



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE
CORSO DI LAUREA MAGISTRALE
BIOLOGIA MOLECOLARE E APPLICATA

Cambiamento dell'espressione dei mi-RNA nelle cellule del cumulo,
stimolate con diversi trattamenti ormonali: effetti sull'oogenesi

Changings of mi-RNA expression in cumulus cells induced by different
ovarie stimulation protocols: effects on oogenesis

Tesi di Laurea Magistrale di:

Annalisa Geraci

Relatore:

PROF.SSA OLIANA CARNEVALI

Correlatore:

DOTT.SSA VALENTINA NOTARSTEFANO

ANNO ACCADEMICO 2018-2019

*Ai miei genitori a cui devo tutto e a me stessa
per non aver smesso mai di crederci...*

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare la mia Relatrice, la Prof.ssa Oliana Carnevali, per aver dato vita a questo lavoro straordinario, per la sua disponibilità e professionalità.

Un grazie va al Dott. Cignitti e al suo gruppo di Medicina della riproduzione e tecniche di fecondazione assistita dell'Ospedale Salesi, di Ancona.

In particolar modo vorrei ringraziare la mia Correlatrice, la Dott.ssa Valentina Notarstefano, per essermi stata accanto in ogni istante, per avermi supportato e incoraggiato sempre!

Ai miei genitori, a mia sorella, al mio ragazzo e ai miei amici, vicini e lontani, che mi hanno sostenuta ogni giorno.

A chi non è più qui con me, ma lo è costantemente nei miei pensieri!

SOMMARIO

1. INTRODUZIONE.....	1
1.1 FOLLICOLOGENESI	4
1.2 REGOLAZIONE ORMONALE	9
1.3 LE CELLULE DEL CUMULO OOFORO.....	12
1.4 STIMOLAZIONE ORMONALE IN ART	14
1.5 RUOLO DEI miRNA NELLA FUNZIONALITA' OVARICA.....	17
1.5.1 BIOGENESI DEI miRNA	19
1.5.2 miRNA PROFILING NELLE CELLULE FOLLICOLARI	21
2. SCOPO DELLA TESI	27
3. MATERIALI E METODI.....	29
3.1 DESCRIZIONE DELLE PAZIENTI IN ESAME	29
3.1.1 CRITERI DI INCLUSIONE	29
3.1.2 GRUPPI SPERIMENTALI	29
3.1.3 DOSAGGI ORMONALI	30
3.2 PICK-UK OVOCITARIO.....	30
3.3 RACCOLTA DELLE CELLULE DEL CUMULO OOFORO.....	31
3.3.1 ISOLAMENTO DELLE CELLULE DEL CUMULO OOFORO	31
3.4 ANALISI TRASCRIZIONALE.....	32
3.4.1 ESTRAZIONE RNA TOTALE	32
3.4.2 VALUTAZIONE DELL'RNA	34
3.4.3 POLIADENILAZIONE DEI miRNA E SINTESI DEL cDNA	34
3.4.4 REAL TIME PCR	36
3.4.5 ANALISI STATISTICA	40
4. RISULTATI	42
5. DISCUSSIONE.....	48
6. CONCLUSIONI.....	55

1. INTRODUZIONE

L'intenso e rapido sviluppo delle tecniche di diagnosi citogenetica e molecolare nello studio del genoma umano ha permesso di accumulare informazioni sulle anomalie che inducono disordini della funzione riproduttiva femminile, nonché infertilità. Con questo termine si intende l'assenza di concepimento dopo 12/24 mesi di rapporti mirati non protetti, definita come vera e propria patologia dall'OMS (*Organizzazione Mondiale della Sanità*).⁽¹⁾ Si stima che l'infertilità colpisca 186 milioni di persone in tutto il mondo e, di conseguenza, rappresenta un importante problema sociale, medico ed economico.⁽²⁾

Tuttavia, negli ultimi 35 anni, i tassi di successo di gravidanza sono migliorati notevolmente grazie alle tecniche di fecondazione in vitro (IVF).⁽³⁾ Alla stregua di tutte le patologie, anche per l'infertilità, scoprire un fattore che contribuisce e caratterizzarne l'eziologia è un'impresa ardua, perché l'effetto di ogni singolo fattore può essere oscurato e confuso dai molti altri coinvolti.⁽⁴⁾

La fertilità femminile, infatti, è un processo dinamico, ben coordinato ma molto complesso, che coinvolge la corretta funzione di numerosi tessuti e organi, tra cui ipotalamo, ipofisi, ovaie e tratto riproduttivo, dando origine nell'insieme a gameti fecondabili (ovociti) e fornendo un supporto per lo sviluppo embrionale.⁽⁵⁾

Ogni ovocita sviluppa e matura nell'unità funzionale dell'ovario, il follicolo, circondato e supportato da cellule della granulosa e cellule della teca, che nell'insieme rappresentano la "nicchia" per la crescita e la maturazione dell'ovocita.⁽⁶⁾

Lo sviluppo del follicolo e la maturazione degli ovociti sono strettamente associati: la proliferazione e la differenziazione delle cellule somatiche follicolari avvengono in sincronia

con la maturazione dell'ovocita, e l'intero processo è mediato da un costante scambio di segnali tra le cellule somatiche e la cellula germinale.⁽⁷⁾ Tale comunicazione, denominata *cross-talk*, si verifica attraverso giunzioni gap, stabilite tra ovociti e cellule del cumulo (CCs).

L'eventuale interruzione di tali interazioni può influire sulla qualità dell'ovocita e, di conseguenza, sullo sviluppo di una ipotetica gravidanza. L'analisi dell'espressione genica, mediante l'utilizzo di tecniche come microarray, array-CGH (Array-Comparative Genomic Hybridization, è una tecnica che si basa sulla comparazione quantitativa del DNA in esame e del reference DNA proveniente da un soggetto sano, utilizzata per identificare eventuali anomalie) ecc., ha fornito un'approfondita conoscenza sia degli ovociti che delle CCs, anche se ad oggi vi sono ancora diversi punti interrogativi sulla regolazione post-trascrizionale.

Ciò riveste una particolare importanza perché la stabilità e traduzione degli mRNA materni, che vengono accumulati durante la maturazione degli ovociti e che guidano lo sviluppo preimpianto, sono controllati proprio da meccanismi regolatori post-trascrizionali.⁽⁸⁾

Negli ultimi anni, particolare attenzione è stata rivolta a specifici RNA non codificanti (*ncRNA, non-coding RNA*), tra cui i miRNA, piccoli trascritti endogeni, lunghi 19-25 nucleotidi, coinvolti nella regolazione genica post-trascrizionale. Attraverso l'appaiamento di basi con specifici mRNA target, fungono da molecole guida nel silenziamento genico, che conduce alla degradazione del messaggero o alla repressione della traduzione. L'espressione dei miRNA è specifica per organo e strettamente correlata alla funzione di quest'ultimo.⁽⁹⁾

I miRNA rappresentano il più grande gruppo di ncRNA nell'ovario; infatti, ne sono stati identificati centinaia ed il loro ruolo è stato associato a diversi processi fisiologici cellulari, inclusi ciclo cellulare, crescita cellulare, proliferazione, differenziazione, angiogenesi e steroidogenesi, ma anche a processi patologici come apoptosi nonché sterilità.⁽¹⁰⁾

I ruoli biologici dei miRNA nell'ovario sono stati compresi e definiti mediante esperimenti di knock-out (delezione a livello genetico) di Dicer, la ribonucleasi III che svolge un ruolo critico nella sintesi di miRNA maturi e funzionali, in cellule embrionali staminali (ESCs) murine. Tale silenziamento, infatti, causa la disfunzione di follicologenesi, maturazione dell'ovocita e ovulazione, portando quindi a infertilità.⁽¹¹⁾

L'interesse è aumentato ancor di più dalla scoperta di esosomi, vescicole di origine cellulare in grado di trasportare diverse proteine e miRNA tra cellule diverse, svolgendo in tal modo un ulteriore ruolo nella comunicazione cellula-cellula.

Sebbene la riproduzione assistita si sia evoluta notevolmente negli ultimi decenni, alcune barriere devono ancora essere superate. Tuttavia, le nuove conoscenze e metodologie sui miRNA, potrebbero fornire nuovi biomarkers dell'infertilità femminile sotto diversi aspetti: dalla fisiologia ovarica alla qualità dell'ovocita, compresa anche quella dell'embrione.

I miRNA rappresentano uno strumento importante e potenzialmente affidabile nella cura dell'infertilità. Tutto ciò porta a credere che una migliore comprensione della funzionalità dei miRNA ovarici, potrebbe portare ad una nuova "era" della salute riproduttiva femminile.⁽¹²⁾

1.1 FOLLICOLOGENESI

La follicologenesi rappresenta un processo fisiologico dai molteplici aspetti il cui obiettivo è la maturazione dei follicoli. Alla nascita, una donna possiede un ‘capitale follicolare’ (follicoli primordiali), che diminuisce nel corso della vita riproduttiva e termina col raggiungimento della menopausa. Ad ogni ciclo mestruale, solo un piccolo numero di follicoli primordiali, sotto stimolo dalle gonadotropine, entra nella fase di accrescimento e differenziazione; in assenza di stimolazione ormonale, i follicoli vanno incontro ad atresia scomparendo dall’ovaio.⁽¹³⁾

Lo sviluppo follicolare procede, infatti, attraverso stadi di reclutamento, selezione e dominanza. Il reclutamento è un processo attraverso il quale una coorte di follicoli primordiali adeguatamente stimolati inizia a maturare. Attraverso la selezione, uno o più follicoli “reclutati” vengono scelti e guidati da un adeguato contenuto di gonadotropine presenti nell’ambiente che li circonda, acquisiscono il potenziale ovulatorio. La dominanza è il meccanismo mediante il quale il follicolo dominante spinge i follicoli subordinati a regredire inibendo il reclutamento di una nuova coorte follicolare.

Dal punto di vista fisiologico ed in funzione dei meccanismi che la regolano, la fase follicolare si divide in due sotto fasi:

1. Fase Pre-Antrale
2. Fase Antrale

La **Fase Pre-Antrale** è gonadotropine-indipendente. Consiste nell’attivazione iniziale dei follicoli primordiali con successivo sviluppo a follicolo primario e secondario.

Follicolo primordiale

Un follicolo primordiale consiste in un ovocita di circa 40 μm di diametro, circondato da un singolo strato di cellule della granulosa squamose, all'esterno delle quali si trova una lamina basale.⁽¹⁴⁾ Una volta formati, alcuni di questi follicoli primordiali vengono selezionati per continuare la crescita.

Follicolo primario

Il passaggio da follicolo primordiale a primario è contraddistinto dalla differenziazione morfofunzionale delle sue cellule, che assumono forma cubica e proliferano attivamente disponendosi su strati sovrapposti. Le cellule della granulosa e l'oocita secernono grandi quantità di glicoproteine che costituiranno la *zona pellucida*, una barriera acellulare che isola entrambi dal supporto vascolare.⁽¹⁵⁾

La cooperazione metabolica tra le due strutture, viene garantita dalla formazione di prolungamenti citoplasmatici (giunzioni gap) che attraversano la zona pellucida in entrambe le direzioni, consentendo lo scambio di aminoacidi, glucosio, metaboliti e fattori di crescita sia fra le cellule stesse (cellule del cumulo e cellule della granulosa) sia con l'oocita.⁽¹⁶⁾ In questo stadio si verifica un altro evento importante, ovvero l'espressione di recettori di FSH nelle cellule della granulosa.⁽¹⁷⁾

Follicolo secondario

Il follicolo secondario è caratterizzato da un ovocita completamente maturo e circondato da una zona pellucida completa, da 2-8 strati di cellule della granulosa cuboidali o colonnari ed uno strato di cellule della teca disposte radialmente all'interno del follicolo.⁽¹⁸⁾

Verso la fine della fase Pre-Antrale si assiste alla comparsa, in entrambi gli strati parietali, dei recettori per le gonadotropine. Mentre tutte le fasi precedenti sono indipendenti dalla stimolazione ormonale, da questo momento in poi, le gonadotropine saranno indispensabili per l'acquisizione delle proprietà steroidogeniche e per la follicologenesi. (Fig.1)

Recentemente è stato osservato che l'ovocita stesso è in grado di promuovere lo sviluppo del follicolo primario grazie all'azione fondamentale del "growth and differentiation factor-9" (GDF-9), una molecola ovocita-specifica della famiglia dei TGF- β , fortemente espresso nell'ovario e localizzato solo negli ovociti dei follicoli reclutati. Nei topi con deficit di GDF-9, la crescita e lo sviluppo dei follicoli si arrestano allo stadio primario; di conseguenza non si formano follicoli dominanti e le femmine sono sterili.⁽¹⁹⁾⁽²⁰⁾

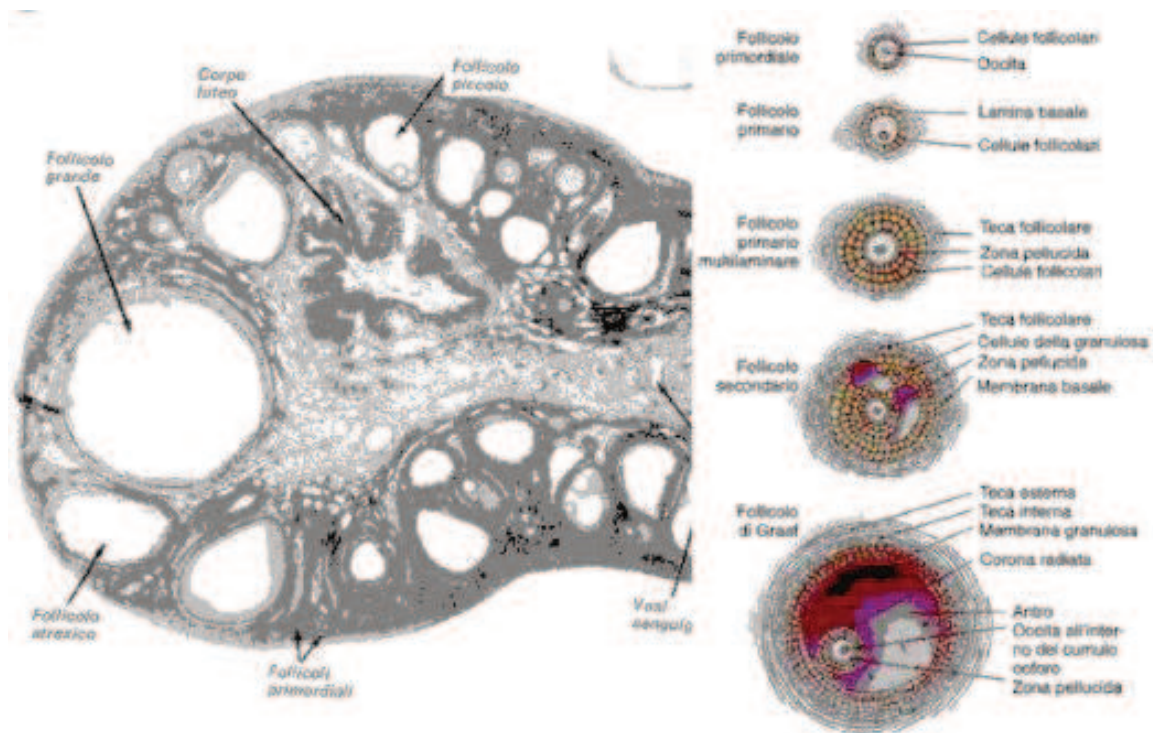


Figura 1 Follicologenesi. Sviluppo di un follicolo preantrale nei vari stadi della follicologenesi, dal reclutamento di un follicolo primordiale fino alla formazione dell'antro (Embriologia Umana M. de Felici)

La **Fase Antrale** è gonadotropino-dipendente e consiste nel reclutamento ciclico di un numero limitato di follicoli preantrali che vengono selezionati per le fasi successive dello sviluppo.

Follicolo Antrale o di Graaf

Uno dei processi chiave che caratterizza il passaggio dalla fase pre-antrale a quella antrale consiste nella formazione di una cavità, definita antro, in cui si ha un accumulo graduale di un fluido tra le cellule della granulosa.⁽²¹⁾

Questo processo prende il nome di Cavitazione o inizio della formazione dell'antro, durante il quale ha inizio la differenziazione delle cellule della teca, processo per cui una sottopopolazione di cellule che circondano il follicolo in crescita, diventa epiteliale ed acquisisce le caratteristiche ultrastrutturali e funzionali tipiche delle cellule attive secernenti steroidi; questo strato cellulare è chiamato teca interna. Nella zona periferica, invece, si trova uno strato di cellule fusiformi disposte concentricamente, che presentano caratteristiche delle cellule muscolari lisce e costituiscono la teca esterna. Quando il follicolo raggiunge approssimativamente i 400 µm di diametro, prende il nome di Follicolo Terziario o di Graaf. (Fig.1)

Il cambiamento strutturale associato alla formazione dell'antro corrisponde a precisi cambiamenti funzionali che trasformano il follicolo in una vera e propria ghiandola endocrina, incaricata di produrre quantità crescenti di ormoni.⁽²²⁾

La biosintesi locale di estrogeni innesca un meccanismo a cascata di autosensibilizzazione, basato sulla sintesi di ulteriori recettori per le gonadotropine nei rispettivi comparti parietali. In maniera sincrona allo sviluppo follicolare, la cellula uovo acquisisce la sua maturità funzionale.⁽²³⁾

In particolar modo, durante questa fase l'ovocita si dispone eccentricamente nel follicolo, circondato da cellule della granulosa ad esso strettamente associate: le cellule del cumulo ooforo. Al termine della fase antrale, gli elevati livelli di FSH e di estrogeni permettono l'attivazione dei recettori dell'LH nelle cellule della granulosa, inducendo in tal modo il follicolo a secernere il "nuovo" ormone e favorendo il passaggio alla fase successiva del ciclo ovarico.

La fase ovulatoria

Gli elevati livelli di estrogeni prodotti dal follicolo antrale stimolano il rilascio di elevate concentrazioni di gonadotropine, in particolar modo di LH. A livello follicolare, questo picco di LH induce modificazioni morfofunzionali, in particolare nelle ultime ore che precedono l'ovulazione, si assiste ad un rapido aumento del volume follicolare, le cellule della granulosa, del cumulo ooforo e della teca esterna modificano i loro rapporti di adesione cellulare, coadiuvando l'assottigliamento della parte follicolare, preludio alla successiva rottura ed espulsione dell'ovocita. ⁽²⁴⁾

La fase luteale

Poco dopo l'ovulazione, le pareti del follicolo ovarico e la teca collassano e si ripiegano. Sotto l'influenza dell'LH, si trasformano in una struttura ghiandolare, il corpo luteo, che secerne progesterone e una certa quantità di estrogeno, facendo sì che le ghiandole dell'endometrio secernino e preparino l'endometrio all'impianto della blastocisti. Se l'ovocita viene fecondato, il corpo luteo si accresce, forma il corpo luteo gravidico e aumenta la sua produzione di ormoni. Se l'ovocita non viene fecondato, il corpo luteo subisce un'invulazione e degenera da 10 a 12 giorni dopo l'ovulazione. Viene quindi chiamato

corpo luteo mestruale. Il corpo luteo viene in seguito trasformato in un tessuto cicatriziale chiamato corpo albicante. ⁽²⁵⁾

1.2 REGOLAZIONE ORMONALE

Il ciclo ovarico è il risultato di una serie di eventi correlati tra loro, che coinvolgono diversi organi funzionalmente uniti in un unico asse: ipotalamo-ipofisi-ovario. ⁽²⁶⁾ Mediante fattori di rilascio (releasing hormones, RH), prodotti e secreti da neuroni neuroendocrini, l'ipotalamo è in grado di controllare l'attività dell'ipofisi che a sua volta produrrà ormoni che agiscono sulle ghiandole endocrine periferiche.

Pertanto, alterazioni dello sviluppo e della funzione dell'asse sono responsabili di diverse forme di infertilità. Il GnRH (Gonadotropin-Releasing Hormone) rappresenta l'ormone chiave della funzione riproduttiva. È un decapeptide prodotto da neuroni localizzati maggiormente a livello del nucleo arcuato ipotalamico. Giunto a livello dell'ipofisi, il GnRH agisce sulle cellule gonadotrope attraverso l'interazione con specifici recettori di membrana (GnRH-R), stimolando il rilascio di due gonadotropine ipofisarie, quali l'ormone follicolo stimolante (FSH) e l'ormone luteinizzante (LH), glicoproteine costituite ciascuna da una subunità comune alfa e da una subunità beta differente tra i due ormoni (che ne permette l'identificazione specifica a scopo diagnostico).⁽²⁷⁾

Anche la regolazione della secrezione delle gonadotropine è complessa, in quanto dipende non solo dalla quantità di GnRH nel circolo portale, ma anche dalla sua pulsatilità secretoria: essa, infatti, determina il *priming* delle cellule gonadotrope, mentre la produzione continua dell'ormone ne provoca la desensibilizzazione. Comincia così la **fase follicolare**.

Follicolo primario (fase follicolare precoce)

Sotto l'influenza dell'FSH, diversi follicoli ovarici iniziano a maturare. Mentre i follicoli crescono, le cellule della granulosa, sotto l'influenza dell'FSH, e le cellule della teca sotto l'influenza dell'LH, iniziano a produrre ormoni steroidei. Le cellule della teca sintetizzano androstenedione che diffonde nelle vicine cellule della granulosa, dove viene convertito ad opera dell'aromatasi in 17- β -estradiolo (estrogeno), in grado di stimolare le stesse cellule della granulosa (stimolazione autocrina) con conseguente sviluppo del follicolo ooforo e dell'utero (stimolazione endocrina), determinando la fase proliferativa del ciclo uterino.

Follicolo in accrescimento (fase follicolare intermedia)

Nonostante il GnRH sia il fattore principale che regola la secrezione di FSH ed LH, la sintesi di FSH è anche sotto il controllo dei peptidi gonadici attivina ed inibina, che fanno parte della famiglia dei fattori di crescita trasformanti β . L'inibina inibisce selettivamente la secrezione di FSH, mentre l'attivina ne stimola la sintesi. In questa fase, infatti, inibina ed estrogeni esercitano un controllo a feedback negativo sulla secrezione ipofisaria di FSH e ipotalamica di GnRH. Allo stesso tempo, gli estrogeni stimolano l'endometrio favorendo la continuazione della fase proliferativa di questa componente uterina.

Follicolo terminale (fase follicolare tardiva)

Quando la fase follicolare tardiva raggiunge il suo acme, la secrezione ovarica degli estrogeni raggiunge il suo picco. In questa fase del ciclo, solo un follicolo si sta ancora sviluppando, mentre gli altri sono degenerati. Al termine della fase follicolare, il 17- β -estradiolo induce la comparsa di recettori per l'LH nelle cellule della granulosa del follicolo dominante, che iniziano a produrre idrossiprogesterone; Gli estrogeni, che esercitavano un feedback negativo sul GnRH e sulle gonadotropine nella fase follicolare precoce, ora

esercitano un feedback positivo, stimolando l'ipofisi a produrre LH: picco LH pre-ovulatorio. L'aumento di LH e idrossiprogesterone inducono la rottura del follicolo dando inizio all'ovulazione.

Ovulazione

Circa 16-24 ore dopo il picco dell'LH si ha l'ovulazione. L' ovulo giunge nelle tube di Falloppio e viene trasportato lontano per essere fertilizzato o degenerare.

Formazione del corpo luteo (fase luteale precoce e intermedia)

Dopo l'ovulazione, l'LH stimola le cellule della granulosa residue a produrre progesterone (PRG); inoltre, attraverso un feedback negativo, l'LH inibisce la produzione di gonadotropine (FSH e LH) e la maturazione di nuovi follicoli.

Degenerazione del corpo luteo (fase luteale tardiva)

Il corpo luteo sopravvive per circa 12 giorni. Se la cellula uovo è stata fecondata, viene trasportata nell'utero, dove passa dallo stadio di morula a quello di blastocisti seguita dalla produzione di Gonadotropina Corionica Umana (HCG) e dalla formazione del Corpo Luteo Gravidico, il quale continuerà a produrre progesterone. Se non si instaura una gravidanza, il corpo luteo degenera spontaneamente in una struttura inattiva, il corpus albicans. Quando le cellule luteali smettono di funzionare, la produzione di progesterone ed estrogeni diminuisce. Questa diminuzione rimuove l'inibizione sull'ipotalamo e sull'ipofisi con conseguente aumento della secrezione di FSH e LH. Inizia così lo sfaldamento dello strato superficiale dell'endometrio con conseguente mestruazione che continuerà per circa 3-7 giorni, corrispondenti alla fase follicolare del ciclo ovulatorio successivo. ⁽²⁸⁾

1.3 LE CELLULE DEL CUMULO OOFORO

Durante la follicologenesi le cellule della granulosa subiscono un processo di differenziamento in cellule del cumulo ooforo. Le cellule del cumulo sono mantenute adese tra loro in una matrice gelatinosa amorfa, contenente un'elevata concentrazione di acido ialuronico, un glicosamminoglicano non solforato con proprietà adesive.⁽²⁹⁾

Tali cellule circondano e supportano l'ovocita nel follicolo secondario in fase avanzata di maturazione. (Fig.2)

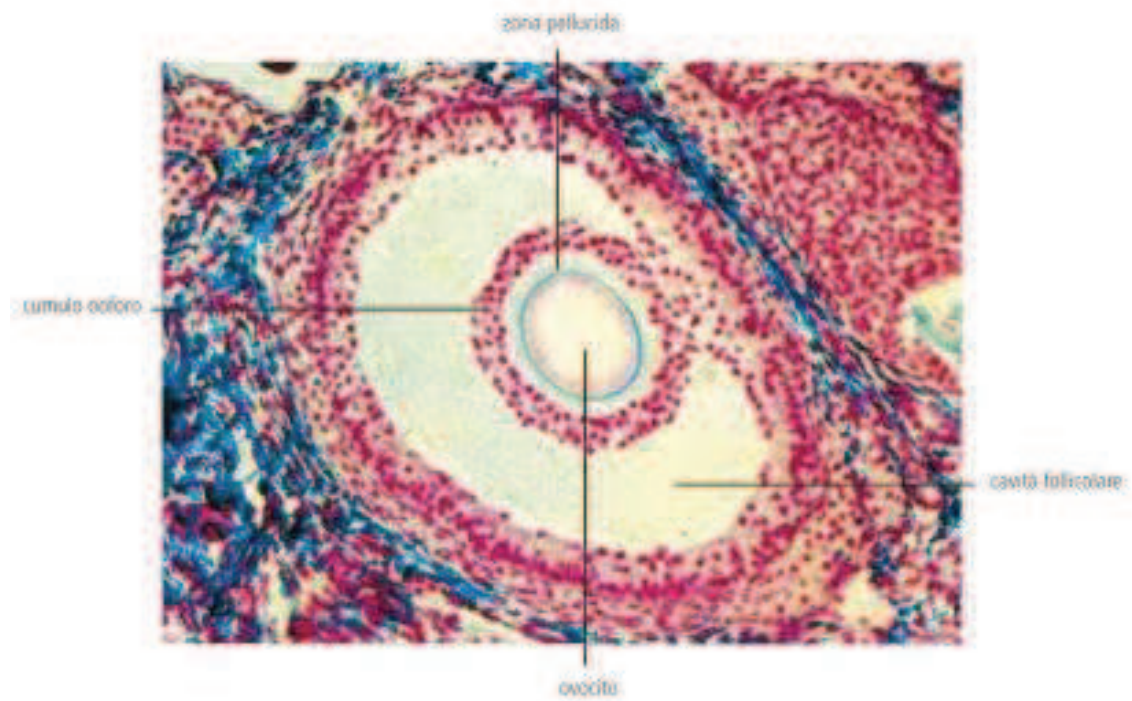


Figura 1 Follicolo. L'ovocita, circondato da cellule della granulosa (cumulo ooforo), sporge nella cavità follicolare ripiena di liquido.

(Salute>Dizionario della salute)

Il cumulo ooforo svolge tre importanti funzioni biologiche:

1. Prima dell'ovulazione supporta la maturazione degli ovociti attraverso il trasporto di nutrienti, la produzione di proteine specifiche ed essenziali e la regolazione dell'espressione genica;
2. Durante l'ovulazione proteggono l'ovocita e lo conducono nell'ovidotto (tuba di Falloppio);
3. Durante la fecondazione oltre a continuare a proteggere l'ovocita, partecipano alla complessa regolazione della fecondazione.⁽³⁰⁾

Si pensa, infatti, che le cellule del cumulo abbiano la capacità, in una certa misura, di “selezionare” gli spermatozoi vitali mediante intrappolamento meccanico e di guidarli verso l'ovocita; inoltre, tali cellule creano un microambiente favorevole alla penetrazione degli spermatozoi.⁽³¹⁾

È bene ricordare un dato morfologico: le cellule del cumulo ooforo ed in particolare quelle della così detta corona radiata (che circondano a monostato l'ovocita), sono collegate fra loro e con la membrana esterna dell'ovocita da giunzioni gap (collegamenti pseudopodali sottili) che servono al trasferimento bidirezionale di precursori metabolici o di molecole regolatrici.⁽³²⁾

Questi scambi bidirezionali sono importanti e, sebbene le cellule del cumulo non siano strettamente indispensabili per ottenere la fertilizzazione dell'ovocita, la loro presenza durante la maturazione meiotica ed in particolare il mantenimento di efficienti giunzioni gap, può influenzare quella capacità dell'ovocita di andare incontro alla fertilizzazione normale, denominata “competenza” ed influenzerà anche la successiva capacità di trasformare il nucleo spermatico penetrato nell'ovocita, in “pronucleo maschile”. Inoltre, si hanno

dimostrazioni che nelle cellule del cumulo ooforo possano accumularsi fattori di crescita come VEGF (vascular endothelial growth factor), leptina e TGF β (transforming growth factor beta).

Infine, le cellule del cumulo regolano l'apoptosi dell'ovocita e questo fa pensare che tale meccanismo concorra a determinare modificazioni apoptotiche ovcitarie più accentuate nelle donne anziane, con il declino della loro fertilità.⁽³³⁾

Il grande interesse rivolto verso questi fattori paracrini è dovuto principalmente al fatto che un'alterazione dell'espressione dei loro rispettivi geni, compromette notevolmente le funzioni ovariche e la fertilità. Nonostante l'evidente importanza di tali comunicazioni tra oocita e cellule somatiche, resta ancora molto da indagare riguardo ai *pathway* che vengono selettivamente attivati nel corso di questi eventi. Dal momento che questo asse di comunicazione bidirezionale sembra essere un prerequisito per garantire un corretto sviluppo e non compromettere la fertilità, è fondamentale conoscere e studiare le basi molecolari di tali eventi.⁽³⁴⁾⁽³⁵⁾

1.4 STIMOLAZIONE ORMONALE IN ART

La perdita progressiva del potenziale di fertilità nelle donne, con il passare degli anni, è dovuta principalmente al declino quantitativo e qualitativo dei follicoli ovarici e quindi degli ovociti, processo che si accentua soprattutto durante la quarta e quinta decade di vita. Questo problema assume un'importanza fondamentale nel trattamento dell'infertilità di coppia, in quanto l'invecchiamento ovarico è un fattore determinante per l'efficacia dei trattamenti.

La qualità ovcitaria è età-dipendente, mentre il patrimonio ovcitario è influenzato da fattori genetico-familiari, endometriosi, chemioterapie, radioterapie e disordini ovulatori che

possono manifestarsi con alterazioni del ciclo mestruale e che sono la causa del 25% dei casi di infertilità di coppia. Prima di impostare un protocollo terapeutico, pertanto, è necessario stabilire i criteri di un'accurata valutazione della riserva ovarica.⁽³⁶⁾

Tale valutazione si basa, oltre che sugli usuali parametri della semeiotica classica, su indagini strumentali e ormonali quali la conta ecografica dei follicoli antrali (AFC) e il dosaggio sierico dell'ormone antimulleriano (AMH). L'introduzione della stimolazione ovarica controllata (COS) per lo sviluppo multiplo follicolare, ha significativamente aumentato i tassi di gravidanza nelle tecniche PMA.

Lo scopo della stimolazione è quello di indurre una maturazione contemporanea di più follicoli per poter avere a disposizione più ovociti maturi. Il recupero di un numero ottimale di ovociti può garantire un migliore tasso di gravidanza cumulativo ottenuto dal trasferimento di embrioni.^(37,38)

L'uso di farmaci induttori dell'ovulazione ad alto dosaggio, infatti, permette il superamento della dominanza monofollicolare e consente di portare a maturazione finale la coorte di follicoli antrali presenti.

La prima tappa del trattamento della sterilità mediante tecniche di PMA (Procreazione Medicalmente Assistita), consiste nell'induzione della crescita follicolare multipla (ICFM) utilizzando, in maniera personalizzata e nel rispetto della sicurezza, dosaggi di gonadotropine maggiori rispetto a quelli fisiologici per l'induzione dell'ovulazione. Il processo di stimolazione ovarica coinvolge solitamente tre stadi:

- Somministrazione di farmaci, come gonadotropine o antiestrogeni, per stimolare la crescita dei follicoli ovarici.
- Somministrazione di farmaci per prevenire la sovraespressione degli ormoni LH ed FSH, che regolano il rilascio degli ovociti dai follicoli.

- Somministrazione di gonadotropina corionica umana (hCG), in dosi diverse da donna a donna, che induce la maturazione finale degli ovociti. Ad un intervallo fisso dalla somministrazione dell'hCG (33-36 ore), si procede col prelievo degli ovociti.⁽³⁹⁾

Esistono diversi farmaci e diverse modalità di somministrazione (protocolli di stimolazione), tra cui quella più frequentemente applicata è l'iniezione sottocutanea di gonadotropine.

Queste ultime possono essere:

- Gonadotropine prodotte sinteticamente in laboratorio: gonadotropine ricombinanti
- Gonadotropine da derivazione urinaria, cioè estratte da urine di donne in menopausa. Esse possono essere o una combinazione di entrambe le gonadotropine (FSH e LH) o solo FSH urinario altamente purificato

In un ulteriore studio è stato riscontrato che l'rFSH sembra essere più efficace dell'uFSH nel trattamento di una particolare infertilità caratterizzata da anovulazione cronica normogonadotrofica.⁽⁴⁰⁾

Nel presente studio, che si è basato su una coorte costituita da 34 pazienti, sono stati presi in considerazione tre diversi trattamenti di stimolazione ovarica:

1. rFSH
2. uFSH
3. FSH+LH

I farmaci utilizzati nel dettaglio sono:

- Puregon (rFSH) il cui principio attivo è la follitropina beta, una copia dell'ormone naturale follicolo-stimolante (FSH). Il dosaggio e la frequenza di somministrazione

di tale farmaco dipendono principalmente dalla risposta della paziente al trattamento.

In questo studio la dose somministrata alle pazienti è compresa tra 1050-2200 UI.

- Gonal-F (rFSH) il cui principio attivo è la follitropina alfa. La sua azione principale è supportare lo sviluppo dei follicoli di Graaf. La quantità utilizzata nelle pazienti oggetto di studio è compresa tra 1500-2400 UI.
- Ovaleap (rFSH) il cui principio attivo è la follitropina alfa.
- Fostimon (uFSH) contiene urofollitropina, ottenuta a partire da urine umane la cui concentrazione si aggira intorno a 1500-2250 UI.
- Menopur (FSH+LH) è un farmaco caratterizzato dall'azione combinata di FSH e LH, la cui quantità varia tra 1250-2100UI
- Pergoveris (FSH+LH) I cui principi attivi sono follitropina alfa e lutropina alfa, la cui somministrazione avviene una volta al dì, fin quando la paziente non ha sviluppato un follicolo adatto.

Lo sviluppo dei follicoli viene seguito costantemente mediante monitoraggio ecografico e misurando il dosaggio degli estrogeni plasmidici. Il tutto viene eseguito sino a stabilire il momento ottimale per il prelievo degli ovociti. Il raggiungimento dell'obiettivo può richiedere circa 5 settimane. ⁽⁴¹⁾

1.5 RUOLO DEI miRNA NELLA FUNZIONALITA' OVARICA

Il potenziale sviluppo di un embrione dipende molto dalla qualità dell'oocita da cui esso è stato generato. Diversi fattori contribuiscono a renderlo qualitativamente eccellente e a permetterne il successivo sviluppo embrionale; tra questi fattori, ricordiamo la nutrizione, la regolazione ormonale e l'ambiente circostante. ⁽⁴²⁾

L'ovaio mantiene e nutre le cellule germinali attraverso delicate interazioni con le cellule somatiche ovariche, fino al raggiungimento della maturazione ed alla fecondazione. In particolar modo ogni oocita sviluppa e matura nell'unità funzionale dell'ovario, il follicolo, circondato e supportato da cellule del cumulo (CCs). L'eventuale interruzione di tali interazioni, potrebbe influire negativamente sulla qualità dell'oocita, sul successivo sviluppo embrionale e di conseguenza sull'esito della gravidanza.⁽⁴³⁾

Affinché lo sviluppo follicolare e l'ovulazione procedano correttamente, è essenziale una comunicazione coordinata e bidirezionale mediata da un vasto numero di prodotti genici. L'espressione di tali geni, deve essere in particolar modo precisa e tempestiva in quanto, qualsiasi alterazione nell'espressione genica potrebbe causare anomalie nello sviluppo degli ovociti o apoptosi.⁽⁴⁴⁾

Per espressione genica si intende l'insieme dei processi attraverso cui l'informazione contenuta in un gene viene convertita in macromolecole funzionali come le proteine. La regolazione dell'espressione genica permette alla cellula di differenziarsi, di svolgere le sue funzioni basali e di modificarle in determinate condizioni e/o in risposta a specifici stimoli. Sistemi interni alla cellula, sempre più sofisticati e complessi lungo la scala evolutiva, assicurano il controllo dell'espressione genica a vari livelli, dalla trascrizione al processamento del mRNA, fino alla traduzione e alla corretta compartimentalizzazione ed attività della proteina sintetizzata.

Diversi studi hanno dimostrato l'esistenza di meccanismi di regolazione dell'espressione genica, mediati da molecole di RNA non codificante (non-coding RNA, ncRNA). Sebbene circa l'80% del genoma sia trascritto in RNA, infatti, solo l'1-2% di esso è tradotto in proteina, generando un elevato numero di ncRNA che sono attivamente coinvolti nella modulazione genica ed epigenetica.⁽⁴⁵⁾ Tra questa famiglia di ncRNA, vi sono i microRNA

(miRNA), lunghi 18-25 nucleotidi, in grado di regolare negativamente l'espressione genica a livello post-trascrizionale.

Recentemente i miRNA sono stati esplorati e studiati nelle cellule ovariche ed hanno suscitato elevato interesse perché, oltre ad influire sull'espressione genica attraverso la repressione o degradazione trascrizionale, svolgono un ruolo importante nel controllo delle funzioni endocrine riproduttive, nel processo di maturazione dell'oocita e nella follicologenesi.

I miRNA sono stati anche associati alla regolazione funzionale delle cellule della granulosa, cellule del cumulo e nella sintesi di steroidi. In diversi recenti studi, l'inibizione della biogenesi dei miRNA, mediante l'ablazione di DICER, ha dimostrato, infatti, arresto dello sviluppo ed infertilità femminile non solo nell'uomo ma anche in altre specie. ⁽⁴⁶⁾

1.5.1 BIOGENESI DEI miRNA

I microRNA (miRNAs) funzionano come molecole guida nel silenziamento genico post-trascrizionale, attraverso l'appaiamento parziale ad una o più sequenze nel 3'UTR (3' *untranslated region*) di un mRNA bersaglio (*target*), al fine di determinarne la degradazione o la repressione trascrizionale, fungendo quindi da interruttori molecolari. I miRNA e i loro target sembrano formare delle complesse reti regolatorie; un singolo miRNA può appaiarsi con più mRNA, così come un singolo mRNA può essere controllato da più miRNA. ⁽⁴⁷⁾

Affinché i microRNA possano svolgere la loro funzione, è necessario che subiscano un processo di maturazione, un meccanismo altamente compartimentalizzato che prende inizio a livello nucleare per poi concludersi nel citoplasma, e che è costituito da numerosi passaggi che lo rendono talmente complesso da essere considerato un vero e proprio *pathway*.

I miRNA sono trascritti nel nucleo dalla RNA polimerasi II o, in alcuni casi, dalla RNA polimerasi III, generando trascritti primari detti pri-miRNA, i quali possiedono un *loop* ed uno *stem* a doppio filamento. Il pri-miRNA viene processato da una RNase III nucleare ad attività endonucleasica, Drosha, una grossa proteina di circa 160kDa, che, agendo in cooperazione con il cofattore DGCR8 (*Di George syndrome critical region gene 8*), si lega alla struttura a *stem-loop*, effettuando dei tagli in siti specifici che determinano il rilascio del pre-miRNA. Questa fase, specificatamente nucleare, prende il nome di *cropping*.⁽⁴⁸⁾ (Fig.3)

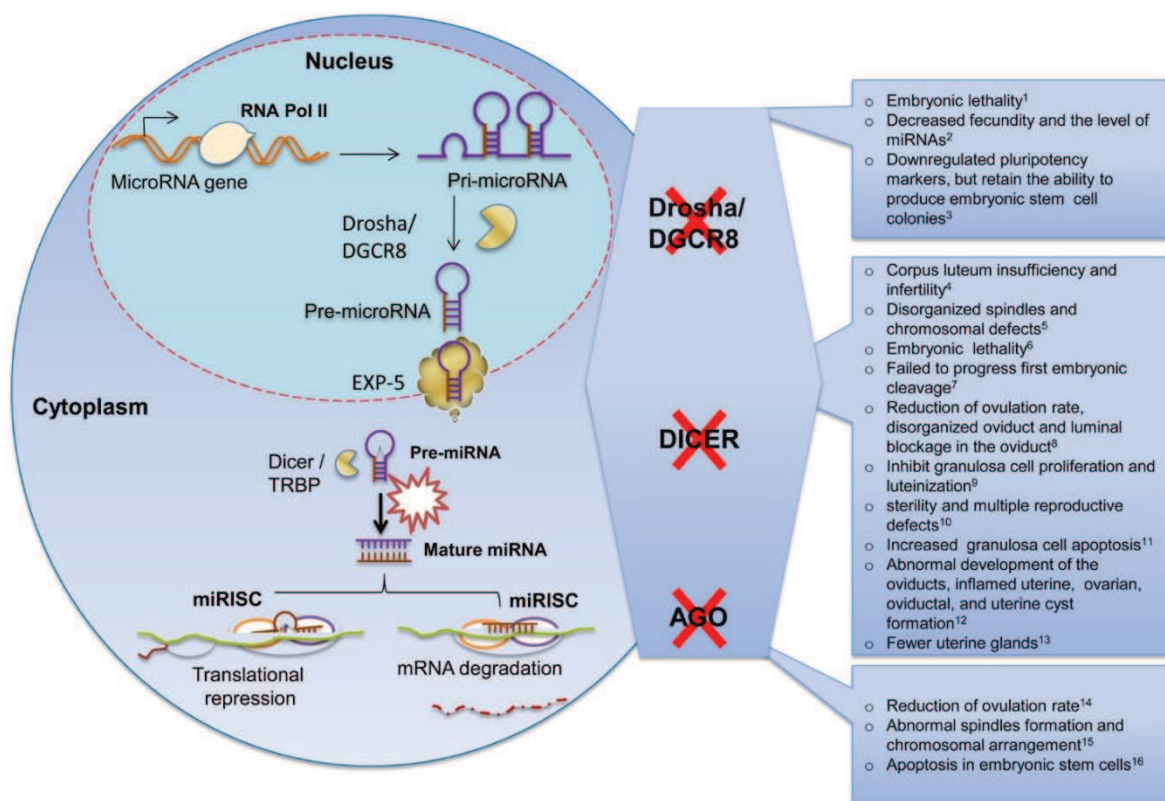


Figura 3 La biogenesi dei miRNA ed il knockout selettivo dei geni chiave e gli effetti fenotipici nella fertilità femminile dei mammiferi

(Reproduction 155, 3; 10.1530/REP-17-0428)

Dicer è una grossa proteina di circa 200 kDa, coinvolta esclusivamente nel processo di maturazione del pre-miRNA: quest'ultimo viene tagliato generando un microRNA *duplex* di circa 22 nucleotidi. Dopo il clivaggio, Dicer e TRBP si dissociano dal complesso e il *duplex* di miRNA viene separato in due filamenti: quello funzionale, che è complementare all'mRNA *target*, viene caricato sulla proteina Ago2 e successivamente incorporato nel complesso del *RISC* (*miRNA-containing RNA-induced silencing complex*), effettore della repressione mediata da microRNA, l'altro, chiamato miRNA* *strand*, viene invece solitamente degradato.⁽⁴⁹⁾ (Fig.4)

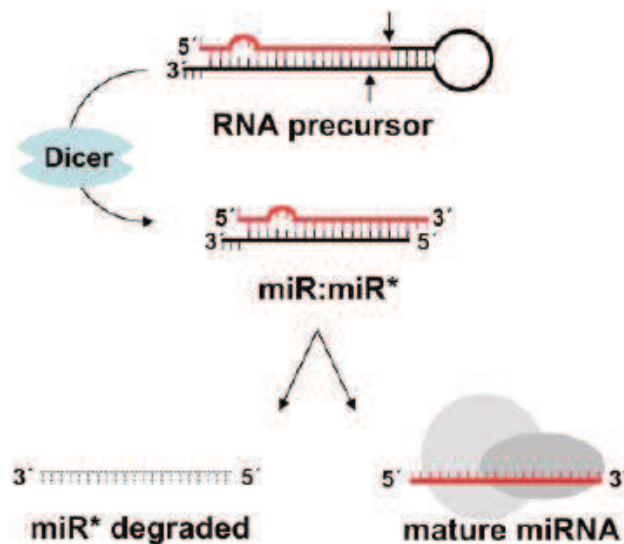


Figura 4 Selezione del filamento che costituirà il miRNA

(www.archivia.unict.it)

1.5.2 miRNA PROFILING NELLE CELLULE FOLLICOLARI

La crescita e lo sviluppo dell'ovocita sono influenzati dalle attività funzionali delle cellule somatiche circostanti.⁽⁵⁰⁾

In particolar modo, la proliferazione, la differenziazione e le funzioni steroidogeniche delle cellule della granulosa, sono necessari per dar luogo ad eventi chiave durante lo sviluppo

follicolare nei mammiferi, incluso reclutamento, selezione, dominio e atresia dei follicoli subordinati anovulatori, svolgendo anche un ruolo cruciale nella creazione di un microambiente unico che nutre il crescente ovocita.⁽⁵¹⁾

Questi processi sono a loro volta regolati post-trascrizionalmente dall'attivazione o inattivazione di molecole, quali miRNA, essenziali per guidare il destino cellulare.⁽⁵²⁾

L'espressione dei miRNA è specifica per ogni organo e strettamente correlata alla funzione di quest'ultimo, in particolar modo nell'ovario, che contiene oltre ad ovociti anche diversi tipi di cellule somatiche come cellule della granulosa, cellule della teca e cellule del cumulo ooforo. L'espressione e la funzione dei miRNA sono associate ai diversi tipi di cellule. Nell'ovario ne sono stati identificati centinaia, tutti coinvolti in numerosi processi inclusi ciclo cellulare, crescita cellulare, proliferazione, differenziazione, angiogenesi, steroidogenesi apoptosi ed atresia.⁽⁵³⁾

In particolar modo, è stato riportato che fattori extra e intra-ovarici regolano lo sviluppo follicolare, inclusi membri della superfamiglia TGF- β e SMAD. La superfamiglia TGF- β comprende: BMP (proteine morfogenetiche ossee), GDF (fattori di differenziazione della crescita), AMH (ormone anti-Mulleriano), Attivine e TGF β .⁽⁵⁴⁾

In questo studio sono stati presi in considerazione diversi miRNA ed i loro rispettivi pathway biologici

- **hsa-miR-181a-5p** inibisce la proliferazione delle cellule della granulosa utilizzando come target Acvr2a (recettore dell'attivina IIA). Le attivine prodotte principalmente dalle cellule della granulosa nell'ovaio, sono indispensabili per lo sviluppo dei follicoli ovarici e per le funzioni riproduttive, poiché topi con delezioni genetiche dei componenti dell'attivina risultano sterili. Regolano inoltre lo sviluppo del follicolo promuovendo la crescita dei follicoli e la proliferazione delle cellule della granulosa.

Come altri membri della superfamiglia TGF- β , le attivine trasducono il segnale attraverso il legame con un recettore di membrana di tipo II (Acvr2a e Acvr2b); quest'ultimo fosforila i residui di serina del recettore di tipo I il quale attiva la proteina SMAD3. Tuttavia, la sovra-espressione del recettore dell'attivina (Acvr2a) determina il blocco di miR-181a

- **hsa-miR-93-5p** promuove la proliferazione delle cellule della granulosa in particolar modo nelle donne affette da PCOS iper-androgeniche (HA), utilizzando come target *cdkn1a*. Il testosterone libero e l'indice di androgeni liberi sono positivamente correlati con miR-93-5p nelle cellule della granulosa in PCOS. Gli androgeni sono fondamentali nella fisiopatologia della PCOS ed hanno effetti sulla crescita del follicolo, sulla salute e sulla sopravvivenza. L'espressione di miR-93-5p è up-regolata nei casi di PCOS e il suo target, CDKN1A (inibitore della chinasi ciclina dipendente 1A), viene attivamente represso. Poiché questo miRNA è stato evidenziato come fattore di risposta agli androgeni, ne segue che può svolgere un ruolo nella disfunzione follicolare coinvolta nella patogenesi della PCOS in condizioni iperandrogeniche.⁽⁵⁵⁾
- **hsa-miR-202-5p** ha come target HAS2 e NLRP2. L'espansione del cumulo è un processo critico per il normale sviluppo degli ovociti, per l'ovulazione e la fecondazione. Ovociti, la cui maturazione non è associata con l'espansione del cumulo, presentano una probabilità d'impianto al quanto ridotta. GDF9 (fattore di differenziazione della crescita), membro della superfamiglia TGF- β , funziona come un fattore paracrino e controlla l'espressione di HAS2, quest'ultimo a sua volta attiva

specificatamente SMAD2 e SMAD3. L'espansione del cumulo è correlata alla qualità degli ovociti e HAS2 controlla la produzione di ialuronano, che è uno dei componenti principali della matrice extracellulare secreta dalle cellule del cumulo. Poiché HAS2 è fortemente espresso nelle cellule del cumulo in risposta all'effetto combinato di FSH e GDF9, e quest'ultimo è secreto dall'ovocita, non sorprende che questa espressione genica sia associata alla qualità degli ovociti. Per cui alti livelli nelle cellule del cumulo sono indice di buona qualità.⁽⁵⁶⁾ NLRP2, invece, è l'altro gene target ad effetto materno, necessario per lo sviluppo embrionale precoce, la cui sovra-espressione nelle cellule del cumulo è correlata all'endometriosi e all'apoptosi.⁽⁵⁷⁾

- **hsa-miR-130b-3p**, quando sovra-espresso, promuove la proliferazione delle cellule del cumulo e della granulosa; inoltre, la sua modulazione altera la produzione di lattato e la biosintesi di colesterolo nelle cellule del cumulo. La steroidogenesi è una delle principali funzioni delle cellule associate agli ovociti durante lo sviluppo follicolare e si ritiene che le cellule del cumulo utilizzino colesterolo lipoproteico ad alta densità per la steroidogenesi. Ragion per cui, è possibile ipotizzare che la sovra-espressione o l'inibizione di miR-130b-5p, può influenzare la funzione delle cellule del cumulo compromettendone il metabolismo. Tuttavia, le vie di trasduzione del segnale regolate da miR-130b-3p, durante la maturazione degli ovociti, non sono ancora chiare. Di certo SMAD5 è uno dei mediatori chiave coinvolto nel pathway di TGF- β , una via essenziale per decidere il destino cellulare. SMAD5 appartiene alle vie di segnalazione SMAD1/5/8, che si ritiene promuovano la proliferazione e l'espressione di un insieme di geni associati alla differenziazione delle cellule

granulosa dall'azione di pro-cumulina e cumulina. Inoltre, l'inibizione dell'espressione di miR-130b durante la maturazione in vitro degli ovociti, riduce l'estrusione del corpo polare, la proporzione di ovociti che raggiungono lo stadio della metafase II e l'attività mitocondriale, mentre la sua inibizione durante lo sviluppo dell'embrione preimpianto riduce significativamente la formazione di morula e blastocisti.⁽⁵⁸⁾

- **hsa-miR-let-7g-5p** la sua sovra-espressione induce apoptosi delle cellule della granulosa e atresia follicolare, utilizzando come gene target TGFBR1. La famiglia di miRNA let 7 è stata la prima ad essere scoperta. Fu identificata per la prima volta nel nematode *Caenorhabditis elegans*, in cui controlla i tempi di divisione e differenziazione delle cellule staminali. Poco dopo, la sequenza matura di miRNA let-7 è stata rilevata nel genoma di *Drosophila melanogaster* ed in seguito anche nell'uomo. Questa famiglia comprende una pluralità di miRNA maturi altamente conservati, che differisce tra le varie specie. TGFBR1, identificato come principale gene target di let-7g-5p, è ampiamente espresso nelle cellule della granulosa; è una serina/treonina chinasi transmembrana che appartiene alla via di segnalazione TGF- β /SMAD. Come componente importante di tale pathway, TGFBR1 trasduce il segnale TGF- β dalla superficie cellulare al citoplasma e questo processo è necessario per il corretto sviluppo follicolare e per la fertilità femminile, infatti, in un recente studio topi knockout TGFBR1, presentavano interruzione dello sviluppo follicolare e del cumulo, con conseguente sterilità. È possibile, quindi, dedurre che let-7g-5p, oltre ad essere altamente conservato tra i mammiferi, è in grado di promuovere l'apoptosi delle cellule della granulosa nell'ovaio, attraverso il targeting diretto e la

down-regolazione del gene TGFBR1, reprimendo il percorso TGF- β /SMAD. Questi risultati possono aiutare a sviluppare nuove strategie che riducono il numero di follicoli primordiali sottoposti a degenerazione e atresia.⁽⁵⁹⁾

- **hsa-miR-34a-5p** inibisce l'espressione di VEGFA (Vascular Endothelial Growth Factor), che risulta maggiore negli ovociti maturi; è una glicoproteina in grado di promuovere la migrazione e la proliferazione delle cellule endoteliali del microcircolo e di incrementare la permeabilità vascolare. La sua intensa espressione nel corpo luteo in fase luteale precoce e media, e soprattutto nella gravidanza iniziale, ne suggerisce la notevole importanza sia nella formazione sia nel mantenimento del corpo luteo qualora avvenga il concepimento. Nel corpo luteo tale fattore di crescita è prodotto dalle cellule steroidogeniche che, come le cellule endoteliali, ne posseggono anche i recettori. Ciò suggerisce quindi che, VEGF possa esercitare anche un'azione autocrina di modulazione della steroidogenesi luteale. miR-34-5p inibisce anche MCM3 e TGFB1: quest'ultimo è un gene coinvolto nel pathway TGF- β ; La via di segnalazione TGF β ha un ampio spettro di funzioni che dipendono da specifici contesti biologici. Generalmente, i ligandi TGF β (TGFB1, TGFB2 e TGFB3) attivano dapprima un recettore di membrana serina / treonina chinasi composto da recettori di tipo II (TGFBR2) e di tipo I (TGFBR1). Dopo la fosforilazione di TGFBR1, SMAD2/3 forma un complesso oligomerico con SMAD4 e trasloca nel nucleo, dove può promuovere o inibire la trascrizione dei geni bersaglio.⁽⁶⁰⁾

2. SCOPO DELLA TESI

La scoperta di meccanismi di comunicazione autocrina e paracrina mediati dai miRNA, all'interno del follicolo ovarico ha rivelato che questi RNA non codificanti rappresentano importanti regolatori all'interno dei percorsi coinvolti nella follicologenesi e nella maturazione degli ovociti. Per il loro potenziale ruolo nella riproduzione, li possiamo quindi definire degli eccellenti marker, per consentire una migliore comprensione dei meccanismi molecolari, che impediscono l'impianto e lo sviluppo dell'embrione. La loro caratterizzazione potrebbe migliorare le nostre conoscenze sulla gametogenesi femminile e potrebbe consentire di individuare nuove molecole coinvolte nei disturbi riproduttivi, consentendo la formulazione di nuovi approcci terapeutici

A tal proposito, il presente progetto di ricerca si propone di comprendere e valutare le potenziali vie biologiche (*pathway*) che collegano i profili di specifici miRNA, oggetto di questo studio, ai diversi trattamenti ormonali utilizzati in Assisted Reproductive Technologies (*ARTs*), al numero di oociti prodotti e all'esito della ART. In particolar modo, questo studio ha l'obiettivo di stabilire se differenti trattamenti ormonali, precisamente rFSH (FSH ricombinante), uFSH (FSH urinario) e FSH combinato con LH, possano in qualche modo avere degli effetti sui miRNA presenti nelle cellule del cumulo e di conseguenza sull'ovogenesi. A tale scopo, in collaborazione con l'Ospedale Salesi di Ancona, è stata selezionata una coorte composta da 34 pazienti sottoposte a tre diversi trattamenti ormonali, per l'induzione di una super ovulazione. L'abbondanza relativa dei miRNA e dei loro specifici geni target sono state correlate ai dati clinici delle pazienti relativi a numero di ovociti recuperati e successo di gravidanza, con lo scopo di fornire nuove informazioni

sull'effetto dei miRNA sulle cellule follicolari e sulla possibilità che il trattamento ormonale selezionato determini ad una modificazione dei loro livelli.

3. MATERIALI E METODI

3.1 DESCRIZIONE DELLE PAZIENTI IN ESAME

Lo studio è stato condotto previa firma delle pazienti in esame di un consenso informato che le rendeva coinvolte in tale progetto di ricerca. In accordo con l'Ospedale Salesi di Ancona sono state prese in considerazione 32 pazienti.

3.1.1 CRITERI DI INCLUSIONE

- Età compresa tra 32 e 41 anni
- BMI: normopeso
- Non fumatrici
- Nessuna distinzione in relazione a diete particolari
- Nessuna distinzione etnica
- Non consumatrici di alcool
- Nessun caso di familiarità di infertilità

3.1.2 GRUPPI SPERIMENTALI

Per la stimolazione ormonale sono stati utilizzati tre differenti trattamenti ormonali:

1. rFSH (FSH ricombinante) N°17 donne
2. uFSH (FSH urinario) N°8 donne
3. FSH + LH (combinazione) N°7 donne

3.1.3 DOSAGGI ORMONALI

Nel corso della terapia di stimolazione, sono stati effettuati controlli ecografici e ormonali, per poter valutare al meglio la risposta alla terapia. Mediante prelievi di sangue, sono stati determinati i livelli di FSH (ormone follicolo stimolante) e AMH (ormone anti-Mulleriano) circolanti, in quanto entrambi gli ormoni sono degli indicatori di riserva ovarica. In particolare modo, il dosaggio dell'FSH è stato eseguito tra il 2° ed il 5° giorno del ciclo ovarico; l'AMH, invece, può essere dosato in qualsiasi momento. Le pazienti, inoltre, sono state analizzate in termini di ovociti recuperati e percentuale di gravidanza ottenuta.

3.2 PICK-UK OVOCITARIO

Quando i follicoli hanno raggiunto la dimensione idonea, la maturazione degli ovociti è stata indotta con una iniezione di cGH (Gonadotropina Corionica umana). Nell'arco di 36 ore da tale somministrazione, è stato eseguito il prelievo ovocitario ecoguidato (pick-up), procedura di rapida esecuzione.(Fig.5)

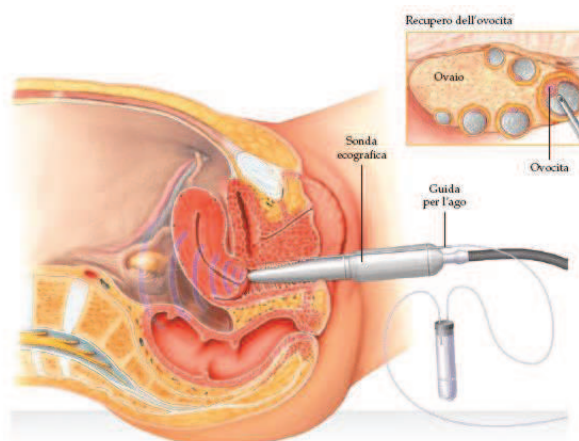


Figura 5 Pick-up ovocitario

(Pacific Fertility Center IVF Procedure: The complete process)

Sotto controllo ecografico, un particolare ago, posizionato sulla sonda ecoguidata, viene introdotto nel canale vaginale; si raggiunge l'ovaio e si aspira il liquido follicolare, insieme agli ovociti. Il numero e la qualità degli ovociti sono stati valutati nel laboratorio di embriologia subito dopo il pick-up.⁽⁶¹⁾

3.3 RACCOLTA DELLE CELLULE DEL CUMULO OOFORO

Gli ovociti appena prelevati non possono essere valutati qualitativamente (valutazione maturità) in quanto sono circondati dalle cellule del cumulo e della corona, per tale motivo si effettua un processo di denudazione meccanica degli stessi, operata in vortex (35Hz per 3 min.) in presenza di 500 µl di medium M199D.

Le eppendorf contenenti le cellule del cumulo ooforo, dopo essere giunte in laboratorio vengono sottoposte ad un protocollo di lavaggio e congelamento, al fine di renderle disponibili per le analisi successive.

3.3.1 ISOLAMENTO DELLE CELLULE DEL CUMULO OOFORO

Da ogni paziente sono state isolate le cellule del cumulo ooforo, mediante un processo che consiste nei seguenti step:

- Centrifugazione a 500g per 15 min.
- Eliminazione del surnatante
- Sospensione del pellet con 1ml di PBS (Phosphate buffered saline)
- Centrifugazione a 500g per 15 min. e rimozione del surnatante
- Secondo lavaggio del pellet con 1ml di PBS

- Centrifugazione a 500g per 15 min. e rimozione del surnatante
- Congelamento del pellet di cellule del cumulo ooforo a -80°C fino al suo utilizzo

3.4 ANALISI TRASCRIZIONALE

3.4.1 ESTRAZIONE RNA TOTALE

L'estrazione dell'RNA totale dai campioni di cellule del cumulo ooforo è stata eseguita utilizzando miRNeasy Mini Kit (Quiagen), che estrae contemporaneamente RNA di lunghezza superiore e inferiore a 200 nt, quindi comprendenti anche i miRNA.

Il Kit è costituito da:

- **QIAzol Lysis Reagent** contenente un sale di guanidina non compatibile con disinfettanti contenenti candeggina
- **Buffer RWT** fornito come concentrato, per cui al primo utilizzo vanno aggiunti 2 volumi di etanolo (96% - 100%) come indicato sulla bottiglia
- **Buffer RPE** fornito come concentrato, per cui al primo utilizzo vanno aggiunti 4 volumi di etanolo (96% - 100%) come indicato sulla bottiglia
- **Acqua RNase-Free**
- **Mini colonnine**
- **Tubi di raccolta**

Con lo scopo di ottenere la purificazione desiderata dell'RNA totale, si è seguito il seguente protocollo:

1. Aggiungere al pellet di cellule precedentemente scongelato 700 μ l del reagente di lisi QIAZOL e lasciar lisare per qualche istante.
2. Vortexare le cellule per 1 min. per permetterne l'omogeneizzazione.
3. Incubare l'eppendorf contenente l'omogenato per 5 min. a temperatura ambiente.
4. Aggiungere 140 μ l di cloroformio e agitare vigorosamente per circa 15 sec. (La miscelazione accurata è fondamentale per la separazione delle fasi). Incubare a temperatura ambiente per 2-3 min.
5. Centrifugare a 12.000 g per 15 min. a 4°C.
6. Trasferire la fase acquosa superiore, incolore, contenente l'RNA in una nuova eppendorf e aggiungere 1,5 volumi di etanolo al 100% e mixare accuratamente pipettando.
7. Pipettare fino a 700 μ l di campione, compreso qualsiasi precipitato formatosi, in una colonna posta in un tubo di raccolta da 2 ml. Centrifugare a circa 10000 g per 15 sec. a temperatura ambiente (15-25°C). Gettare il flow-through e ripetere il passaggio se è avanzato del campione.
8. Aggiungere 700 μ l di Buffer RWT alla colonna e centrifugare a 10.000 g per 1 min. Gettare il flow-through.
9. Pipettare 500 μ l di Buffer RPE nella colonna e centrifugare a 10.000 g per 2 min. Gettare il flow-through. Le numerose centrifugature consentono alla membrana posta nella colonna di asciugarsi, assicurando in tal modo che durante l'eluizione dell'RNA non venga trasportato etanolo, il quale potrebbe interferire con le reazioni a valle.
10. Opzionale: centrifugare a 12.000g per 1 mn.
11. Trasferire la colonnina in una nuova eppendorf da 1,5 ml e pipettare 30 μ l di acqua RNase-free direttamente sulla membrana. Centrifugare a 10.000 g per 1 min.

3.4.2 VALUTAZIONE DELL'RNA

È stato eseguito il dosaggio dell'RNA estratto di ogni singolo campione, mediante l'utilizzo dello spettrofotometro (NanoPhotometer P-Class), per ricavarne la concentrazione e per valutarne la purezza. Il Nanodrop misura l'assorbanza alle tre diverse lunghezze d'onda e calcola automaticamente il rapporto di concentrazione e purezza del campione. Gli acidi nucleici, infatti, assorbono la luce in uno spettro che varia da 230nm a 280nm con un picco di assorbimento in corrispondenza di 260 nm. Tale assorbimento è determinato dalle basi azotate e perciò è caratteristico sia del DNA che dell'RNA. Per determinare la purezza dei campioni, si misurano due rapporti che indicano rispettivamente la purezza da fenoli (260/230) e quella da proteine (260/280), campioni con buoni indici di purezza devono essere caratterizzati da un valore del rapporto 260/230 maggiore di 1.8 e 260/280 compreso tra 1.8 e 2.

3.4.3 POLIADENILAZIONE DEI miRNA E SINTESI DEL cDNA

Al fine di eseguire un'adeguata qPCR, è stata adottata una strategia di adattamento poli (T) secondo Shi & Chiang (2005) sviluppando un protocollo ottimale. Con questo metodo, i microRNA contenuti nella frazione di *small-RNA* sono stati estesi aggiungendo una coda di poly (A) e successivamente convertiti in cDNA mediante reazione di trascrizione inversa (Fig.6).

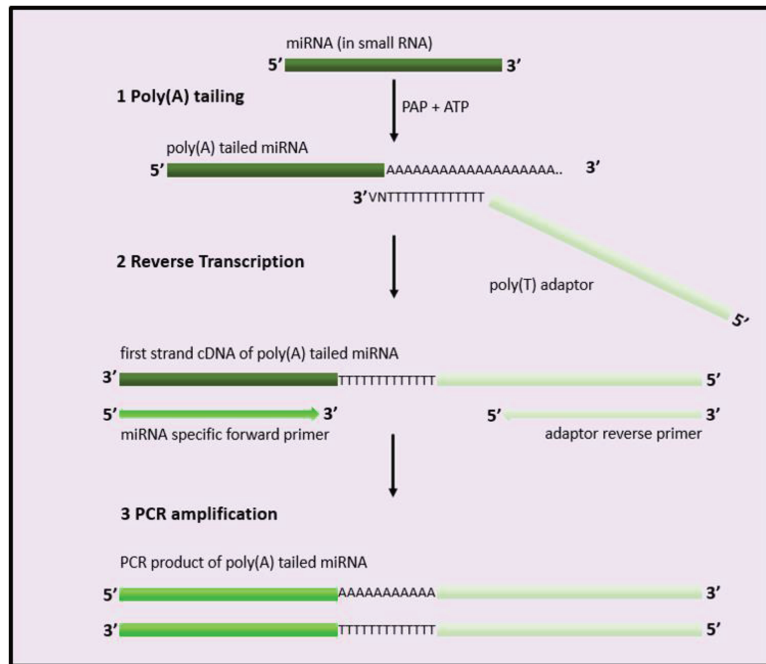


Figura 6 Poly (T) RT-PCR. 1: coda di Poly (A) nel miRNA; 2: Trascrizione inversa del miRNA dalla coda di poly (A) innescata dall'adattatore di poly (T); 3: Amplificazione mediante RT-PCR del primo filamento di cDNA usando un primer forward specifico per miRNA e un primer reverse complementare all'adattatore di poly (T)

(Huazhong University of Science and Technology)

Questa strategia ci ha permesso di superare alcune limitazioni metodologiche poiché, senza alcuna estensione, le sequenze dei miRNA sono troppo brevi e ciò non avrebbe permesso di effettuare una qPCR sufficientemente efficiente, tale da permettere l'analisi dell'espressione dei miRNA. L'aggiunta di poly (A) è stata eseguita utilizzando l'enzima *E.coli* poly(A) Polymerase (New England BioLabs, USA) seguendo le istruzioni riportate. Brevemente, per ciascun campione, una frazione di volume di *small-RNA* precedentemente trattata con DNasi, corrispondente a una concentrazione di 2 µg/µL, è stata aggiunta ad una miscela contenente 2 µl di Reaction Buffer, 2 µl di ATP (1 mM) e 1 µl di enzima *E. coli* poly (A) Polimerase, in un volume di reazione finale di 20 µl. La soluzione finale è stata infine collocata nel termociclatore con le seguenti condizioni cicliche: 70 ° C per 10 ", 37 ° C per

10", 65 ° C per 20 ". Al termine della poliadenilazione, è stata eseguita la sintesi del cDNA utilizzando un kit di trascrizione inversa specifico ad elevata capacità (ThermoFisher Scientific, USA). Una concentrazione di 2 µg/µl di frazione contenente microRNA poliadenilati, è stata aggiunta ad una master mix contenente 2 µl di tampone RT 10X, 5 µl di 100 uM oligo-dt adaptor, 0,8 µl di 10 mM dNTP mix , (2,5 mM ciascuno) e 1 µl di MultiScribe™ RT (50 U / µL) in un volume finale di 20 µl. In fine la miscela è stata incubata nel termociclatore con le seguenti condizioni cicliche: 25 ° C per 10 ", 37 ° C per 120", 85 ° C per 5 ". Infine, il cDNA è stato diluito 1:10. La sequenza dell'adattatore oligo-dt è riportata in Tab. 1.

3.4.4 REAL TIME PCR

La Reazione a Catena della Polimerasi (Polymerase Chain Reaction, PCR) è un metodo in vitro di amplificazione degli acidi nucleici. La PCR permette una sintesi esponenziale di un segmento di DNA a partire da un filamento di DNA stampo, utilizzando un enzima, la *DNA-polimerasi*, che lega le sequenze oligonucleotidiche costruite in modo tale da legarsi all'estremità della sequenza di interesse. La reazione prevede il susseguirsi di cicli di amplificazione realizzati grazie all'alternanza di specifici cicli di temperature. Le fasi che si possono distinguere, per ogni ciclo, sono tre: la denaturazione, l'appaiamento o *annealing* e infine l'estensione. La tecnica di PCR convenzionale è una tecnica qualitativa, infatti non è possibile correlare la quantità di prodotto finale con la quantità di DNA stampo presente inizialmente, perché nella fase finale l'efficienza della reazione può essere variabile. Uno sviluppo della tecnica di PCR consiste nella real-time PCR. La real-time PCR, o qPCR (PCR quantitativa), consente di quantificare la sintesi del prodotto di PCR ad ogni ciclo di

amplificazione in tempo reale. Questo permette di effettuare un'analisi quantitativa della quantità di DNA stampo iniziale. Il segnale che viene quantificato, è rappresentato dalla fluorescenza emessa dal fluoroforo, il SYBR Green, un colorante fluorescente in grado di legarsi alle molecole di DNA prodotte ad ogni ciclo di amplificazione. Il complesso DNA-SYBR[®] Green assorbe luce blu ad una lunghezza d'onda $\lambda_{max} = 488 \text{ nm}$ ed emette luce verde a una lunghezza d'onda $\lambda_{max} = 522 \text{ nm}$. (Fig.7)

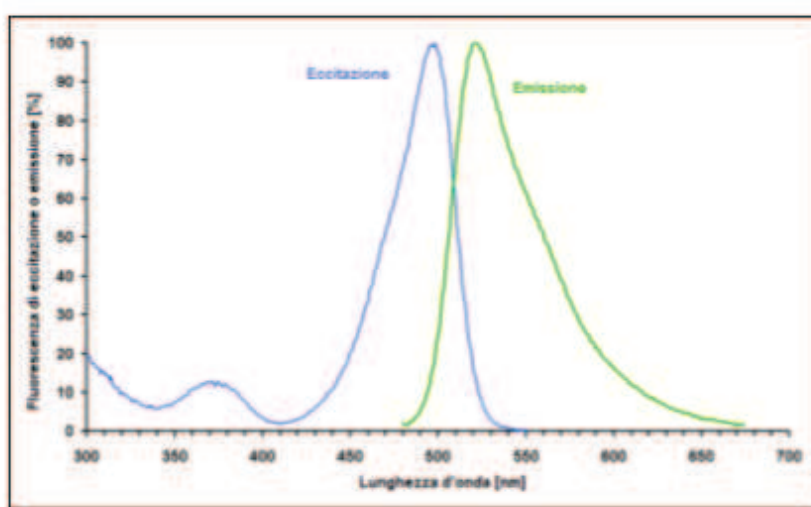


Figura 7: Spettro di eccitazione e di emissione dei SYBR Green

Le analisi di *Real-Time PCR* sono state condotte utilizzando un mix di reazione (Master Mix) per ogni gene target, ottenuto aggiungendo 5 μl di SYBR Green (Euroclone), 3,6 μl di H_2O , 0,2 μl di Primer Forward e 0,2 μl di Primer Reverse. 9 μl di questa Master Mix sono stati pipettati in ciascun pozzetto di strip da 8, ed in fine è stato aggiunto 1 μl di cDNA diluito 1:10 (o 1 μl di H_2O per I bianchi).

Le curve di melting costruite al termine della reazione di PCR descrivono la variazione della fluorescenza in funzione della temperatura; ogni amplificato di PCR ha la sua curva di

melting caratteristica. La quantificazione del segnale di fluorescenza di real-time PCR, è stata valutata mediante una quantificazione relativa, in quanto consente di determinare i cambiamenti di livello di espressione di un gene target, in più campioni, rispetto ad un controllo interno, ovvero un gene di riferimento che può essere co-amplificato insieme al target di interesse. Un gene di riferimento (*reference gene*) è un gene il cui livello di espressione rimane costante in tutti i campioni del test, e la cui espressione non è influenzata dal trattamento sperimentale di cui si vuole studiare gli effetti. L'impiego di un gene di riferimento è vantaggioso nei casi in cui non è possibile quantificare in maniera precisa il materiale di partenza e quando è disponibile solo una piccola quantità di templatino iniziale. In questo studio, il controllo dell'integrità dei cDNA e la loro normalizzazione sono state verificate tramite l'amplificazione di tre geni housekeeping (*reference gene*):

- Beta-actina
- GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)
- RPL13A (Ribosomal Protein L13A)

Gene	Forward Primer (5' - 3')	Reverse Primer (5' - 3')
β-actina	GCAGAAGGAGATCACATCCCTGGC	CATTGCCGTCACCTTCACCGTTC
GAPDH	GTGAAGGTCGGAGTCAACG	GGTGAAGACGGCCAGTGGACTC
RPL13A	TCTGGAGGACTGTAAGAGGTATGC	AGACGCACAATCTTGAGAGCAG

Tabella 1: geni housekeeping utilizzati nell'analisi di espressione genica mediante Real-Time PCR

Sono stati selezionati i seguenti miRNA:

miRNA	SEQUENCE
hsa-miR-181a-5p	AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGU
hsa-miR-93-5p	CAAAGUGCUGUUCGUGCAGGUAG
hsa-miR-202-5p	UUCCUAUGCAUAUACUUCUUUG
hsa-miR-130b-3p	CAGUGCAAUGAUGAAAGGGCAU
hsa-let-7g-5p	UGAGGUAGUAGUUUGUACAGUU
hsa-miR-34a-5p	UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU

Tabella 2: miRNA selezionati per questo studio

Sono stati selezionati i target dei precedentemente descritti miRNA con il software DIANA:

miRNA	Target Gene	Putative Function
hsa-miR-181a-5p	Acvr2a	Promuove la proliferazione delle cellule della granulosa
hsa-miR-93-5p	Cdkn1a	Promuove la proliferazione delle cellule della granulosa
hsa-miR-202-5p	HAS2, NLRP2	Indice di buona qualità degli embrioni
hsa-miR-130b-3p	SMAD5	Promuove la proliferazione delle cellule della granulosa e del cumulo
hsa-let-7g-5p	TGFBR1	Promuove l'apoptosi delle cellule della granulosa e atresia follicolare
hsa-miR-34a-5p	VEGFA, MCM3, TGFB1	Maturazione follicolare finale e luteinizzazione

Tabella 3: miRNA, geni target e loro rispettive funzioni

Gene	Forward Primer (5' - 3')	Reverse Primer (5' - 3')
<i>acvr11a</i>	CCTCGGACTTTAGGTGTCTGG	CCAAGTATAGCACCTGAAGAACA
<i>smad3</i>	GCCTGTGCTGGAACATCATC	TTGCCCTCATGTGTGCTCTT
<i>cdkn1a</i>	AGGTGGACCTGGAGACTCTCAG	TCCTCTTGGAGAAGATCAGCCG
<i>cdk2</i>	ATGGATGCCTCTGCTCTCACTG	CCCGATGAGAATGGCAGAAAGC
<i>has2</i>	GTCATGTACACAGCCTTCAGAGC	ACAGATGAGGCTGGGTCAAGCA
<i>nlrp2</i>	CATTCTGCGTCAAGCACTGTCG	CCGTCCAGAAAGGAAGCATGTG
<i>smad5</i>	CAGGAGTTTGCTCAGCTTCTGG	GGTGCTGGTTACATCCTGCCG
<i>tgfβ1</i>	GACAACGTCAGGTTCTGGCTCA	CCGCCACTTTCCTCTCCAAACT
<i>vegfa</i>	TTGCCTTGCTGCTCTACCTCCA	GATGGCAGTAGCTGCGCTGATA
<i>tgfβ1</i>	GCCGTGGAGGGGAAATTGAG	TGAACCCGTTGATGTCCACTT

Tabella 4: Primer dei geni target

3.4.5 ANALISI STATISTICA

Le pazienti incluse in questo studio sperimentale (34), sono state suddivise in tre gruppi sperimentali sulla base del trattamento ormonale a cui sono state sottoposte (uFSH, rFSH o FSH+LH). Con lo scopo di creare dei gruppi sperimentali distinti, e considerando tutte le variabili in esame, è stata effettuata una Cluster Analysis. La presenza di differenze statisticamente significative tra i gruppi in esame, in termini di espressione genica è stata indagata tramite One-Way ANOVA, seguita dal test di Tukey, utilizzando il software Prism6

(Graphpad Software, Inc.USA). I risultati sono riportati in termini di media e deviazione standard e la significatività statistica è stata settata a $p < 0.05$.

4. RISULTATI

Lo studio condotto in collaborazione con l'Ospedale Salesi di Ancona, ha preso in considerazione un pool costituito da 32 pazienti aventi un'età compresa tra 32 e 41 anni, un BMI normale, non fumatrici e non consumatrici di alcool, senza alcuna distinzione etnica.

Dati clinici

Tutti i dati relativi alle pazienti, che sono stati descritti in Materiali e Metodi, sono riportati in dettaglio nella Tabella 5:

	Età	BMI	ovo recuperati	gravidanza
uFSH	35.24 ± 4.29	24.69 ± 1.95	6.46 ± 2.19 ^a	26.67%
rFSH	35.9 ± 4.84	24.1 ± 2.06	5.83 ± 3.9 ^a	36.67%
FSH+LH	36.53 ± 2.94	23.73 ± 1.28	4.92 ± 1.89 ^b	18.75%

Tabella 5: Analisi dettagliata pazienti in esame

Dati sperimentali

I box charts di seguito riportati mostrano l'espressione dei miRNA, oggetto di questo studio, per ciascun gruppo sperimentale. Le differenti lettere sopra ciascun grafico indicano differenze statisticamente significative nei diversi gruppi. La significatività statistica è stata fissata a 0,05.

Per il miR-181a-5p, che inibisce la proliferazione delle cellule della granulosa utilizzando come gene target *acvr2a*, che a sua volta attiva la proteina SMAD3, si nota un'espressione significativamente più alta nel gruppo sperimentale trattato con uFSH, mentre non vi è variazione significativa tra i gruppi trattati con rFSH e FSH + LH (Fig.8).

L'andamento opposto dell'espressione di miR-181a-5p e *acvr2a* risulta coerente con i meccanismi di regolazione noti.

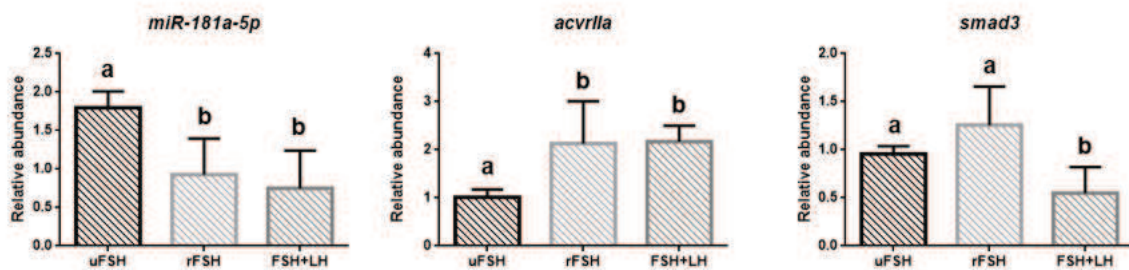


Figura 8 Espressione miR181a-5p e relativi geni target

Nel miR-93-5p, che promuove la proliferazione delle cellule della granulosa utilizzando come gene target *cdkn1a*, si nota una differenza statisticamente significativa tra il gruppo sperimentale trattato con rFSH, rispetto ai gruppi trattati con uFSH e FSH + LH, che non sono tra loro statisticamente differenti (Fig.9).

L'andamento opposto nell'espressione di miR-93a-5p e *cdkn1a* è in accordo con i meccanismi noti, così come tra *cdk2* e *cdkn1a*.

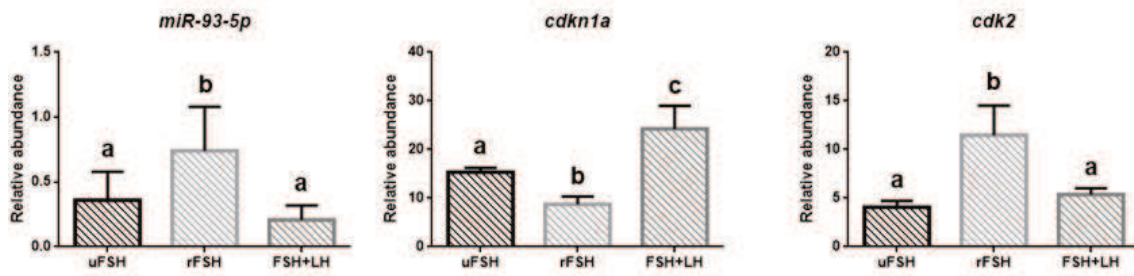


Figura 9 Espressione miR-93a-5p e relativi geni target

Il miR-202-5p, la cui espressione nelle cellule del cumulo ooforo è correlata con la qualità degli oociti, ha come geni target *has2* e *nlrp2*. Si nota un'espressione significativamente più alta nel gruppo sperimentale trattato con uFSH, rispetto agli altri due (rFSH e FSH + LH), non statisticamente differenti tra loro. Vi è un andamento opposto nell'espressione di miR-202-5p e *has2* ed un andamento simile con *nlrp2* in accordo con i meccanismi conosciuti (Fig.10).

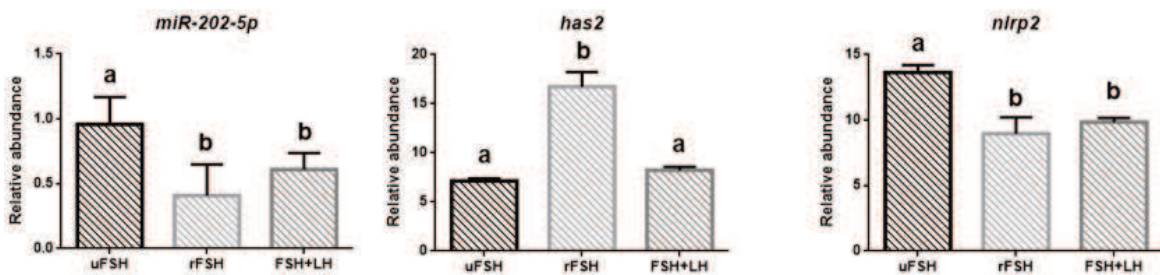


Figura 10 Espressione miR-202-5p e relativi geni target

Per il miR-130b-3p, che promuove la proliferazione delle cellule del cumulo ooforo e della granulosa utilizzando come gene target *smad5*, si nota un'elevata espressione nei gruppi trattati con uFSH e rFSH e variazione statisticamente significativa con il gruppo trattato con FSH + LH (Fig.11).

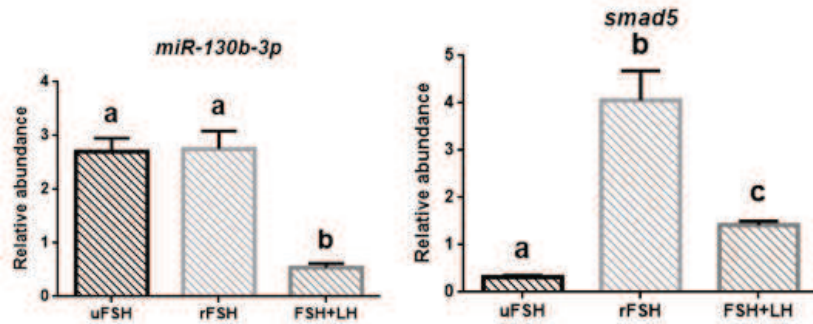


Figura 11 Espressione miR-130b-3p e relativo gene target

In *let-7g-5p*, che induce apoptosi delle cellule della granulosa e atresia follicolare utilizzando come gene target *tgfβr1*, si può osservare una differenza statisticamente significativa di espressione in tutti e tre i gruppi sperimentali (Fig.12).

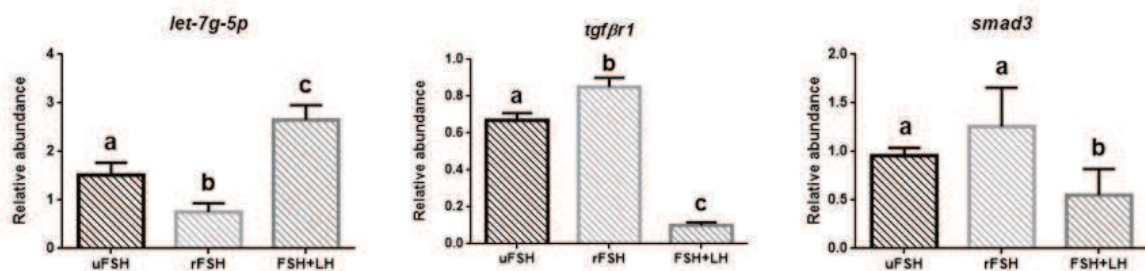


Figura 12 Espressione let-7g-5p e relativi geni target

L'ultimo miRNA, miR-34a-5p, coinvolto nella maturazione follicolare finale e nella luteinizzazione, evidenzia una differenza statisticamente significativa di espressione in tutti e tre i gruppi sperimentali con livelli maggiori nell'uFSH. Inoltre, si nota un andamento opposto dell'espressione tra miR-34a-5p e i rispettivi geni target (Fig.13).

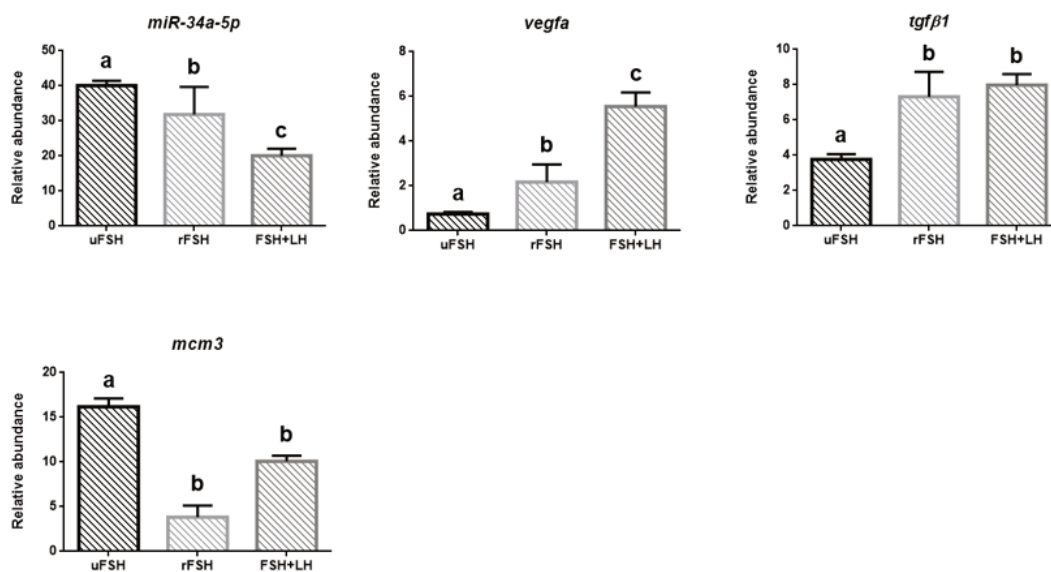


Figura 13 Espressione miR-34a-5p e relativi geni target

È stato dimostrato che i microRNA (miRNA) svolgono un ruolo chiave nella regolazione dell'attività cellulare, in quanto regolano l'espressione genica legandosi a geni target, portando quindi, all'inibizione della traduzione proteica o alla degradazione dell'mRNA. Molti pathway e processi cellulari sono risultati essere potenzialmente influenzati da questi miRNA.(Fig.14)

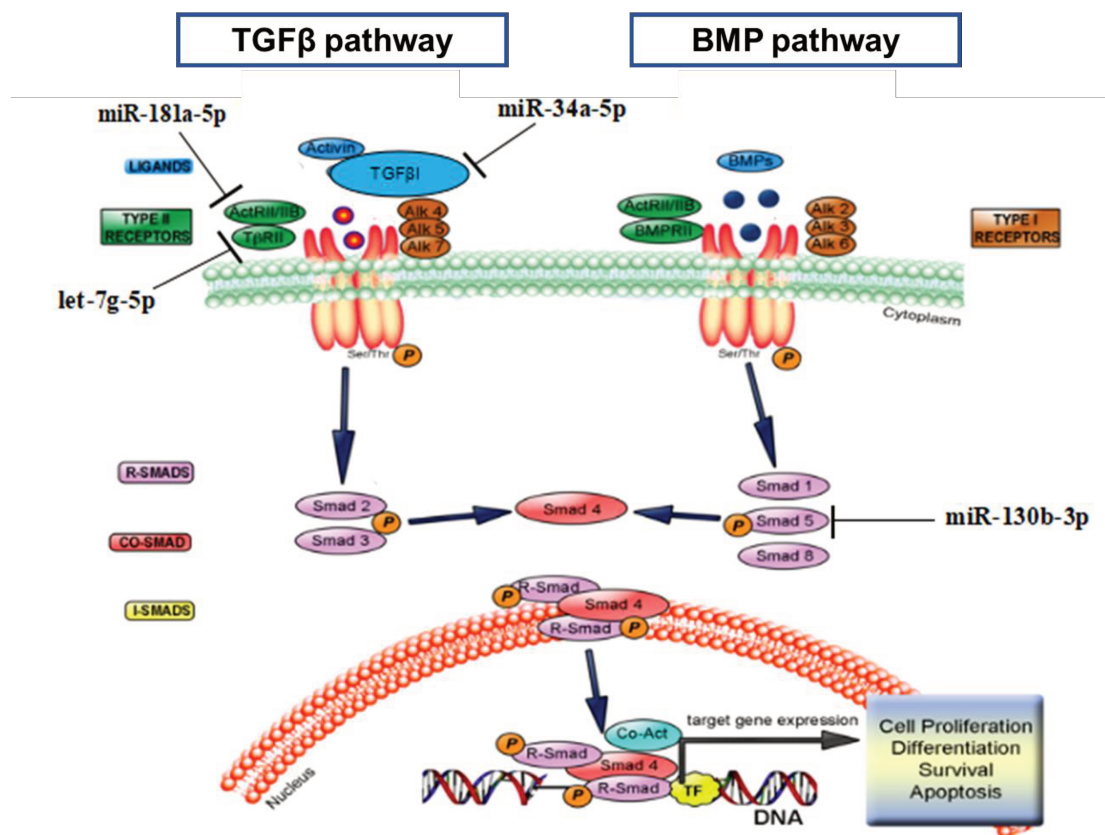


Figura 14 Pathway influenzati dai miRNA. miR-181a-5p, miR-34a-5p e let-7g-5p influenzano TGF-beta pathway. miR-130b-3p influenza BMP pathway

(Chapter 1 Role of TGF-β Signaling in Neurogenic Regions After Brain Injury Sonia Villapol, Trevor T. Logan, Aviva J. Symes)

5. DISCUSSIONE

Il potenziale sviluppo di un embrione dipende molto dalla qualità dell'oocita da cui esso è stato generato. Diversi fattori contribuiscono a renderlo qualitativamente eccellente e a permetterne il successivo sviluppo embrionale, tra cui la nutrizione, la regolazione ormonale e l'ambiente circostante, nonché processi mediati da interazioni tra l'ovario e le cellule somatiche circostanti (cellule del cumulo).⁽⁶²⁾ Per cui, affinché lo sviluppo follicolare e l'ovulazione procedano correttamente, è essenziale una comunicazione coordinata e bidirezionale mediata da un vasto numero di prodotti genici.

La scoperta di un ipotetico coinvolgimento dei miRNA nei meccanismi di comunicazione autocrina e paracrina all'interno del follicolo ovarico, ha rivelato che questi RNA non codificanti rappresentano importanti regolatori all'interno dei percorsi coinvolti nella follicologenesi e nella maturazione degli ovociti.⁽⁶³⁾ Per il loro potenziale ruolo significativo nella riproduzione, li possiamo quindi definire degli eccellenti candidati per una migliore comprensione delle attività molecolari che impediscono l'impianto e l'ulteriore sviluppo dell'embrione.⁽⁶⁴⁾ Alla luce di tali considerazioni, dalla collaborazione tra il reparto di Medicina della Riproduzione dell'Ospedale Salesi di Ancona ed il Laboratorio di Biologia dello Sviluppo e della Riproduzione dell'Università Politecnica delle Marche, è stato condotto questo progetto di ricerca, volto a comprendere e valutare i potenziali pathway che collegano i profili di specifici miRNA all'esito della fecondazione assistita.

In particolar modo, l'obiettivo è stato quello di stabilire se differenti trattamenti ormonali, precisamente uFSH (FSH urinario), rFSH (FSH ricombinante) e FSH combinato con LH, possano avere degli effetti sull'espressione dei miRNA e, di conseguenza, sulla gametogenesi.

A tale scopo, si è deciso di basare lo studio sull'utilizzo delle cellule del cumulo. Queste, infatti, nonostante siano considerate "materiale di scarto" nei laboratori di fecondazione assistita, sono fondamentali nel mantenimento di un adeguato ambiente follicolare, nell'acquisizione della competenza ovocitaria e nel metabolismo degli ovociti. In particolare, le cellule del cumulo servono al trasferimento bidirezionale di precursori metabolici o di molecole regolatrici da e per l'ovocita, grazie alla presenza di giunzioni gap.

Per lo svolgimento del lavoro sono state selezionate 32 pazienti, che sono state sottoposte a fecondazione in vitro (IVF) presso l'Ospedale Salesi di Ancona, suddivise in tre gruppi sperimentali sulla base del trattamento di stimolazione ovarica indotto: uFSH, rFSH e FSH + LH.

È noto che le cellule del cumulo subiscono modificazioni in funzione dell'età della donna⁽⁶⁵⁾ e del BMI⁽⁶⁶⁾; pertanto per evitare bias nei risultati, sono stati analizzati questi parametri e si è visto che le loro variazioni all'interno dei gruppi sperimentali non sono significativamente differenti.

Un altro parametro molto importante che è stato preso in considerazione nel presente studio, è il numero di ovociti recuperati, che risulta essere inferiore nel gruppo sperimentale con trattamento ormonale FSH + LH, risultando pertanto in accordo, con il lavoro svolto da Smitz e collaboratori nel 2007, in cui dimostrarono che la stimolazione ovarica indotta con FSH+LH (Menopur) comporta un minor recupero di ovociti.⁽⁶⁷⁾

Il numero di ovociti recuperati, è associato ad un numero maggiore di nascite e di conseguenza ad un maggior tasso di successo della fecondazione assistita, come riportato da Ji e collaboratori (2013), tuttavia in questo specifico studio non è stata evidenziata correlazione tra numero di ovociti recuperati e percentuale di gravidanze ottenute, infatti, il gruppo sperimentale trattato con uFSH è stato quello che ha mostrato un maggior recupero

del numero di ovociti (6.46 ± 2.19^a) mentre, per quanto riguarda la percentuale di gravidanza, il gruppo sperimentale trattato con FSH ricombinante, mostra un valore pari al 36.67%, che è significativamente più alto rispetto ai gruppi trattati con uFSH (26.67%) e FSH+LH (18.75%), in accordo con lo studio condotto da Godfarb e Desai (2003)⁽⁶⁸⁾

Nel particolare abbiamo visto che in termini di ovociti recuperati i tre trattamenti ormonali hanno generato tre differenti risultati:

- uFSH 6.46 ± 2.19
- rFSH 5.83 ± 3.9
- FSH+LH 4.92 ± 1.89

Il numero di follicoli ottenuti con il trattamento con FSH urinario o ricombinante non ha prodotto differenze significative mentre il risultato peggiore si è ottenuto con il trattamento con FSH accoppiato a LH. Data la differenza tra numero di ovociti recuperati e percentuale di gravidanze ottenute, abbiamo deciso di basarci solo sul recupero degli ovociti, in quanto, nell'instaurarsi di una gravidanza possono influire anche altri fattori, come ad esempio la componente maschile, non trattata in questo specifico studio e la recettività dell'endometrio. La via di segnalazione di Transforming Growth Factor- β (TGF- β) occupa un ruolo centrale nel controllo del destino cellulare durante l'embriogenesi. Come mostrato nella precedente Figura 14 la via di trasduzione di TGF- β è molto semplice: i ligandi TGF- β legano sulla superficie cellulare due recettori dotati di attività serintreonina chinasi (recettori di tipo I e II). L'interazione tra i due recettori porta all'attivazione, mediante fosforilazione, dei recettori Smad (RSmads). Le R-Smads a questo punto legano Smad4 e traslocano nel nucleo, dove regoleranno l'espressione di specifici geni bersaglio.

Prendendo in considerazione i diversi miRNA ed i loro rispettivi pathway biologici, risulta che per il miR-181a-5p, che inibisce la proliferazione delle cellule della granulosa

utilizzando come gene target *acvr2a* e attivando la proteina SMAD3, si nota un'espressione significativamente più alta nel gruppo sperimentale trattato con uFSH, mentre non vi è variazione significativa tra i gruppi trattati con rFSH e FSH + LH. Come riportato da Qun Zhang e collaboratori (2013), le attivine prodotte principalmente dalle cellule della granulosa nell'ovaio, sono indispensabili per lo sviluppo dei follicoli ovarici e per le funzioni riproduttive, poiché topi con delezioni genetiche dei componenti dell'attivina risultano sterili. In accordo con il suo ruolo di silenziamento del target, miR-181a-5p mostra un andamento di espressione opposto rispetto al suo gene target *acvr2a*, indicando che miR-181a-5p potrebbe svolgere un ruolo importante nello sviluppo del follicolo ovarico. In relazione al fatto che il maggior numero di ovociti recuperati si è verificato nel trattamento con FSH urinario, è possibile ipotizzare un effetto di tali trattamenti ormonali sull'espressione dei miRNA. In particolar modo, il miR181a-5p ha mostrato un livello di espressione nettamente maggiore nei campioni trattati con uFSH, rispetto a quelli trattati con rFSH e FSH+LH, suggerendo un suo possibile coinvolgimento nel reclutamento di un numero maggiore di ovociti.

È noto che miR-93-5p promuove la proliferazione delle cellule della granulosa utilizzando come gene target *cdkn1a*, il profilo di espressione ha mostrato un andamento opposto rispetto l'espressione del gene target *cdkn1a*. Questo risultato è in linea con uno studio condotto da Jiang L e collaboratori (2015) in cui si osserva che la sovraespressione di miR-93-5p porta ad una notevole riduzione dei livelli di *cdkn1a*, mentre l'inibizione dello stesso ha aumentato i livelli di espressione del gene target. Questi risultati hanno indicato pertanto che, *cdkn1a* è un bersaglio diretto di miR-93-5p nelle cellule della granulosa dimostrando, inoltre, che miR-93-5p è espresso ad alti livelli nelle donne con PCOS e promuove la proliferazione delle cellule della granulosa, il che potrebbe spiegare la follicologenesi disordinata nella PCOS.

In relazione al ruolo dei trattamenti ormonali, il trend di espressione di miR-93-5p non sembra correlato con il numero di ovociti recuperati, essendo la sua espressione significativamente diversa tra l'FSH urinario e quello ricombinante, nonostante il numero di ovociti recuperati, non sia significativamente differente.

Con l'invecchiamento si assiste ad un naturale declino della fertilità a causa della diminuzione della qualità degli ovociti e della riserva ovarica. A tal proposito è stato determinato il livello di espressione del miR-202-5p, e di un suo gene target *has2* (hyaluronic acid synthase 2), il quale nelle cellule del cumulo ooforo, è correlato alla qualità degli oociti. Si nota, infatti, un'espressione significativamente più alta nel gruppo sperimentale trattato con uFSH. Come confermato nello studio condotto da F. Cillo e collaboratori (2007), l'espressione di *has2* è controllata da *gdf9* (fattore di differenziazione della crescita), membro della superfamiglia TGF- β , il quale a sua volta attiva specificatamente SMAD2 e SMAD3. In tale studio è stato possibile osservare concordanza tra i livelli d'espressione di miR-202-5p e le proteine SMAD. L'espansione del cumulo è correlata alla qualità degli ovociti e *has2* controlla la produzione di ialuronano, che è uno dei componenti principali della matrice extracellulare secreta dalle cellule del cumulo. Poiché *has2* è fortemente espresso nelle cellule del cumulo in risposta all'effetto combinato di FSH e GDF9, e quest'ultimo è secreto dall'ovocita, non sorprende che questa espressione genica sia associata alla qualità degli ovociti. Per cui alti livelli nelle cellule del cumulo sono indice di buona qualità. miR-202-5p ha mostrato livelli di espressione significativamente più elevati nelle donne sottoposte a trattamento ormonale con uFSH, risultando, invece, meno espresso nei restanti due gruppi tratti con rFSH e FSH+LH i quali non mostrano tra loro alcuna differenza statisticamente significativa.

La steroidogenesi è una delle principali funzioni delle cellule associate agli ovociti durante lo sviluppo follicolare e si ritiene che le cellule del cumulo utilizzino colesterolo lipoproteico ad alta densità per la steroidogenesi. A tal proposito svolge un ruolo chiave il miR-130b-3p la cui sovra-espressione promuove la proliferazione delle cellule del cumulo e della granulosa, utilizzando come gene target *smad5*; inoltre, la sua modulazione altera la produzione di lattato e la biosintesi di colesterolo nelle cellule del cumulo. In questo studio si nota un'elevata espressione di miR-130b-3p nei gruppi trattati con uFSH e rFSH. In accordo con lo studio condotto da Sinha PB e collaboratori (2017), la sovra-espressione di miR-130b-5p inibisce il livello di espressione di *smad5*, indicando che potrebbe essere coinvolto nella proliferazione delle cellule del cumulo e della granulosa, modulando i livelli di espressione del gene *smad5*. Bassi livelli di espressione di *smad5* promuovono la proliferazione cellulare; al contrario, alti livelli di espressione sono responsabili di bassa proliferazione cellulare. L'inibizione di miR-130b-5p riduce il tasso di proliferazione e il metabolismo. Il suo livello di espressione è apparso elevato nelle donne trattate con uFSH e rFSH, non mostrando quindi alcuna differenza statisticamente significativa tra i due gruppi. Nel terzo gruppo di donne, trattate con FSH+LH, i livelli di espressione di tale miRNA risultano significativamente più bassi suggerendo una correlazione con il minor numero di ovociti recuperati.

Il miR-let-7g-5p nel presente studio ha mostrato un livello di espressione diverso in tutti e tre i gruppi sperimentali. La sua espressione e quella del gene target *tgfβr1*, hanno mostrato un andamento opposto, in linea con gli studi effettuati da J. Zhou e collaboratori (2015) in cui si enuncia che let-7g-5p inibisce *tgfβr1*, più specificatamente reprime il percorso TGF-β/SMAD nelle cellule della granulosa, inducendo apoptosi e atresia follicolare. Il trend di espressione di let-7g-5p mostra che alti livelli di questo miRNA sono associati ad un basso

numero di ovociti recuperati, infatti la maggiore espressione si è ottenuta in cellule del cumulo provenienti da donne trattate con FSH+LH.

L'ultimo miRNA in esame, miR-34a-5p, coinvolto nella maturazione follicolare finale e nella luteinizzazione, ha mostrato una differenza statisticamente significativa di espressione in tutti e tre i gruppi sperimentali; inoltre è stato individuato un andamento opposto dell'espressione tra miR-34a-5p e i rispettivi geni target quali *vegfa*, *tgfb1* e *mcm3*. Questo risultato è in linea con uno studio condotto da G. M. Yerushalm e collaboratori (2018) in cui si osserva un'inibizione dei geni target da parte di tale miRNA, in particolar modo, *vegfa* viene inibito durante l'ovulazione attraverso miR-34a-5p e *tgfb1*. L'alta espressione di miR-34a-5p in CC da pazienti trattate con uFSH suggerisce un ruolo positivo di questo sul numero di ovociti recuperati.

Le evidenze sperimentali ottenute mostrano come l'espressione dei vari miRNA sia correlata al trattamento ormonale, in particolar modo a quello con uFSH, che ha determinato nella coorte di pazienti in esame il recupero del maggior numero di ovociti.

6. CONCLUSIONI

La comunicazione tra l'ovocita e le cellule follicolari circostanti, rappresenta un requisito fondamentale nel sistema riproduttivo, in cui svolgono un ruolo fondamentale i miRNA, interruttori molecolari in grado di regolare l'espressione genica legandosi a sequenze complementari di specifici geni target. Il presente studio riporta l'espressione e le funzioni di alcuni miRNA a livello delle cellule follicolari e dei loro rispettivi pathway, in relazione ai diversi trattamenti ormonali, suggerendo che tali miRNA rappresentano degli eccellenti candidati nella ricerca, per una migliore comprensione delle attività molecolari che impediscono l'impianto ed il successivo sviluppo embrionale.

Lo studio dei profili di espressione dei miRNA, in funzione ai trattamenti ormonali, ha rivelato una differenza sostanziale nei loro trend di espressione nelle donne sottoposte ad iperstimolazione ovarica con uFSH, rFSH e FSH+LH. In particolare, è stato possibile osservare che i trattamenti con FSH urinario e ricombinante, svolgono un ruolo analogo a livello clinico, in quanto portano ad un recupero simile di ovociti, non vi è infatti una differenza statisticamente significativa. Tuttavia, considerando i risultati ottenuti con i tre trattamenti, si può ipotizzare che l'FSH urinario sia il trattamento ormonale che conduce al recupero del maggior numero di ovociti, di contro è l'utilizzo dell'FSH combinato all'LH, sembra essere meno efficace. Il presente studio ha dimostrato che l'iperstimolazione ovarica porta a cambiamenti nell'abbondanza relativa dei miRNA presi in esame, stabilendo quindi dei collegamenti tra la segnalazione ormonale e l'espressione dei miRNA presenti nelle cellule del cumulo. Quest'ultimi rappresentano quindi, degli importanti regolatori all'interno dei percorsi coinvolti nella follicologenesi e di conseguenza nell'ovulazione, gettando le basi per un nuovo interrogativo sui ruoli che specifici miRNA possono svolgere nell'oovogenesi.

Pertanto, la conoscenza della loro regolazione e quella dei loro targets rappresenta un punto di partenza molto interessante per futuri trattamenti di casi specifici di infertilità.

Tali nuove conoscenze e metodologie da applicare a futuri studi sui miRNA potrebbero fornire nuovi *biomarcatori* dell'infertilità femminile in grado di regolare la fisiologia ovarica, la qualità dell'ocita e dell'embrione. Tutto ciò porta a credere che una migliore comprensione della funzionalità dei miRNA ovarici, potrebbe portare ad una nuova "era" della salute riproduttiva femminile.

Bibliografia

1. Lindsay TJ, Vitrikas KR2. "Evaluation and treatment of infertility". *Am Fam Physician*. 2015 Mar 1;91(5):308-14
2. Koot YE, Macklon NS Embryo implantation: biology, evaluation, and enhancement. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2013 Aug;25(4):274-9
3. Machtinger R, Racowsky C. "Morphological systems of human embryo assessment and clinical evidence". *Reprod Biomed Online*. 2013 Mar;26(3):210-21.
4. Hutt KJ, Albertini DF "An oocentric view of folliculogenesis and embryogenesis". *Reprod Biomed Online*. 2007 Jun;14(6):758-64.
5. Tesfaye D, Gebremedhn S, Salilew-Wondim D, Hailay T, Hoelker M, Grosse-Brinkhaus C, Schellander K "MicroRNAs: tiny molecules with a significant role in mammalian follicular and oocyte development". *Reproduction*. 2018 Mar;155(3):R121-R135.
6. Irma V., Anders S., Mikael K. and Thomas S. "MicroRNAs: From Female Fertility, Germ Cells, and Stem Cells to Cancer in Humans". *Stem Cells International* Volume 2016
7. Battaglia R., Vento ME., Borzi P., Ragusa M., Barbagallo D., Arena D., Purrello M., Di Pietro C. "Non-coding RNAs in the Ovarian Follicle". *Front Genet*. 2017 May 12;8:57.
8. Niakan KK, Han J, Pedersen RA, Simon C, Pera RA "Human pre-implantation embryo development". *Development*. 2012 Mar;139(5):829-41.
9. Furlong HC, Stämpfli MR, Gannon AM, Foster WG "Identification of microRNAs as potential markers of ovarian toxicity". *J Appl Toxicol*. 2018 May;38(5):744-752.

10. Nie M, Yu S, Peng S, Fang Y, Wang H, Yang X. "miR-23a and miR-27a promote human granulosa cell apoptosis by targeting SMAD5". *Biol Reprod.* 2015 Oct;93(4):98.
11. Lei L, Jin S, Gonzalez G, Behringer RR, Woodruff TK "The regulatory role of Dicer in folliculogenesis in mice". *Mol Cell Endocrinol.* 2010 Feb 5;315(1-2):63-73
12. Irma V., Anders S., Mikael K. and Thomas S. "MicroRNAs: From Female Fertility, Germ Cells, and Stem Cells to Cancer in Humans". *Stem Cells International* Volume 2016
13. J. Larry Jameson MD PhD; David M. "Endocrinology Adult and Pediatric: Reproductive Endocrinology, 6e"
14. Suh CS, Sonntag B, Erickson GF. "The ovarian life cycle: a contemporary view". *Rev Endocr Metab Disord.* 2002 Jan;3(1):5-12.
15. Gook DA, Edgar DH, Borg J, Martic M. "Detection of zona pellucida proteins during human folliculogenesis". *Hum Reprod.* 2008 Feb;23(2):394-402. Epub 2007 Nov 22.
16. Kidder GM, Mhawi AA. "Gap junctions and ovarian folliculogenesis". *Reproduction.* 2002 May;123(5):613-20.
17. Oktay K, Briggs D, Gosden RG. "Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in isolated human ovarian follicles". *J Clin Endocrinol Metab.* 1997 Nov;82(11):3748-51.
18. J. Larry Jameson MD PhD; David M. "Endocrinology Adult and Pediatric: Reproductive Endocrinology, 6e"
19. Gregory F. Erickson "Follicle Growth and Development" Vol 5, Chap 12

20. Vitt UA, Mazerbourg S, Klein C, Hsueh AJ. "Bone morphogenetic protein receptor type II is a receptor for growth differentiation factor-9". *Biol Reprod.* 2002 Aug;67(2):473-80.
21. Gregory F. Erickson "The Graafian Follicle: A Functional Definition"
22. Webb R, Nicholas B, Gong JG, Campbell BK, Gutierrez CG, Garverick HA, Armstrong DG. "Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle". *Reprod Suppl.* 2003;61:71-90
23. Miyano T, Manabe N. "Oocyte growth and acquisition of meiotic competence". *Soc Reprod Fertil Suppl.* 2007;63:531-8.
24. Stouffer RL, Xu F, Duffy DM "Molecular control of ovulation and luteinization in the primate follicle". *Front Biosci.* 2007 Jan 1;12:297-307.
25. Keith L. Moore T.V.N. Persuad Mark G. Torchia "Lo sviluppo prenatale dell'uomo. Embriologia ad orientamento clinico".
26. A. Christensen, G. E. Bentley, R. Cabrera, H. H. Ortega, N. Perfito, T. J. Wu, and P. Micevych "Hormonal Regulation of Female Reproduction" *Horm Metab Res.* 2012 Jul; 44(8): 587–591.
27. Prince Henry's Institute of Medical Research, "The role of steroids in follicular growth", *Reprod Biol Endocrinol* 2006
28. Keith L. Moore T.V.N. Persuad Mark G. Torchia "Lo sviluppo prenatale dell'uomo. Embriologia ad orientamento clinico".
29. Tong XH, Xu B, Zhang YW, Liu YS, Ma CH "Research Resources: Comparative MicroRNA Profiles in Human Corona Radiata Cells and Cumulus Oophorus Cells

- Detected by Next-Generation Small RNA Sequencing”. *PLoS One*. 2014 Sep 4;9(9):e106706.
30. Van Soom A, Tanghe S, De Pauw I, Maes D, de Kruif A. “Function of the cumulus oophorus before and during mammalian fertilization”. *Reprod Domest Anim*. 2002 Jun;37(3):144-51.
31. Assou S, Anahory T, Pantesco V, Le Carrouer T, Pellestor F, Klein B, Reyftmann L, Dechaud H, De Vos J, Hamamah S “The human cumulus-oocyte complex gene-expression profile” *Hum Reprod*. 2006 Jul;21(7):1705-19.
32. Kidder GM¹, Mhawi AA. Gap junctions and ovarian folliculogenesis, *Reproduction* 2002 May;123(5):613-20.
33. Adriano Bompiani “Le tecniche di fecondazione assistita:una rassegna critica”
34. Christine X. Yeo, Robert B. Gilchrist and Michelle Lane. “Disruption of Bidirectional Oocyte-Cumulus Paracrine Signaling During In Vitro Maturation Reduces Subsequent Mouse Oocyte Developmental Competence”. *Biol Reprod*. 2009;80(5):1072-80
35. R.B. Gilchrist, L.J. Ritter, D.T. Armstrong. “Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals” *Anim Reprod Sci*. 2004 Jul;82-83:431-46.
36. Grisendi V, La Marca A. “Individualization of controlled ovarian stimulation in IVF using ovarian reserve markers: from theory to practice”. *Minerva Ginecol*. 2017 Jun;69(3):250-258.
37. Capalbo A, Rienzi L, Buccheri M, Maggiulli R, Sapienza F, Romano S, Colamaria S, Iussig B, Giuliani M, Palagiano A, Ubaldi F. “The worldwide frozen embryo reservoir: methodologies to achieve optimal results”. *Ann N Y Acad Sci*. 2011 Mar;1221:32-9.

38. Ji J, Liu Y, Tong XH, Luo L, Ma J, Chen Z. “The optimum number of oocytes in IVF treatment: an analysis of 2455 cycles in China”. *Hum Reprod.* 2013 Oct;28(10):2728-34.
39. Gallos I. Eapen A. “Controlled ovarian stimulation protocols for assisted reproduction: a network meta-analysis” Published online 2017 Mar 9
40. Herjan J.T., Coelingh B. “Fertilità: ormone FSH ricombinante più efficace dell’FSH urinario”. *Fertility and Sterility*, vol. 69, n. 1
41. David K Gardner, Ariel Weissman, Colin M Howles, Zeev Shoham “Drugs used for ovarian stimulation: Clomiphene citrate, aromatase inhibitors, metformin, gonadotropins, gonadotropin-releasing hormone analogs and recombinant gonadotropins” June 2012
42. O'Doherty AM, O'Brien YM, Browne JA, Wingfield M, O'Shea LC “Expression of granulosa cell microRNAs, AVEN and ATRX are associated with human blastocyst development” *Mol Reprod Dev.* 2018 Nov;85(11):836-848
43. Assou S, Al-edani T, Haouzi D, Philippe N, Lecellier CH, Piquemal D, Commes T, Aït-Ahmed O, Dechaud H, Hamamah S “microRNAs: new candidates for the regulation of the human cumulus-oocyte complex”. *Hum Reprod.* 2013 Nov;28(11):3038-49.
44. Tannaz Toloubeydokhti, M.D., Postdoctoral Fellow, Orhan Bukulmez, M.D., Assistant Professor, and Nasser Chegini, Ph.D., Professor “Potential regulatory functions of MicroRNAs in the ovary” *Semin Reprod Med.* 2008 Nov; 26(6): 469–478.
45. Claes Wahlestedt “Targeting long non-coding RNA to therapeutically upregulate gene expression”. *Nat Rev Drug Discov.* 2013 Jun;12(6):433-46.

46. Imbar T, Eisenberg I “Regulatory role of microRNAs in ovarian function ”. *Fertil Steril*. 2014 Jun;101(6):1524-30.
47. Gross N, Kropp J, Khatib H “Micro RNA signaling in embryo development”. *Biology (Basel)*. 2017 Sep 14;6(3).
48. Tesfaye D, Gebremedhn S, Salilew-Wondim D, Hailay T, Hoelker M, Grosse-Brinkhaus C, Schellander K. “MicroRNAs: tiny molecules with a significant role in mammalian follicular and oocyte development” *Reproduction*. 2018 Mar;155(3):R121-R135
49. Siomi H, Siomi MC. “On the road to reading the RNA-interference code” *Nature*. 2009 Jan 22;457(7228):396-404.
50. Sinha PB, Tesfaye D, Rings F, Hossien M, Hoelker M, Held E, Neuhoff C, Tholen E, Schellander K, Salilew-Wondim D.”MicroRNA-130b is involved in bovine granulosa and cumulus cells function, oocyte maturation and blastocyst formation”. *J Ovarian Res*. 2017 Jun 19;10(1):37
51. Tesfaye D, Gebremedhn S, Salilew-Wondim D, Hailay T, Hoelker M, Grosse-Brinkhaus C, Schellander K “Micro rnas: tiny molecules with a significant role in mammalian follicular and oocyte development” *Reproduction*. 2018 Mar;155(3):R121-R135.
52. Sinha PB, Tesfaye D, Rings F, Hossien M, Hoelker M, Held E, Neuhoff C, Tholen E, Schellander K, Salilew-Wondim D. “MicroRNA-130b is involved in bovine granulosa and cumulus cells function, oocyte maturation and blastocyst formation” *J Ovarian Res*. 2017 Jun 19;10(1):37.

53. Mingyue N, Song Y, Sha P, Ying F, Hongmei W. “miR-23a and miR-27a Promote Human Granulosa Cell Apoptosis by Targeting SMAD5” *Biology of Reproduction*, Volume 93, Issue 4, 1 October 2015, 98, 1-10
54. Tesfaye D, Gebremedhn S, Salilew-Wondim D, Hailay T, Hoelker M, Grosse-Brinkhaus C, Schellander K “Micro rnas: tiny molecules with a significant role in mammalian follicular and oocyte development” *Reproduction*. 2018 Mar;155(3):R121-R135.
55. Jiajie T, Albert H.H. C., Clement L.K. C. and Wai-Yee Chan “The Role of microRNAs in Ovarian Granulosa Cells in Health and Disease” *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019; 10: 174
56. Cillo F, Brevini TA, Antonini S, Paffoni A, Ragni G, Gandolfi F. “Association between human oocyte developmental competence and expression levels of some cumulus genes” *Reproduction*. 2007 Nov;134(5):645-50
57. Cutting AD, Bannister SC, Doran TJ, Sinclair AH, Tizard MV, Smith CA. “The potential role of microRNA in regulating gonadal sex differentiation in the chicken”. *Chromosome Res*. 2012 Jan;20(1):201-13.
58. Sinha PB, Tesfaye D, Rings F, Hossien M, Hoelker M, Held E, Neuhoff C, Tholen E, Schellander K, Salilew-Wondim D. “MicroRNA-130b is involved in bovine granulosa and cumulus cells function, oocyte maturation and blastocyst formation” *J Ovarian Res*. 2017 Jun 19;10(1):37.
59. Zhou J, Liu J, Pan Z, Du X, Li X, Ma B, Yao W, Li Q, Liu H “The let-7g microRNA promotes follicular granulosa cell apoptosis by targeting transforming growth factor- β type 1 receptor”. *Mol Cell Endocrinol*. 2015 Jul 5;409:103-12.

60. G. M. Yerushalmi “Characterization of the miRNA regulators of the human ovulatory cascade” *Scientific Reports* 23 October 2018
61. Molecular Genetics Laboratories (Genoma Group)
62. O'Doherty AM, O'Brien YM, Browne JA, Wingfield M, O'Shea LC “Expression of granulosa cell microRNAs, AVEN and ATRX are associated with human blastocyst development” *Mol Reprod Dev.* 2018 Nov;85(11):836-848
63. Jingjie L, Shaoyu W, and Zhengguang W. “Role of microRNAs in embryo implantation”. *Reprod Biol Endocrinol.* 2017 Nov 21
64. Battaglia R, Vento ME, Borzi P, Ragusa M, Barbagallo D, Arena D, Purrello M, Di Pietro C. “Non-coding RNAs in the Ovarian Follicle”. *Front Genet.* 2017 May 12;8:57
65. McReynolds S, Dzieciatkowska M, McCallie BR, Mitchell SD, Stevens J, Hansen K, Schoolcraft WB, Katz-Jaffe MG. “Impact of maternal aging on the molecular signature of human cumulus cells”. *Fertil Steril.* 2012 Dec;98(6):1574-80.e5.
66. Al-Edani T, Assou S, Ferrières A, Bringer Deutsch S, Gala A, Lecellier CH, Aït-Ahmed O, Hamamah S. “Female aging alters expression of human cumulus cells genes that are essential for oocyte quality” *Biomed Res Int.* 2014;2014:964614.
67. Smitz J, Andersen AN, Devroey P, Arce JC; MERIT Group. “Endocrine profile in serum and follicular fluid differs after ovarian stimulation with HP-hMG or recombinant FSH in IVF patients”. *Hum Reprod.* 2007 Mar;22(3):676-87.
68. Goldfarb JM, Desai N. “Follitropin-a versus human menopausal gonadotropin in an in vitro fertilization program” *Fertil Steril.* 2003 Nov;80(5):1094-9.

