



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

Corso di Laurea
SCIENZE BIOLOGICHE

**FSH E LH RICOMBINANTI STIMOLANO LA FUNZIONALITÀ
MITOCONDRIALE NELLE CELLULE FOLLICOLARI IN
INVECCHIAMENTO**

**RECOMBINANT FSH AND LH ENHANCE MITOCHONDRIAL
FUNCTION IN AGING FOLLICULAR CELLS**

Tesi di Laurea di:
di:
NICOLE PAGANELLI

Docente Referente
Chiar.mo Prof.
FRANCESCA MARADONNA

Sessione ESTIVA

Anno Accademico 2025/2026



**FSH E LH RICOMBINANTI STIMOLANO LA
FUNZIONALITÀ MITOCONDRIALE NELLE
CELLULE FOLLICOLARI IN
INVECCHIAMENTO**

Introduzione

**Invecchiamento
ovarico**



processo naturale
riduzione riserva ovarica e qualità ovociti

Mitocondri



essenziali per approvvigionamento energetico e metabolismo
disregolazione porta a invecchiamento riproduttivo

FSH



agisce su cellule della granulosa
favorisce crescita follicolare e steroidogenesi

LH



produzione di androgeni da parte delle cellule della teca
maturazione e ovulazione

Scopo dello studio

QUESITO

Valutare l'impatto di FSH e LH ricombinanti sulla funzionalità mitocondriale e sul metabolismo delle cellule follicolari in modelli "aging"

Materiali e Metodi

IN VITRO

HGL5



- sub-culturing per fenotipo invecchiato
- incubazione con o senza supplementazione FSH/LH (150 IU)
- valutazione funzione mitocondriale: CellROS, MitoTracker Green, TMRM, MitoSOX e ATP, citometria a flusso
- valutazione morfologia e respirazione mitocondriale: saggi di funzionalità e Western Blot
- RNA cellule granulosa: Real-Time PCR
- analisi metaboliti: spettrometria di massa tandem

IN VIVO

MODELLO MURINO

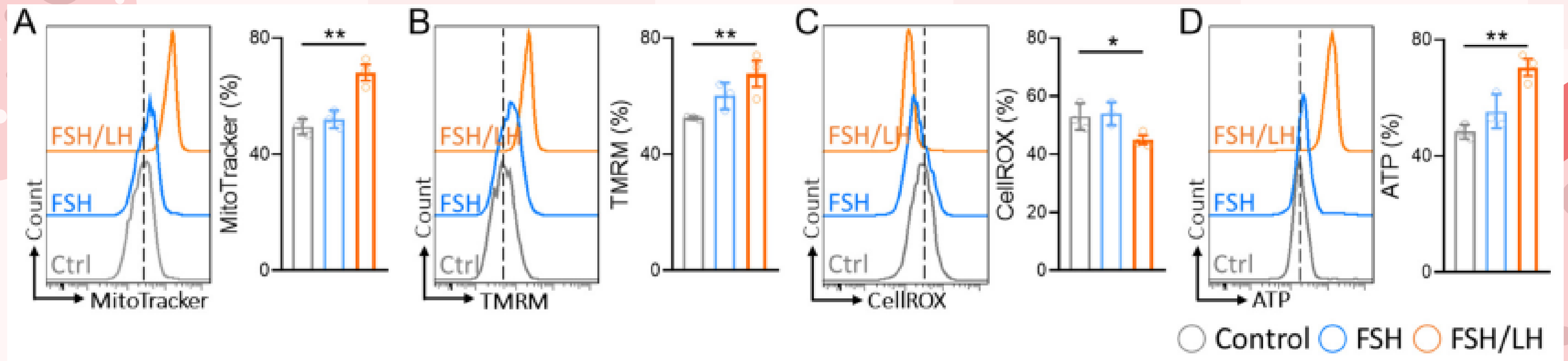


- C57BL/6J con età maggiore a 40 settimane per il fenotipo “aged”
- raccolta follicoli ovarici e poi ovociti isolati dal cumulo
- gruppo di controllo e trattato con supplementazione FSH/LH (150 IU)
- valutazione funzione mitocondriale: colorante TMRM
- valutazione stress ossidativo: MitoSOX e CellROX, microscopia a fluorescenza
- valutazione estrusione primo corpuscolo polare

Risultati

1. FSH/LH migliorano la funzione mitocondriale

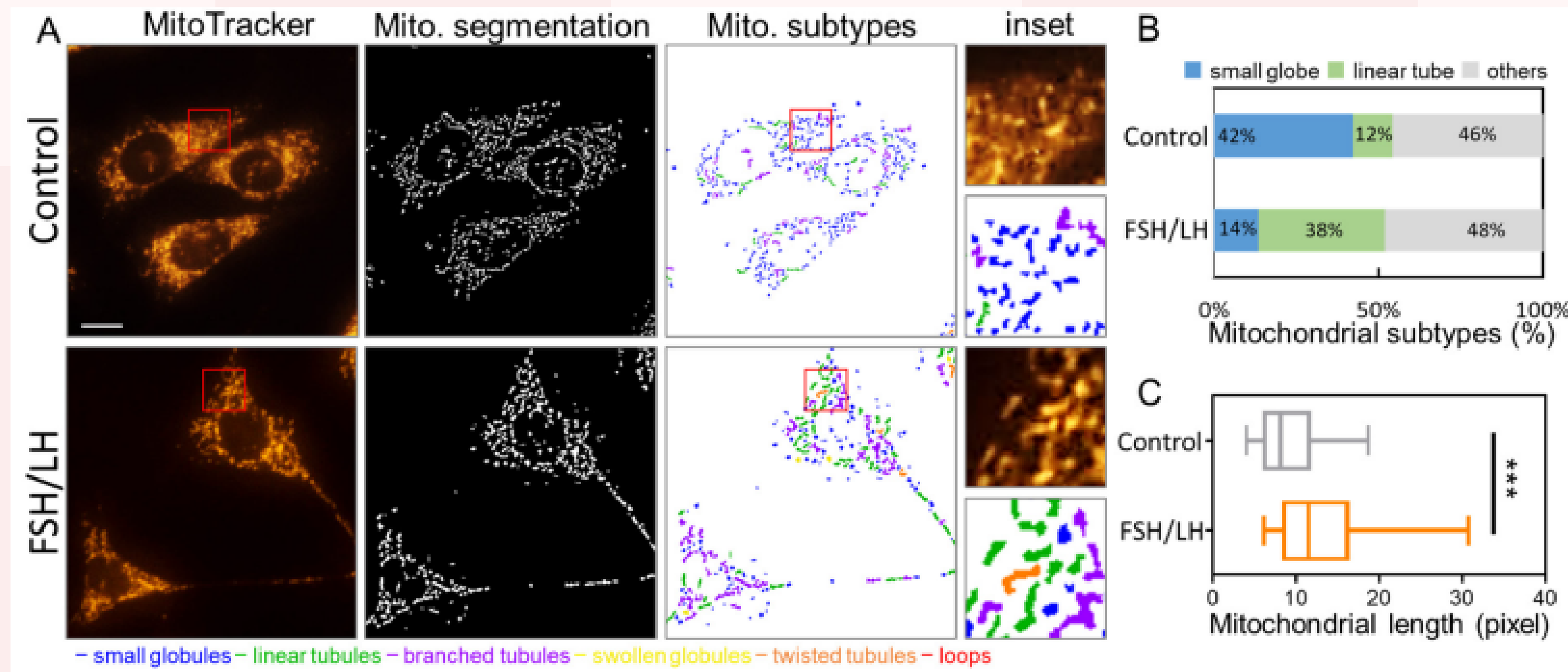
Si è notata una **conservazione** di circa il **70% della massa mitocondriale**, rispetto al gruppo invecchiato. Il potenziale di membrana mitocondriale (**MMP**), dopo il trattamento, è notevolmente **aumentato** ed è stato valutato tramite l'osservazione dell'intensità di fluorescenza del TMRM nelle cellule della granulosa. Tramite l'utilizzo di 2 coloranti fluorescenti si è notato come lo **stress ossidativo sia diminuito** rispetto al gruppo di controllo e che i **livelli di ATP siano aumentati di circa il 20%**.



Risultati

2. FSH/LH migliora lo squilibrio dinamico dei mitocondri

Per valutare la struttura mitocondriale è stato utilizzato un colorante specifico per i mitocondri, il **MitoTracker Red**. I risultati hanno mostrato una **riduzione dei detriti mitocondriali del 42%** e il trattamento ha determinato un **aumento dei mitocondri allungati dal 12% al 38%**. In generale hanno mostrato un netto allungamento rispetto al gruppo di controllo.



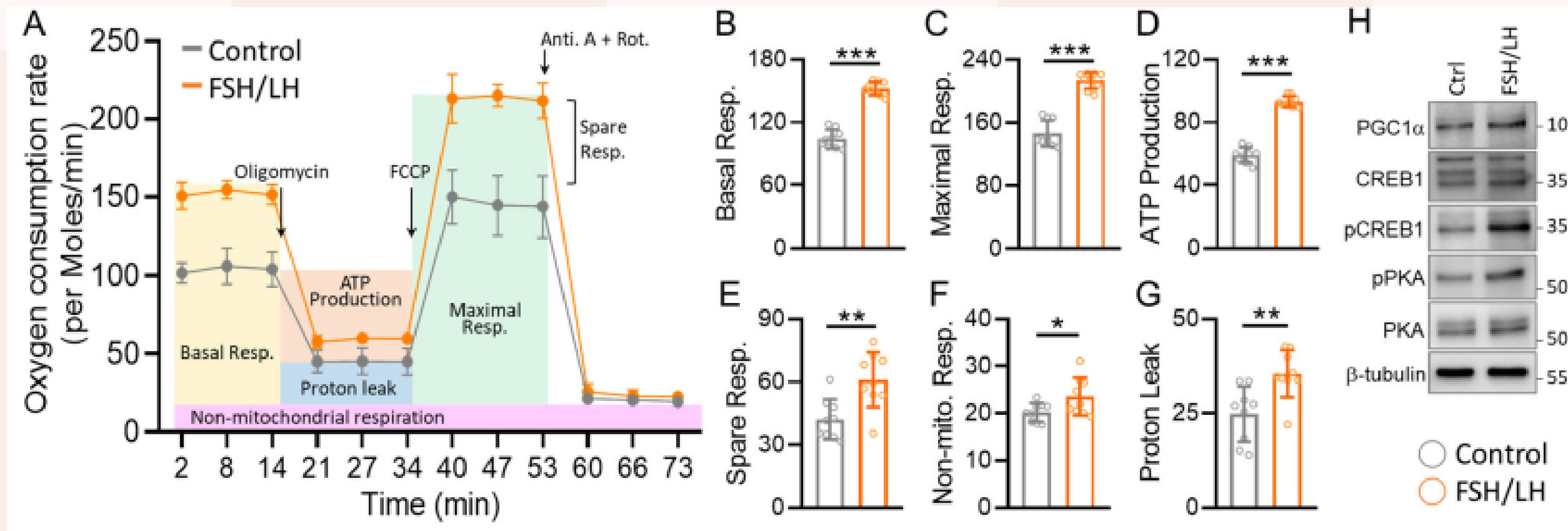
Risultati

3. FSH/LH potenzia biogenesi mitocondriale

Si è misurato in tempo reale il tasso di consumo di ossigeno (OCR). Dopo la stabilizzazione dei livelli basali sono stati introdotti: oligomicina (inibitore dell'ATP sintasi), FCCP (agente disaccoppiante che altera MMP), antimicina A e rotenone (inibitori del complesso III e I della catena di trasporto)

Le cellule trattate hanno evidenziato un miglioramento nella **respirazione massimale**, nella **produzione di ATP** e nella **capacità respiratoria di riserva**.

C'è stato anche un aumento delle proteine bioenergetiche correlate alla biogenesi mitocondriale.



Risultati

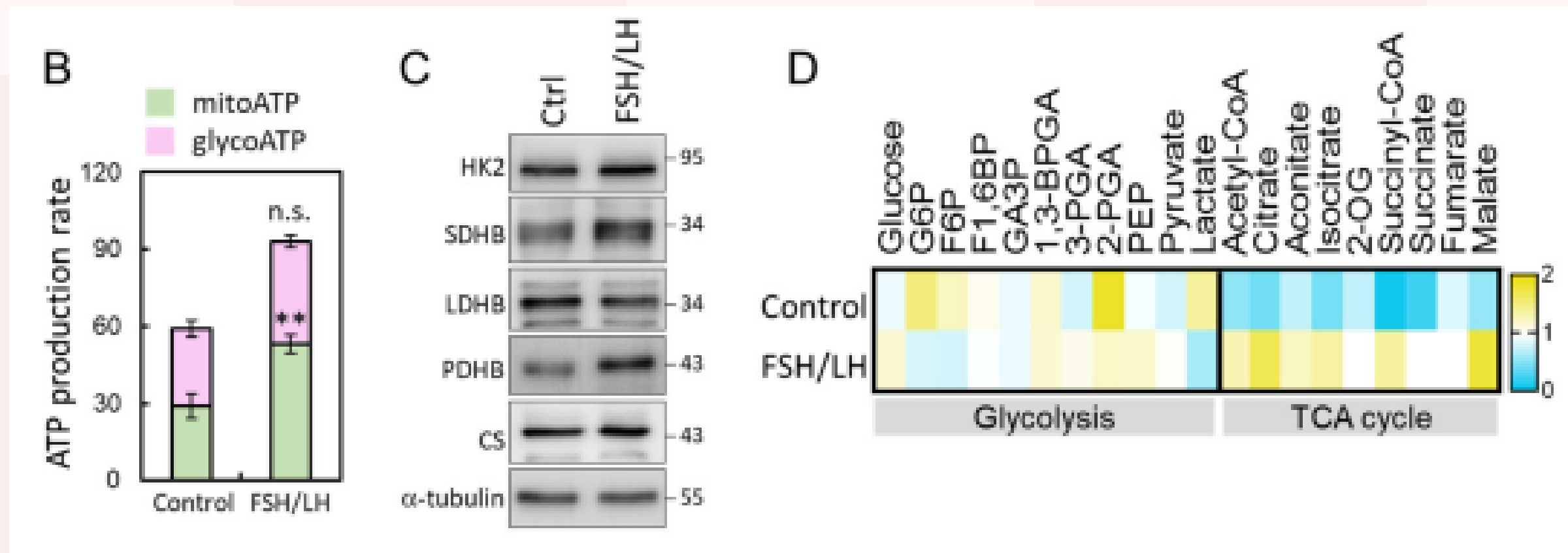
4. FSH/LH induce riprogrammazione del metabolismo cellulare

Si è analizzata l'espressione dei geni chiave della glicolisi e del ciclo di Krebs con PCR quantitativa e dopo il trattamento si è notato un **significativo aumento** rispetto al gruppo non trattato.

Si è anche analizzato il tasso di produzione di ATP mitocondriale (**mitoATP**) e di ATP glicolitico (glycoATP).

Il primo è aumentato **dal 28,7% al 53,1%**.

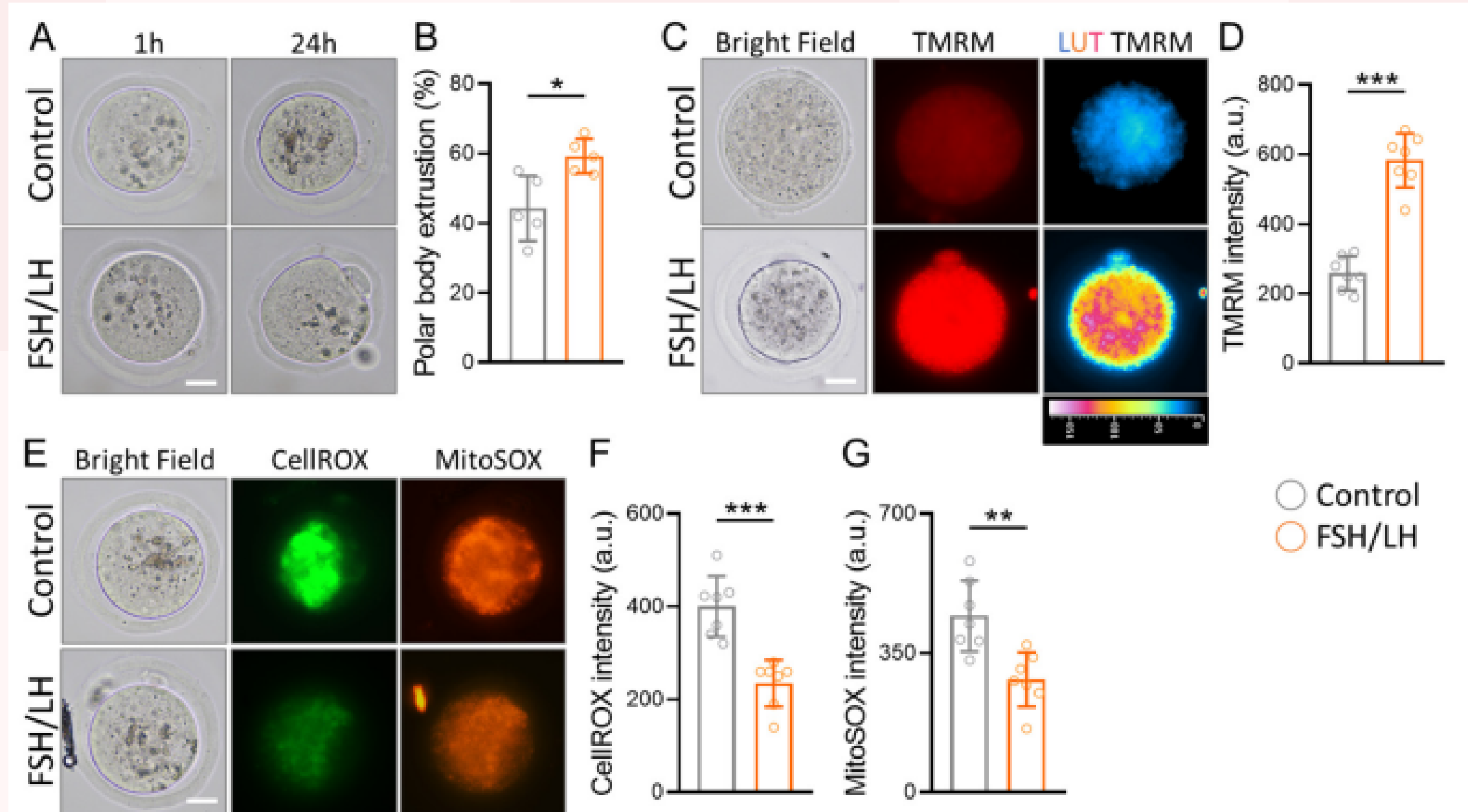
Anche l'analisi dei metaboliti ha evidenziato un aumento di quelli intermedi del ciclo di Krebs



Risultati

5. FSH/LH migliora qualità ovocitaria nei topi anziani

Si è valutata l'estrazione del primo globulo polare (PBE) e il trattamento ha aumentato il numero degli ovociti che hanno completato la maturazione. La funzione mitocondriale è stata misurata sfruttando l'intensità di fluorescenza di un colorante, che dopo il trattamento è aumentata significativamente. Per valutare i livelli di stress ossidativo si sono usati CellROX e MitoSOX e si è notata una riduzione dell'accumulo di ROS.



Discussione

I risultati hanno mostrato che la funzione mitocondriale è essenziale per ritardare il declino delle cellule della granulosa e degli ovociti in generale.

Il trattamento FSH/LH ha apportato grandi benefici, aumentando la respirazione cellulare e la produzione di ATP.

Molto importante la riduzione dello stress ossidativo e il ripristino dell'espressione dei geni coinvolti nel metabolismo nelle cellule invecchiate, che permettono ai mitocondri di mantenere uno stato "giovanile" rallentando il processo di invecchiamento

Discussione

L'innovazione di questo studio è stata sfruttare la sinergia di queste due gonadotropine per andare a migliorare la disfunzione mitocondriale correlata all'età.

Questa supplementazione potrebbe rappresentare un punto di svolta per migliorare gli esiti riproduttivi in donne in età avanzata sottoposte a tecniche di riproduzione assistita.

Saranno necessari altri studi per comprendere come potenziare le difese antiossidanti delle cellule invecchiate o come migliorarne la capacità di riparazione.



Grazie mille

Presentato da: Nicole Paganelli