



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI TERAMO

**P.O.R. ABRUZZO – OBIETTIVO 3 PER IL 2000/2006**  
**PROTOCOLLO DI INTESA TRA REGIONE ABRUZZO,**  
**COMITATO DI COORDINAMENTO REGIONALE DELLE UNIVERSITÀ ABRUZZESI**  
**E**  
**UFFICIO SCOLASTICO REGIONALE**  
**PER L'ATTUAZIONE DEL MACROPROGETTO**  
**INNOVAZIONE, COMPETITIVITÀ, GOVERNANCE**  
**(PROGETTO REGIONALE FORMAZIONE TECNICO SCIENTIFICA**  
**E**  
**PROGETTO IN\_CO: AZIONI INTEGRATE PER LO SVILUPPO DI**  
**“INTERMEDIARI DELLA CONOSCENZA TECNOLOGICA, ORGANIZZATIVA E GESTIONALE”)**  
**“ASSEGNI REGIONALI PER ATTIVITÀ DI RICERCA E ALTA FORMAZIONE “ IN MATERIE TECNICO**  
**SCIENTIFICHE, INTERVENTO IC4E – sotto - UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TERAMO-**

Relazione Attività periodo Gennaio- Giugno 2007

**ASSEGNISTA DI RICERCA:**

Rinaldi Carlo

**Tutor/ Responsabile Scientifico:**

Prof.ssa Barbara Barboni

**Nome istituzione a cui afferisce laboratorio ospitante:**

**Nome e qualifica del responsabile del laboratorio ospitante:**

Paolo Berardinelli

**Durata soggiorno laboratorio ospitante:**

Annuale

Considerando la notevole entità dei processi di rimodellamento strutturale e vascolare a cui va incontro il follicolo ovarico dal suo reclutamento sino all'ovulazione, il presente progetto è stato realizzato al fine di studiare in modo cinetico il processo di organizzazione vascolare nelle fasi di maturazione e di stabilizzazione del letto vasale follicolare.

In questa prima fase della ricerca, abbiamo condotto primariamente un'analisi morfologica dell'architettura vascolare follicolare, riferita puntualmente ai diversi quadri endocrini noti, indotti sperimentalmente su scrofette prepuberi sincronizzate. L'osservazione morfologica delle strutture follicolari è stata messa in correlazione ai quadri di proliferazione cellulare riscontrati, indici di accrescimento e rimodellamento di tali strutture e delle reti vascolari.

Nella seconda fase della ricerca si andrà successivamente a valutare la tipologia dei vasi follicolari nei diversi momenti, ed inoltre si procederà all'osservazione al microscopio elettronico a scansione (SEM) dei preparati già ottenuti in questa prima fase con la tecnica del "vascular corrosion casting" (VCC).

## MATERIALI E METODI

Il modello sperimentale della presente ricerca è la specie suina, sia per il lungo intervallo periovulatorio (40-44h dal picco dell'LH all'ovulazione, simile alla specie umana), sia per la facilità con cui la ciclicità follicolare può essere riprodotta mediante validati trattamenti ormonali (Barboni et al.2000).

In particolare, sono state utilizzate 6 scrofette Large White del peso medio di circa 90Kg, suddivise in tre gruppi di animali. A tutte le scrofette sono stati somministrati 1250UI di eCG (equine chorionic gonadotropin; Folligon, Intervet, Holland), sostanza ad effetto FSH-simile, per indurre lo sviluppo follicolare, e successivamente dopo 60h a 4 animali sono stati somministrati 750UI di hCG (human chorionic gonadotropin; Corulon, Intervet, Holland), sostanza ad effetto LH-simile, per simulare il picco fisiologico di LH e far entrare i follicoli preovulatori nella fase periovulatoria.

Le ovariectomie sono state effettuate a 60 ore eCG (2 animali), 18h hCG (2 animali), 36h hCG (2 animali).

Subito dopo l'asportazione, un ovaio di ciascun animale è stato fissato in paraformaldeide al 4% in PBS per 12 ore a 4°C, quindi deidratato in etanolo ed incluso in paraffina per i successivi studi istologici ed immunoistochimici. L'ovaio controlaterale di ogni animale è stato trasportato in laboratorio in soluzione fisiologica eparinizzata a temperatura di 37°C e perfuso con resina Mercox secondo protocolli validati (Macchiarelli 2000, Jiang et al.,2003); si è così ottenuto un "corrosion cast" di ciascun ovaio, che è stato quindi processato per l'osservazione al SEM.

La nostra ricerca si è focalizzata sull'analisi morfologica e strutturale dei follicoli preovulatori (60ore eCG) e dei follicoli periovulatori nella prima fase (ovaio 18h hCG) e nella seconda fase più prossima all'ovulazione (36h hCG).

In particolare, sezioni istologiche di ovaio tagliate a 5µm su vetrini polilisinati sono state utilizzate per analisi morfologiche e morfometriche, realizzate eseguendo:

1) osservazione diretta delle strutture follicolari dopo colorazione con ematossilina-eosina, per individuare i follicoli che hanno risposto positivamente ai trattamenti (preovulatori a 60h eCG, periovulatori a 18h e 36h hCG);

2) reazioni di immunistochemica per il fattore di von Willebrand (FvW), proteina che rappresenta un marker specifico per le cellule endoteliali dei vasi e che ci ha consentito di effettuare la misurazione dell' "area vascolare" (VA). Per l'analisi quantitativa dei dati, le immagini sono state acquisite con un sistema di analisi di immagini collegato a fotocamera e quindi processate utilizzando il sistema Ks300 (Zeiss, Oberkochen, Germany);

3) doppie reazioni di immunistochemica per il il fattore di von Willebrand (FvW) e per il Ki-67, proteina a localizzazione nucleare presente in cellule in fase di attiva proliferazione; questo ci ha permesso di mettere in evidenza contemporaneamente le reti vascolari perifollicolari e le cellule proliferanti, consentendoci di osservare se tali processi di mitosi avvengono a carico delle cellule endoteliali dei vasi, indice questo di processi attivi di angiogenesi in corso.

L' osservazione delle reazioni di immunofluorescenza è stata effettuata avvalendosi di un microscopio ad epifluorescenza Axioscop 2plus (Zeiss, Oberkochen, Germany) dotato di un sistema di acquisizione di immagini a triplo canale (CCD; Axiovision Cam, Zeiss), collegato ad un computer con software di analisi di immagini Axiovision, Zeiss.

## **RISULTATI**

*Nei follicoli preovulatori, a 60 ore dall'eCG*, l'osservazione morfologica dopo immunomarcatura con FvW ha messo in evidenza intorno alle strutture follicolari la presenza di due reti vasali concentriche: la rete vasale più interna si trova nella teca interna, a ridosso della membrana basale, mentre la rete vasale esterna è localizzata nella teca esterna. Le due reti sono interconnesse tra loro da ponti anastomotici.

Oltre alla valutazione dell'architettura vasale, è stata inoltre misurata l'area vascolare (VA). Nei follicoli preovulatori a 60 ore dall'eCG, l'area vascolare totale risulta essere pari a  $6746,17 \pm 1339,72$  VA/area di campo analizzato ("a"). Il contributo maggiore all'area totale è quello relativo alla teca esterna, che presenta da sola una VA pari a  $3863,71 \pm 799,56$  VA/a.

La proliferazione cellulare osservata con l'immunopositività all'antigene nucleare Ki67 ha rivelato la presenza di un abbondante numero di cellule attivamente proliferanti sia in granulosa sia in teca; in particolare, nel comparto tecale, si osservano cellule fusiformi Ki67-positive in stretta associazione ai vasi della rete esterna e in numero ancora maggiore a ridosso della rete vascolare interna. Tali cellule esprimono la presenza di attivi fenomeni mitotici a carico delle cellule endoteliali dei vasi follicolari, indice di attiva angiogenesi.

***Nei follicoli periovulatori, nella prima fase a 18 ore dalla somministrazione di hCG***, si è osservata ancora la presenza della doppia rete vasale, con un parziale mantenimento della rete interna ed un calo imponente della rete esterna, che in alcuni punti tende quasi a scomparire. Questo si riflette in una considerevole variazione nel valore dell'area vascolare totale, che infatti si è ridotta a valori di  $3822,13 \pm 828,74$  VA/a (rispetto ai  $6746,17 \pm 1339,72$  VA/a precedenti). In particolare, però, si è potuto osservare soprattutto una drastica riduzione della rete vasale esterna ( $1068,96 \pm 175,64$  rispetto a  $3863,71 \pm 799,56$  VA/a. nei preovulatori).

In questa prima fase della fase periovulatoria, i fenomeni angiogenetici sembrano arrestarsi, così come sembra dimostrato dalla quasi scomparsa di cellule Ki-67 positive sia in teca interna sia in teca esterna.

***Nei follicoli periovulatori, a 36 ore dall'hCG e quindi più vicini all'ovulazione***, si osserva sempre la doppia rete vasale, ma il dato più significativo è un completo rimodellamento della struttura follicolare, con la comparsa di pieghe delle teca interna rivolte verso l'antro follicolare; queste formazioni sono del tutto caratteristiche della tarda fase periovulatoria e, comparando soltanto in prossimità dell'ovulazione, sembra possano avere un ruolo importante nella prime fasi di formazione del corpo luteo. La comparsa di grossi vasi nello spessore delle pieghe tecali indica parallelamente anche la presenza di importanti fenomeni di rimodellamento vascolare, anch'essi funzionalmente importanti per le successive fasi postovulatorie, che saranno oggetto di ulteriore studio nella fase successiva della nostra ricerca.

La valutazione dell'area vascolare totale in questi follicoli, indica un suo aumento fino a valori di  $8623,70 \pm 2983,01$  VA/a , maggiori quindi anche rispetto ai  $6746,17 \pm 1339,72$  VA/a dei follicoli preovulatori. Anche in questa fase, però, l'area relativa alla rete interna mantiene valori simili a quelli delle altre fasi, mentre l'aumento è soprattutto a carico della rete vasale esterna ( $5764,44 \pm 1001,64$  VA/a), che rappresenta quindi il 60% dell'area vascolare totale.

Nei follicoli periovulatori a 36 ore dall'hCG, quindi in prossimità dell'ovulazione, si è osservata nuovamente la presenza di cellule endoteliali in proliferazione, in particolare a livello della rete vasale interna. Allo stesso tempo, un alto grado di proliferazione è stato notato anche in granulosa ed in corrispondenza delle pieghe della teca rivolte verso l'antro.

## **DISCUSSIONE**

Questi dati, confermando anche studi precedenti (Berardinelli et al.,2001, Martelli et al.,2006), mettono in evidenza come al termine dell'accrescimento follicolare in follicoli preovulatori (60 ore eCG) l'ampio sviluppo delle reti vascolari perifollicolari è correlato ad attivi processi di angiogenesi. Successivamente, il segnale indotto dall' LH porta ad una fase periovulatoria in cui, in un primo momento (18h hCG), si assiste ad una stabilizzazione delle reti vascolari con un drastico calo dei fenomeni angiogenetici, ed in seguito in una finestra più vicina all'ovulazione (36-40 ore hCG) i fenomeni di angiogenesi riprendono in modo rapido ed intenso, per seguire quei fenomeni di importante rimodellamento strutturale e vascolare coinvolti nell'ovulazione e nella formazione del corpo luteo.

Nella seconda parte della ricerca, con l'osservazione al SEM dei corrosion casts si potranno evidenziare in modo tridimensionale lo sviluppo e le modificazioni delle reti vasali nei diversi quadri endocrini considerati (60h eCG, 18h hCG, 36h hCG). Inoltre, si focalizzerà l'attenzione sui processi di rimodellamento vascolare presenti della tarda fase periovulatoria.

Il dottorando  
**Carlo Rinaldi**

Il Coordinatore del Dottorato  
**Prof.ssa Barbara Barboni**