



Università Politecnica delle Marche
Dipartimento Scienze della Vita e dell'Ambiente
Corso di Laurea in Scienze Biologiche

Insufficienza ovarica precoce: ripristino delle funzioni attraverso l'attivazione della via di segnalazione PI3K/AKT

Premature ovarian failure: functions restore through PI3K/AKT signaling pathway

Laureando:
Giovanna Alessia Robbe

Relatore:
Dott.ssa Francesca Maradonna

Sessione autunnale
Anno Accademico 2019/2020

PREMATURE OVARIAN FAILURE (POF)

- Insufficienza ovarica

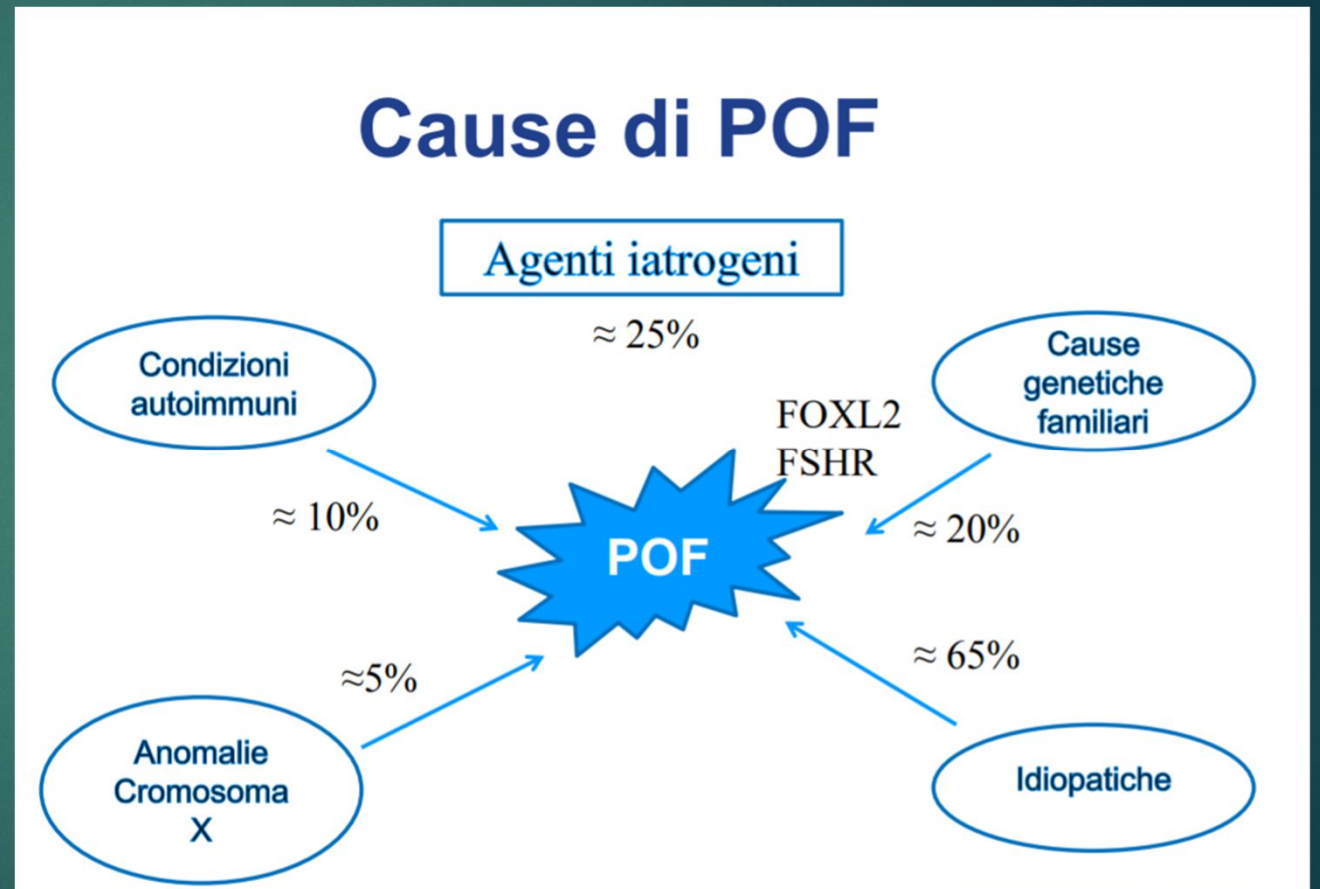


Amenorrea precoce

- Aumento FSH e una diminuzione dei livelli di E2 e AMH
- Deplezione oocitaria
- Apoptosi cellule della granulosa



Atresia follicolare

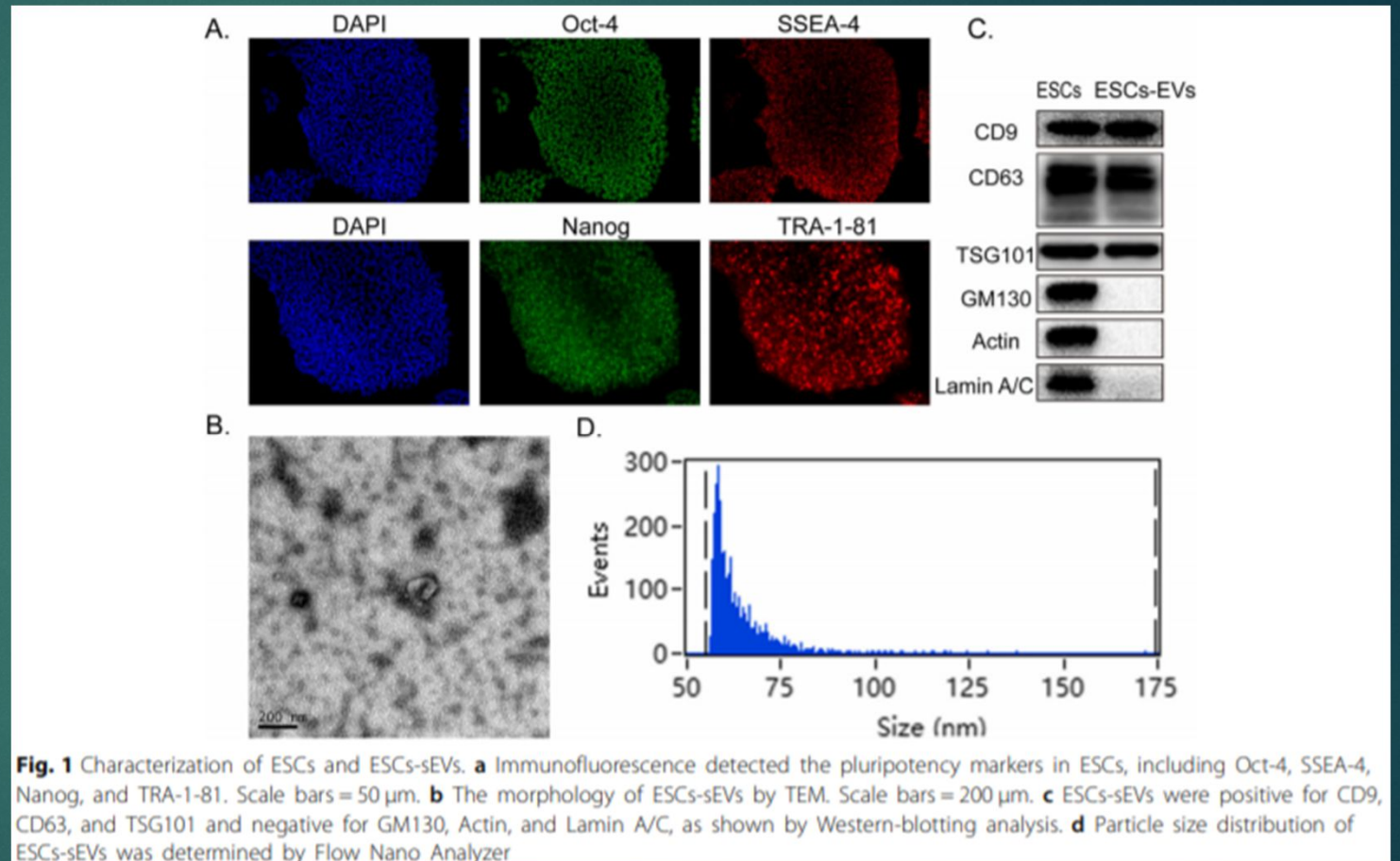


Scopo:

Piccole vescicole extracellulari derivanti da cellule staminali embrionali:
promettente candidato terapeutico?

Caratteristiche:

- Pluripotenza
- Unica capacità proliferativa
- Rigenerazione tessuti
- Autorinnovamento



L'analisi di immunoistochimica ha rivelato l'espressione di ESC con marcatori specifici legati alla **pluripotenza**, tra cui Oct4, SSEA4, Nanog e TRA-1-81

Modello:

Topi affetti da POF
ottenuti tramite
iniezione di
ciclofosfamide e
busulfano (farmaci
citotossici)



3 Gruppi di analisi:

- Control group
- CTX+BUS (topi affetti da POF)
- CTX+BUS+ESCs-sEVs (tramite iniezione intraperitoneale)

Materiali e Metodi:

- Test ELISA: variazione dei livelli di E2, FSH e AMH
- Immunofluorescenza: morfologia e identificazione delle cellule della granulosa
- Test TUNEL: identificazione cellule apoptotiche
- Western Blot: verificare l'espressione di PI3K/AKT e proteine apoptotiche-correlate

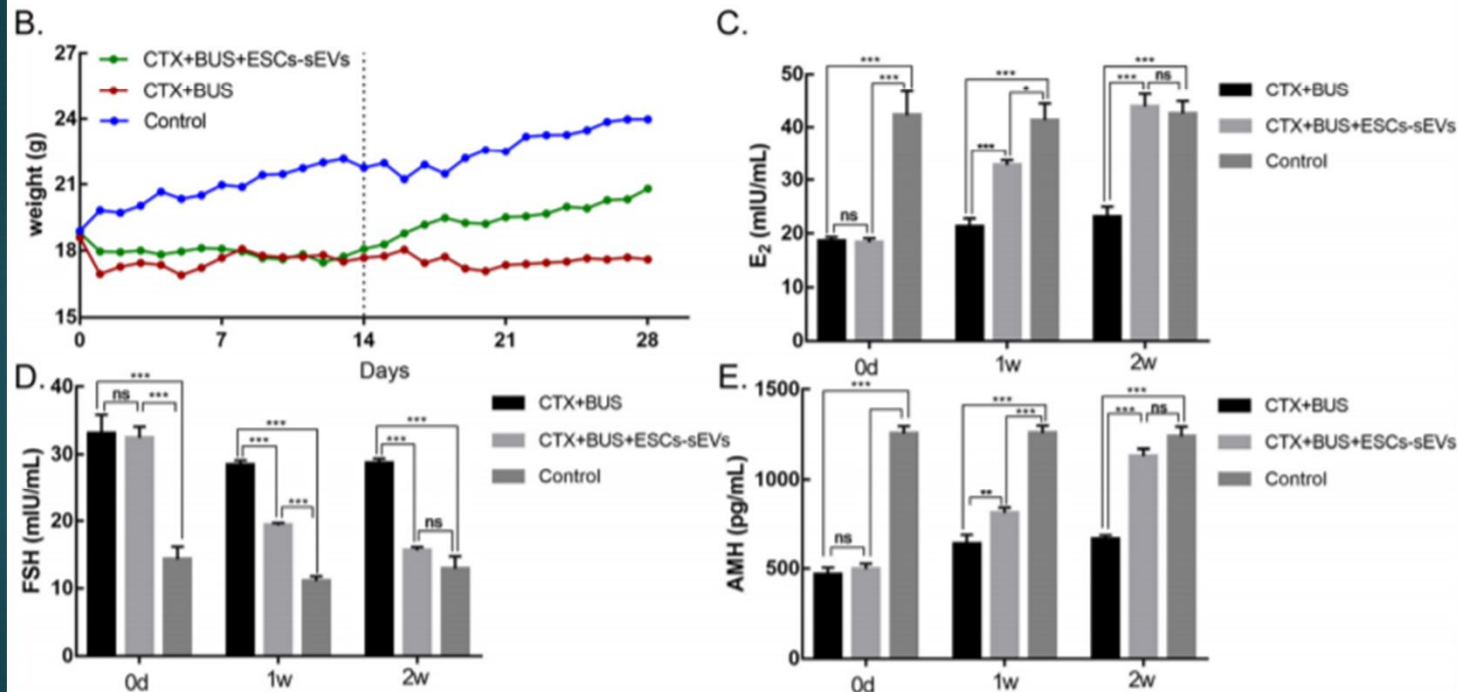
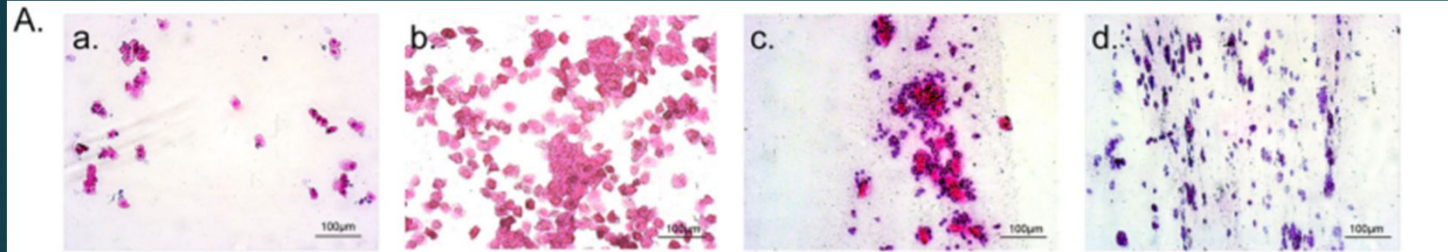


Fig. 2 ESCs-sEVs contributed to the estrous cycle, body weight, and hormone levels in mice. **A** Estrous cycle of mice: (a) proestrus, (b) estrus, (c) metestrus, and (d) diestrus. **B** The weight of mice with ESCs-sEVs gradually increased to normal levels, while the weight of the CTX + BUS group gradually decreased to stable levels. The dashed line indicates mice that received treatment for 14 days. **C** E₂ was significantly increased compared to the CTX + BUS group. **D** FSH was significantly decreased compared to the CTX + BUS group. **E** AMH was significantly increased compared to the CTX + BUS group. Scale bars = 100 µm. (Data are presented as the mean ± SD, **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001; ns, no significance)

Risultati:

Livelli ormonali dopo 14 giorni:

FSH: ↑ CTX+BUS; ↓ control e ESCs-sEVs

E₂: ↑ control group e ESCs-sEVs

AMH: ↑ control group e ESCs-sEVs

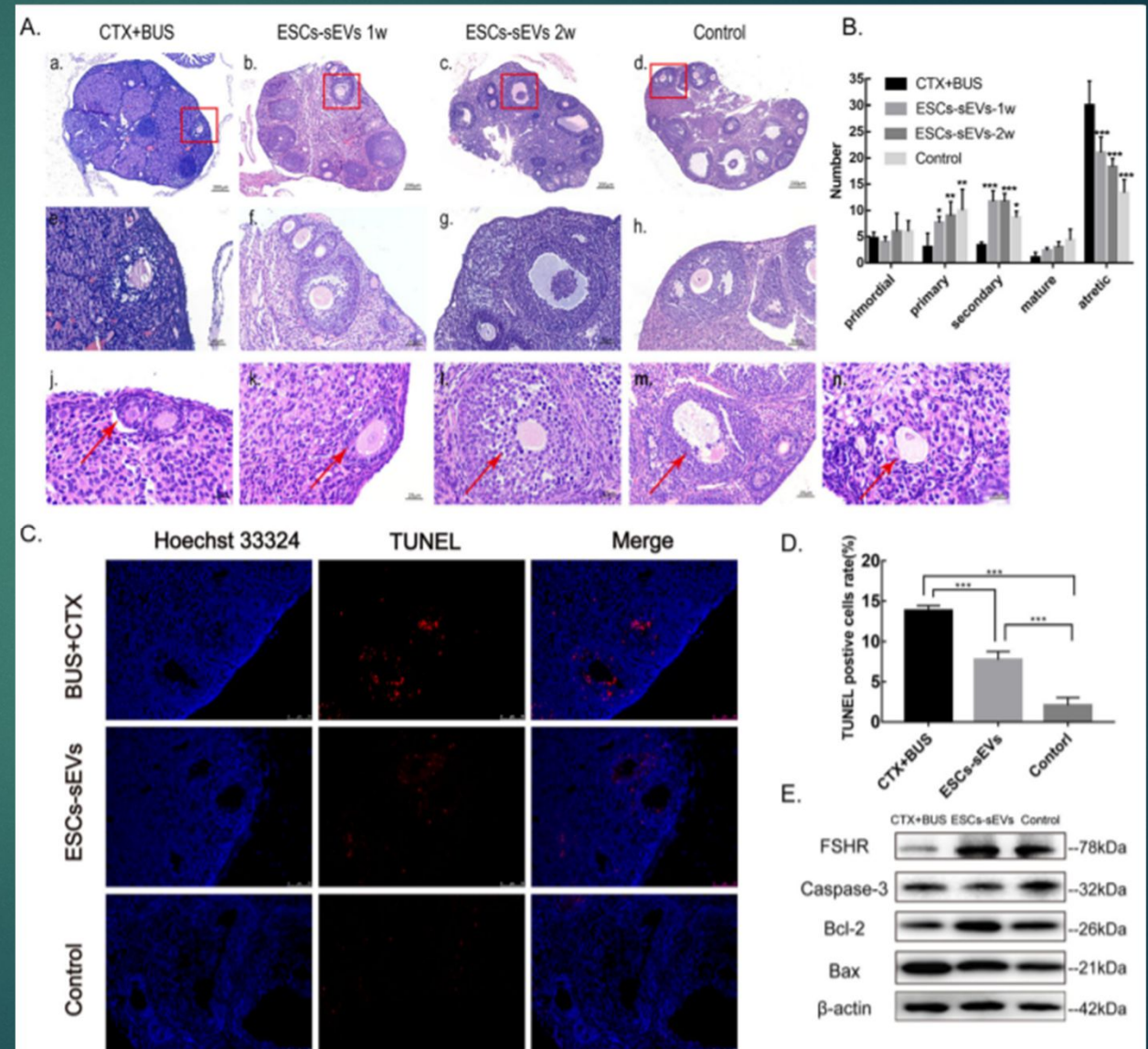
Istologia ovarica e conta dei follicoli

- Il numero di follicoli atresici è aumentato nel gruppo CTX+BUS
- Il trapianto di ESCs-sEVs ha promosso lo sviluppo e l'accrescimento dei follicoli in tutte le fasi e inibito l'apoptosi

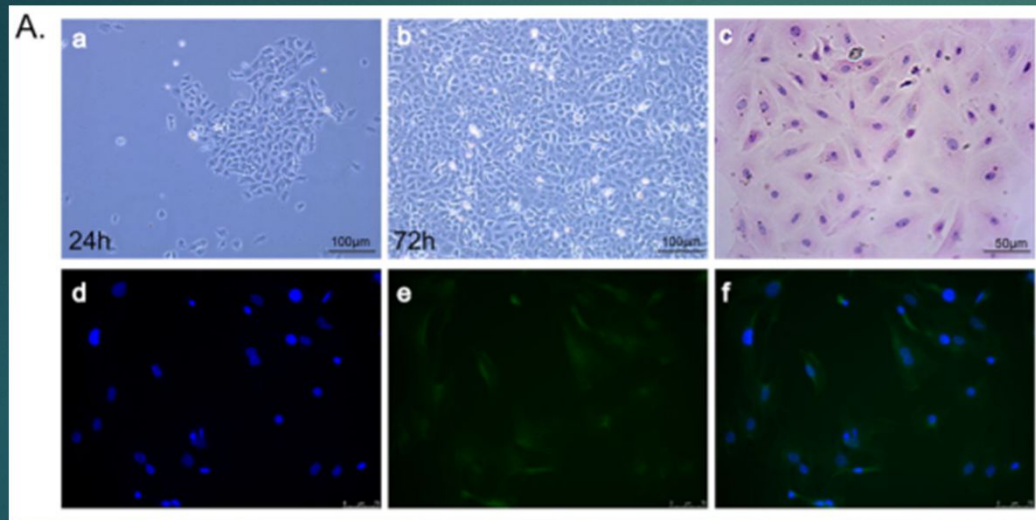
Cellule apoptotiche → TUNEL assay
 DAPI (blue fluorescence): nuclei delle cellule
 Cy3 (red fluorescence): cellule apoptotiche

Proteine apoptotiche → Western Blot

- Il contributo di ESCs-sEVs potrebbe essere correlato ad un effetto antiapoptotico



Morfologia e identificazione delle cellule della granulosa



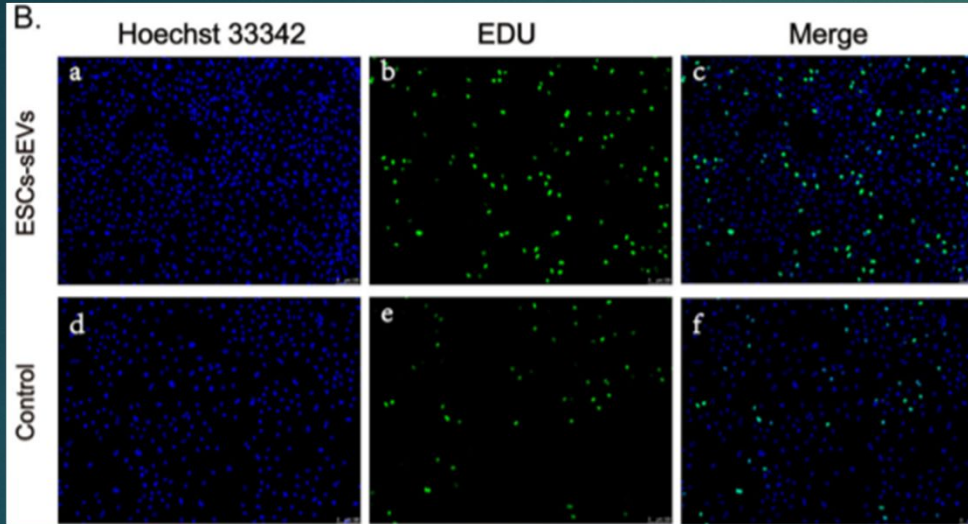
Estrazione dalle ovaie di cellule granulosa:

- Dopo 24h → singolo strato di crescita
- Dopo 72h → significativa proliferazione

Morfologia (analisi microscopica con H&E):
forma ovale o poligonale con nucleo blu e citoplasma rossastro

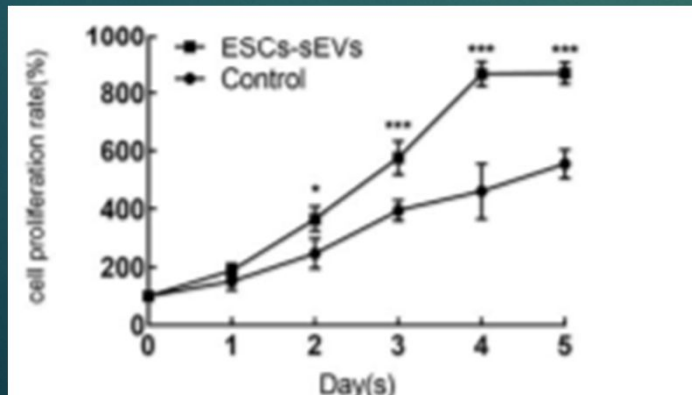
- (d-f) → identificazione cellule granulosa attraverso immunofluorescenza di FSHR

ESCs-sEVs promuovono la proliferazione delle cellule della granulosa in vitro



EdU test

FITC (fluorescenza verde):
attività proliferativa → maggiore in ESCs-sEVs

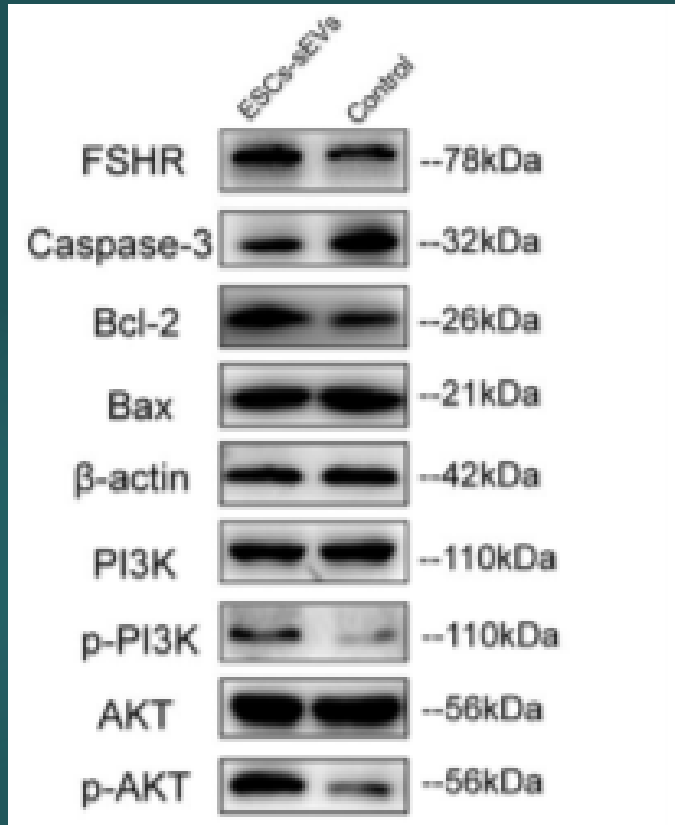


CCK-8 test

La proliferazione delle cellule della granulosa è stata significativamente migliorata nel trattamento con ESCs-sEVs per 5 giorni, soprattutto intorno ai 2 e ai 4 giorni.

PI3k/Akt:

- Ruolo nella sopravvivenza e nell'attivazione dei follicoli primordiali che influenzano la follicologenesi



Western Blot

ESCs-sEVs: PI3k fosforilato e Akt ↑

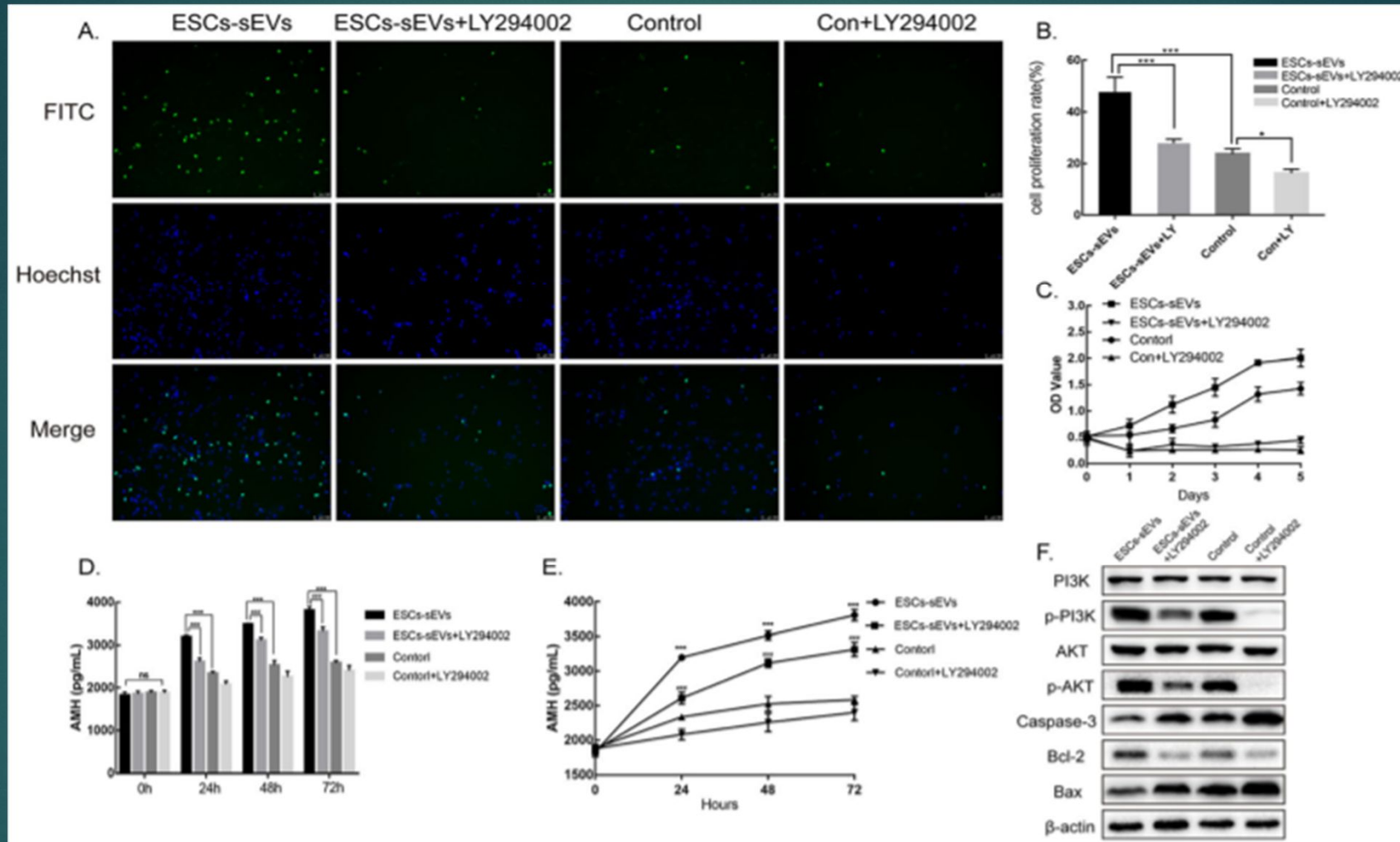
Bcl-2 ↑

Bax e Caspase-3 ↓



Gli ESCs-sEV promuovono il percorso PI3K/AKT e inibiscono l'apoptosi delle cellule della granulosa

L'effetto di ESCs-sEVs sulle cellule di granulosa è stato inibito da un inibitore PI3K/AKT: LY294002



Tutti questi dati suggeriscono che l'effetto di promuovere la proliferazione delle cellule della granulosa viene soppresso quando il percorso PI3K/AKT è bloccato.

Conclusioni



I risultati hanno suggerito che gli ESCs-sEVs consentono di:

- ripristinare i livelli di E2, AMH, e FSH a livelli normali;
- diminuire il numero di follicoli atresici;
- aumentare il numero di follicoli normali.

Ulteriori studi hanno dimostrato che gli ESCs-sEVs possono promuovere la via di segnalazione PI3K/AKT e aumentare la fosforilazione di PI3K e la e AKT, inibendo così l'apoptosi e promuovere la proliferazione delle cellule della granulosa.

- Inoltre, questo studio potrebbe fornire un approccio terapeutico promettente per la POF in clinica.

Bibliografia

- **Mengyu Liu, Yu Qiu, Zhuowei Xue, Ruoyu Wu, Jie Li, Xin Niu, Ji Yuan, Yang Wang and Qingkai Wu. Small extracellular vesicles derived from embryonic stem cells restore ovarian function of premature ovarian failure through PI3K/AKT signaling pathway. Liu et al. Stem Cell Research & Therapy (2020) 11:3; 1-13.**
- Maclaran K, Panay N. Premature ovarian failure. J Fam Plann Reprod Health Care. 2011;37(1):35–42.
- Santos JMS, Lins T, Barberino RS, et al. Kaempferol promotes primordial follicle activation through the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B signaling pathway and reduces DNA fragmentation of sheep preantral follicles cultured in vitro. Mol Reprod Dev. 2019;86(3):319–29.
- Lai D, Wang F, Yao X, et al. Human endometrial mesenchymal stem cells restore ovarian function through improving the renewal of germline stem cells in a mouse model of premature ovarian failure. J Transl Med. 2015;13:155.
- Sun Y, Lin Y, Li H, et al. 2,5-Hexanedione induces human ovarian granulosa cell apoptosis through BCL-2, BAX, and CASPASE-3 signaling pathways. Arch Toxicol. 2012;86(2):205–15.

Riassunto esteso

- ▶ L'insufficienza ovarica precoce (POF) ha un grande impatto sulla funzione endocrina riproduttiva nelle donne, ed è una causa importante di infertilità. Precedenti studi hanno dimostrato che piccole vescicole extracellulari (sEVs) derivanti da cellule staminali svolgono un ruolo importante nella rigenerazione dei tessuti. Questo studio mira a indagare l'effetto terapeutico degli sEVs derivati da cellule staminali embrionali (ESCs-sEVs) sulle ovaie danneggiate e ad esplorarne i meccanismi molecolari.
- ▶ Dopo il trapianto di ESCs-sEVs, i livelli sierici degli ormoni sessuali hanno ripristinato i valori normali. Inoltre, il numero di follicoli è significativamente aumentato e il numero di cellule apoptotiche è diminuito. I risultati in vitro hanno rivelato che ESCs-sEVs potrebbero migliorare significativamente il tasso di proliferazione delle cellule della granulosa e aumentare l'espressione di PI3K e AKT fosforilato. Al contrario, l'effetto positivo sulla proliferazione e gli effetti negativi sull'apoptosi osservati nelle cellule della granulosa sono diminuiti quando il segnale della via PI3K/AKT è stato inibito.
- ▶ I risultati suggeriscono che ESCs-sEVs potrebbero migliorare la funzione ovarica regolando il percorso di segnalazione PI3K/AKT, assicurando una promettente terapia clinica per POF.