, le GCs hanno raggiunto le loro dimensioni massime.
- Nei giorni a seguire è stato osservato un progressivo distaccamento delle cellule dalla superficie delle flasks, iniziando così il processo di apoptosi che si è completato intorno al quattordicesimo giorno.

Paziente	N°pazienti	Dimensione massima media (\pm DS)
Controllo	7	128 \pm 5 μ m
Endometriosi	5	122 \pm 7 μ m

Tabella 4: Confronto della dimensione massima media delle GCs nei due diversi gruppi.

I dati delle variabili sono espressi come media \pm deviazione standard (DS).

I valori della dimensione massima media fanno riferimento al settimo giorno delle GCs in coltura.

Non vi sono significative differenze tra i due gruppi né per quanto riguarda le dimensioni massime raggiunte dalle cellule, né per quanto riguarda la loro sopravvivenza (Figura 9).

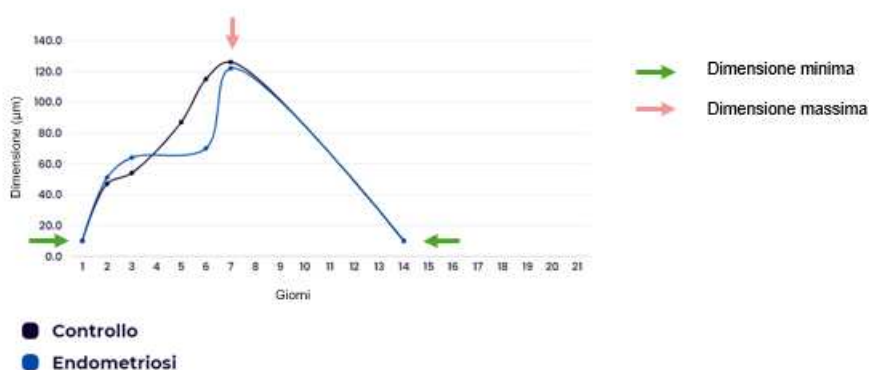


Figura 9: Confronto della crescita e della sopravvivenza delle GCs nel Medium di Coltura (MC) nei gruppi “Controllo” ed “Endometriosi”.

Le due curve risultano avere un andamento diverso dal 2° giorno al 7° giorno nei due diversi gruppi:

- Il gruppo “Controllo” (in nero) si caratterizza per GCs che hanno una crescita esponenziale, in termini di dimensioni, ogni giorno.
- Il gruppo “Endometriosi” (in blu), invece, presenta GCs che dal 1° al 3° giorno crescono, dal 3° al 6° giorno hanno delle dimensioni pressoché costanti. Aumentano poi nuovamente di dimensioni tra il 6° e il 7° giorno, arrivando ad avere dimensioni massime quali quelle delle GCs appartenenti al gruppo “Controllo”.

4.4 Effetto dei trattamenti sulla sopravvivenza e sulla morfologia delle GCs

4.4.1 Sopravvivenza

Precedenti studi [5] avevano sottolineato come la presenza di fluido follicolare (33%) nel Medium MC, portasse ad un incremento della sopravvivenza delle cellule della granulosa di pazienti la cui causa di infertilità non era stata specificata.

Per determinare le potenziali differenze tra i fluidi follicolari del gruppo “Controllo” e del gruppo “Endometriosi” nell’incrementare la sopravvivenza delle cellule in coltura, abbiamo trattato le GCs con terreno MC in presenza di concentrazioni crescenti di fluido follicolare (FF).

Sono state fatte delle prove iniziali con l’obiettivo di stabilire il giusto quantitativo di fluido follicolare da aggiungere alle GCs in coltura.

Le GCs di tre separate pazienti appartenenti al gruppo “Controllo” e quelle di tre separate pazienti appartenenti al gruppo “Endometriosi” sono state incubate in MC contenente fluido follicolare nei seguenti rapporti:

- 100% fluido follicolare e 0% MC (1:0)
- 50% di fluido follicolare e 50% di MC (1:1)

Le GCs incubate con solo fluido follicolare non hanno mostrato miglioramento ma, al contrario hanno mostrato apoptosi dopo soli due giorni in coltura (Figura 10a).

Le GCs trattate, invece, con 50% di FF e 50% MC hanno mostrato una sopravvivenza maggiore rispetto alle precedenti, ma non hanno mostrato un miglioramento nella sopravvivenza rispetto a quelle incubate con solo MC: dopo 14 giorni circa, sono andate in apoptosi (Figura 10b).

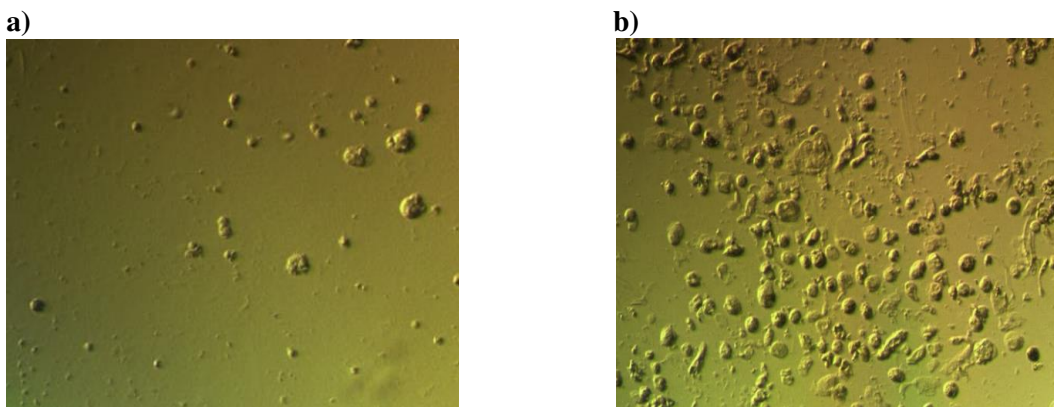


Figura 10: Immagine fatta con microscopio invertito (ingrandimento 4X) delle cellule GCs del gruppo “Controllo” in coltura con 100% (a) e 50% (b) di fluido follicolare (FF) proveniente dal gruppo “Controllo”.

La figura è rappresentativa di 3 diversi esperimenti sia da parte di pazienti del gruppo “Controllo” che da parte del gruppo “Endometriosi”.

Dopo aver trovato il giusto rapporto tra MC e FF, volevamo capire se l'effetto che FF aveva sulle cellule potesse essere legato alla presenza dell'ormone FSH, presente nel fluido follicolare come conseguenza della somministrazione di questo alle pazienti per terapia ormonale.

Abbiamo quindi incubato le GCs di pazienti "Controllo" (n=6) e pazienti "Endometriosi" (n=6) secondo il seguente schema:

- Trattamento con solo MC (DMEM)
- Trattamento con MC supplementato con FSH (100 ng/ml) [21]
- Trattamento con MC + fluido follicolare, preparato come sopra descritto, derivato da pazienti del gruppo "Controllo" (FFC)
- Trattamento con MC + fluido follicolare, preparato come sopra descritto, derivato da pazienti del gruppo "Endometriosi" (FFENDO)

Le GCs sono state osservate al T_0 (momento della semina) e monitorate poi nei giorni a seguire, con ripetuti cambi di terreno per 21 giorni. La valutazione finale è stata eseguita al T_{21} (ventunesimo giorno di coltura) (Figura 11).

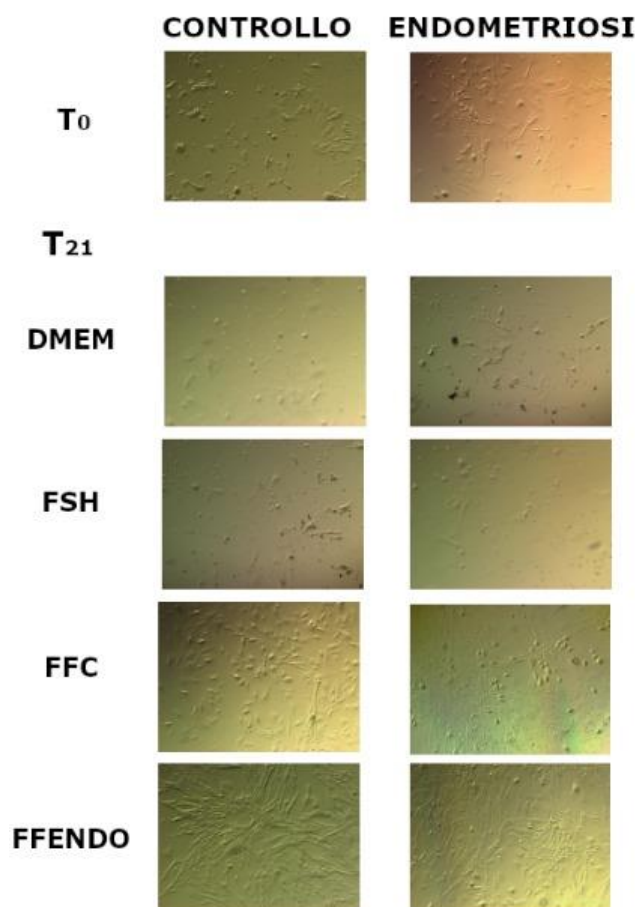


Figura 11: Aspetto morfologico delle GCs da pazienti del gruppo “Controllo” e del gruppo “Endometriosi” al T₀ e dopo 21 giorni (T₂₁) di trattamento in assenza (DMEM) o presenza di FSH (100 ng/ml), FFC (fluido follicolare derivato da pazienti del gruppo “Controllo”) o FFENDO (fluido follicolare derivato da pazienti del gruppo “Endometriosi”).

L’immagine, presa mediante microscopio invertito, è rappresentativa di 6 esperimenti del gruppo “Controllo” e, 6 esperimenti del gruppo “Endometriosi”.

Come aspettato, in entrambi i gruppi, le GCs trattate con DMEM (presenza del solo Medium di Coltura o MC) hanno dimostrato una sopravvivenza non superiore alle due settimane, come evidenziato da una percentuale di apoptosi superiore al 90.

Nessuna differenza dal punto di vista morfologico è stata osservata, al termine dei 21 giorni, sia per il gruppo “Controllo” che per il gruppo “Endometriosi”.

In terreno DMEM con aggiunta di FSH, in entrambi i gruppi, le GCs mostrano un comportamento analogo a quanto visto in DMEM con accentuata apoptosi dopo 21 giorni.

Completamente diversa, invece, è la sopravvivenza delle GCs in coltura con terreno costituito da DMEM + FF.

Sia nel caso di FFC, che in caso di FFENDO, le GCs di tutte le pazienti non solo sono sopravvissute (assenza di apoptosi), ma si sono velocemente replicate e sviluppate.

Questo esperimento mostra, non solo, che la presenza di una percentuale di fluido follicolare è necessaria per la crescita e lo sviluppo delle GCs, ma anche che la componente fondamentale per garantire questo positivo effetto non è dovuto alla componente ormonale dell'FSH, ma a qualche altro fattore presente nei fluidi follicolari.

4.4.2 Saggio di apoptosi

Per confermare che la morte cellulare che osserviamo in assenza di fluido sia effettivamente apoptosi le cellule ottenute al termine dei trattamenti sopra descritti (DMEM; FSH; FFC; FFENDO), sono state analizzate con Annessina V-FITC e PI al citofluorimetro.

L'estroffessione della fosfatidilserina, che viene considerata come l'evento iniziale del processo apoptotico, e la denaturazione della membrana nucleare con la colorazione con PI della componente nucleare, considerata come l'evento terminale del processo apoptotico, sono stati evidenziati nei campioni DMEM e FSH sia per le GCs del gruppo "Controllo" che in quelle del gruppo "Endometriosi" (Figura 12).

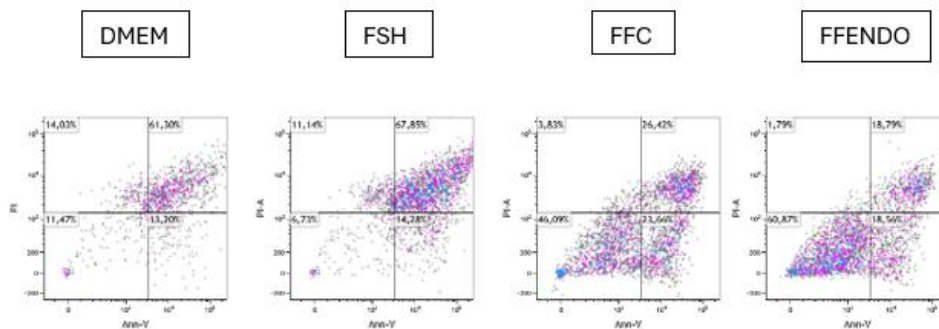


Figura 12: Analisi quantitativa di apoptosi precoce e apoptosi finale in GCs al termine del trattamento in assenza (DMEM) o presenza di FSH (100 ng/ml), FFC (fluido follicolare derivato da pazienti del gruppo "Controllo") o FFENDO (fluido follicolare derivato da pazienti del gruppo "Endometriosi").

Per ogni pannello, nel quadrante superiore destro gli eventi di apoptosi finale (GCs positive all'annessina V e positive al PI), nel quadrante inferiore destro gli eventi di apoptosi precoce (GCs positive all'annessina V, ma negative al PI) e nel quadrante inferiore sinistro le cellule vitali (GCs negative all'annessina V e negative al PI).

L'immagine è rappresentativa del comportamento delle GCs nei diversi trattamenti per il gruppo "Controllo" (n=6) e per il gruppo "Endometriosi" (n=6)

Al contrario, le cellule in coltura FFC e le cellule in coltura FFENDO risultano per la maggior parte vitali come indicato dall'ampia presenza di cellule nel quadrante in basso a sinistra.

Solo una minima parte risulta in apoptosi precoce e/o finale con un'interessante ulteriore riduzione in FFENDO rispetto all'FFC per le GCs di entrambi i gruppi (Figura12).

4.4.3 Morfologia cellulare

Inoltre, le cellule trattate come sopra descritto, sono state anche osservate al microscopio per valutare l'effetto dei trattamenti sulla loro morfologia.

Al T₀, cioè in assenza di fluidi follicolari, le cellule di entrambi i gruppi ("Controllo" ed "Endometriosi") si caratterizzano per la presenza di tre diverse morfologie (Figura 13):

- Cellule di tipo epiteliale di derivazione follicolare, o *follicle epithelial like granulosa cells* (FELGCs)
- Cellule della granulosa non differenziate, o *undifferentiated granulosa cells* (uGCs)
- Cellule della granulosa simili ai fibroblasti, o *fibroblast like cells*

In seguito all'aggiunta di FFC o FFENDO, già dopo 14 giorni (T₁₄), è stato possibile osservare un differenziamento delle GCs come conseguenza della comparsa di diversi tipi cellulari, assenti al T₀ (Figura 13), quali:

- Cellule della granulosa simili alle cellule muscolari, o *muscle like cells*
- Cellule della granulosa simili ai condroblasti, o *chondroblast like cells*
- Cellule della granulosa simili alle cellule neuronali, o *neuronal like cells*

Inoltre, al T₁₄ è evidente un'aumento delle *fibroblast like cells* che sono presenti anche al T₀, ma in quantità decisamente inferiore.

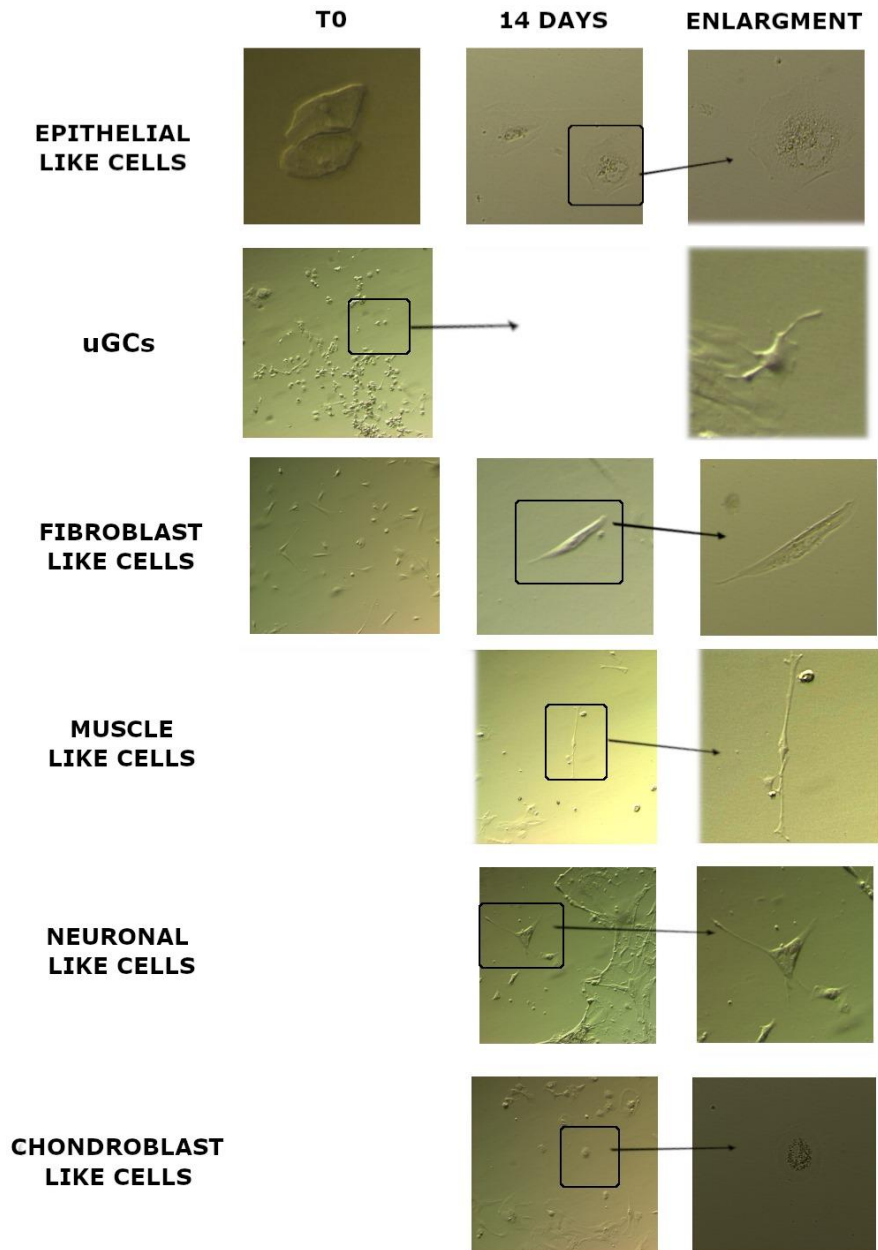


Figura 13: Morfologia delle cellule della granulosa.

L'immagine riporta i tipi cellulari presenti al T₀ (in terreno DMEM, prima del trattamento) e i tipi cellulari presenti al T₁₄ (dopo il trattamento con FFC e FFENDO).

In 'enlargment' sono riportati gli ingrandimenti della cellula contrassegnata dal riquadro. Al T₀ sono assenti le foto delle *muscle like cells*, delle *neuronal like cells* e *chondroblast like cells*, perché prima del trattamento esse non si sviluppano. Al T₁₄ invece, sono assenti le uGCs in quanto, in seguito al trattamento con FFC o FFENDO, si differenziano negli altri tipi cellulari assenti al T₀.

Dopo un'attenta osservazione microscopica, è stato possibile delineare caratteristiche distintive delle cellule:

- le FELGCs hanno forma pressoché rotondeggiante, schiacciata e assenza di prolungamenti;
- Le uGCs hanno forma rotondeggiante e presenza di prolungamenti (da 1 a 4 per singola cellula);
- Le *fibroblast like cells* hanno forma allungata con presenza di prolungamenti, come le uGCs;
- Le *muscle like cells* hanno una morfologia simile alle *fibroblast like cells*, ma si differenziano per lo spessore minore, al contrario delle *fibroblast like cells* che sono ugualmente allungate, ma più spesse;
- Le *chondroblast like cells* hanno forma sferica, differente dalle FELCGs, e assenza di prolungamenti.
- Le *neuronal like cells* hanno forma poligonale e 3 o 4 prolungamenti per singola cellula.

La valutazione della percentuale delle sub-popolazioni cellulari, presenti al T₀, è stata analizzata e confrontata. (Figura 14).

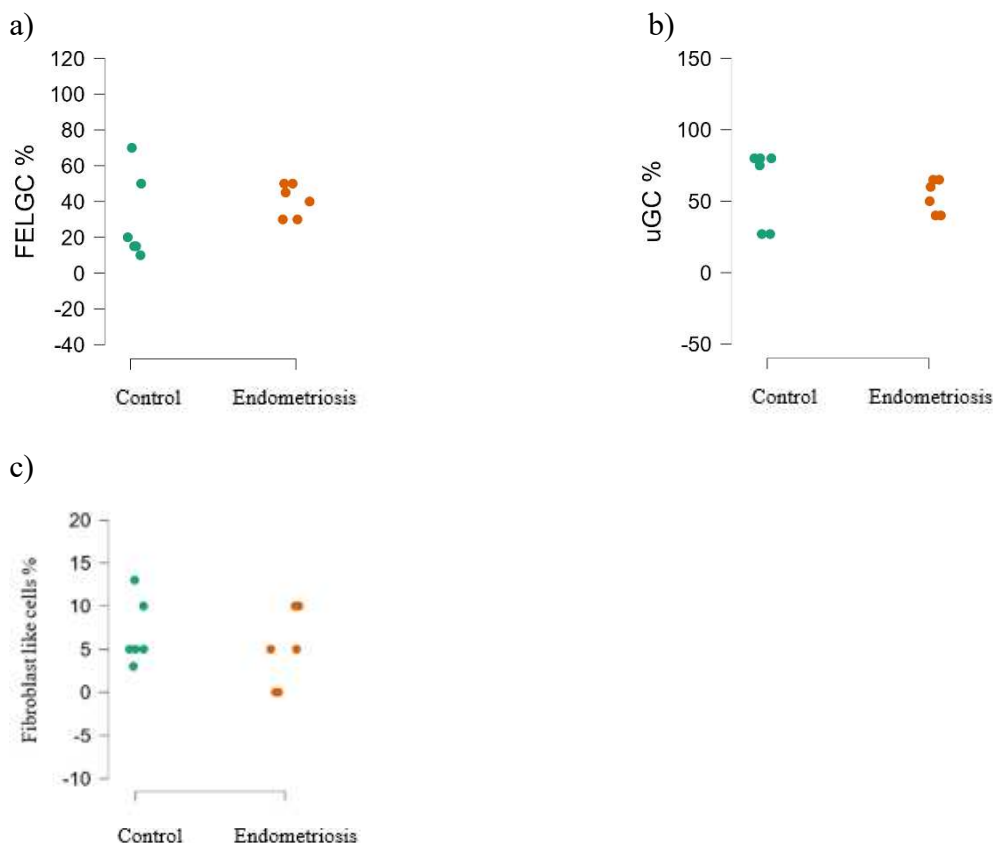


Figura 14: Morfologia delle cellule della granulosa al T₀.

Valutazione percentuale delle sub-popolazioni presenti nei due gruppi “Controllo” ed “Endometriosi” al T₀. Nel pannello a) vengono mostrate le percentuali delle FELCGs nel gruppo “Controllo” (verde) e nel gruppo “Endometriosi” (rosso); nel pannello b) vengono

mostrate le percentuali delle uGCs nel gruppo “Controllo” (verde) e nel gruppo “Endometriosi” (rosso); nel pannello c) vengono mostrate le percentuali delle *fibroblast like cells* nel gruppo “Controllo” (verde) e nel gruppo “Endometriosi” (rosso).

Le percentuali sono ottenute mediante conta di almeno 100 cellule in diversi campi al microscopio ottico invertito per ciascun campione dei due gruppi “Controllo” (n=6) ed “Endometriosi” (n= 6).

Quel che emerge dall’analisi è la mancanza di evidenti differenze tra i due diversi gruppi.

In entrambi i casi, c’è prevalenza di FELGCs e uGCs con una piccolissima percentuale di *fibroblast like cells* nei campioni di tutte le pazienti.

A seguire, abbiamo eseguito la stessa valutazione della percentuale delle sub-popolazioni cellulari al T₁₄ e i dati sono riportati in Tabella 5a e Tabella 5b.

Patient (Controllo)	Muscle like cells %		Neuronal like cells %		Fibroblast like cells %		Chondroblast like cells %	
	FFC	FFENDO	FFC	FFENDO	FFC	FFENDO	FFC	FFENDO
61	0	0	10	30	20	30	70	40
71	0	10	30	10	30	50	40	30
72	0	15	20	5	35	45	45	35
79								
80	25	35	10	5	65	60	0	0
81								
84	20	45	0	5	25	45	55	5
90	80	20	4	5	15	60	1	10

Tabella 5a: Valutazione percentuale delle GCs dopo il trattamento nel gruppo “Controllo”

Patient (Endometriosi)	Muscle like cells %		Neuronal like cells %		Fibroblast like cells %		Chondroblast like cells %	
	FFC	FFENDO	FFC	FFENDO	FFC	FFENDO	FFC	FFENDO
25	10	20	10	20	35	30	50	30
33	5	30	15	35	80	40	0	0
44	10	0	10	5	45	30	35	65
51	0	0	5	5	55	70	40	25
78	10	15	5	5	75	70	10	10
99	60	70	10	10	30	20	0	0

Tabella 5b: Valutazione percentuale delle GCs dopo il trattamento nel gruppo “Endometriosi”

Le cellule del gruppo “Controllo” (Tabella 5a) e del gruppo “Endometriosi” (Tabella 5b) sono state trattate con FFC e FFENDO per 14 giorni.

La valutazione percentuale delle sub-popolazioni presenti nei due gruppi “Controllo” ed “Endometriosi” al T₁₄ è stata ottenuta mediante conta di almeno 100 cellule in diversi campi al microscopio ottico invertito per ciascun campione dei due gruppi “Controllo” (n=6) ed “Endometriosi” (n= 6).

Come si può notare, le percentuali delle differenti sub-popolazioni non differiscono molto tra le GCs del gruppo “Controllo” rispetto a quelle del gruppo “Endometriosi” sia in funzione del trattamento con FFC che del trattamento con FFENDO.

La differenza significativa risulta essere invece l’effetto del trattamento FFC rispetto al trattamento FFENDO indipendentemente dal gruppo (“Controllo” o “Endometriosi”) di appartenenza delle GCs. (Figura 15)

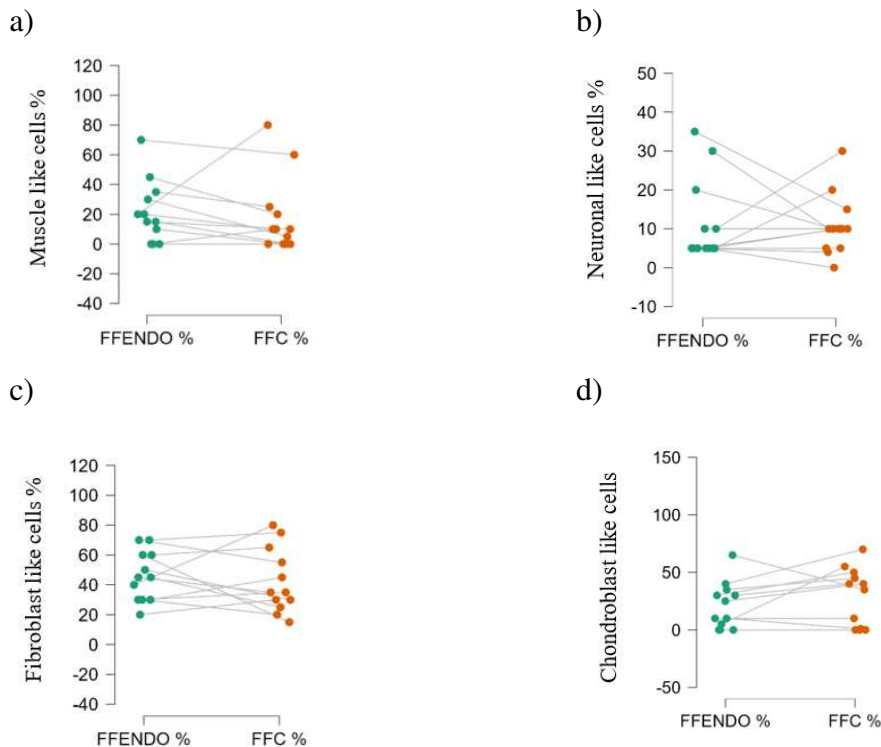


Figura 15: Morfologia delle cellule della granulosa del gruppo “Controllo” (n=6) e del gruppo “Endometriosi” (n=6) dopo il trattamento.

Percentuali ottenute dalle GCs di entrambi i gruppi in funzione del trattamento FFENDO (verde) rispetto a FFC (rosso).

Ogni punto è identificativo di una paziente.

Per ogni paziente, indipendentemente dal gruppo di appartenenza (“Controllo” o “Endometriosi”), viene mostrata la diversa percentuale di sub-popolazione di GCs in funzione del trattamento: a) *muscle like cells*; b) *neuronal like cells*; c) *fibroblast like cells*; d) *chondroblast like cells*.

La linea di congiunzione tra i due punti serve ad evidenziare come cambia la percentuale di GCs nella stessa paziente in funzione del diverso trattamento.

Quello che si nota dall’analisi è l’assenza di una significativa differenza per le *muscle like cells* e le *neuronal like cells*: il trattamento con FFC e FFENDO fa differenziare le uGCs in tali cellule, ma la percentuale di queste è simile nei due trattamenti.

Diverso invece è il differenziamento delle *fibroblast like cells* e delle *chondroblast like cells*: le *fibroblast like cells* sono in percentuale maggiore in FFENDO; mentre, al contrario, le *chondroblast like cells* sono in percentuale maggiore in FFC.

Questi dati (Figure 11, Figura 13, Figura 14, Figura 15) hanno evidenziato l'importanza del fluido follicolare (FF) nel terreno di coltura non solo per incrementare la sopravvivenza delle GCs, ma anche per indurre il differenziamento delle uGCs prevalentemente in *fibroblast like cells* e *chondroblast like cells*.

È inoltre ipotizzabile la presenza di una diversa composizione del fluido follicolare FFENDO rispetto a quello FFC in grado di indurre un diverso differenziamento in un tipo di sub-popolazione rispetto all'altra.

4.5 Effetto dei vari trattamenti sull'espressione del recettore per l'ormone follicolo stimolante (FSHR) come indicatore delle corrette caratteristiche delle GCs.

L'ormone follicolo stimolante (FSH) svolge un ruolo chiave nella riproduzione umana attraverso la produzione di estrogeni da parte delle cellule della granulosa, la crescita e la maturazione dei follicoli ovarici e la regolazione del ciclo ovulatorio. La funzione dell'FSH viene svolta tramite il legame con il suo recettore, il recettore dell'ormone follicolo-stimolante (FSHR) espresso sulla superficie delle cellule della granulosa.

Il legame di FSH al recettore determina l'attivazione di vie di segnalazione intracellulare che, a loro volta, portano alla stimolazione della crescita, differenziazione o proliferazione [22].

L'FSHR, che appartiene alla famiglia dei recettori accoppiati alle proteine G (GPCR), è un recettore di membrana, caratteristico delle cellule della granulosa nella fase follicolo-stimolante ed è utilizzato come indicatore di riconoscimento delle GCs stesse.

Le GCs del gruppo "Controllo" (n=6) e del gruppo "Endometriosi" (n=6), sottoposte ai diversi trattamenti (DMEM, FSH, FFC, FFENDO), sono state analizzate per il loro contenuto di FSHR, a conferma che il trattamento non abbia indotto delle modifiche non solo morfologiche, ma anche di tipizzazione delle cellule trattate.

I diversi campioni sono stati, quindi, trattati con anticorpo primario (anti-FSHR) e, evidenziati con anticorpo secondario fluorescente (Alexa 594) per l'analisi citofluorimetrica (Figura 16).

Per ciascun campione cellulare abbiamo utilizzato come controllo di auto fluorescenza le GCs trattate solamente con l'anticorpo secondario.

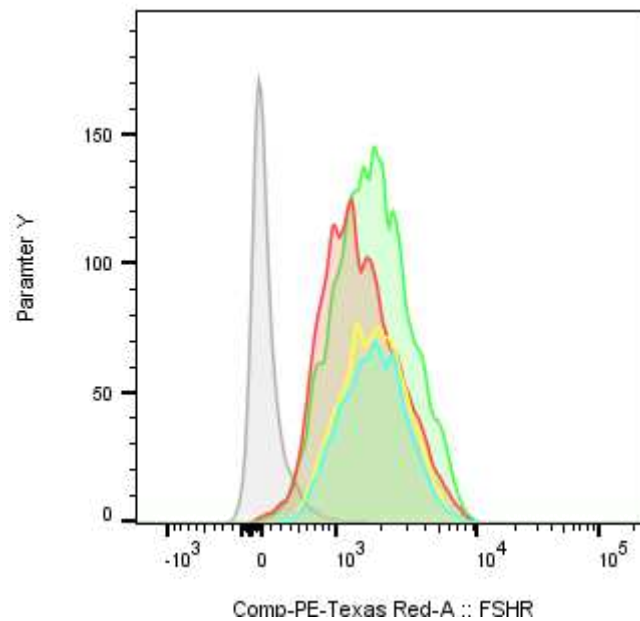


Figura 16: Effetto dei vari trattamenti sull'espressione di FSHR.

La figura è rappresentativa sia per il gruppo "Controllo" (n=6) che per il gruppo "Endometriosi" (n=6).

Nel grafico le curve mostrano l'intensità di espressione di FSHR e, in particolare:

la curva grigia rappresenta il controllo di auto fluorescenza.

la curva gialla le GCs trattate con DMEM;

la curva celeste quelle trattate con FSH;

la curva verde le GCs trattate con FFC

e, infine, la curva rossa le GCs trattate con FFENDO.

L'analisi ha mostrato che l'espressione di FSHR in tutti i trattamenti non varia, dimostrando quindi che le cellule in coltura mantengono le caratteristiche di cellule della granulosa.

4.6 Effetto dei vari trattamenti sull'espressione della proteina Connexina 43 (Cx43)

Le giunzioni comunicanti sono un tipo di giunzione cellulare che media la comunicazione cellula-cellula. Queste strutture cilindriche, simili a canali, collegano direttamente cellule vicine e consentono il rapido passaggio di varie piccole molecole (<1 Kda), ioni e metaboliti.

Proteine delle giunzioni comunicanti sono le connesine, proteine di transmembrana.

Nei follicoli ovarici sono state rilevate diverse isoforme di connesine, tra queste, la Connexina 37 (Cx37) e la Connexina 43 (Cx43) sono le isoforme più abbondantemente espresse che svolgono un ruolo nella modulazione della crescita del follicolo e della maturazione degli ovociti.

Le giunzioni comunicanti tra le cellule della granulosa sono formate prevalentemente da Cx43; mentre, le giunzioni comunicanti tra cellule del cumulo e ovociti sono formate prevalentemente da Cx37 [23].

Le GCs del gruppo "Controllo" (n=6) e del gruppo "Endometriosi" (n=6), sottoposte ai diversi trattamenti (DMEM, FSH, FFC, FFENDO), sono state analizzate per il loro contenuto di Cx43.

I diversi campioni sono stati, quindi, trattati con anticorpo primario (anti-Cx43) ed evidenziati con anticorpo secondario fluorescente (Alexa 488) per l'analisi citofluorimetrica (Figura 17a).

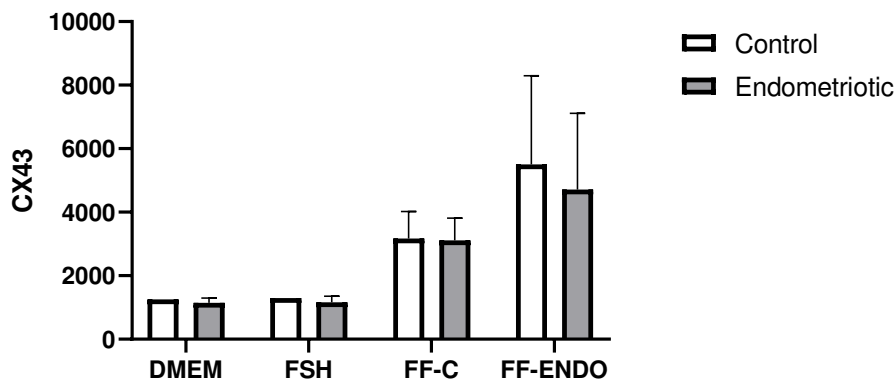


Figura 17a: Effetto dei vari trattamenti (DMEM; FSH; FFC; FFENDO) sulle GCs del gruppo "Controllo" (n=6) (bianco) e del gruppo "Endometriosi" (n=6) (grigio) sull'espressione della Cx43.

Il grafico riporta l'espressione della Connexina 43 (Cx43) secondo l'intensità di fluorescenza media (MFI).

I dati sono riportati come media \pm DS dei valori ottenuti da n=6 per ciascun gruppo.

Come si può notare, l'espressione di Cx43, nelle cellule trattate con DMEM e FSH risulta essere paragonabile per entrambi i gruppi e decisamente bassa. Il dato significativo si è osservato in presenza di FFC e, ancor di più in presenza di FFENDO, indipendentemente dal gruppo di appartenenza delle GCs, con un incremento di oltre il 100% per l'FFC e di circa il 200% per l'FFENDO.

Abbiamo nuovamente evidenziato l'importanza del fluido follicolare nel trattamento delle GCs.

Oltre al positivo effetto sulla sopravvivenza delle GCs, il fluido follicolare risulta determinante anche per l'espressione di una delle proteine responsabili della comunicazione intercellulare, che potrebbe essere uno dei fattori responsabili di una diversa differenziazione delle cellule della granulosa non differenziate (uGCs).

Sulla base di questa ipotesi, abbiamo valutato l'espressione della Connexina 43 nelle GCs del gruppo "Controllo" ed "Endometriosi", trattate con FFC e FFENDO e, bloccate al 50% e al 75% di confluenza.

In questo modo, supponendo che la Cx43 potesse essere direttamente correlata alla fase di sviluppo dei prolungamenti, attraverso i quali le cellule comunicano tra loro, l'espressione della Connexina dovrebbe essere direttamente proporzionale alla lunghezza dei prolungamenti che diminuiscono all'aumentare della confluenza.

In Figura 17b riportiamo i risultati ottenuti dall'analisi citofluorimetrica dell'espressione della Connexina 43 (Cx43).

Per ciascuna paziente sono state preparate 4 flasks (2 FFC e 2 FFENDO).

Le GCs sono state poi monitorate mediante osservazione al microscopio.

Due flasks di ciascuna paziente, di ciascun gruppo, sono state trattate una volta raggiunto il 50% di confluenza.

Le restanti due invece lasciate proseguire fino a circa il 75% di confluenza.

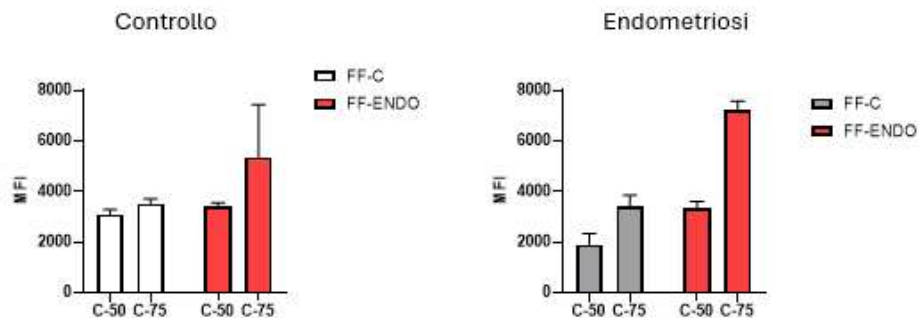


Figura 17b: Variazione dell'espressione di Cx43 in FFC e FFENDO in funzione della confluenza.

Le GCs del gruppo "Controllo" (n=3) e del gruppo "Endometriosi" (n=3) sono state trattate con FFC e FFENDO, e, una volta raggiunto il 50% (C-50) e il 75% (C-75) di confluenza, sono state trattate con anticorpo primario (anti-Cx43) ed evidenziate con anticorpo secondario fluorescente (Alexa 488) per l'analisi citofluorimetrica.

In figura sono riportati due grafici, uno relativo al gruppo "Controllo" e uno al gruppo "Endometriosi", che mostrano l'espressione di Cx43 secondo l'intensità di fluorescenza media (MFI). I dati sono riportati come media \pm DS.

Al contrario di quanto sopra ipotizzato, abbiamo osservato un incremento dell'espressione della Cx43 all'aumentare della confluenza, incremento che risulta notevolmente superiore in presenza del trattamento con FFENDO.

È stato precedentemente descritto da Clarke HJ [24] la presenza di quattro diversi tipi di comunicazioni presenti tra le cellule della granulosa (Figura 18)

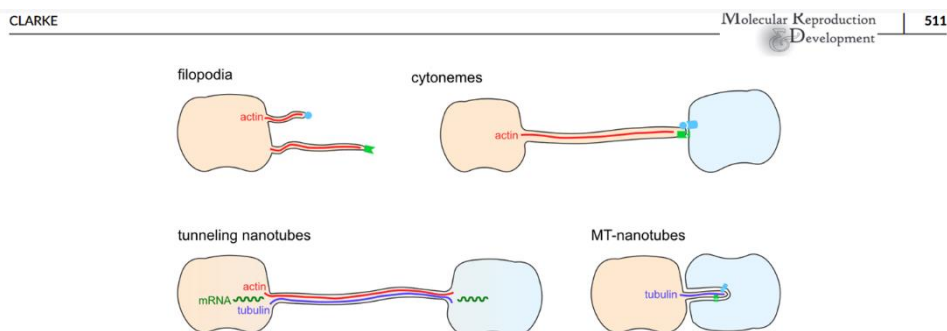


Figura 18: Descrizione dei meccanismi di comunicazione tra le cellule della granulosa. [24].

Filopodia: composte da uno scheletro di F-actina, queste dinamiche estensioni citoplasmatiche possono mediare comunicazioni tra cellule non adiacenti. Non sono canali aperti in quanto sono dotati di ligando o di un recettore.

Cytonemes: sono strutturalmente simili ai filopodia e sono principalmente implicati nelle comunicazioni intercellulari a lunga distanza. Anche questi possono essere dotati di ligandi e recettori per meglio interagire con le cellule comunicanti.

Tunneling nanotubes: sono principalmente costituiti da uno scheletro di actina, ma in alcuni casi anche tubulina. Al contrario dei precedenti sono canali aperti da entrambi i lati per permettere lo scambio di macromolecole come miRNAs.

MT-nanotubes: contengono uno scheletro di tubulina e, penetrano all'interno delle invaginazioni legate alla membrana di una cellula vicina.

Basandoci su quanto evidenziato dallo schema sopra descritto, è ipotizzabile che la Cx43 sia parte integrante delle comunicazioni di tipo *NT-nanotubes* tra cellule adiacenti e che quindi abbia un'espressione maggiore all'aumentare della confluenza.

Inoltre, i dati evidenziano un'enorme differenza tra i due trattamenti con l'FFENDO responsabile di un notevole incremento nell'espressione della Cx43 che, in entrambi i gruppi ("Controllo" ed "Endometriosi") risulta quasi raddoppiata.

Si potrebbe ipotizzare la presenza nel fluido follicolare di un fattore determinante per l'espressione della Cx43, fattore poco rilevante sia in DMEM che in FSH e presente probabilmente in concentrazioni diverse nei due fluidi FFC e FFENDO. Questo fattore non è legato all'ormone follicolo-stimolante (FSH), come dimostrato dal trattamento con FSH che non è in grado di indurre l'espressione della Cx43, che risulta simile al DMEM.

Potrebbe quindi non essere correlato direttamente al processo di crescita e sviluppo del follicolo, ma essere determinato da altri fattori che, confluendo nel fluido follicolare, potrebbero essere direttamente associati allo stato fisiologico generale della paziente e, nel caso specifico dell'endometriosi, legato allo stato ossidativo sistemico dovuto alla patologia.

Ulteriori studi saranno necessari per confermare e valutare questa ipotesi anche nell'ambito di potenziali terapie per l'IVF.

4.7 Identificazione e localizzazione di Cx43

Per confermare la presenza e la localizzazione della Cx43 nelle cellule al termine dei trattamenti, abbiamo testato i campioni provenienti da entrambi i gruppi (“Controllo” ed “Endometriosi”) con immunocitochimica.

In particolare, le GCs provenienti da pazienti “Controllo” (n=6) e pazienti “Endometriosi” (n=6) sono state seminate su vetrino e trattate secondo il seguente schema:

- Trattamento con solo MC (DMEM)
- Trattamento con MC supplementato con FSH (100 ng/ml) [20]
- Trattamento con MC + fluido follicolare, preparato come sopra descritto, derivato da pazienti del gruppo “Controllo” (FFC)
- Trattamento con MC + fluido follicolare, preparato come sopra descritto, derivato da pazienti del gruppo “Endometriosi” (FFENDO)

I vetrini vengono successivamente processati per l’immunocitochimica, in presenza di anticorpo anti-Cx43, come descritto in Materiali e Metodi, e osservati al microscopio confocale (Figura 19, Figura 20).

Le GCs seminate in presenza di DMEM e FSH non sono sopravvissute e, quindi, non è stato possibile eseguirne l’analisi.

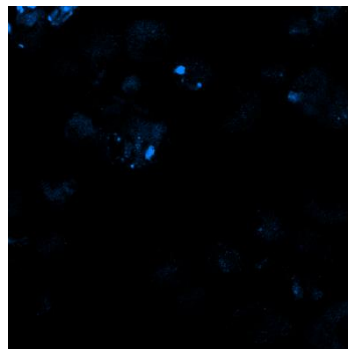


Figura 19: Aspecifico degli anticorpi secondari, a riprova della specificità del segnale ottenuto con l’anticorpo primario.

La figura è rappresentativa delle GCs di entrambi i gruppi in tutti i trattamenti (FFC e FFENDO).

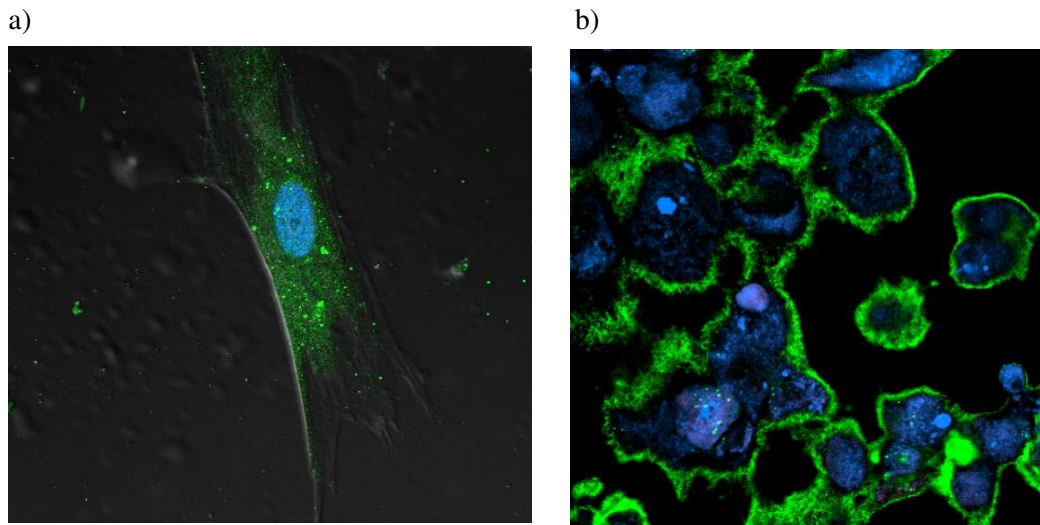


Figura 20: Espressione e localizzazione della CX43 su cellula singola (a) e su cellule adiacenti (b).

La figura è rappresentativa delle GCs di entrambi i gruppi in tutti i trattamenti (FFC n=6; FFENDO n=6), sia in caso di cellula isolata (a) che in caso di cellule a confluenza/contatto (b).

Le immagini (a e b), ottenute con un microscopio confocale, mostrano la Connexina 43 (Cx43) in verde e il nucleo con DAPI (blu).

Come si può osservare la Cx43 risulta essere localizzata principalmente sulla superficie della cellula (Figura 20a) e, notevolmente concentrata in prossimità dei contatti con le cellule adiacenti (Figura 20b).

Questo risultato conferma quanto precedentemente ottenuto in Figura 17b relativo all'incremento dell'espressione della Cx43 all'aumentare della confluenza come potenziale conferma che la Cx43 possa essere parte integrante delle comunicazioni di tipo *NT-nanotubes* tra cellule adiacenti (Figura 18).

5. CONCLUSIONE E PROSPETTIVE FUTURE

Nell'ambito della PMA molte sono le domande ancora senza risposta per quanto riguarda l'infertilità o sub-fertilità femminile di pazienti in cerca di una gravidanza. Il nostro studio si è occupato di due gruppi di pazienti: "Controllo" ed "Endometriosi".

Le cellule della granulosa (GCs), ottenute dai fluidi follicolari in seguito al prelievo ovocitario o *pick up*, sono cellule con una limitata aspettativa di vita.

Partendo da questo presupposto, per poterne studiare le caratteristiche, l'obiettivo iniziale del nostro studio è stato quello di poterne prolungare la sopravvivenza in coltura, mantenendone le caratteristiche di cellule della granulosa.

I dati che abbiamo ottenuto sono:

- I comuni fattori di crescita, presenti in FBS (*fetal bovine serum*), non si sono rivelati sufficienti a mantenere le GCs in vitro
- FSH, ormone fondamentale per la formazione e la crescita del follicolo ovarico costituito dalle GCs, si è rivelato inefficace per la sopravvivenza
- Solo la presenza di fluido follicolare, purché in definitiva percentuale, garantisce l'accrescimento, lo sviluppo e la proliferazione delle GCs.

L'obiettivo secondario è stato quello di evidenziare la capacità o meno di differenziamento tra le GCs di pazienti del gruppo "Controllo" rispetto a quelle del gruppo "Endometriosi".

- Per quanto riguarda il differenziamento morfologico, non si sono osservate differenze significative tra le cellule provenienti dai due gruppi
- Differenze sono invece comparse in funzione del fluido follicolare utilizzato, con una maggior potenzialità dimostrata FFENDO rispetto a FFC nel differenziare le GCs verso una morfologia di tipo *fibroblast like cells* e *chondroblast like cells*

L'obiettivo finale è stato quello di capire se ci fosse una specifica proteina, potenzialmente interessata nella diversa differenziazione indotta da FFENDO rispetto a FFC.

- FSHR (recettore di FSH) si è dimostrato essere onnipresente in tutte le GCs, a conferma del mantenimento delle caratteristiche di cellule della granulosa, a prescindere dal gruppo di appartenenza delle cellule e dal tipo di trattamento a cui sono state sottoposte.
- La proteina Cx43 è stata dimostrata essere molto più espressa nelle GCs trattate con FFENDO rispetto a quelle trattate con FFC, indipendentemente dal gruppo di appartenenza.
- L'espressione di Cx43 è risultata essere direttamente dipendente dalla confluenza delle cellule, con una localizzazione sulla membrana in concomitanza dei punti di contatto con le cellule adiacenti.

La proteina Cx43, parte integrante delle comunicazioni di tipo *NT-nanotubes* tra cellule adiacenti, potrebbe svolgere un ruolo determinante nella diversa

differenziazione indotta da FFENDO, favorendo un più ampio scambio di informazioni sottoforma di proteina, mRNA, miRNAs, fattori di crescita, etc. L'ipotesi che sorge dai dati sopra riportati è che in FFENDO possa esser presente un componente non correlato direttamente al processo di crescita e sviluppo del follicolo (FSH), ma determinato da altri fattori associati allo stato fisiologico generale della paziente e, nel caso specifico dell'endometriosi, legati allo stato ossidativo sistemico dovuto alla patologia. che, confluendo nel fluido follicolare, potrebbero essere responsabili della sua presenza.

Ulteriori studi saranno necessari per confermare queste ipotesi portando nuove evidenze che aiuteranno nei processi di PMA.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Healy, D.L.; Trounson, A.O.; Andersen, A.N. Female Infertility: Causes and Treatment. *The Lancet* **1994**, *343*, 1539–1544, doi:10.1016/S0140-6736(94)92941-6.
2. Dompe, C.; Kulus, M.; Stefańska, K.; Kranc, W.; Chermuła, B.; Bryl, R.; Pieńkowski, W.; Nawrocki, M.J.; Petite, J.N.; Stelmach, B.; et al. Human Granulosa Cells—Stemness Properties, Molecular Cross-Talk and Follicular Angiogenesis. *Cells* **2021**, *10*, 1396, doi:10.3390/cells10061396.
3. Erickson, G.F. Follicle Growth and Development. *Glob. Libr. Womens Med.* **2009**, doi:10.3843/GLOWM.10289.
4. Rodgers, R.J.; Irving-Rodgers, H.F. Formation of the Ovarian Follicular Antrum and Follicular Fluid. *Biol. Reprod.* **2010**, *82*, 1021–1029, doi:10.1095/biolreprod.109.082941.
5. Bruckova, L.; Soukup, T.; Visek, B.; Moos, J.; Moosova, M.; Pavelkova, J.; Rezabek, K.; Kucerova, L.; Micuda, S.; Brackova, E.; et al. Proliferative Potential and Phenotypic Analysis of Long-Term Cultivated Human Granulosa Cells Initiated by Addition of Follicular Fluid. *J. Assist. Reprod. Genet.* **2011**, *28*, 939–950, doi:10.1007/s10815-011-9617-6.
6. Jeppesen, J.V.; Kristensen, S.G.; Nielsen, M.E.; Humaidan, P.; Dal Canto, M.; Fadini, R.; Schmidt, K.T.; Ernst, E.; Yding Andersen, C. LH-Receptor Gene Expression in Human Granulosa and Cumulus Cells from Antral and Preovulatory Follicles. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2012**, *97*, E1524–E1531, doi:10.1210/jc.2012-1427.
7. Best, M.W.; Wu, J.; Pauli, S.A.; Kane, M.A.; Pierzchalski, K.; Session, D.R.; Woods, D.C.; Shang, W.; Taylor, R.N.; Sidell, N. A Role for Retinoids in Human Oocyte Fertilization: Regulation of Connexin 43 by Retinoic Acid in Cumulus Granulosa Cells. *MHR Basic Sci. Reprod. Med.* **2015**, *21*, 527–534, doi:10.1093/molehr/gav017.
8. Sidell, N.; Rajakumar, A. Retinoic Acid Action in Cumulus Cells: Implications for Oocyte Development and In Vitro Fertilization. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 1709, doi:10.3390/ijms25031709.
9. Shafir, A.L.; Farland, L.V.; Shah, D.K.; Harris, H.R.; Kvaskoff, M.; Zondervan, K.; Missmer, S.A. Risk for and Consequences of Endometriosis: A Critical Epidemiologic Review. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* **2018**, *51*, 1–15, doi:10.1016/j.bpobgyn.2018.06.001.
10. Burney, R.O.; Giudice, L.C. Pathogenesis and Pathophysiology of Endometriosis. *Fertil. Steril.* **2012**, *98*, 511–519, doi:10.1016/j.fertnstert.2012.06.029.
11. Lee, S.-Y.; Koo, Y.-J.; Lee, D.-H. Classification of Endometriosis. *Yeungnam Univ. J. Med.* **2021**, *38*, 10–18, doi:10.12701/yujm.2020.00444.
12. Tanbo, T.; Fedorcsak, P. Endometriosis-associated Infertility: Aspects of Pathophysiological Mechanisms and Treatment Options. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* **2017**, *96*, 659–667, doi:10.1111/aogs.13082.
13. Graham, M.E.; Jelin, A.; Hoon, A.H.; Wilms Floet, A.M.; Levey, E.; Graham, E.M. Assisted Reproductive Technology: Short- and Long-term Outcomes. *Dev. Med. Child Neurol.* **2023**, *65*, 38–49, doi:10.1111/dmcn.15332.
14. Ministero Della Salute Procreazione Medicalmente Assistita. **2024**.

15. Istituto Superiore di Sanità Tecniche Di Procreazione Medicalmente Assistita. **2023**.
16. Sreerangaraja Urs, D.B.; Wu, W.-H.; Komrskova, K.; Postlerova, P.; Lin, Y.-F.; Tzeng, C.-R.; Kao, S.-H. Mitochondrial Function in Modulating Human Granulosa Cell Steroidogenesis and Female Fertility. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 3592, doi:10.3390/ijms21103592.
17. Regan, S.L.P.; Knight, P.G.; Yovich, J.L.; Leung, Y.; Arfuso, F.; Dharmarajan, A. Granulosa Cell Apoptosis in the Ovarian Follicle—A Changing View. *Front. Endocrinol.* **2018**, *9*, 61, doi:10.3389/fendo.2018.00061.
18. Kuypers, F.; Lewis, R.; Hua, M.; Schott, M.; Discher, D.; Ernst, J.; Lubin, B. Detection of Altered Membrane Phospholipid Asymmetry in Subpopulations of Human Red Blood Cells Using Fluorescently Labeled Annexin V. *Blood* **1996**, *87*, 1179–1187, doi:10.1182/blood.V87.3.1179.bloodjournal8731179.
19. Rybska, M.; Knap, S.; Jankowski, M.; Jeseta, M.; Bukowska, D.; Antosik, P.; Nowicki, M.; Zabel, M.; Kempisty, B.; Jaśkowski, J.M. Characteristic of Factors Influencing the Proper Course of Folliculogenesis in Mammals. *Med. J. Cell Biol.* **2018**, *6*, 33–38, doi:10.2478/acb-2018-0006.
20. Kałużna, S.; Bryl, R.; Chermuła, B.; Sibiak, R.; Stefańska, K.; Pieńkowski, W.; Kranc, W.; Jeseta, M.; Ventruba, P.; Zakova, J.; et al. Expression of Genes Involved in the Inflammatory Response in Human Granulosa Cells in Short-Term in Vitro Culture. *Med. J. Cell Biol.* **2020**, *8*, 190–195, doi:10.2478/acb-2020-0025.
21. Heng, D.; Wang, Q.; Ma, X.; Tian, Y.; Xu, K.; Weng, X.; Hu, X.; Liu, W.; Zhang, C. Role of OCT4 in the Regulation of FSH-Induced Granulosa Cells Growth in Female Mice. *Front. Endocrinol.* **2020**, *10*, 915, doi:10.3389/fendo.2019.00915.
22. Szymańska, K.; Kałafut, J.; Przybyszewska, A.; Paziewska, B.; Adamczuk, G.; Kielbus, M.; Rivero-Müller, A. FSHR Trans-Activation and Oligomerization. *Front. Endocrinol.* **2018**, *9*, 760, doi:10.3389/fendo.2018.00760.
23. Chen, Y.-C.; Chang, H.-M.; Cheng, J.-C.; Tsai, H.-D.; Wu, C.-H.; Leung, P.C.K. Transforming Growth Factor-B1 up-Regulates Connexin43 Expression in Human Granulosa Cells. *Hum. Reprod.* **2015**, *30*, 2190–2201, doi:10.1093/humrep/dev175.
24. Clarke, H.J. Transzonal Projections: Essential Structures Mediating Intercellular Communication in the Mammalian Ovarian Follicle. *Mol. Reprod. Dev.* **2022**, *89*, 509–525, doi:10.1002/mrd.23645.