



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea
Scienze Biologiche

IL PROFILO MOLECOLARE E METABOLICO DELLE CELLULE DELLA
GRANULOSA UMANE È CORRELATO AL DESTINO DEGLI OVOCITI?
NUOVE SCOPERTE REALIZZATE DALL'ANALISI DELLA
MICROSPETTROSCOPIA FTIR

Tesi di Laurea di:
di:

Antonio Di Bello

Docente Referente
Chiar.mo Prof.

Elisabetta Giorgini

Sessione Autunnale

Anno Accademico 2019/2020



INTRODUZIONE

Nella routine **ART** la selezione degli ovociti si basa principalmente sulle caratteristiche morfologiche del citoplasma, del corpo polare e delle cellule del cumulo.

ART è una routine che comprende procedure mediche utilizzate principalmente per affrontare l'infertilità, come la fecondazione in vitro o l'iniezione intracitoplasmatica di spermatozoi.

Tutti questi criteri per la classificazione e lo screening degli ovociti sono soggettivi e controversi, e non sembrano essere correlati alla competenza intrinseca dell'ovocita.

Informazioni utili possono derivare dallo studio delle **cellule della granulosa**, che svolgono un ruolo dominante nel regolare lo sviluppo e l'acquisizione di competenze dell'ovocita e nel mantenere il microambiente adatto



STUDIO DELLA TECNICA DELLA MICROSPETTROSCOPIA INFRAROSSA

La microspettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FTIRM) è una tecnica vibrazionale consolidata, ampiamente applicata a vari campi biomedici delle scienze della vita per scopi diagnostici.

L'accoppiamento della spettroscopia infrarossa (IR) con la microscopia a luce visibile offre la possibilità di rilevare, allo stesso tempo e sullo stesso campione, informazioni chimiche e biologiche uniche sulla composizione e sui blocchi strutturali del campione.

Infatti, l'analisi delle bande spettrali FTIR in termini di posizione, intensità e larghezza, permette di rilevare gruppi funzionali, tipi di legame e conformazioni delle molecole biologiche più rilevanti. Sono stati effettuati diversi studi sull'analisi FTIR dei gameti femminili.

Un tentativo di connettere il profilo metabolico dei mezzi in coltura visti nel vicino IR con la vitalità embrionale, si è tentato di eseguire, per la 1^a volta, l'analisi FTIRM di cellule della granulosa (GC) umane.

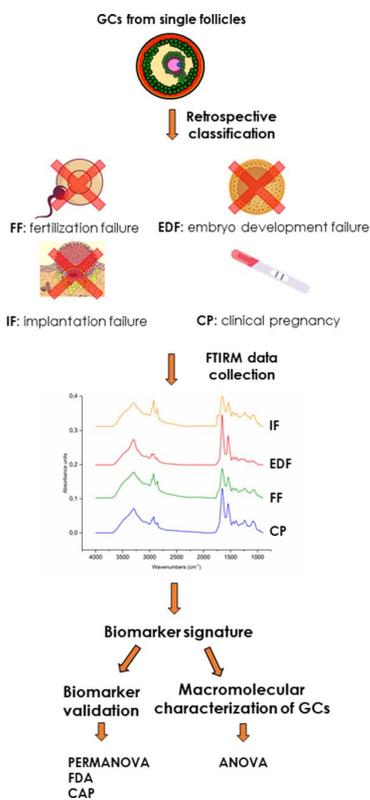


PROGETTAZIONE SPERIMENTALE

In totale, 284 campioni di GCs prelevati dai 55 pazienti iscritti sono stati classificati retrospettivamente secondo il corrispondente esito clinico degli ovociti nei seguenti gruppi sperimentali:

- FF: GCs da ovociti che non hanno supportato una normale fecondazione (N= 92).
- EDF: GCs da ovociti che si sviluppano in embrioni che si sono arrestati durante la coltura tra il 2°giorno e il momento del trasferimento (5° giorno o 6° giorno) (N= 113).
- IF: Cellula GCs da ovociti che si sviluppano in embrioni di buona qualità che non sono riusciti ad impiantarsi dopo il trasferimento (N= 56).
- CP: GCs da ovociti che si sviluppano in embrioni di buona qualità che hanno dato origine ad aCP dopo il trasferimento (N= 23).

Il processo metodologico dello studio è descritto nella figura adiacente.





RACCOLTA DATI FTIRM

L'analisi FTIRM è stata effettuata presso la IR beamline SSSI (Synchrotron Infrared Source for Spectroscopic and Imaging), Elettra-Sincrotrone Trieste, Italia. È stato utilizzato un microscopio Hyperion 3000 Vis-IR dotato di un rivelatore Hg-Cd-Te raffreddato ad azoto (MCT_A) e accoppiato ad un interferometro Vertex 70. Le sospensioni di GC sono state lasciate cadere con una pipetta Gilson su finestre ottiche di grado UV CaF₂ per l'analisi IR e poi lasciate ad asciugare a temperatura ambiente sotto una cappa biologica per 30min. Per ogni campione di GC, 30 zone con dimensioni 30x30 μm² contenenti monostrato cellulare densamente imballato sono stati selezionati al microscopio visibile. Su queste zone gli spettri IR corrispondenti sono stati acquisiti in modalità di trasmissione, con una fonte convenzionale GlowBar. Un obiettivo Schwarzschild 15x abbinato ad un condensatore 15x nella regione Mid-IR sono stati utilizzati. Ogni spettro è stato raccolto con una risoluzione spettrale di 4 cm⁻¹ nella gamma spettrale IR 4000-800 cm⁻¹ ed è stato il risultato di una media di 256 scansioni. Uno spettro di fondo è stato raccolto prima di ogni analisi del campione su una zona pulita della finestra ottica.



Su ogni spettro IR sono state individuate bande specifiche di rilevanza biologica. Per ciascuna di esse sono stati riportati l'intervallo spettrale corrispondente e l'assegnazione a specifici gruppi funzionali cellulari (Tabella I). Poi, per tutte queste bande, gli integrali di area sono stati ottenuti utilizzando il Modo di Integrazione B e utilizzati per calcolare specifici rapporti di area di banda (Tabella II).

Table I Spectral intervals of the main bands comprising granulosa cell infrared spectra, together with the related vibrational mode, assigned label and the cellular functional groups.

| Spectral Interval (cm ⁻¹) | Vibrational attribution | Label | Cellular features | Reference |
|---------------------------------------|--|-----------------|---|--|
| 2990–2836 | Symmetric and asymmetric CH _{2/3} stretching modes | Lipids | Saturated alkyl chains of cellular lipids (mainly) and proteins | Baker et al. (2014) |
| 3027–2995 | =CH stretching mode | CH | Unsaturated alkyl chains of lipids | Giorgini et al. (2014) |
| 2992–2948 | Asymmetric CH ₃ stretching mode | CH ₃ | Methyl groups of cellular lipids (mainly) and proteins | Sabbatini et al. (2013) |
| 2946–2889 | Asymmetric CH ₂ stretching mode | CH ₂ | Methylene groups of cellular lipids (mainly) and proteins | Sabbatini et al. (2013) |
| 1765–1723 | C=O ester moiety stretching | COO | Carbonyl ester of fatty acids | Gioacchini et al. (2014) |
| 1723–1591 | Mainly C=O stretching in peptide linkage, Amide I | AI | Cellular proteins | Baker et al. (2009) |
| 1591–1481 | Mainly C–N stretching and N–H deformation in peptide linkage, Amide II | All | Cellular proteins | Baker et al. (2009) |
| 1723–1481 | Sum of AI and All | Proteins | Cellular proteins | Baker et al. (2009) |
| 1480–1426 | CH _{2/3} bending | 1460 | Methyl and methylene groups of cellular lipids (mainly) and proteins | Conti et al. (2007) |
| 1426–1372 | Mainly CH ₃ symmetric stretching of protein chains | 1400 | Methyl groups of cellular lipids (mainly) and proteins | Caine et al. (2012) |
| 1273–1191 | Asymmetric stretching modes of phosphate groups | PhI | Phosphate moieties of nucleic acids (mainly), phospholipids and phosphorylated proteins | Giorgini et al. (2015), Tosi et al. (2010) |
| 2990–2899 and 1775–1191 | Sum of all the vibrations indicated above | Cell | Overall cellular biomolecular content | |

Table II Band area ratios calculated on the spectral intervals defined in Table I with their assigned label and biological significance.

| Band area ratios | Label | Biological significance |
|--|-----------|--|
| Lipids/Cell | LIP/CELL | Total cellular lipids |
| Proteins/Cell | PRT/CELL | Total cellular proteins |
| AmideI/AmideII | AI/All | Protein pattern |
| Lipids/Proteins | LIP/PRT | Lipids related to protein content |
| PhosphateI/Cell | PHI/CELL | Total cellular phosphate groups |
| PhosphateI/Proteins | PHI/PRT | Phosphate groups related to protein content |
| PhosphateI/Lipids | PHI/LIP | Phosphate groups related to lipid content |
| Carbonyl ester of fatty acids/Cell | COO/CELL | Total cellular fatty acids |
| Carbonyl ester of fatty acids/Lipids | COO/LIP | Ester moieties in lipids |
| 1400/Proteins | 1400/PRT | Methyl groups related to protein content |
| 1400/Lipids | 1400/LIP | Methyl groups related to lipid content |
| 1460/Proteins | 1460/PRT | Methyl and methylene groups related to protein content |
| 1400/1460 | 1400/1460 | Methyl and methylene proportion in aliphatic chains |
| 1460/Lipids | 1460/LIP | Methyl and methylene groups related to lipid content |
| Unsaturated alkyl chains of lipids/Cell | CH/CELL | Unsaturation levels in lipid chains |
| Unsaturated alkyl chains of lipids/Lipids | CH/LIP | Unsaturation levels in lipid chains |
| Unsaturated alkyl chains of lipids/Methyl groups of cellular lipids | CH/CH3 | Unsaturation levels in lipid chains |
| Methylene groups of cellular lipids/Lipids | CH2/LIP | Branching of lipid chains |
| Methylene groups of cellular lipids/Methyl groups of cellular lipids | CH2/CH3 | Branching of lipid chains |



FIRMA DEI BIOMARCATORI

Per la firma dei biomarcatori è stato costruito un set di dati bilanciati, chiamato DS1. A questo scopo, a causa delle diverse dimensioni di ciascun gruppo, sono stati selezionati 23 campioni scelti in maniera casuale per ogni gruppo.

Per identificare il sottoinsieme minimo dei rapporti di area di banda necessari e non ridondanti per segregare e caratterizzare i gruppi sperimentali CP, EDF, FF e IF, sono stati effettuati i seguenti approcci statistici su DS1:

Metodo «Leave-one-out» su FDA (Factorial Discriminant Analysis);

Metodo della Caratterizzazione Variabile;

Metodo di Regressione Logistica con il modello Multinomio Logit



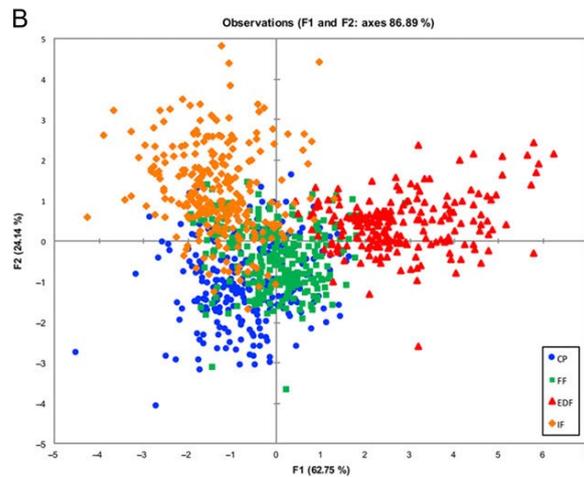
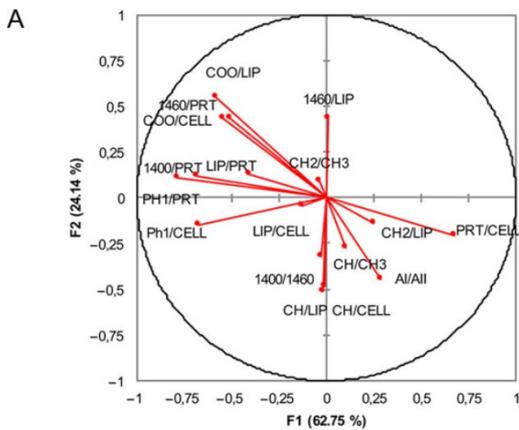
CONVALIDA DEI BIOMARCATORI

Per convalidare i biomarcatori selezionati sono state effettuate due analisi statistiche multivariate su un nuovo set di dati, denominato DS2, composto da 1043 righe, corrispondenti agli spettri IR su cui sono stati calcolati i rapporti di area di banda (290 per CP, 286 per FF, 200 per EDF e 267 per IF) e da 17 colonne, corrispondenti ai 17 biomarcatori spettrali selezionati. In particolare, le permutazioni multivariate ANOVA (PERMANOVA) e FDA sono state utilizzate utilizzando DS2. PERMANOVA utilizza le permutazioni per stimare la significatività statistica. La FDA ha permesso di determinare quali biomarcatori sono utili e necessari per discriminare le GC precedentemente classificate nei gruppi sperimentali.

Table III Pair-wise permutational multivariate ANOVA results.

| Groups | t | P(perm) | Unique perms | P(MC) |
|---------|--------|---------|--------------|-------|
| CP, IF | 8.0024 | 0.001 | 999 | 0.001 |
| CP, FF | 4.2377 | 0.001 | 997 | 0.001 |
| CP, EDF | 4.9418 | 0.001 | 999 | 0.001 |
| IF, FF | 5.5322 | 0.001 | 999 | 0.001 |
| IF, EDF | 5.6797 | 0.001 | 997 | 0.001 |
| FF, EDF | 2.8348 | 0.001 | 998 | 0.001 |

Results reported as: t, pseudo-t, calculated as the square root of pseudo-F; P(perm), permutation P value; P(MC), Monte Carlo P-value. CP, Granulosa cells (GCs) from oocytes, which gave clinical pregnancy; FF, GCs from oocytes, which failed fertilization; EDF, GCs from oocytes, which failed embryo development, and IF, GCs from oocytes, which failed implantation.





DISCUSSIONE

Un forte effetto perspicace di questi biomarcatori è stato identificato dall'analisi PERMANOVA, in termini di segregazione dei campioni di GC in CP, FF, EDF o IF.

Inoltre, l'analisi del diagramma dei punteggi FDA evidenzia una chiara separazione delle GC di CP e IF dalle GC di EDF e FF lungo l'asse F1 e quindi tra gli ovociti che sono in grado o meno di svilupparsi in embrioni. Inoltre, l'asse F2 ha separato le GC di CP da quelle di IF, e quindi gli embrioni che hanno portato ad una gravidanza da quelli che non sono riusciti ad impiantarsi.

I risultati delle tabelle I e II confermano la stretta relazione tra il destino degli ovociti e il microambiente follicolare, e gettano nuova luce sulle specifiche alterazioni biochimiche delle GC e su come queste influiscono sui diversi esiti clinici dei loro ovociti compagni. In particolare, la FF sembrava essere associata a una compromissione del metabolismo lipidico delle GC, con una maggior quantità di lipidi e catene alchiliche insature.

Tutti questi risultati dimostrano che le GC appartenenti a diversi gruppi sperimentali sono caratterizzati da specifici tratti macromolecolari, riconducibili a diverse caratteristiche biologiche e metaboliche.



CONCLUSIONE

Per concludere, questo è uno studio di prova di concetto che suggerisce il potenziale dell'FTIRM per identificare le differenze biochimiche nelle GC umane associate a ovociti con destini di sviluppo diversi. Come tale, in primo luogo, questo risultato iniziale dovrebbe essere convalidato con gruppi più ampi di campioni ottenuti da pazienti selezionati secondo gli stessi criteri di selezione. Poi si dovrebbe verificare l'applicabilità dei biomarcatori identificati per i campioni derivati da altre tipologie di pazienti, per valutare l'universalità della metodologia. Infine, la rilevanza clinica dell'approccio proposto dovrebbe essere testata in un RCT (Studio Controllato Randomizzato), prima dell'introduzione nella pratica clinica.