



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 UNIVERSITA' 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-

ASSEGNISTA DI RICERCA:

Carlo Rinaldi

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

RIMODELLAMENTO VASCOLARE NEI FOLLICOLI OVARICI DI SUINO

INTRODUZIONE

L'apparato riproduttore femminile rappresenta un'ottimo modello di studio dell'angiogenesi poiché contiene organi, come l'ovaio, che vanno incontro ciclicamente a fasi di accrescimento e di regressione, sempre accompagnate da rapidi ed imponenti adattamenti dell'architettura vascolare (Fraser et al.2001).

L'angiogenesi è modulata dall'attivazione locale di geni codificanti fattori angiogenetici, capaci primariamente di stimolare l'attività mitotica e migratoria delle cellule endoteliali; secondariamente di condizionare i processi di trasformazione delle matrici extracellulari e delle stesse pareti vasali, durante le fasi di maturazione dei vasi neoformati (Distler et al.2000, Jain et al.2003).

Nelle fasi iniziali dei processi angiogenetici le cellule endoteliali dei vasi preesistenti proliferano e si organizzano in cordoni vascolari. Successivamente alla formazione del lume del nuovo vaso, avviene una stabilizzazione grazie al reclutamento di cellule perivascolari (Betsholtz et al.2006).

Tra i fattori angiogenetici ovarici, il vascular endothelial growth factor (VEGF) riveste un ruolo preponderante (Reynolds et al.1998, Wulff et al.2001, Shimizu et al.2003).

Come recenti studi hanno evidenziato, nell'ovaio, durante la follicologenesi, le strutture follicolari dominanti capaci di raggiungere lo stadio di accrescimento finale preovulatorio siano quelle che hanno sviluppato non solo una maggiore recettorialità per le gonadotropine ma anche un maggior letto capillare, indice di un adeguato apporto trofico. In particolare, nel modello suino, è stata evidenziata una relazione funzionale tra le gonadotropine (FSH in fase preovulatoria e LH in fase periovulatoria) e l'espressione del VEGF nelle strutture follicolari (Barboni et al.2000; Mattioli et al.2001). Inoltre, è stata dimostrata una correlazione tra l'espressione di fattore angiogenetico, l'estensione delle reti vasali e l'attività steroidogenetica follicolare (Berardinelli et al.2000).

OBIETTIVI

Considerando la notevole entità dei processi di rimodellamento strutturale e vascolare a cui va incontro il follicolo ovarico, il presente progetto è realizzato al fine di studiare in modo cinetico il processo di organizzazione vascolare nelle fasi di maturazione e di stabilizzazione del letto vasale follicolare. L'analisi morfologica dell'architettura e della tipologia vasale sarà effettuata mediante la metodica del "vascular corrosion casting" (VCC) (Macchiarelli et al.2000, Jiang et al.2002) associata all'osservazione al microscopio elettronico a scansione (SEM), parallelamente a metodiche di immunistochemica (IHC).

DESCRIZIONE DELLA RICERCA

Il modello sperimentale della presente ricerca sarà 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). Le ovariectomie saranno effettuate a 60 ore eCG, 18h hCG, 36h hCG.

In ogni animale un ovaio sarà processato per il VCC e quindi osservato al SEM (Leo1530), mentre l'ovaio controlaterale sarà processato per la microscopia ottica. Le analisi morfologiche e morfometriche condotte su sezioni istologiche saranno realizzate mediante metodiche di IHC rivolte contro marker endoteliali (fattore di vonWillebrand), marker di proliferazione cellulare (Ki-67) e marker dell'actina delle cellule muscolari lisce (α SMA). Tali metodiche saranno utili al fine di identificare la rete vasale ed eventuali fenomeni di angiogenesi attiva a suo carico, per tipizzare i vasi e valutarne il grado di maturazione. L'osservazione delle reazioni di IHC sarà effettuata avvalendosi di un microscopio ad epifluorescenza Axioscop2plus Zeiss, dotato di un sistema di acquisizione di immagini a triplo canale (AxiovisionCam, Zeiss), collegato ad un computer con software di analisi di immagini (Axiovision, Zeiss). Sarà inoltre utilizzato il microscopio confocale Radiance2000 (MCF).

Con la tecnica del VCC associata all'osservazione al SEM si potranno evidenziare in modo tridimensionale lo sviluppo e le modificazioni della rete vasale nei diversi momenti di accrescimento follicolare con particolare attenzione alle figure angiogenetiche (quali gemmazione, sprouting, intussuscezione), alla tipizzazione vascolare e ad eventuali sfinteri vascolari. Infine, le analisi quantitative delle reti vascolari esaminate saranno effettuate mediante un analizzatore semiautomatico (Analysis, Soft Imaging System) collegato al SEM.

RISULTATI ATTESI

Con il presente progetto ci si propone di:

1. descrivere in modo cinetico i rimodellanti vascolari a carico del follicolo di suino nelle fasi pre- e periovulatorie sia in modo bidimensionale (MO,IHC,MCF) sia in modo tridimensionale (VCC,SEM);
2. definire i precisi momenti di attiva angiogenesi;
3. tipizzare i vasi follicolari neoformati così da definire il grado di maturità delle strutture neoformate.

BIBLIOGRAFIA

- Barboni B, Turriani M, Galeati G, Spinaci M, Bacci ML, Forni M, Mattioli M. Vascular endothelial growth factor production in growing pig antral follicles. *Biol Reprod.* 2000 Sep;63(3):858-64.
- Berardinelli P, Martelli A, Russo V, Nardinocchi D, Turriani M, Barboni B, Mattioli M, Scapolo PA, Clavenzani P. Correlation between VEGF production and blood vessel density in steroidogenic activated pig antral follicles. *It. J Anat. Embryol.* 2002 Sep;107(supplement2) n.3: 115-126.
- Betsholtz C, Armulik A. Homeostatic functions of vascular endothelial growth factor in adult microvasculature. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006 Feb;290(2):H509-11.
- Distler JH, Hirth A, Kurowska-Stolarska M, Gay RE, Gay S, Distler O. Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis. *Q J Nucl Med.* 2003 Sep;47(3):149-61. Review.
- Fraser HM, Wulff C. Angiogenesis in the primate ovary. *Reprod Fertil Dev.* 2001;13(7-8):557-66. Review.
- Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med.* 2003 Jun;9(6):685-93. Review.
- Jiang JY, Macchiarelli G, Miyabayashi K, Sato E. Follicular microvasculature in the porcine ovary. *Cell Tissue Res.* 2002 Oct;310(1):93-101. Epub 2002 Aug 10.
- Macchiarelli, The microvasculature of the ovary: a review by SEM of vascular corrosion casts, *J Reprod Dev* 2000; 46:207-225.
- Mattioli M, Barboni B, Turriani M, Galeati G, Zannoni A, Castellani G, Berardinelli P, Scapolo PA. Follicle activation involves vascular endothelial growth factor production and increased blood vessel extension. *Biol Reprod.* 2001 Oct;65(4):1014-9.
- Reynolds LP, Redmer DA. Expression of the angiogenic factors, basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor, in the ovary. *J Anim Sci.* 1998 Jun;76(6):1671-81. Review.

- Shimizu T, Kawahara M, Abe Y, Yokoo M, Sasada H, Sato E. Follicular microvasculature and angiogenic factors in the ovaries of domestic animals. *J Reprod Dev.* 2003 Jun;49(3):181-92. Review.
- Wulff C, Wiegand SJ, Saunders PT, Scobie GA, Fraser HM. Angiogenesis during follicular development in the primate and its inhibition by treatment with truncated Flt-1-Fc (vascular endothelial growth factor Trap(A40)). *Endocrinology.* 2001 Jul;142(7):3244-54.