



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELL'AQUILA
DIPARTIMENTO DI MEDICINA CLINICA, SANITA' PUBBLICA, SCIENZE DELLA
VITA E DELL'AMBIENTE (MESVA)

Dottorato di Ricerca in *Scienze Della Salute*
e Dell'Ambiente
Curriculum Imaging Molecolare e Ultrastrutturale
XXXVII ciclo

Titolo della tesi
**Alterazioni morfo-funzionali indotte dalla sindrome nell'ovaio policistico (PCOS) in un
modello murino: effetto protettivo delle carnitine**

SSD BIO/16

Dottoranda
Dott.ssa Ilaria Antenisca Mascitti
282003

Coordinatrice del corso
Prof.ssa Maria Grazia Cifone

Tutor
Prof.ssa Maria Grazia Palmerini

Correlatrice
Dott.ssa Domenica Cocciolone

A.A. 2023/2024

INDICE

<i>Abstract</i>	pag. 1
1. INTRODUZIONE	“ 3
1.1 <i>La sindrome dell’ovaio policistico: definizione ed epidemiologia</i>	“ 3
1.1.1 <i>Sintomi</i>	“ 3
1.1.2 <i>Eziopatogenesi</i>	“ 8
1.1.3 <i>Diagnosi</i>	“ 11
1.2 <i>PCOS e infertilità</i>	“ 12
1.2.1 <i>Alterazione della ricettività endometriale in PCOS</i>	“ 13
1.2.2 <i>Coinvolgimento degli ovidotti nella PCOS</i>	“ 15
1.3 <i>PCOS e stress ossidativo e glicativo</i>	“ 15
1.3.1 <i>Danni da stress ossidativo e glicativo nel riproduttivo femminile</i>	“ 18
1.3.2 <i>Danni da stress ossidativo e glicativo nel cervello</i>	“ 19
1.3.3 <i>Danni da stress ossidativo e glicativo nel fegato</i>	“ 20
1.4 <i>Terapie di cura</i>	“ 21
1.5 <i>Antiossidanti come trattamento per la PCOS</i>	“ 22
1.5.1 <i>Meccanismo ed effetti positivi delle carnitine sulla PCOS</i>	“ 24
1.6 <i>Il modello murino</i>	“ 26
1.6.1 <i>Ciclo uterino e ciclo estrale a confronto</i>	“ 26
2. SCOPO DEL LAVORO	“ 30
3. MATERIALI E METODI	“ 32
3.1 <i>Animali</i>	“ 32
3.1.1 <i>Determinazione della fase del ciclo estrale</i>	“ 33
3.2 <i>Preparativa per la Microscopia Ottica (LM)</i>	“ 33
3.2.1 <i>Colorazione ematossilina – eosina (E&E)</i>	“ 33
3.2.2 <i>Colorazione Azan Tricromica</i>	“ 34
3.2.3 <i>Morfometria mediante ImageJ</i>	“ 34
3.2.4 <i>Immunoistochimica: MG-AGE e 4-HNE</i>	“ 34

3.2.5	<i>Immunoistochimica: TOMM20, Coll e 17 β-HSD IV</i>	“ 35
3.2.6	<i>Immunoistochimica: Sirt1 e IL-1</i>	“ 35
3.2.7	<i>Analisi semiquantitativa dei markers</i>	“ 36
3.2.8	<i>Analisi statistica</i>	“ 36
3.3	<i>Preparativa per la Microscopia Elettronica a Trasmissione (TEM)</i>	“ 36
4.	RISULTATI	“ 38
4.1	<i>Effetti della carnitina sul ciclo estrale del fenotipo PCOS</i>	“ 38
4.2	<i>Utero</i>	“ 40
4.2.1	<i>Fibrosi e iperplasia uterina</i>	“ 40
4.2.2	<i>Steroidogenesi (17β-HSD IV)</i>	“ 45
4.2.3	<i>Danno ossidativo (4-HNE)</i>	“ 46
4.2.4	<i>Danno mitocondriale (Tomm20)</i>	“ 46
4.2.5	<i>Danno glicativo (MG-AGE)</i>	“ 47
4.3	<i>Ovidotti</i>	“ 49
4.3.1	<i>Ipertrofia, iperplasia e fibrosi oviduttale</i>	“ 49
4.3.2	<i>Steroidogenesi (17β-HSD IV)</i>	“ 54
4.3.3	<i>Danno ossidativo (4-HNE)</i>	“ 55
4.3.4	<i>Danno mitocondriale (Tomm20)</i>	“ 56
4.3.5	<i>Danno glicativo ((MG-AGE)</i>	“ 57
4.3.6	<i>Valutazione dei cambiamenti ultrastrutturali negli ovidotti</i>	“ 58
4.3.6.1	<i>Gruppo CTR</i>	“ 58
4.3.6.2	<i>Gruppo DHEA</i>	“ 59
4.3.6.3	<i>Gruppo DHEA/LC-ALC</i>	“ 61
4.4	<i>Cervello</i>	“ 64
4.4.1	<i>Degenerazione cellulare</i>	“ 64
4.4.2	<i>Danno ossidativo (Sirt-1)</i>	“ 66
4.4.3	<i>Danno glicativo (MG-AGE)</i>	“ 68
4.5	<i>Fegato</i>	“ 70
4.5.1	<i>Fibrosi epatica</i>	“ 70
4.5.2	<i>Danno cellulare (IL-1β)</i>	“ 72
5.	DISCUSSIONE	“ 75

6.	<i>CONCLUSIONE e PROSPETTIVE FUTURE</i>	“ 83
7.	<i>BIBLIOGRAFIA</i>	“ 85
	<i>RINGRAZIAMENTI</i>	“ 93

Abstract

Polycystic ovarian syndrome (PCOS) is a heterogeneous condition characterized by hyperandrogenism (HA), polycystic ovaries, and dysfunctional ovulation, and it is associated with metabolic problems, such as insulin resistance (IR) and obesity. After having investigated the morphological and antioxidant/antiglycative alterations on the ovaries collected from PCOS mice induced by dehydroepiandrosterone (DHEA), in this PhD thesis the attention was focused on uteri, oviducts, brain and liver using the same experimental model. The modulating effects of the antioxidants L-carnitine (LC) and acetyl-L-carnitine (ALC), as oral supplements in the diet, were also assessed.

CD1 mice were administered or not with DHEA (6 mg/100 g body weight) for 20 days, alone or with 0.40 mg of L-carnitine (LC) and 0.20 mg of acetyl-L-carnitine (ALC). Samples were then subjected to histology and immunohistochemistry (IHC) to evaluate morphology, collagen deposition, and steroidogenesis. Oxidative, mitochondrial, and methylglyoxal (MG)-dependent damages were also investigated by IHC. Transmission Electron Microscopy (TEM) was used to detect ultrastructural alterations in the oviducts. PCOS uteri, oviducts and brain were affected by hyperfibrosis, hyperplasia, hypertrophy; altered steroidogenesis, with oxidative alterations associated with MethylGlyoxal-Advanced Glycation End product (MG-AGE) accumulation, were observed. PCOS liver had vacuolated and necrotic cells, with the presence of an inflammatory status, evidenced by IL-1 β .

LC-ALC administration mitigated most of the PCOS-induced morphofunctional alterations. These results provide evidence for the detrimental action of oxidative and glycative stress in PCOS uteri, oviducts, brain and liver, confirming a protective role of carnitines on the PCOS phenotype.

1. INTRODUZIONE

1. Introduzione

1.1 La sindrome dell'ovaio policistico: definizione ed epidemiologia

La sindrome dell'ovaio policistico rappresenta una delle più grandi sfide in medicina, a causa della sua complessità, per gli aspetti legati alla sua progressione e per le conseguenze che comporta nella vita della donna che ne soffre, dall'adolescenza alla menopausa (Bacarat *et al.*, 2022). Nota anche con l'acronimo PCOS (dall'inglese *Polycystic Ovarian Syndrome*), la malattia è uno dei più comuni disordini endocrini esistenti e colpisce il 4-21% delle donne nella fascia di età fertile (Rugarli *et al.*, 2021). Secondo l'Organizzazione mondiale della Sanità (*World Health Organization*, WHO), sono 116 milioni le donne al mondo che soffrono di ovaio policistico (Lakshmi *et al.*, 2023). Viene definita anche policistosi ovarica, anovulazione iperandrogenica o anche sindrome di Stein-Leventhal; quest'ultima denominazione si deve ai due ginecologi americani, appunto Stein e Leventhal, i quali nel 1935 citarono per primi la malattia in letteratura medica moderna, anche se un quadro clinico simile era stato già descritto nel secolo precedente: descrissero sette casi di donne che riportavano sintomi, tra cui amenorrea, irsutismo e ovaie gonfie con cisti multiple (Stein and Leventhal, 1935).

Per tali motivi, tutt'oggi la classificazione delle cause, dei sintomi e della diagnosi della malattia rimane un argomento controverso e lungamente dibattuto.

1.1.1 Sintomi

La PCOS è caratterizzata da una vasta gamma di sintomi, riguardanti non solo l'aspetto ginecologico, ragione per cui la sua identificazione può risultare complicata e tuttora è oggetto di dibattito. Dopo una prima descrizione fatta nel 1935, i cosiddetti "Criteri di Rotterdam", redatti nel 2003, rappresentano i criteri di valutazione della malattia più utilizzati, non sono stati accettati globalmente. Ad oggi ci sono tre definizioni di PCOS autenticate dalle più importanti società scientifiche e autorità sanitarie (Escobar-Morreale *et al.*, 2018). I criteri proposti nell'Aprile 1990, ad una conferenza organizzata dalla National Institutes of Health/National Institute of Child Health and Human Development (NIH/NICHD), rappresentano una delle classificazioni più condivise della PCOS, e questa include:

- Iperandrogenismo/iperandrogenemia;

- Anovulazione o oligo-ovulazione;
- Esclusione di patologie concomitanti, come ad esempio disturbi tiroidei, iperprolattinemia, iperplasia surrenalica congenita (Goodarzi *et al.*, 2006).

Nel maggio del 2003, a Rotterdam, è stata organizzata una conferenza indipendente dei membri della European Society of Human Reproduction and Embryology and American Society of Reproductive Medicine (ESHRE/ASRM), in cui è stata inclusa la natura policistica dell'ovaio, con presenza di piccoli follicoli antrali, nella definizione di PCOS; quindi secondo la classificazione di Rotterdam, le donne che presentano almeno due dei seguenti tre sintomi, escludendo altre patologie correlate, ricevono una diagnosi di PCOS:

- Oligo-ovulazione o anovulazione, che posso condurre ad amenorrea, infertilità anovulatoria, con sanguinamento irregolare e prolungato;
- Iperandrogenismo, giustificato da altri livelli di testosterone, androstenedione e deidroandrosterone (DHEA) nel sangue, il quale può manifestarsi con acne, irsutismo e disturbi dell'umore;
- Morfologia policistica dell'ovaio (*polycystic ovarian morphology*, PCOM) (Goodarzi *et al.*, 2006), che all'esame ecografico presenta cisti ovariche con la cosiddetta disposizione a "collana di perle" (fig. 1); queste originano dalla mancata ovulazione, che porta il follicolo a rimanere nelle ovaie per molti mesi, e possono accumularsi anche oltre 10 follicoli, mentre in un'ovulazione canonica ogni mese ne verrebbe selezionato uno come dominante, e se non fecondato collasserebbe e scomparirebbe con la mestruazione fisiologica (Sito NIH).

Due workshop organizzati dalle stesse società, nel 2006 e nel 2008, sono molto citati per aver dato importanza alla diagnosi della malattia e all'impatto sull'infertilità; l'ultimo documento sulla PCOS pubblicato dalle due società delinea la comprensione attuale ed evidenzia le lacune per quanto riguarda le principali caratteristiche della PCOS, che quindi influenzano l'assistenza sanitaria delle pazienti (Fauser *et al.*, 2012). In una conferenza della Androgen Excess and

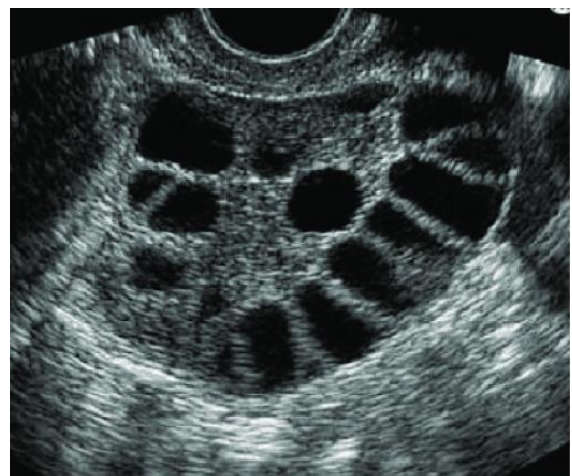


Figura 1 – Morfologia ovarica in caso di PCOS; è visibile la disposizione classica dei follicoli “a collana di perle” (Sana *et al.*, 2022).

PCOS Society (AE-PCOS) nel 2006 sono stati proposti altri parametri per la diagnosi di PCOS, ossia:

- Iperandrogenismo, che include la comparsa di irsutismo (soprattutto nella zona del viso) o iperandrogenemia (testata con analisi biochimiche);
- Disfunzioni ovariche, tra cui oligo-ovulazione/anovulazione o ovaie policistiche;
- Esclusione di patologie correlate che comportano un'eccessiva produzione di androgeni (Azziz *et al.*, 2009);

quest'ultima classificazione dichiara la presenza di PCOS, anche se la condizione di ovaio policistico o l'iperandrogenismo non sono predominanti.

Il punto comune alle tre classificazioni, riassunte in tabella 1, è l'eliminazione di altre malattie che presentano segni e sintomi simili, come per esempio tumori androgeni-secernenti, iperplasia congenita del surrene, iperprolattinemia, ipotiroidismo, ipertecosi, ipercortisolismo, sindrome di Cushing e tumore ovarico.

Tabella 1 - Riassunto dei criteri diagnostici della PCOS, con le relative caratteristiche per la diagnosi.

Criteri diagnostici	Anno di formula zione	Caratteristiche della diagnosi
<ul style="list-style-type: none"> • <u>NIH/NICD</u> (National Institute of Health/National Institute of Child Health and Human Development) 	Aprile 1990	1. Iperandrogenismo/iperandrogenemia 2. Oligo-ovulazione o anovulazione; 3. Esclusione di disturbi correlati (malattie tiroidee, iperprolattinemia, iperplasia surrenalica congenita).

<ul style="list-style-type: none"> • <u>Rotterdam criteria</u> ESHRE/ASRM (European Society of Human Reproduction and Embryology and American Society of Reproductive Medicine) 	Maggio 2003	Le pazienti devono presentare almeno 2 delle seguenti 3 caratteristiche:
		<ol style="list-style-type: none"> 1. Iperandrogenismo; 2. Oligo-ovulazione o anovulazione; 3. Ovaie con cisti.
		Eliminazione delle patologie associate.
<ul style="list-style-type: none"> • <u>AE-PCOS</u> (Androgen Excess and PCOS Society) 	2006	<ol style="list-style-type: none"> 1. Iperandrogenismo con segni di irsutismo (testato da analisi cliniche) e iperandrogenemia (analisi biochimiche);
		<ol style="list-style-type: none"> 2. Disfunzioni ovariche, come oligo-ovulazione, anovulazione o ovaie con cisti.
		Eliminazione di altri disturbi che comportano una produzione eccessiva di androgeni.

Inoltre, sono state scoperte quattro diverse espressioni fenotipiche della malattia, basate sulla probabile compresenza tra i seguenti criteri:

- Iperandrogenismo (biochimico o clinico) e anovulazione persistente;
- Iperandrogenismo (biochimico o clinico) morfologia policistica delle ovaie, diagnosticata tramite ultrasuoni, in presenza di cicli ovulatori;
- Anovulazione prolungata nel tempo e morfologia policistica delle ovaie in mancanza di iperandrogenismo;

- Iperandrogenismo in presenza di ovaie policistiche e anovulazione cronica (Conway *et al.* 2022).

Dopo aver escluso la presenza di altre patologie, è stato proposto che la diagnosi di PCOS nelle giovani donne adolescenti venga determinata dalla presenza di segni clinico e/o biochimici della presenza di iperandrogenismo con oligomenorrea cronica, escludendo le giovani che riportano solamente la presenza di cisti ovariche e anovulazione, dato che questi sintomi possono essere presenti in maniera transitoria nelle varie fasi di sviluppo della donna, risultando quindi insufficienti per la formulazione della diagnosi sospettata (Legro *et al.*, 2022).

Di conseguenza esiste ancora una controversia tra queste tre classificazioni, considerando il caso in cui la paziente presenti ovaie con cisti, disfunzioni ovulatorie, ma non presenti iperandrogenismo biochimico o clinico, non si è ancora certi se le si possa diagnosticare la PCOS o meno (Siddiqui *et al.*, 2022).

Quella che viene imputata come la prima causa di PCOS, ossia l'iperandrogenismo, viene identificato mediante la sua manifestazione più diffusa: l'irsutismo; tale sintomo, che è il più comune, viene valutato attraverso l'utilizzo della scala di Ferriman e Gallwey (fig. 2), in cui viene assegnato un punteggio da 0 (assenza) a 4 (disposizione pilifera tipicamente maschile) in 9 diverse zone del corpo sensibili agli androgeni (Ferriman, Gallwey *et al.*, 1961).

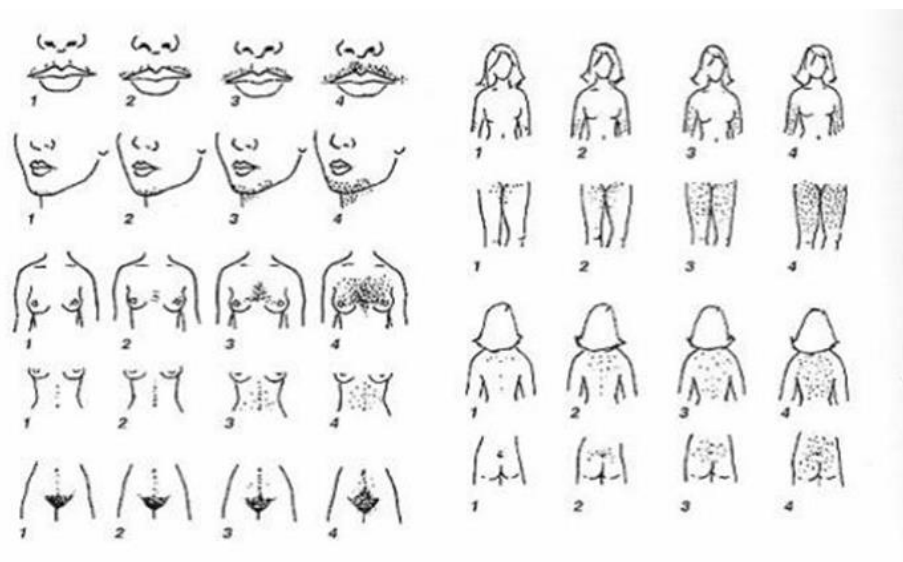


Figura 2 - Scala di Ferriman e Gallwey per la misurazione della gravità dell'irsutismo.

Spesso all'irsutismo si accompagna la presenza di acne, e attribuibili ad una differenza di espressione della 5α -reduttasi, enzima deputato alla conversione del testosterone in diidrotestosterone, nelle ghiandole sebacee e nei follicoli piliferi; per tale motivo alle donne con acne viene caldamente consigliato dai medici di approfondire i dettagli della loro storia mestruale e sulla presenza di eventuale iperandrogenismo (Lowenstein *et al.*, 2006).

Altri sintomi che possono coadiuvare il professionista nella diagnosi di PCOS sono:

- Alopecia androgenica, ossia perdita dei capelli, tipica del sesso maschile;
- Dermatite seborroica;
- *Acanthosis nigricans*, ossia presenza di macchie scure sulla pelle;
- Molluschi penduli (fibromi molli);
- Prolungati periodi di sindrome premestruale, con conseguenti gonfiore addominale, sbalzi d'umore, cefalea, dolore pelvico, ritenzione idrica e mal di schiena;
- Apnee nel sonno;
- Obesità centrale, ossia che riguarda la metà inferiore del torace, dando al tronco la caratteristica forma a mela.
- Ingrossamento delle ovaie (possono raggiungere dimensioni da 1.5 a 3 volte maggiori della norma) a causa delle cisti;
- Superficie ovarica spessa, liscia, perlescente;
- Rapporto tra i livelli di LH (ormone luteinizzante) ed FSH (ormone follicolo-stimolante) maggiori di 2.5, quando misurati al terzo giorno del ciclo mestruale;
- Bassi livelli di SHBG (globulina che trasporta gli ormoni sessuali) (Sito NIH).

Ad oggi questo dibattito risulta essere ancora attivo, ma vengono ugualmente usate tutte le classificazioni descritte, anche se vantaggi e limiti dell'applicazione dei criteri di Rotterdam, cause della PCOS, fattori di rischio associati, effetti a lungo termine della malattia, best practice per la prevenzione e il trattamento della PCOS sono stati tutti delineati nel workshop metodologico basato sulle prove del NIH del 2012 sulla PCOS (Sito NIH).

1.1.2 Eziopatogenesi

L'eziologia della malattia non è univoca; infatti, l'interazione tra diversi fattori che contribuiscono al suo esordio, tra cui certamente fattori genetici ed ambientali, rappresenta la migliore ipotesi per comprendere al meglio la natura della malattia (Bacarat *et al.*, 2022).

Famiglie in cui i casi di PCOS sono ricorrenti dimostrano che c'è una certa ereditarietà nella malattia rispetto al resto della popolazione; tale fattore ereditario include quelle famiglie in cui la malattia si è manifestata tra le donne legate dal primo grado di parentela (Polak *et al.*, 2016): uno studio dimostra che tra 80 donne con PCOS, il 22% delle loro sorelle presenta la stessa malattia e il 24% delle sorelle presenta iperandrogenismo con cicli regolari (Manco *et al.*, 2014). I fattori genetici coinvolti nell'esordio della PCOS comprendono i polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs, *single nucleotide polymorphisms*) all'interno di singoli geni, ed esistono più di 240 variazioni genetiche legate alla PCOS, che toccano geni coinvolti nella steroidogenesi, nel funzionamento delle cellule della teca ovarica e nella secrezione ormonale legata all'asse ipotalamo-ipofisi. Altri aspetti comprendono i fattori epigenetici che si verificano durante lo sviluppo del feto, come l'esposizione intrauterina con l'ambiente materno in eccesso di androgeni, che può portare alcuni cambiamenti in un cromosoma che mostra ereditarietà stabile, senza effettive alterazioni nella sequenza del DNA. Questi cambiamenti epigenetici iniziano a causa dell'interazione con l'ambiente durante lo sviluppo fetale e infantile, e contribuirebbero all'esordio della PCOS (Escobar-Morreale *et al.*, 2018).

I fattori ambientali presentano la loro incidenza già durante la gravidanza, come ad esempio ipertensione materna, fumo, stress, obesità, diabete, farmaci, presenza di interferenti endocrini nell'ambiente, per esempio nelle confezioni degli alimenti, e comportano un ritardo nella crescita intrauterina del feto; tale ritardo, sommato ai fattori ambientali a cui la bambina/adolescente è soggetta durante le prime fasi della sua vita, come stile di vita sedentario, abitudini alimentari scorrette, con consumo di cibi ricchi di zuccheri e AGE (*Advanced Glycation End products*) e interferenti ambientali, può portare ad uno stato di sovrappeso e/o obesità, che gioca un ruolo cruciale nella sindrome, insieme alla possibile presenza di contemporanea insulino-resistenza (Escobar-Morreale *et al.*, 2018).

La base biologica della sindrome è rappresentata dalla presenza di iperandrogenismo, il quale porta con sé anche altri squilibri ormonali tipici della PCOS:

- Elevati livelli di ormone luteinizzante (LH);
- Bassi livelli di ormone follicolo-stimolante (FSH);

nonostante questo, i meccanismi di contro-regolazione positivo e negativo di ormone di rilascio delle gonadotropine (GnRH)-FSH/LH-estrogeni rimangono invariati (Rugarli *et al.*, 2021).

L'evento scatenante sembra verificarsi durante l'adrenarca, ossia la prima fase della pubertà, ed è stato identificato nell'alterazione dello sviluppo del corticosurrene, che porterebbe ad un livello elevato di androgeni, presenza di irsutismo ed eccesso ponderale; il circolo vizioso descritto è destinato ad auto-alimentarsi, poiché i tanti androgeni in circolo vengono convertiti ad estrogeni nei tessuti periferici, specialmente a livello del tessuto adiposo, ricco dell'enzima aromatasi (Rugarli *et al.*, 2021).

L'elevata presenza di estrogeni in circolo concorre all'attivazione dei sistemi di controrelazione ipotalamo-ipofisi, aumentando la responsività dell'ipofisi al GnRH e attivando in maniera non ciclica il meccanismo di controregolazione positiva della secrezione di ormone luteinizzante (LH); l'eccesso di quest'ultimo provoca iperplasia nello stroma ovarico e nelle cellule della teca, con innalzamento nei livelli di produzione degli androgeni, i quali rappresentano altro substrato circolante per il processo di aromatizzazione periferica, andando ad alimentare il processo responsabile della sindrome (Rugarli *et al.*, 2021).

Di contro, i bassi livelli di ormone follicolo stimolante (FSH) in circolo, ed il contemporaneo aumento della concentrazione intraovarica di androgeni, provocano maturazione incompleta dei follicoli ovarici, accompagnata da anovulazione cronica e ipo-estrogenismo ovarico. Nelle fasi avanzate della malattia le ovaie rappresentano la sede di maggior produzione degli androgeni, la cui quota risulta innalzata anche da una iperproduzione da parte delle ghiandole del surrene (Rugarli *et al.*, 2021).

Negli anni l'attenzione si è spostata anche sulla eventuale compromissione del metabolismo glucidico in alcune pazienti, dato che il 60-70 % di loro risulta essere in sovrappeso, e tale situazione risulta essere associata a presenza di insulino-resistenza, presente in percentuale variabile anche nelle donne normopeso con PCOS; dunque, circa il 40% dei soggetti PCOS presenta un'intolleranza glucidica, e di questa una parte potrebbe sviluppare diabete mellito di tipo II (Rugarli *et al.*, 2021).

L'insulino-resistenza concomitante alla PCOS viene causata da un meccanismo molecolare specifico per la malattia, differente da quanto avviene nell'obesità; l'insulina e l'IGF-1 (*insulin-like growth factor- 1* o somatomedina -1) sono attori fondamentali nella regolazione della funzione ovarica, influenzando la steroidogenesi e lo stato androgenico; l'insulina esercita la sua azione direttamente sulle cellule della teca ovarica, attivando il citocromo

p450c17, enzima coinvolto nella sintesi degli androgeni; a livello epatico riduce la sintesi di SHBG (*sex hormone binding globulin*, globulina legante gli ormoni sessuali) aumentando la quota di testosterone libero; in ultimo agisce sull'ipotalamo, disturbando la secrezione pulsatile di LH. È quindi chiaro che l'anovulazione è un processo reversibile, causato da un segnale scorretto che dall'ipotalamo arriva all'ipofisi, provocando un'alterazione nella secrezione di gonadotropina (fig. 3). Dunque, tramite adeguate cure farmacologiche e anche la concomitante riduzione delle adiposità mediante regime alimentare opportuno, si può tornare ad una condizione normale di cicli ovulatori (Rugarli *et al.*, 2021).

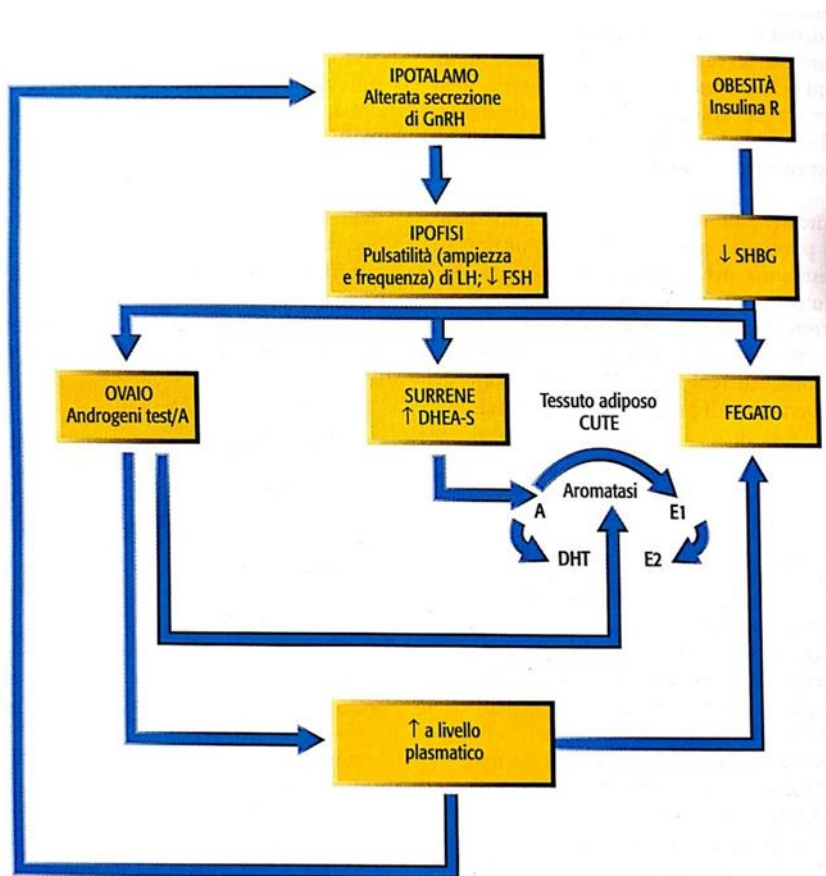


Figura 3 - Eziopatogenesi della PCOS (Rugarli *et al.*, 2021).

1.1.3 Diagnosi

Le donne a livello internazionale sperimentano diagnosi di PCOS ritardate e profonda insoddisfazione per le cure (Gibson-Helm *et al.*, 2017). Il gold standard per l'identificazione della PCOS, nonostante i numerosissimi sintomi, rimane l'ecografia pelvica, strumento diagnostico indispensabile, ma non è l'unico, poiché non tutte le donne con PCOS presentano ovaie policistiche, e coloro che le hanno non soffrono sempre di PCOS.

Si utilizzano diverse procedure diagnostiche, tra cui:

- Riscontro anamnestico di obesità, irsutismo ed assenza di sviluppo mammario;
- Ecografia pelvica;
- Dosaggio del testosterone libero (*free androgen index*);
- Altre analisi ematiche, come il rapporto LH/FSH;

tra gli esami aggiuntivi abbiamo:

- Chirurgia laparoscopica, per il prelievo di campioni bioptici;

infine, ci sono procedure diagnostiche per le condizioni associate a rischio:

- Profilo lipidico ed ematico a digiuno;
- Test di tolleranza del glucosio a 2 ore dalla somministrazione orale di glucosio (OGTT) nelle pazienti con fattori di rischio (obesità, storia familiare, storia di diabete gestazionale): questi possono mostrare un'alterata tolleranza glucidica, ossia insulino-resistenza nel 15-30% delle pazienti con PCOS (Sito NIH).

1.2 PCOS e Infertilità

La sindrome dell'ovaio policistico rappresenta la causa più comune compromissione riproduttiva nelle donne, e soprattutto di infertilità anovulatoria nelle giovani (Xie *et al.*, 2019). Viene suggerita un'ampia gamma di interventi utili per migliorare i tassi di ovulazione, anche se la percentuale di pazienti con PCOS che ricorrono alla fecondazione in vitro è molto alta, risultano essere nullipare e la loro età al momento del primo parto è più alta rispetto alle donne che non sono affette da PCOS; infatti ciò suggerisce la presenza di altre anomalie che influenzano la fertilità tra le pazienti, indipendentemente dall'ovulazione; inoltre è acceso il dibattito sul fatto che le donne che presentano il fenotipo ovulatorio della PCOS, ossia che ovulano correttamente ma sono affette dalla malattia, hanno la stessa capacità riproduttiva delle donne che non soffrono della sindrome (Palomba, 2021). L'analisi dei dati presenti in letteratura suggerisce quindi che le donne con PCOS hanno un tasso di fecondità spontanea ridotto, ma le strategie adottate sono funzionali, soprattutto nel caso dell'utilizzo della fecondazione in vitro, che migliora drasticamente le percentuali di riuscita di gravidanza nelle donne con PCOS, soprattutto per coloro con età avanzata; infatti, anche se il rapporto di

fertilità standardizzato è inferiore di circa il 20% nelle donne con PCOS rispetto a coloro che non ne soffrono, i tassi di fertilità tornano normali a tutte le età dopo la diagnosi, suggerendo che quindi l'infertilità nelle donne con PCOS è una condizione curabile (Palomba, 2021).

Per le pazienti affette da PCOS tra le complicanze più diffuse ci sono certamente quelle legate alla gravidanza in sé ed alla sua fase tardiva, tra cui ipertensione indotta dalla gravidanza stessa, preclampsia, diabete mellito gestazionale e parto pretermine; le complicazioni legate alla fase iniziale, come l'aborto spontaneo, non sono diverse da quelle presentate dalle pazienti sane, indipendentemente dall'obesità, dal *Body Mass Index* e dal cariotipo. I dati sulle malformazioni congenite richiedono maggiori approfondimenti per essere ritenuti affidabili (Palomba, 2021).

L'aumento del rischio di complicazioni nelle gravidanze di donne con PCOS è giustificato anche da dati sperimentali sulla compromissione dell'invasione del trofoblasto deciduale e della placentazione, anomalie strettamente correlate agli elevati livelli di androgeni, ai marcatori di resistenza all'insulina e ad uno stato aumentato di infiammazione cronica di basso grado; queste caratteristiche sono più rappresentate in specifici fenotipi PCOS, come la PCOS conclamata e i fenotipi con morfologia ovarica policistica (*polycystic ovarian morphology*, PCOM). Altri fattori di rischio che compromettono gli esiti delle gravidanze possono essere certamente obesità, iperandrogenismo, resistenza all'insulina, sindrome metabolica, ma anche fattori correlati all'infertilità, come un lungo periodo per raggiungere il concepimento, età materna avanzata, uso di farmaci per la stimolazione ovarica e per la fecondazione in vitro (Palomba, 2021).

Tutte i fattori di rischio elencati concorrono ad influenzare lo sviluppo degli ovociti e la competenza endometriale, l'invasione del trofoblasto, la placentazione e quindi l'esito della gravidanza. Obesità e sindrome metabolica correlate alla PCOS concorrono ad allungare i tempi necessari per il raggiungimento della gravidanza e ad abbassare il tasso di nati vivi (Palomba, 2021).

1.2.1 Alterazione della ricettività endometriale in PCOS

L'intuizione del fatto che la sindrome potesse scatenare delle conseguenze anche nell'utero è arrivata quando si assisteva a fallimenti nell'impianto dell'ovulo dopo induzione dell'ovulazione, oppure ad un più alto rischio di aborto spontaneo dopo la gravidanza: la

ridotta fertilità nelle donne che soffrivano di PCOS poteva essere attribuita non solo a problemi di anovulazione, ma anche a disfunzioni riguardanti l'endometrio (Shang *et al.*, 2012).

L'endometrio delle pazienti con PCOS presenta diverse anomalie primarie, tra cui l'espressione anomala di proteine coinvolte nel ciclo cellulare, nel trasporto cellulare e nella segnalazione, nella riparazione del DNA, dei processi apoptotici e nel metabolismo mitocondriale, indipendentemente dall'ovulazione e della normale ciclicità mestruale (Palomba, 2021). È stata segnalata un'espressione anomala dei recettori degli estrogeni, del progesterone e degli androgeni e dei loro co-regolatori: infatti si riscontra resistenza al progesterone, a causa di un'alterazione qualitativa e quantitativa all'espressione dei suoi recettori; ciò causa un'alterazione a livello del metabolismo glucidico, la quale a sua volta comporta una decidualizzazione alterata dell'endometrio (Neff *et al.*, 2020). Invece l'espressione aumentata dei recettori degli androgeni nelle cellule epiteliali endometriali delle donne PCOS, la disfunzione ipotalamo/ipofisaria e l'aumento sistemico degli estrogeni e degli androgeni possono contribuire al peggioramento della resistenza al progesterone nelle pazienti (Palomba, 2021).

Si conferma la presenza del tipico stato di infiammazione cronica di basso grado e la presenza di cellule immunitarie anomale, e tale situazione è correlata alle alterazioni metaboliche delle donne con PCOS, in cui la sensibilità insulinica endometriale può peggiorare, contribuendo a influenzare negativamente anche la sensibilità insulinica generale; questi due fattori, insieme all'iperandrogenismo, possono influenzare diversi fattori che favoriscono l'angiogenesi nell'endometrio delle pazienti: infatti si manifestano livelli molto elevati di VEGF (*vascular epithelial growth factor*) circolante, sVEGFR-1 (*soluble VEGF receptor 1*), angiopoietine, PDGF (*platelet-derived growth factor*), PIGF (*placental growth factor*), fattore di crescita dei fibroblasti e TGF- β ; è da segnalare che nella secrezione dei fattori angiogenetici pre- e post-impianto sono coinvolte le cellule natural killer (NK) uterine e nell'endometrio con PCOS il numero di queste ultime è notevolmente ridotto rispetto al controllo, portando ad una angiogenesi alterata (Tal *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2020).

L'endometrio sembra essere il bersaglio di quasi tutte le alterazioni cliniche, biochimiche e metaboliche presenti nelle donne con PCOS; l'attore protagonista è l'iperandrogenismo, che va ad alterare la funzione endometriale, peggiorando l'espressione dei recettori degli ormoni sessuali e dei co-attivatori, aumentando lo stress ossidativo, attivando la ferroptosi e

modulando diversi fattori coinvolti nel controllo della differenziazione e della ricettività endometriale. In presenza di PCOS, gli alti livelli di testosterone influenzano la segnalazione dell'insulina, e quindi il metabolismo ed il trasporto del glucosio a livello endometriale, inducendo così resistenza insulinica locale e iperinsulinemia, che insieme potenziano gli effetti dannosi dell'iperandrogenismo sulla funzionalità endometriale, quindi uterina.

1.2.2 Coinvolgimento degli ovidotti nella PCOS

La PCOS è una malattia per sua natura multifattoriale ed eterogenea, per cui i suoi effetti sono visibili anche in organi diversi dalle ovaie; un altro esempio sono le tube di Falloppio, o ovidotti, strutture di fondamentale importanza poiché sono il sito in cui vengono trasportati i gameti, ed in cui avvengono la fertilizzazione e l'embriogenesi (Coy *et al.*, 2012). È risaputo che l'eccesso di testosterone, tipico della PCOS, può comportare disfunzioni tubariche: queste possono essere dovute ad una loro ostruzione, causata da un eccesso di muco da loro prodotto, oppure da un danno del loro epitelio o da un collasso luminale dell'istmo; tutto ciò comporta evidenti ed importanti conseguenze negative per la fertilità, soprattutto a causa degli effetti sulla funzionalità delle ciglia presenti all'interno delle tube, e che permettono il transito dei gameti (Dulohery *et al.*, 2020; Jackson-Bey *et al.*, 2021). Tuttavia, ad oggi sono pochi gli studi in letteratura che forniscono delucidazioni a riguardo.

1.3 PCOS e stress ossidativo e glicativo

Negli ultimi anni in letteratura l'attenzione si è spostata su diversi studi che correlano la PCOS con un'alterazione dello status ossidativo e glicativo di chi ne soffre (Di Emidio *et al.*, 2020 (B); Palmerini *et al.*, 2023; De Rubeis *et al.*, 2024).

Lo stress ossidativo è strettamente legato alla sindrome da ovaio policistico: questo fenomeno esiste perché le specie reattive dell'ossigeno (*reactive oxygen species*, ROS) vengono prodotte più velocemente di quanto gli antiossidanti riescano a rimuoverle dal corpo, e possono essere presenti in condizioni come l'iperglicemia, come dimostrato da diversi studi sulla presenza di leucociti nel sangue periferico; l'effetto collaterale dell'incremento di stress ossidativo è la produzione di citochine proinfiammatorie, le quali portano alle condizione di insulino-

resistenza e iperandrogenismo, innanzitutto inoltre il rischio di incorrere in malattie cardiovascolari (Gonzalez *et al.*, 2006).

Le ROS possono formarsi mediante molteplici processi: una fonte di ossigeno reattivo in condizioni normali nell'uomo è la perdita di ossigeno attivato dai mitocondri durante la fosforilazione ossidativa (Seaver *et al.*, 2004), oppure durante le reazioni di disintossicazione condotte dal citocromo epatico (Geiszt *et al.*, 1997); invece fonti esogene di ROS includono gli inquinanti ambientali, il fumo di sigaretta, il consumo di alcool, l'esposizione alle radiazioni ionizzanti, infezioni di tipo batterico, virale, fungino, etc. (Bouaved *et al.*, 2013).

Le ROS danneggiano proteine, lipidi, ma soprattutto il DNA, portando così il danno a riflettersi sui tessuti. I marker di stress ossidativo sono molteplici, tra cui:

- Capacità ossidante totale (TOC), ossia il numero totale di molecole antiossidanti in circolo;
- Capacità antiossidante totale (TAC), ossia il numero totale di antiossidanti in corpo;
- Malonilaldeide (MDA), che descrive lo status della perossidazione lipidica;
- Glutazione (GSH), che descrive la capacità antiossidante non enzimatica;
- Attività della superossido dismutasi (SOD), che descrive la capacità antiossidante enzimatica;
- Indice di stress ossidativo, dato dal rapporto tra TOC e TAC;
- Dimetilarginina asimmetrica (ADMA), che descrive la disfunzione endoteliale in relazione allo stress ossidativo;
- Paraonasi-1 (PON1), che determina la capacità antiossidante della cellula (Liu *et al.*, 2021; Murri *et al.*, 2013).

Per prevenire la formazione delle ROS nelle cellule ci sono delle molecole che donano un elettrone ai radicali liberi rimanendo allo stesso tempo stabili, e prendono il nome di antiossidanti, i quali possono essere presenti come sistemi enzimatici e non enzimatici; tra i primi la più citata è la superossido dismutasi (SOD) (Al-Gubory *et al.*, 2010), mentre tra gli antiossidanti non enzimatici vale la pena citare i complessi contenuti nelle vitamine E, C ed A (Herrera *et al.*, 2001).

Per comprendere il ruolo dello stress ossidativo nella PCOS sono stati studiati diversi biomarkers, come la MDA e l'ossido nitrico.

L'ossido nitrico è un radicale libero, e allo stesso tempo anche un'importante molecola che funge da segnale in molti processi fisiologici e patologici, ma un suo eccesso diviene tossico; infatti, si è visto che i livelli di NO nelle pazienti con PCOS sono statisticamente più alti rispetto a coloro che non ne soffrono (Karabulut *et al.*, 2012).

Una maggiore produzione di danno al DNA mediato dal superossido ($O_2^{\bullet-}$) e una ridotta difesa antiossidante sono stati implicati come fattori che contribuiscono allo sviluppo della PCOS, con segnalate alterazioni nella funzione della superossido dismutasi (SOD), la presenza di squilibrio nel rapporto zinco/rame e una maggiore attività della catalasi. Questi eventi possono comportare una diminuzione dell'accumulo di perossido di idrogeno (H_2O_2) con un aumento degli eventi di perossidazione lipidica. Una diminuzione di NO, potenzialmente dovuta all'aumentata attività degli inibitori della NO sintasi (NOS) come la dimetilarginina asimmetrica (ADMA), e uno squilibrio nella distribuzione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS), come la diminuzione di H_2O_2 e l'aumento di $O_2^{\bullet-}$, può compensare i processi fisiologici che circondano lo sviluppo follicolare, la maturazione degli ovociti e l'ovulazione, i quali contribuiscono alla disfunzione riproduttiva nelle pazienti con PCOS (Awonuga *et al.*, 2023).

La presenza degli AGEs (*Advanced Glycation End products*), ossia prodotti finali della glicazione avanzata) nell'ambiente sono la causa più diretta di stress glicativo per l'uomo; gli AGE si formano per aggregazione di specie reattive molecolari che vengono prodotte da una reazione endogena non enzimatica, nota come *reazione di Maillard* o di imbrunimento, che si verifica tra i gruppi amminici liberi di proteine, lipidi o acidi nucleici con il gruppo carbonilico, oppure tra gli acidi nucleici ed il gruppo carbonilico dei carboidrati (Piperi *et al.*, 2012); vengono assunti dal uomo anche per via esogena, data la loro elevata presenza nei cibi da fastfood, o che riportano parti bruciate in seguito ad una cottura non idonea, dovuta a tempi di cottura prolungati a temperature troppo elevate. Nelle pazienti con PCOS sono stati rilevati alti livelli sierici di AGEs (Garg *et al.*, 2015); infatti, vengono considerati come i fattori ambientali che concorrono al manifestarsi delle alterazioni riproduttive e metaboliche che caratterizzano la PCOS (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2012).

Inoltre, la patogenesi dei disturbi legati al metabolismo dei carboidrati nella PCOS è associata all'accumulo di AGEs derivanti dalla glicazione precoce e avanzata nei tessuti, che includono prodotti della glicazione non enzimatica e dell'ossidazione delle proteine. I processi patologici di glicazione portano al legame incrociato irreversibile delle proteine, alla perdita della loro struttura e della loro funzione, seguita dall'apoptosi cellulare. L'effetto dannoso degli AGEs si manifesta sia in modo indipendente dal legame con il loro recettore, sia legandosi ai recettori dei prodotti finali della glicazione (recettore RAGE, per i prodotti finali della glicazione avanzata) (Yarmolinskaya *et al.*, 2021).

Esiste un collegamento tra stress ossidativo e glicativo: le ROS possono catalizzare la formazione degli AGE nell'organismo (Stadtman *et al.*, 1997); tutto ciò conduce ad infiammazione e propagazione del danno tissutale, che portano all'innescarsi di un circuito autocatalitico. In numerosi studi è riportata l'ipotesi che gli AGE possano alterare la biosintesi degli ormoni steroidei nella policistosi ovarica, attaccando la funzionalità enzimatica, inducendo cambiamenti dati dall'infiammazione e portando alla condizione di insulino-resistenza (Garg *et al.*, 2016); il risultato dell'alterazione nella steroidogenesi potrebbe portare ad un'elevata sintesi di androgeni e ad una follicologenesi anormale, proprio come avviene in PCOS (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2012).

1.3.1 Danni da stress ossidativo e glicativo nel riproduttivo femminile

Il meccanismo specifico della produzione di ROS nella PCOS non è completamente compreso, ma diversi fattori contribuiscono all'aumento della produzione di ROS nelle pazienti con PCOS. Quando i mitocondri non funzionano in modo ottimale, generano più ROS come sottoprodotto della catena di trasporto degli elettroni durante la fosforilazione ossidativa; questa produzione eccessiva di ROS contribuisce alla presenza di stress ossidativo nei tessuti ovarici (Zeber-Lubecka *et al.*, 2023).

Si è visto che le ovaie di un modello murino di PCOS presentano segni di sofferenza portati dall'accumulo degli AGEs a livello del loro stroma ovarico, visibili mediante gli alti livelli di metilgliosale (MG-AGE), composto dicarbonilico a basso peso molecolare derivante dai processi metabolici, che funge da precursore per la formazione degli AGEs; è stato dimostrato che lo stress glicativo MG-dipendente è coinvolto nelle disfunzioni ovariche associate alla

PCOS e viene suggerito che questa condizione contribuisce alla deregolamentazione della funzionalità di SIRT1 e dell'attività mitocondriale. (Di Emidio *et al.*, 2020 (A)).

Si è visto che le implicazioni dello stress ossidativo legato alla PCOS hanno delle conseguenze anche sull'utero: in uno studio effettuato utilizzando *M. Auratus* come modello di PCOS, in cui la sindrome è stata indotta mediante trattamento con latrazolo, si è visto i livelli di enzimi antiossidanti e di perossidazione lipidica erano nettamente alti rispetto al controllo, e che la citoarchitettura uterina risultava alterata, mostrando iperplasia dell'endometrio e ghiandole ingrossate (Hansda *et al.*, 2021).

Da ciò viene l'idea che anche altri comparti dell'apparato riproduttivo femminile, come le tube di Falloppio e i genitali esterni, possano essere sottoposti all'azione dello stress ossidativo correlato alla PCOS, ma non sono stati ancora effettuati studi perfettamente incentrati sull'argomento.

1.3.2 Danni da stress ossidativo e glicativo nel cervello

Sono diversi gli studi in letteratura che correlano la PCOS con la presenza di disturbi di natura psichiatriche, come ansia, disturbo ossessivo-compulsivo, disturbo bipolare, depressione, alterazioni cognitive e sessuali, anoressia, bulimia e disturbo dismorfico corporeo, che possono influenzare negativamente la qualità della vita della donna affetta da PCOS; è stata confermata anche la presenza di cambiamenti a livello funzionale e strutturale. Grazie ai recenti progressi nelle tecniche di imaging cerebrale, come la risonanza magnetica strutturale (MRI) e funzionale (fMRI) o la tomografia a emissione di positroni (PET), è stato possibile indagare l'effetto dell'iperandrogenismo sul cervello femminile e sulle funzioni cognitive ed emozionali correlate; l'elettroencefalografia (EEG) ha fornito informazioni complementari sulle regioni cerebrali e sulle funzioni interessate dall'alterazione ormonale nella PCOS. Sebbene solo pochi studi abbiano indagato le alterazioni cerebrali correlate alla PCOS utilizzando tecniche di neuroimaging ed EEG, diverse prove hanno rilevato che la PCOS è associata a un funzionamento cognitivo più scarso, per esempio con alterazioni funzionali nelle regioni cerebrali responsabili della memoria di lavoro visiva, come il giro frontale medio e superiore destro (Pinto *et al.*, 2024).

In uno studio in cui è stato somministrato del deidroepiandrosterone a ratti da laboratorio tipo Wistar, per simulare un modello di PCOS, si è visto che questi hanno riportato diverse

modifiche nei parametri dei test neurocomportamentali e delle analisi ormonali; si è osservata una diminuzione delle attività motorie generali, che suggerisce la presenza di disturbi depressivi e declino cognitivo, associata ad un aumento del comportamento ansioso; è stata registrata un'ipersecrezione di LH ed FSH, confermando il quadro tipico della malattia. Inoltre, è stata valutata la presenza di danno ossidativo mediato da radicali liberi, mediante analisi dei livelli di MDA e ROS, la presenza di prodotti della perossidazione lipidica, la correlazione col possibile effetto pro-infiammatorio, mediante l'analisi dell'interleuchina-6 (IL-6), confermando l'effetto negativo della presenza di stress ossidativo. Ulteriori conferme derivano dalle analisi istologiche della corteccia cingolata anteriore e della corteccia prefrontale anteriore e mediale, che mostrano la presenza di ipertrofia e iperplasia cellulare, con un'ampia degenerazione neuronale (Igbo *et al.*, 2022).

1.3.3 Danni da stress ossidativo e glicativo nel fegato

Rivolgendo lo sguardo agli organi che esulano dall'apparato riproduttivo per quanto riguarda il loro coinvolgimento nella PCOS, il fegato merita un'attenzione particolare, a causa del suo ruolo fondamentale a livello metabolico.

Le malattie epatiche e la PCOS condividono diversi fattori di rischio, come obesità centrale, insulino-resistenza, infiammazione cronica di basso grado e iperandrogenismo (Vidal-Cevallos *et al.*, 2023).

Infatti, ci sono studi che correlano la presenza della PCOS a malattie epatiche, come la steatosi epatica non alcolica (*Nonalcoholic Fatty Liver Disease*, NAFLD), proprio a causa della resistenza all'insulina, tratto comune nella patogenesi delle due malattie. Uno dei meccanismi considerati nello sviluppo della NAFLD è l'ossidazione delle biomolecole da parte delle specie reattive dell'ossigeno mitocondriali, che portano a un aumento del danno ossidativo del fegato (Sprenovich Radenovich *et al.*, 2022), proprio come accade negli altri organi.

Più in generale, la presenza del cosiddetto “fegato grasso” (*Fatty Liver Disease*, FLD) risulta essere comune tra le pazienti con PCOS, e si pensa sia guidata da determinanti multifattoriali, tra cui un'ampia gamma di fattori di rischio ereditari e ambientali. Risulta perciò importante individuare con una valutazione strumentale, unitamente a quella di laboratorio, la presenza di steatosi o fibrosi epatica, al fine di scongiurare lo sviluppo di una malattia epatica avanzata nelle donne che già soffrono di PCOS (Smyk *et al.*, 2023)

1.4 *Terapie di cura*

Ad oggi non esiste una terapia specifica e definitivamente risolutiva che affronti contemporaneamente tutta la sintomatologia associata alla sindrome dell'ovaio policistico, ma terapie farmacologiche mirate e modifiche nello stile di vita possono contribuire ad alleviare i singoli sintomi, come i disturbi legati al ciclo mestruale, l'infertilità, gli squilibri metabolici, irsutismo ed acne (Sito WHO).

Le principali opzioni di cura possono essere:

- **Terapie ormonali**, come l'utilizzo della pillola anticoncezionale estro-progestinica orale, per regolarizzare il ciclo mestruale e ridurre quindi i livelli di testosterone, responsabili di irsutismo e acne (Cochran *et al.*, 2024); l'utilizzo di pillola progestinica orale o di dispositivi intrauterini (IUD) al progesterone, per le donne con controindicazioni agli estrogeni, possono essere utili unicamente alla regolarizzazione del ciclo mestruale (Forslund *et al.*, 2023).
- **Terapie per la gestione della fertilità**, che vanno a stimolare l'ovulazione, come per esempio trattamenti a base di clomifene citrato, come ad esempio il Clomid, o in alternativa il letrazolo: agiscono bloccando gli estrogeni, in modo che vengano prodotti gli ormoni utili ad indurre l'ovulazione, con LH ed FSH (Imani *et al.*, 1998); possono essere utilizzate anche le gonadotropine, le quali vanno a stimolare direttamente le ovaie, nel caso in cui altre terapie risultino inconcludenti, oppure gli inibitori delle aromatasi o la metformina, utile non solo nel trattamento del diabete, ma anche in un miglioramento della fertilità (Zehravi *et al.*, 2021).
- **Gestione di sovrappeso/obesità**; primo fra tutti è importante il dimagrimento, dato che una diminuzione del grasso corporeo previene la conversione di estrogeni in androgeni nel tessuto adiposo; ciò può risultare possibile seguendo un regime alimentare ipocalorico, adottando per esempio lo schema di una dieta mediterranea, abbinato allo sport praticato in maniera abituale (Barrea *et al.*, 2029).
- **Terapie per diabete di tipo 2 e insulino-resistenza**; oltre alla terapia farmacologica, che prevede l'utilizzo di farmaci ipoglicemizzanti, tra cui il farmaco più utilizzato a tale scopo è la metformina (Johnson, 2014), è fondamentale adottare degli accorgimenti nell'alimentazione per la gestione della glicemia, seguendo una dieta a basso indice glicemico e prestando particolare attenzione all'utilizzo dei carboidrati,

come ad esempio quella mediterranea, a basso contenuto di carboidrati e grassi (Minari *et al.*, 2023).

- **Supporto psicologico;** essendo la PCOS una malattia che colpisce diversi aspetti della vita di una donna, a causa dei cambiamenti fisici che potrebbe comportare e delle eventuali difficoltà nel concepimento, potrebbero manifestarsi stati di ansia e depressione, per i quali potrebbe essere utile una terapia di tipo cognitivo-comportamentale (CBT), o un supporto alla fertilità della coppia (Cowan *et al.*, 2023).
- **Terapie complementari;** in diversi casi le pazienti trovano giovamento con la pratica dell'agopuntura, che andrebbe a migliorare il metabolismo glucidico e la sensibilità all'insulina (Zheng *et al.*, 2021) e con l'utilizzo di integratori alimentari come gli inositoli, come il mio-inositolo ed il D-chiro-inositolo, che contribuiscono anche al miglioramento della funzionalità ovarica, essendo utili a molteplici processi biologici (Unfer *et al.*, 2016).

1.5 Antiossidanti come trattamento per la PCOS

Dato che non esiste una terapia specifica per la cura dell'ovaio policistico, una strategia terapeutica alternativa, molto in voga nell'ultimo decennio, risulta essere l'utilizzo di integratori alimentari per alleviare alcuni dei sintomi della malattia; un esempio sono quelli a base di antiossidanti, molecole utili a combattere la presenza di stress ossidativo; sono diversi gli studi in letteratura sull'utilizzo di queste molecole, come per esempio quelli effettuati sul resveratrolo: questa è una fitoalessina naturale che fa parte dei polifenoli non flavonoidi, e può essere isolata dalla buccia dell'uva e da numerosi altri prodotti alimentari, come il gelso, con proprietà antinfiammatoria e antidiabetica; inoltre è in grado di indurre o inibire l'apoptosi, e contribuisce alla riduzione del numero dei follicoli atresici, inibendo la transizione da follicoli primari a quelli in via di sviluppo: si è quindi visto che può essere uno strumento promettente nel trattamento della PCOS (Yarmolinskaya *et al.*, 2021).

Un'altra molecola antiossidante, la carnitina, viene spesso utilizzata in concomitanza con la PCOS; questa è un derivato aminoacidico (3-idrossi-4-N-trimetilammoniobutanoato), che è stato ampiamente studiato sin dalla sua scoperta, nel 1905, quando venne identificata per la prima volta in un estratto di carne bovina, da cui proviene il nome (Steiber *et al.*, 2004). L'interesse nei riguardi di questo composto è aumentato grazie alla scoperta dei meccanismi

legati al suo deficit primario e secondario nell'uomo, e quindi al suo utilizzo come terapia e integratore (Alhasaniah *et al.*, 2022). La presenza di carnitina nell'organismo umano varia a seconda della composizione corporea, del sesso, e della dieta: è proprio una maggiore assunzione di carnitina tramite il cibo che permette l'aumento plasmatico dei suoi livelli. Quando non viene assunta con l'alimentazione, viene prodotta endogenamente da due aminoacidi essenziali, lisina e metionina, e ciò può avvenire nel cervello, nel fegato e nei reni; gli organi che ne contengono di più, ossia muscolo scheletrico e cardiaco, non sono in grado di sintetizzarla e devono ottenerla dal plasma.

La carnitina integrata e non assorbita viene distrutta dal microbiota intestinale. Condizioni che possono influenzarne negativamente la presenza sono complicanze diabetiche, traumi, emodialisi, malnutrizione, obesità, cardiomiopatie, diete troppo restrittive, squilibri endocrini, interazioni con altri farmaci (Guerra *et al.*, 2021).

L'integrazione di carnitina viene fatta mediante la sua forma L, che è quella farmacologicamente attiva, e risulta essere benefica in pazienti che soffrono di molteplici disturbi: uremia, malattie cardiovascolari, malattie neurologiche, tra cui il morbo di Alzheimer, il morbo di Parkinson, l'encefalopatia epatica, il disturbo dello spettro autistico e altre neuropatie dolorose, disturbi oculari, trattamento di cachessia, casi di carenza primaria di carnitina, diabete, obesità, intolleranza al glucosio (Alhasaniah *et al.*, 2022). Viene utilizzata da molti sportivi, in assenza di patologie, come integratore per migliorare la performance, ma è molto conosciuta anche per il suo utilizzo nel trattamento delle carenze nutrizionali di neonati e bambini (Buist *et al.*, 2016).

In molte ricerche sono state impiegate le carnitine per la cura dell'infertilità femminile e per aumentare la funzione riproduttiva, sia su modelli umani che animali. La maggior parte degli studi sull'uomo ha utilizzato l'isoforma L della carnitina come integrazione per alleviare o trattare la condizione di infertilità femminile. L'integrazione con LC, unita alla acetil-L-carnitina (ALC) allevia malattie come endometriosi, sindrome dell'ovaio policistico e amenorrea, secondo diverse ricerche. È stato dimostrato che le carnitine promuovono la salute degli ovociti e aumentano i livelli di ormoni sessuali e gonadotropine (Genazzani *et al.*, 2011).

1.5.1 Meccanismo ed effetti positivi delle carnitine sulla PCOS

Il ruolo degli antiossidanti naturali nella promozione della sensibilità all'insulina e nella modulazione della risposta infiammatoria sembra riportare ad un equilibrio funzionale nelle pazienti con PCOS e nei modelli animali della malattia (Furat Rencber *et al.*, 2018; Yarmolinskaya *et al.*, 2021). Infatti, un'integrazione di antiossidanti nella dieta porta al miglioramento della ciclicità mestruale, dell'acne e dell'irsutismo nelle pazienti con ovaio policistico, con una significativa riduzione del peso corporeo e del *Body Mass Index* (BMI) (Advani *et al.*, 2020). A tal proposito, il ruolo delle carnitine è emerso dalla ricerca clinica e sperimentali: queste svolgono un ruolo fisiologico fondamentale nel metabolismo lipidico e nelle vie metaboliche intermedie; trasferendo i gruppi acetilici dall'esterno all'interno della membrana mitocondriale, regolano il metabolismo energetico e regolano i livelli di energia cellulare (Reuter *et al.*, 2012) Per un corretto funzionamento della cellula, è necessario che sia presente l'intero pool di carnitina. La L-carnitina (LC) rappresenta il 50-85% del pool e l'acetil-L-carnitina (ALC) è la più abbondante. Dati i diversi effetti della LC e ALC sulla respirazione cellulare, è noto che la presenza combinata di LC e ALC è nota per sostenere la flessibilità metabolica (McCann *et al.*, 2021). Il rapporto ALC/LC, che varia da 0,3 a 0,5, è specifico per ogni tessuto e i suoi cambiamenti sono la prova di un metabolismo mitocondriale disturbato (Reuter *et al.*, 2012).

La LC è essenziale nel metabolismo degli acidi grassi, in quanto facilita il trasporto degli acidi grassi liberi a lunga catena nella matrice mitocondriale, rendendoli disponibili per la β -ossidazione; è anche coinvolta nel trasporto e nell'ossidazione degli alfa-chetoacidi all'interno del mitocondrio e modula il rapporto acil-CoA/CoA intramitocondriale; inoltre, la LC trasporta i gruppi acetilici dall'interno all'esterno della membrana mitocondriale, regolando in tal modo il metabolismo del glucosio e di rilevando i livelli energetici delle cellule; la LC ha proprietà antiossidanti dirette, protegge il metabolismo mitocondriale e modula le attività degli enzimi che producono ROS; per queste ragioni, può contribuire al trattamento della PCOS e delle sue complicanze legate allo squilibrio redox (Reuter *et al.*, 2012).

Si è visto anche come la L-carnitina raggiunge l'ovocita attraverso il canale OCTN2 (organic cation transporter-2) (fig. 4), migliorandone l'attività tramite:

- Innalzamento dei livelli di energia prodotta attraverso la β -ossidazione;

- Riduzione dello stress nel reticolo endoplasmatico rugoso (ER), eliminando l'eccesso di palmitato qui presente;
- Riduzione dei danni dati dallo stress ossidativo, eliminando i radicali liberi;
- Prevenzione dell'apoptosi, tramite la sua azione inibente nei confronti delle caspasi (Agarwall *et al.*, 2018).

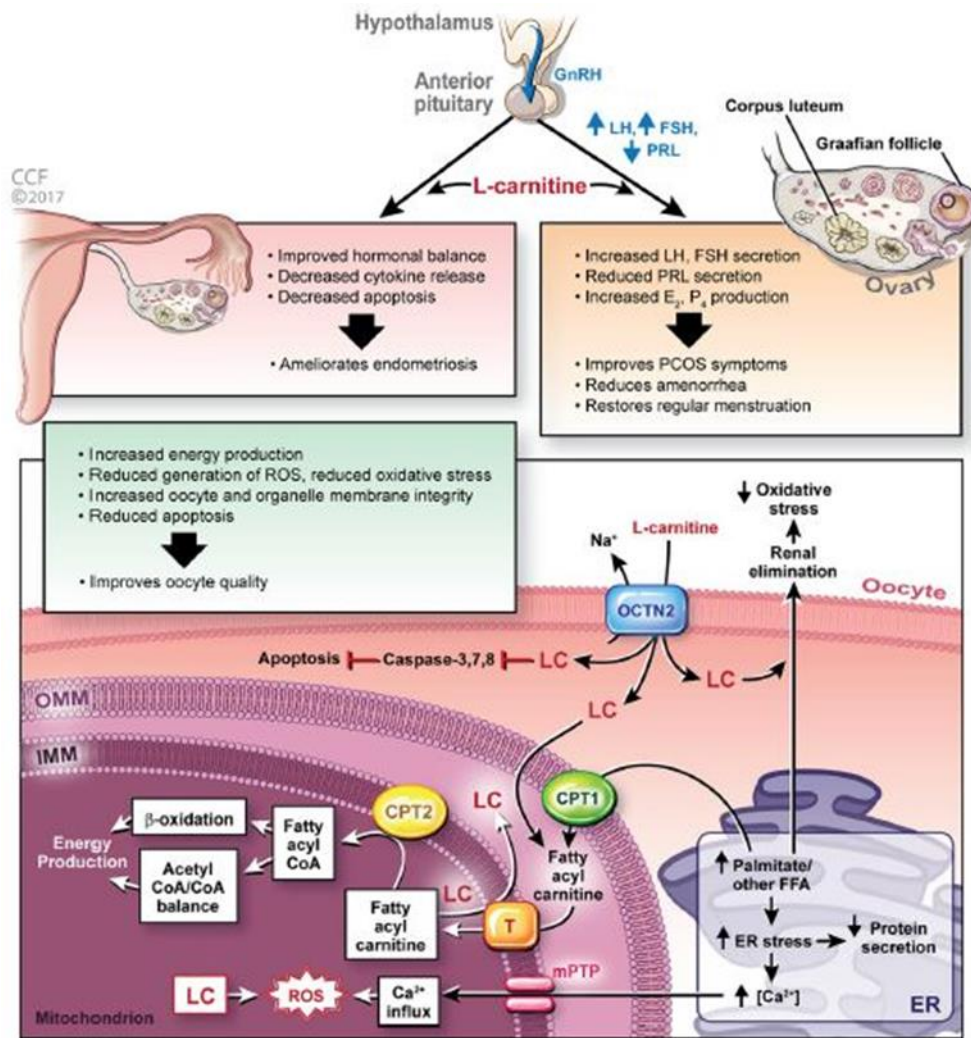


Figura 4 - Meccanismo d'azione della L-carnitina nella fertilità della donna (Agarwall *et al.*, 2018).

Le proprietà antiossidanti dell'ALC, il principale estere acetilico dell'LC, hanno effetti favorevoli sulla funzione riproduttiva (Aliabadi *et al.*, 2012). L'ALC è necessario per il metabolismo intermedio nei mammiferi, fungendo da donatore di gruppi acetilici e aiutando il trasporto degli acidi grassi. È stato dimostrato che l'ALC ha proprietà colinomimetiche e modula il sistema GABA. Può modulare la funzione neuronale e quindi l'asse ipotalamo-

ipofisi-gonadi per imporre la sua influenza sulla riproduzione femminile poiché è diffuso nell'ipotalamo (Liu *et al.*, 2004).

In un recente lavoro le formulazioni di carnitina contenenti LC e acetyl-L-carnitina (ALC) somministrate per via orale a un modello di topo PCOS indotta da DHEA, sono risultate efficaci nel migliorare la funzionalità ovarica (Di Emidio *et al.*, 2020 (B)).

Ciò è in accordo con la presenza di bassi livelli sierici di carnitine nelle donne PCOS obese e non obese, in associazione all'insulino-resistenza e all'iperandrogenismo (Fenkci *et al.*, 2008, Samimi *et al.*, 2016).

Altri gruppi di ricerca hanno scoperto che con somministrazione di LC migliorano la regolarità del ciclo mestruale, dell'ovulazione e i tassi di gravidanza (Zhao *et al.*, 2024).

1.6 Il modello murino

Il modello utilizzato per lo studio della sindrome è il topo; risulta essere il prescelto per la maggior parte degli studi delle malattie dell'uomo poiché l'organizzazione del suo DNA e l'espressione dei suoi geni sono pressoché simili a quelle umane; il 98% dei geni umani trova geni paragonabili a quelli del topo (Rosenthal *et al.*, 2007); il loro sistema nervoso e quello riproduttivo trovano molte somiglianze con quelli dell'uomo, e soprattutto contraggono molte delle malattie umane. Avendo un ciclo di vita breve e un alto tasso di riproduttività, tale modello permette di osservare in breve tempo gli effetti dei trattamenti effettuati, anche su più generazioni; aspetto da non sottovalutare è il basso costo di gestione e mantenimento rispetto ad altri modelli animali, come primati non umani.

1.6.1. Ciclo uterino e ciclo estrale a confronto

Nell'uomo e nel topo la maturazione degli organi genitali femminili è regolata da eventi ciclici, che differiscono per durata e per modificazioni che apportano.

Il ciclo uterino che si verifica nella donna è costituito dalle fasi, controllate dagli ormoni steroidei rilasciati dalle ovaie, ossia estrogeno e progesterone, che vanno a preparare l'endometrio all'eventuale impianto di un ovulo fecondato, e quindi alla gravidanza; per convenzione il ciclo uterino inizia il primo giorno del ciclo mestruale, e dura di media 28 giorni, e le fasi sono 3 (fig. 5):

- *Fase mestruale*, che dura da 3 a 6 giorni; inizia la maturazione di un follicolo nell'ovaio e si ha la degenerazione, il distacco e l'eliminazione, insieme al sangue, di tutto lo strato funzionale dell'endometrio fino allo strato basale, che rimane intatto; la degenerazione della mucosa si ha in seguito alla chiusura prolungata delle arterie in seguito ad un'ischemia;
- *Fase proliferativa o follicolare*, che dura fino al 14° giorno, e corrisponde alla fase follicolare del ciclo ovarico; si ha una grande attività proliferativa delle cellule dello stroma, delle ghiandole e dei vasi sanguigni per riformare la mucosa uterina, che si innalza sempre di più;
- *Fase secretiva o luteinica*, che dura fino al 28° giorno, e corrisponde alla fase luteinica del ciclo ovarico; si ha il completamento della riparazione della mucosa uterina, che si prepara ad accogliere l'uovo nel caso venga fecondato; la mucosa uterina, in questo momento, è edematosa e spessa circa 6 mm, le ghiandole diventano tortuose, le cellule dello stroma si trasformano in cellule predeciduali, in cui si accumulano glicogeno e lipidi, e le arterie si dilatano, spiralizzandosi (Guyton *et al.*, 2017).

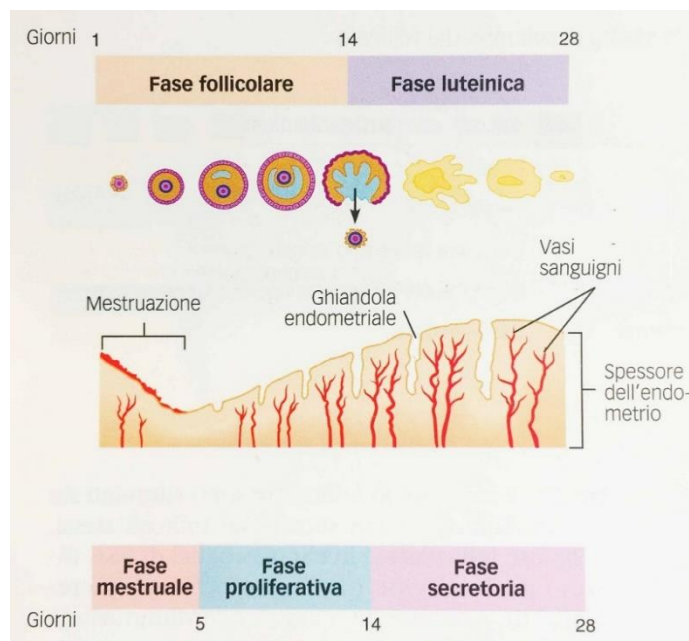


Figura 5 - Fasi del ciclo uterino.

Nel topo invece gli organi genitali femminili subiscono cambiamenti legati alla maturazione durante la pubertà ed anche cambiamenti ciclici durante il periodo della riproduzione, che vanno sotto il nome di ciclo estrale, che si divide in:

- *Proestro*, che è una fase anabolica in cui c'è un'attiva crescita del tratto genitale: la mucosa uterina e l'orifizio esterno dell'utero si ispessiscono ed aumentano la loro vascolarizzazione; nello striscio vaginale il numero di leucociti e cellule nucleate è simile; normalmente dura 1-1,5 giorni;
- *Estro*, seconda fase anabolica in cui la vulva si ispessisce e aumenta la sua vascolarizzazione; nello striscio vaginale appaiono cellule epiteliali squamose anucleate; di solito dura 1-3 giorni;
- *Metaestro*, che è una fase catabolica, in cui la vagina inizia ad essere rivestita da un epitelio di tipo cheratinizzato; dura 1-5 giorni;
- *Diestro*, che è un periodo di quiescenza: nella vagina compare il muco, ed allo striscio vaginale viene evidenziata la presenza dei leucociti; può durare da 2 a 4 giorni (Ruberte *et al.*, 2017).

2. SCOPO DEL LAVORO

2. Scopo del lavoro

La PCOS è tipicamente caratterizzata da anovulazione o oligo-ovulazione, con segni di eccesso di androgeni, come irsutismo e acne, e cisti ovariche multiple nelle ovaie. È manifestata dal 5-10% delle donne, e negli Stati Uniti è la causa più frequente di infertilità (Rocha *et al.*, 2019).

Dopo aver studiato e caratterizzato la presenza di specifiche alterazioni morfologiche nelle ovaie di un modello di PCOS, indotta nel topo tramite la somministrazione di DHEA (Motta, 2010; Li *et al.*, 2016), e l'effetto protettivo della somministrazione di una formulazione di carnitine, contenente L-carnitina ed acetil-L-carnitina, in questo lavoro di tesi sperimentale si è voluta indagare la presenza di eventuali alterazioni morfo-funzionali in altri organi dell'apparato riproduttivo, come utero ed ovidotti, per verificare ulteriori azioni negative sulla fertilità femminile, utilizzando lo stesso modello sperimentale. Lo studio si è poi focalizzato anche su cervello e fegato; per il primo sono state studiate l'isocorteccia ed il giro dentato dell'ippocampo, aree fondamentali per l'apprendimento e la memoria, che potrebbero risultare compromesse dalla presenza della sindrome. L'intenzione di indagare la struttura epatica è scaturita dallo stato di infiammazione cronica a basso grado associato alla PCOS, che è correlato ad un maggior rischio di sviluppo della steatosi epatica non alcolica (Rocha *et al.*, 2019).

Grazie ad un'indagine istologica ed immunohistochimica, su tutti gli organi oggetto di studio ci si è incentrati su:

- Morfologia;
- Steroidogenesi;
- Danni da stress ossidativo;
- Danni alla funzionalità mitocondriale;
- Danni da stress glicativo;
- Status infiammatorio.

3. MATERIALI E METODI

3. Materiali e Metodi

3.1 Animali

Per gli studi sono stati utilizzati topi di razza CD-1 (Charles River Italia s.r.l., Calco), mantenuti in ambiente a temperatura controllata, con un ciclo di luce/buio di 12 ore (07:00-19:00) e con libero accesso a cibo ed acqua *ad libidum*.

Tutti gli esperimenti sono stati condotti rispettando la legislazione nazionale ed internazionale (Direttiva del Consiglio della Comunità Economica Europea 86/609, GU 358, 12 dicembre 1987; Decreto Legislativo 116/92, Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana n. 40, 18 febbraio 1992; *National Institutes of Health*, Guida per la cura e l'uso di animali da laboratorio, Pubblicazione NIH n. 85-23, 1985). Il progetto è stato approvato dal Ministero della Salute Italiano e dal Comitato Etico dell'Università Degli Studi Dell'Aquila (Autorizzazione n.269/2018-PR).

30 topi femmina di 44 settimane di vita e di 20-21 grammi di peso sono stati assegnati a caso a 3 gruppi di 10 esemplari l'uno; per creare il modello della sindrome ai topi è stata fatta un'iniezione giornaliera di DHEA (6 mg/100 g di peso corporeo, 100 µL/topo in olio di semi di sesamo con 10% di 95% etanolo, Sigma) per 20 giorni consecutivi (topi DHEA) (Motta, 2010; Li *et al.*, 2016); al gruppo di controllo sono stati iniettati 0,09 mL di olio di semi di sesamo e 0,01 mL di etanolo 95% tutti i giorni per 20 giorni consecutivi (topi CTR); allo stesso tempo un altro gruppo ha ricevuto per via orale giornalmente una formulazione di carnitina contenente L-carnitina e acetil-L-carnitina (0,40 mg LC, L-carnitina, 0,20 mg ALC acetil-L-carnitina, topi DHEA/LC-ALC), disciolta in 100 µL di acqua per animale, somministrata per 20 giorni consecutivi; i gruppi CTR e DHEA hanno ricevuto una somministrazione giornaliera di acqua per 20 giorni consecutivi.

I topi sono stati sacrificati tramite inalazione di diossido di carbonio (CO₂ 10-30%), seguita da dislocazione cervicale; il tutto è stato fatto in modo da minimizzare la sofferenza degli animali (Di Emidio *et al.*, 2020 (A)). Gli organi sono stati asportati e lavati con tampone fosfato salino (PBS), prima di essere fissati.

3.1.1 Determinazione della fase del ciclo estrale

L'analisi degli strisci vaginali è stata fatta giornalmente dal settimo giorno dopo la prima iniezione di DHEA e controllo. Gli stadi del ciclo estrale sono stati determinati ogni giorno effettuando uno striscio vaginale; le cellule vaginali sono state raccolte tramite un lavaggio salino e poi analizzate al microscopio ottico con ingrandimento 10x.

Le varie fasi del ciclo sono caratterizzate dalla presenza di diversi tipi e combinazioni di cellule:

- La *fase proestr*ale è riconoscibile dalla predominanza di cellule epiteliali nucleate e di alcune cellule epiteliali corneificate;
- La *fase estr*ale presenta una maggioranza di cellule epiteliali corneificate squamose;
- La *fase metaestr*ale presenta insieme leucociti e cellule epiteliali corneificate squamose;
- La *fase disestr*ale è caratterizzata da una massiccia presenza di leucociti (Di Emidio *et al.*, 2020 (A)).

3.2 Preparativa per la microscopia ottica (L.M.)

3.2.1 Colorazione ematossilina - eosina

Uteri, ovidotti, cervelli e fegati, prelevati in doppio da due animali differenti, sono stati lavati in tampone fosfato salino (PBS) e immediatamente fissati in paraformaldeide (PFA) al 3.7% in PBS (Bio-Optica, Milano, Italia) per la colorazione ematossilina – eosina (E&E) (Bio-Optica, Milano, Italia); in seguito sono stati deidratati con una serie crescente di alcoli, chiarificati in xilene e inclusi in blocchi di paraffina; i campioni sono stati tagliati con un microtomo (Leica SMR2000, Wetzlar, Germany) in sezioni seriali di 6 µm di spessore. In seguito, le sezioni sono state deparaffinate con xilene ed idratate con una scala decrescente di alcoli, colorate con E&E secondo le istruzioni del produttore (Bio-Optica, Milano, Italia) e osservate tramite microscopio ottico (Zeiss Axiostar Plus, Oberkochen, Germany).

3.2.2 *Colorazione Mallory Tricromica*

Le sezioni di uteri, ovidotti, cervelli e fegati, incluse in paraffina, sono state deparaffinate con xilene, idratate attraverso una scala crescente di alcoli, e processate per la colorazione Mallory Tricromica (Bioptica, Milano), seguendo le istruzioni del produttore, e osservate al microscopio ottico (Zeiss Axiostar Plus, Oberkochen, Germany).

3.2.3 *Morfometria mediante ImageJ*

L'analisi morfometrica degli uteri e degli ovidotti è stata effettuata tramite l'utilizzo del software ImageJ; quest'ultimo è un programma informatico di elaborazione digitale delle immagini, rilasciato nel pubblico dominio, basato su Sun-Java; nel presente lavoro è stato utilizzato con la funzione di misurazione della distanza (Collins *et al.*, 2007).

3.2.4 *Immunoistochimica: MG-AGE e 4-HNE*

Le sezioni di utero, ovidotti e cervello incluse in paraffina, sono state deparaffinate e idratate attraverso l'utilizzo di xilene e alcoli a gradazione discendente. Per aumentare l'immunoreattività, le sezioni sono state fatte bollire in tampone citrato 10 mM (pH: 6.1. Bio-Optica, Milan, Italy) in micronde a 720 W (3 cicli/3 minuti ognuno); dopodiché le sezioni sono state sottoposte al trattamento per il blocco dell'attività delle perossidasi endogene (Dako). Dopo un accurato lavaggio, le sezioni sono state incubate per una notte nel reagente per il blocco di IgG di topo M.O.M. (Mouse On Mouse, Vector Laboratories) secondo il protocollo della casa produttrice. Poi le sezioni sono state incubate con anticorpo monoclonale mouse to methylglyoxal (MG)-AGE (Arg-Pyridine, AGE06B, BioLogo, 1:100) e anticorpo policlonale rabbit to 4-HNE (4-Hydroxynonenal, ab46545, Abcam, 1:100) diluito in M.O.M. per 40 minuti, seguendo le istruzioni di Vector Laboratories. MG-AGE e 4-HNE sono stati rivelati mediante Labelled Polymer-HRP, 3,3-diaminobenzidina 153 (DAB) e DAB (DAKO kit), secondo le istruzioni del produttore. La controcolorazione è stata fatta con ematossilina (Bio-Optica, Milano, Italia). Il controllo negativo è stato realizzato omettendo l'anticorpo primario e sostituendolo con diluente M.O.M. tal quale. Le sezioni sono state deidratate, montate con Neomount (Merck, Darmstadt, 157 Germany), osservate e fotografate con un microscopio Leiz Laborlux S (Germany) dotato di una camera digitale compatta Olympus.

3.2.5 *Immunoistochimica: TOMM20, Coll e 17 β -HSD IV*

Le sezioni di utero e ovidotti, incluse in paraffina, sono state deparaffinate e idratate attraverso l'utilizzo di xilene e alcoli a gradazione discendente. Per aumentare l'immunoreattività, le sezioni sono state fatte bollire in tampone citrato 10 mM (pH: 6.1. Bio-Optica, Milan, Italy) in microonde a 720 W (3 cicli/3 minuti ognuno); dopodiché le sezioni sono state sottoposte al trattamento per il blocco dell'attività delle perossidasi endogene (Dako). Dopo un accurato lavaggio, le sezioni sono state incubate per un'ora a temperatura ambiente in PBS/BSA 5% (Sigma-Aldrich). Dopodiché le sezioni sono state incubate con i seguenti anticorpi primari: 17 β -HSD IV policlonale rabbit e TOMM20 (1:100 e 1:400 rispettivamente) (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) e Coll1 policlonale rabbit (1:500) (Immunological Sciences Ab-82138), tutti diluiti in 1% BSA/PBS overnight a 4 °C. Dopo lavaggio in PBS, gli anticorpi rabbit sono stati rivelati mediante l'utilizzo di kit DAKO (Labelled Polymer-HRP, 3,3-diaminobenzidine (DAB) substrate buffer and DAB 172) secondo le istruzioni del produttore. Il controllo negativo è stato effettuato omettendo l'anticorpo primario e sostituendolo con soluzione di BSA/PBS 1% tal quale. La controcolorazione è stata effettuata con ematossilina (Bio-Optica, Milano, Italia). Le sezioni sono state deidratate e montate con Neomount (Merck, Darmstadt, Germany), osservate e fotografate con un microscopio Leiz Laborlux S (Germany) dotato di una camera digitale compatta Olympus.

3.2.6 *Immunoistochimica: Sirt-1 e IL-1*

Le sezioni di cervello e fegato, precedentemente incluse in paraffina, sono state deparaffinate e reidratate attraverso l'utilizzo dello xilene e di una scala a concentrazione decrescente di alcoli. Per aumentarne l'immunoreattività, le sezioni sono state fatte bollire in 10mM di tampone citrato (pH 6.1, Bio-Optica, Milan, Italy) in microonde a 720 W (3 cicli/3 min ognuno). Dopodiché le sezioni sono state sottoposte al trattamento per il blocco dell'attività delle perossidasi endogene (Agilent Dako, Santa Clara, USA). Dopo alcuni lavaggi, le sezioni sono state incubate con Background Sniper (Biocare Medical, Pacheco, California) per 15 min a temperatura ambiente. Poi le sezioni di cervello sono state incubate con l'anticorpo policlonale Sirt-1 (1:500) (Novus Biological, USA) diluito in una soluzione 1% BSA/PBS a 4°C per una notte; contemporaneamente le sezioni di fegato sono state incubate con il seguente anticorpo primario: anticorpo policlonale di topo IL-1 β (1:500) (Novus Biological, USA) diluito in una soluzione 1% BSA/PBS a 4°C per una notte. Dopo un lavaggio in PBS, entrambe gli anticorpi sono stati rivelati tramite kit DAKO (Labelled Polymer-HRP, 3,3-

diaminobenzidine (DAB) substrate buffer e DAB) secondo le istruzioni della casa produttrice. La controcolorazione è stata effettuata con ematossilina (Bio-Optica, Milano, Italia). Il controllo negativo è stato realizzato omettendo l'anticorpo primario e sostituendolo con il diluente all'1% di BSA/PBS assoluto. Le sezioni sono state deidratate e infine montate con Neomount (Merck, Darmstadt, Germany), osservate e fotografate con un microscopio ottico Leiz Laborlux S (Germany) munito di una fotocamera digitale compatta Olympus.

3.2.7 Analisi semiquantitativa dei markers

La valutazione semiquantitativa dei markers indagati è stata effettuata utilizzando il software Image J 1.44p (plugin IHC PROFILER per analisi immunoistochimiche), secondo quanto suggerito da Varghese *et al.*, 2014. La quantificazione dei markers è stata eseguita tenendo conto del background presente nei controlli negativi e di quello delle aree di marcatura delle sezioni valutate.

3.2.8 Analisi statistica

L'analisi statistica è stata valutata tramite t-test. Le analisi sono state eseguite utilizzando il software SigmaStat (Jandel Scientific Corporation, San Rafael, CA, USA). I valori $p < 0,05$ sono stati considerati statisticamente significativi.

3.3 Preparativa per la Microscopia Elettronica a Trasmissione (TEM)

Gli ovidotti sono stati scelti, ne è stata selezionata la porzione d'interesse, e sono stati lavati in tampone fosfato salino (PBS), e immediatamente fissati in glutaraldeide al 2,5% (Agar Scientific, Stansted, UK) in tampone fosfato salino (PBS). I campioni fissati sono stati tenuti a 4 °C per almeno 48 ore, fino al momento dell'inclusione; successivamente sono stati lavati in PBS, post-fissati in tetrossido di osmio (Agar Scientific) 1% in PBS e di nuovo lavati in PBS. In seguito, I campioni sono stati deidratati mediante passaggi in una serie di alcoli (Carlo Erba Reagenti, Milan, Italy) a gradazione ascendente, e successivamente immersi in ossido di propilene (BDH Italia, Milan, Italy) per la sostituzione del solvente, e inclusi in resina epossidica EMbed-812 (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA). Sezioni semifini, di 1 mm di spessore, sono state colorate con blu di metilene, esaminate mediante microscopio

ottico (Zeiss Axioskop, Oberkochen, Germany) e fotografate mediante camera digitale (DFC230; Leica, Wetzlar, Germany). Sezioni ultrafini, di 60-80 nm, sono state tagliate mediante l'utilizzo di una lama di diamante montata su un ultramicrotomo Reichert-Jung Ultracut E (Reichert Technologies, Munich, Germany), raccolte su grids di rame e contrastate con Uranyless (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) ed in seguito citrato di piombo (SIC, Rome, Italy). Le sezioni sono state esaminate e fotografate usando i microscopi elettronici a trasmissione Zeiss EM100 e Philips TEM CM100, operanti ad una tensione di 80 kV.

4.RISULTATI

4. RISULTATI

Le analisi morfologiche, sia dal punto di vista strutturale - ultrastrutturale che immunoistochimico, hanno evidenziato che le alterazioni attese sono state riscontrate in tutti gli organi esaminati per i gruppi CTRL, DHEA, DHEA/LC-ALC, sottolineando dunque che non è presente variabilità di risultato all'interno di uno stesso gruppo, e confermando che gli animali hanno risposto in maniera omogenea ai trattamenti effettuati. Di seguito vengono descritte dettagliatamente tutte le caratteristiche studiate per ognuno degli organi in esame.

4.1 Effetti della carnitina sul ciclo estrale del fenotipo PCOS

All'atto dell'analisi degli strisci vaginali la maggior parte dei topi del gruppo di controllo (80%) ha mostrato una normale ciclicità estrale, caratterizzata dall'alternanza di tutte le fasi; tutti i topi del gruppo DHEA hanno mostrato un ciclo anormale, bloccato alla fase estrale; dei topi DHEA trattati con carnitina, il 20% presentava una ciclicità estrale normale, mentre l'80% risultava essere bloccato in fase estrale; infatti, al momento del sacrificio, i topi del gruppo CTRL erano in fase metaestrale, mentre quelli del gruppo DHEA e DHEA/LC-ALC in fase estrale (fig. 6).

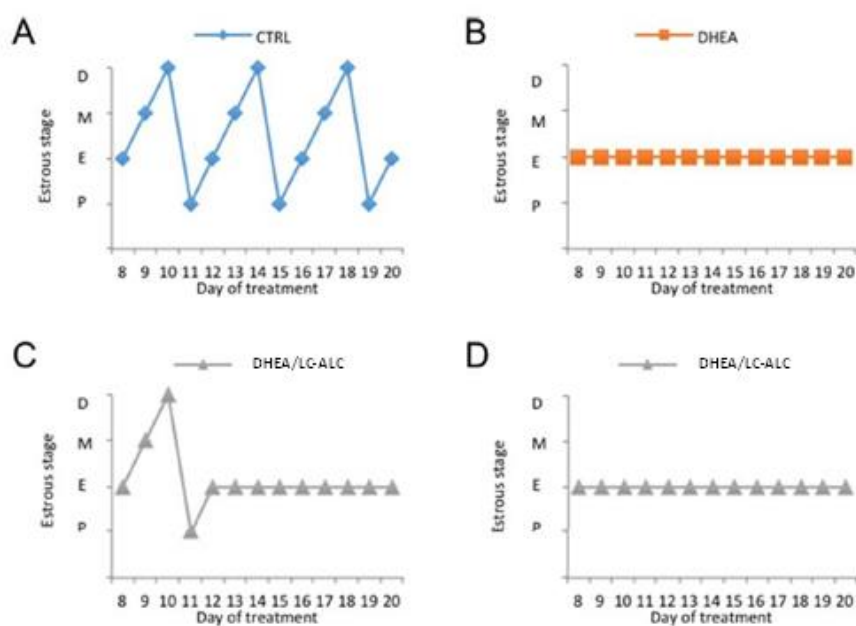


Figura 6 – Rappresentazione grafica del ciclo estrale di un topo del gruppo CTR (A) ed uno del gruppo DHEA (B). Rappresentazione grafica del ciclo estrale in due topi del gruppo DHEA/LC-ALC: il 20 % dei topi di questo gruppo mostravano una ciclicità estrale normale durante la seconda settimana di trattamento, la quale è stata persa nell'ultima settimana (C); l'80% dei topi DHEA/LC-ALC non presentava ciclicità estrale durante l'intera durata del trattamento (D). Nelle ordinate dei grafici: (D), Diestro; (M), Metaestro; (E), Estro; (P), Proestro.

4.2 Utero

4.2.1 Fibrosi e iperplasia uterina

L'analisi istologica della porzione delle corna uterine di topo in tutti i tre gruppi mostra un'organizzazione microscopica ben preservata che, in sezione trasversale, a partire dal lato luminale, consta di una tonaca mucosa, una tonaca muscolare e una tonaca sierosa. Nel gruppo di controllo la colorazione in ematossilina - eosina rende visibile un endometrio con un epitelio colonnare semplice, costituito da cellule secretorie non ciliate e cellule ciliate meno numerose, ma comunque presenti, e uno stroma, con una sottostante lamina propria molto cellularizzata, che ospita ghiandole uterine tubulari semplici (fig. 7A-D). Lo spessore medio dell'epitelio e dell'endometrio è $12,464 \pm 1,685$ e $141,615 \pm 13,266$ μm (tabella 2). Il miometrio è costituito da tre strati muscolari, ognuno con orientamento differente delle fibre muscolari, e un perimetrio costituito da un sottile strato di mesotelio e tessuto connettivo lasso (fig. 7A-D). Nel gruppo DHEA l'endometrio risulta essere iperplastico e più spesso rispetto al gruppo di controllo; lo spessore dell'epitelio luminale aumenta e risulta essere invaginato nel sottostante stroma, che mostra una cellularità minore se comparato al gruppo di controllo (fig. 7E-H). Lo spessore medio di epitelio ed endometrio nel gruppo DHEA è, rispettivamente, $25,119 \pm 2,370$ e $345,584 \pm 17,199$ μm (tabella 2).

Tabella 2 – Analisi morfometrica dello spessore di endometrio, epitelio e stroma dell'utero murino. I valori sono espressi come media \pm DS. Le differenze sono state valutate con ANOVA seguito da Tukey test HSD post hoc. Gli apici indicano una differenza significativa nella stessa riga ($p < 0,05$).

	CONTROLLO	DHEA	DHEA/LC-ALC
ENDOMETRIO	$141,615 \pm 13,266^a$	$345,584 \pm 17,199^b$	$237,225 \pm 40,884^c$
EPITELIO	$12,464 \pm 1,685^a$	$25,119 \pm 2,370^b$	$19,435 \pm 2,582^{a,b}$
STROMA	$129,864 \pm 13,419^a$	$321,645 \pm 14,989^b$	$209,886 \pm 38,386^a$

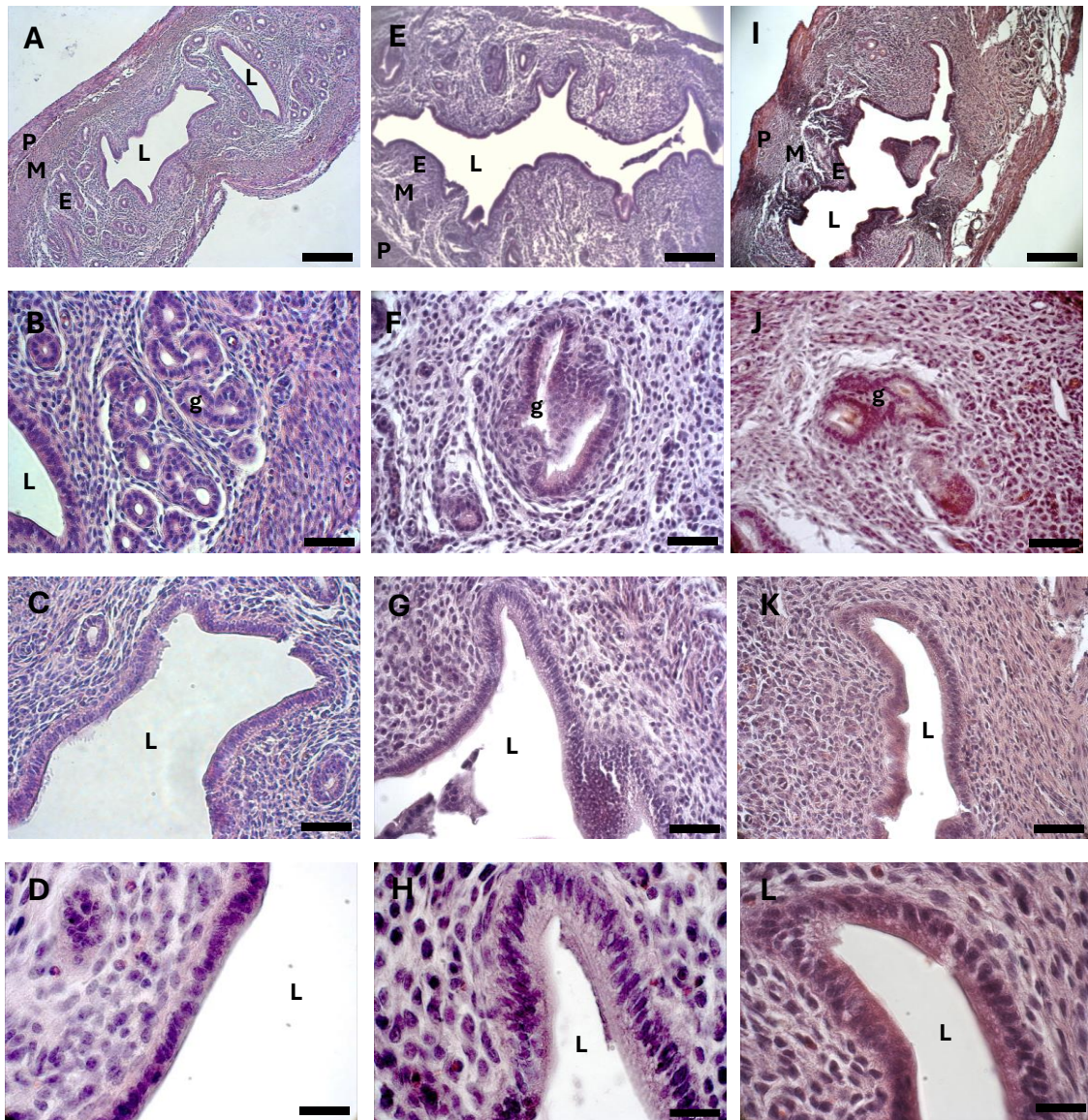


Figura 7 – Colorazione in ematossilina-eosina delle corna uterine di topo nei gruppi controllo (A – D), DHEA (E – H) e DHEA/LC-ALC (I – L). (A, E, I): immagini di microscopia ottica a basso ingrandimento di lume (L), endometrio (E), miometrio (M) e perimetrio (P). (B, F, J): epitelio ghiandolare (g). (C, J, K): epitelio luminale. (D, H, L): immagini ad alto ingrandimento di epitelio luminale, costituito da cellule colonnari. 10 x ((A, E, I) Bar: 200 μ m), 20 x ((B, C, F, G, J, K) Bar: 50 μ m), 40 x ((D, H, L) Bar: 20 μ m).

Nel gruppo DHEA/LC-ALC, l'architettura istologica generale è più simile a quella del gruppo di controllo (fig. 7I–L). Le analisi morfometriche dell'epitelio non evidenziano differenze significative rispetto ai gruppi controllo e DHEA (epitelio: $19,435 \pm 2,582$; $p > 0.05$); invece, l'endometrio appare significativamente ridotto rispetto al gruppo DHEA ($237,225 \pm 40,884$

μm vs. $345,584 \pm 17,199 \mu\text{m}$, DHEA/LC- ALC vs. DHEA; $p < 0.01$), ma non rispetto al controllo ($237,225 \pm 40,884 \mu\text{m}$ vs. $141,615 \pm 13,266 \mu\text{m}$; $p < 0.01$) (tabella 2).

Nel gruppo DHEA segnali di iperplasia sono visibili sia nell'epitelio ghiandolare (fig. 7F) che in quello luminale (fig. 7G), con formazione di strati multipli di cellule, vascolarizzazione più elevata nell'epitelio stromale (fig. 8A) e un'aumentata presenza di cellule infiammatorie, come eosinofili, linfociti e macrofagi (fig. 8B). Tuttavia, il numero delle ghiandole uterine appare diminuito, come si osserva nella sezione trasversale, ma in queste si osservano dilatazioni multiple, con iperplasia epiteliale e una deposizione cellulare meno regolare rispetto al controllo (fig. 7E-F). Nel gruppo trattato con carnitine le ghiandole uterine diminuiscono in numero e volume se comparate a quelle dei gruppi DHEA e controllo, in associazione con un'iperplasia ridotta dell'epitelio luminale e ghiandolare ed una presenza diminuita di cellule infiammatorie stromali (fig. 7I-J). Il gruppo DHEA è caratterizzato anche da iperfibrosi uterina se confrontato al controllo, come viene dimostrato dall'innalzamento della deposizione di collagene nella lamina propria (fig. 10E-F) e fibrosi muscolare (fig. 10G e inset) visibile con la colorazione Azan-Mallory e con il marker Col-1. Nel gruppo DHEA/LC-ALC si osserva una riduzione del tessuto fibrotico, ma non una completa scomparsa di questo (fig. 10I-J).

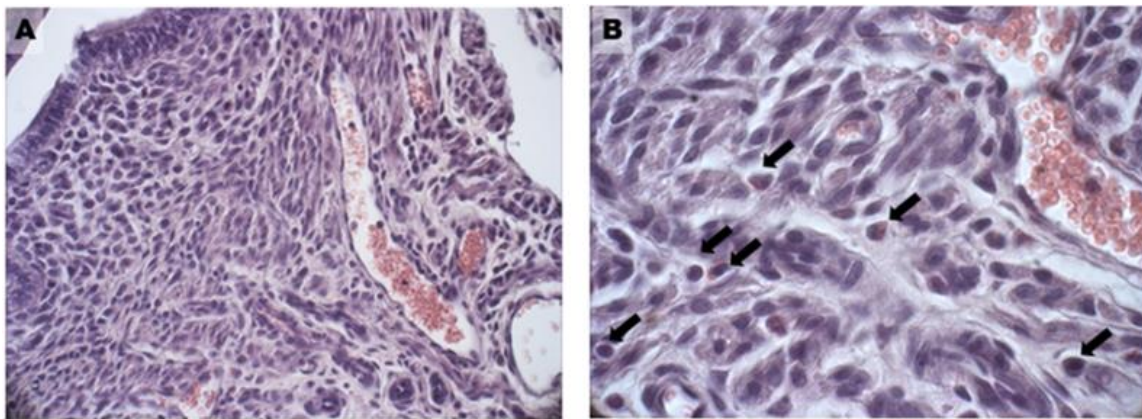


Figura 8 – Abbondante vascolarizzazione (A) e presenza di cellule infiammatorie (B) nell'endometrio del gruppo DHEA. Le frecce nere in (B) indicano le singole cellule infiammatorie come eosinofili, linfociti e macrofagi. LM, 20 x (A), 40 x (B).

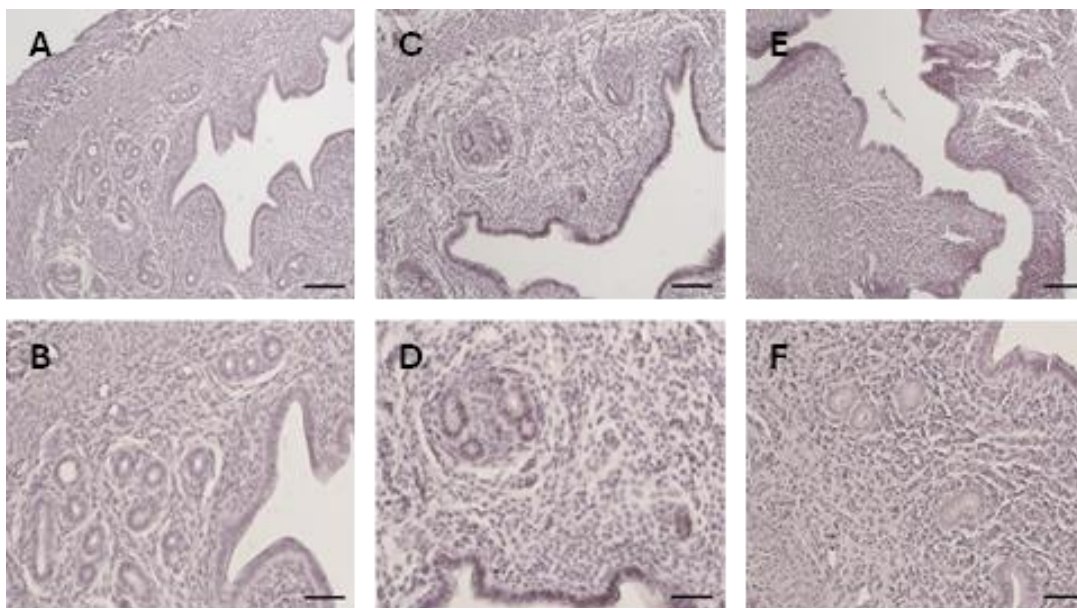


Figura 9 – Controlli negativi relativi all'immunoistochimica effettuata sulle sezioni di utero nei gruppi CTR (**A, B**), DHEA (**C, D**) e DHEA / LC-ALC (**E, F**). LM, mag. 10 x (**A, C, E**) Bar: 200 μ m), 20 x (**B, D, F**) Bar: 50 μ m).

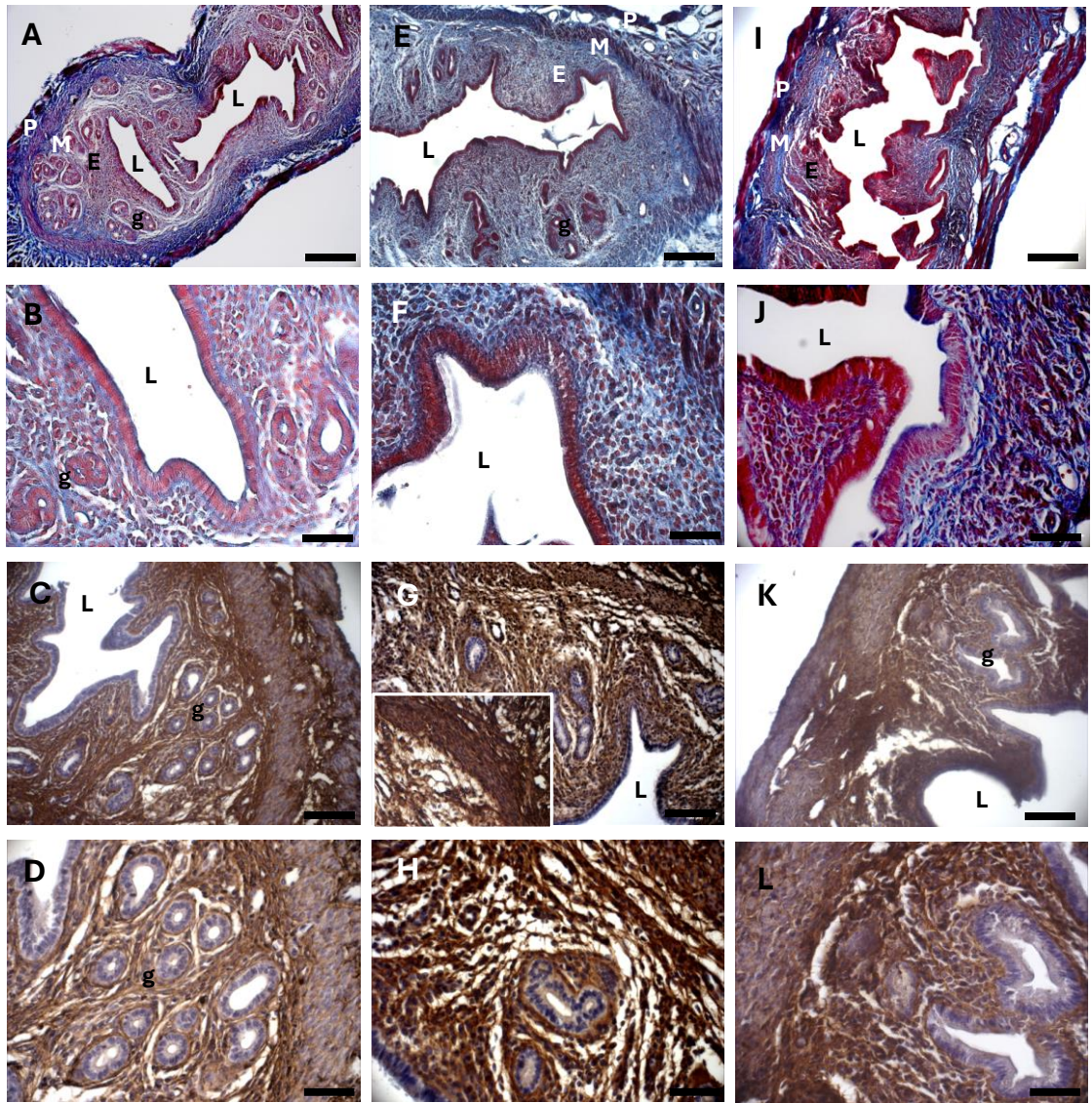


Figura 10 – Immunohistochimica con tricromica di Mallory (A, B, E, F, I, J) e Col-1 (C, D, G, H, K, L) di corna uterine nei gruppi controllo (A – D), DHEA (E - H) e DHEA / LC- ALC (I – L). (A, E, I): immagini in microscopia ottica a basso ingrandimento (L), endometrio (E), miometrio (M) e perimetrio (P). (B, F, J): immagini ad alto ingrandimento di epitelio luminale. (C, D, G, H, K, L): dettagli di epitelio ghiandolare (g). L'inset in figura G mostra un dettaglio della tonaca muscolare (40 x). LM, mag. 10 x ((A, E, I) Bar: 200 μ m), 20 x ((B, C, F, G, J, K) Bar: 50 μ m), 40 x ((D, H, L) Bar: 20 μ m)).

4.2.2 Steroidogenesi (17 β -HSD IV)

Basandoci sui dati precedentemente ottenuti per quanto riguarda le alterazioni indotte dal DHEA nell'espressione di 17 β -HSD4 nell'ovaio di topo (Di Emidio *et al.*, 2020 (A), (B)), è stata valutata l'espressione e la distribuzione spaziale di questo marker nell'utero, dove ha il compito di inattivare l'estradiolo convertendolo in estrone, e convertendo l'androstenedione in DHEA (Breitling *et al.*, 2001). L'analisi immunohistochimica di 17 β -HSD4, maggiormente espresso nell'epitelio ghiandolare e luminale dei campioni del gruppo di controllo (fig. 11A e inset), mostra una sua elevata espressione in tutti i comparti endometriali, ma anche nel miometrio del gruppo DHEA (fig. 11B e inset). Un pattern di espressione del marker più comparabile a quello del gruppo di controllo si vede nel gruppo DHEA/LC-ALC, in particolare nell'epitelio ghiandolare (fig. 11C e inset).

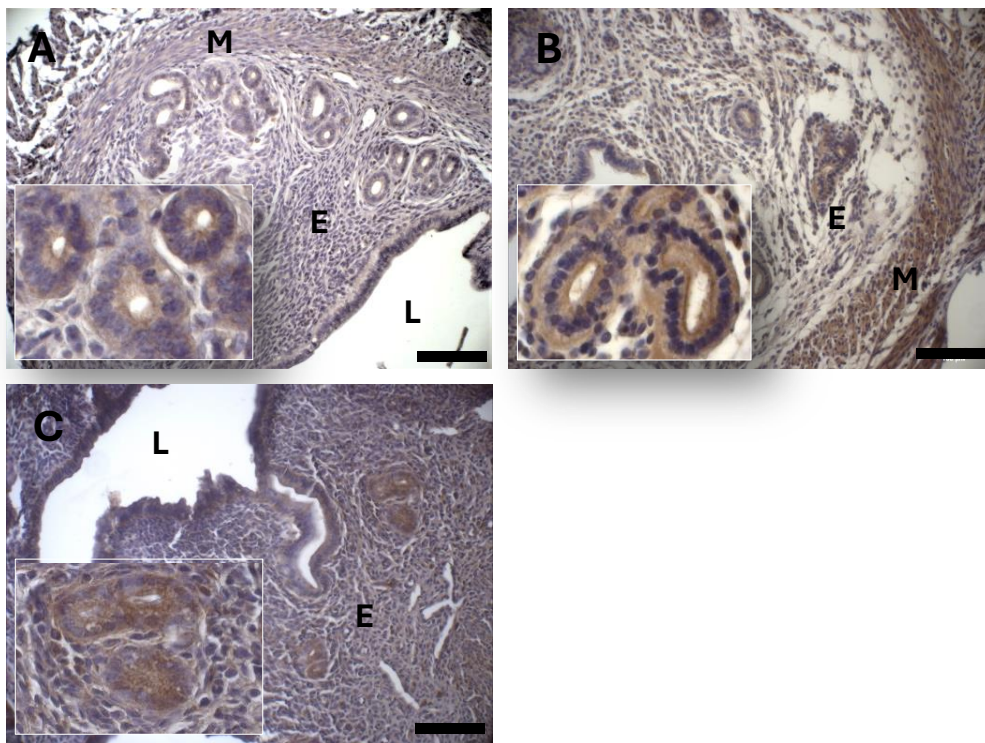


Figura 11 – Immunohistochimica con marker 17 β -HSD4 (A–C) nei campioni di corna uterine di topo nei gruppi controllo (A), DHEA (B) e DHEA /LC-ALC (C). Gli insets mostrano i dettagli dell'epitelio ghiandolare. L: lume; E: endometrio; M: miometrio; P: perimetrio. LM, Mag. 10 x, bar: 100 μ m; Insets: 20 x, bar: 50 μ m.

4.2.3 Danno ossidativo (4-HNE)

La presenza di danno ossidativo è stata indagata esaminando l'espressione degli addotti proteici del 4-idrossinonenale (4-HNE), marker molto conosciuto di perossidazione lipidica e stress ossidativo. Nelle cellule epiteliali dell'endometrio del gruppo DHEA (fig. 12B e inset) il marker è molto presente. Gli alti livelli di 4-HNE presenti nell'epitelio endometriale, luminale e ghiandolare, come anche nel miometrio, si riducono nel gruppo DHEA/LC-ALC (fig. 12C e inset), mostrando un quadro simile al gruppo di controllo (fig. 12A e inset).

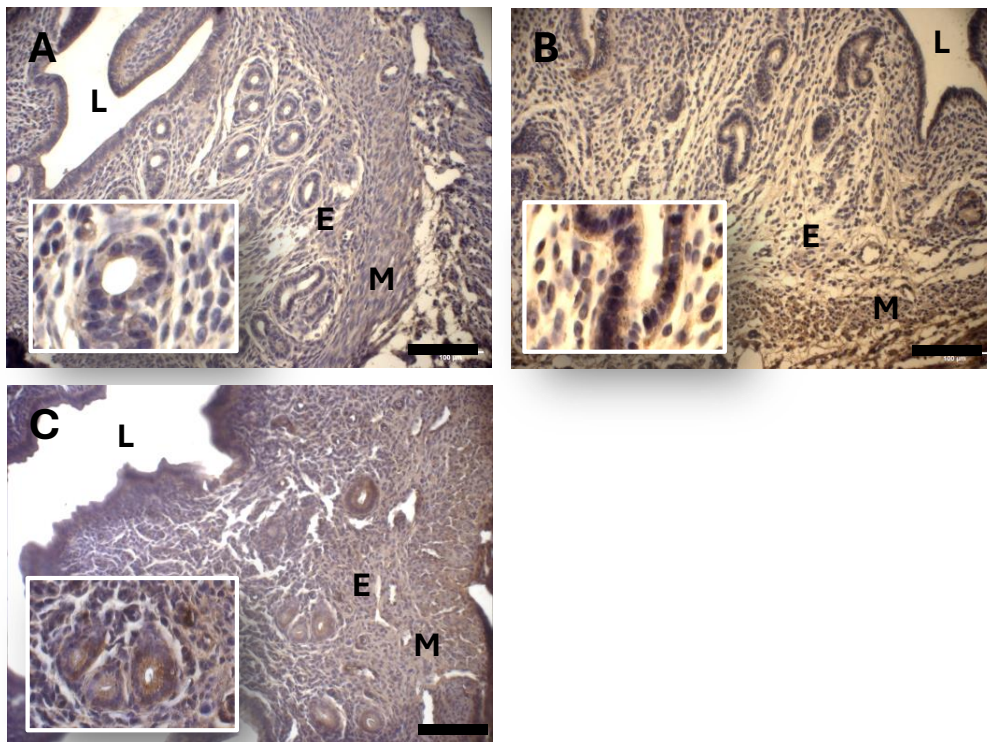


Figura 12 – Immunohistochimica con marker 4-HNE (A-C) nei campioni di corna uterine di topo nei gruppi controllo (A), DHEA (B) e DHEA /LC-ALC (C). Gli insets mostrano i dettagli dell'epitelio ghiandolare. L: lume; E: endometrio; M: miometrio; P: perimetrio. LM, Mag. 10 x bar: 100 μ m; Insets: 20 x, bar: 50 μ m.

4.2.4 Danno mitocondriale (Tomm20)

Gli effetti sulla funzionalità mitocondriale sono stati investigati valutando il marker Tomm20, che è una traslocasi della membrana esterna del mitocondrio. Questo risulta essere molto rappresentato nel controllo, in particolare nel dominio apicale dell'epitelio luminale e ghiandolare dell'endometrio, come anche nelle cellule muscolari del miometrio (fig. 13A e

inset). Una ridotta espressione del trasportatore mitocondriale è osservabile nel gruppo DHEA rispetto al gruppo di controllo (fig. 13B e inset). L'espressione del trasportatore migliora nel gruppo DHEA/LC-ALC (fig. 13C e inset).

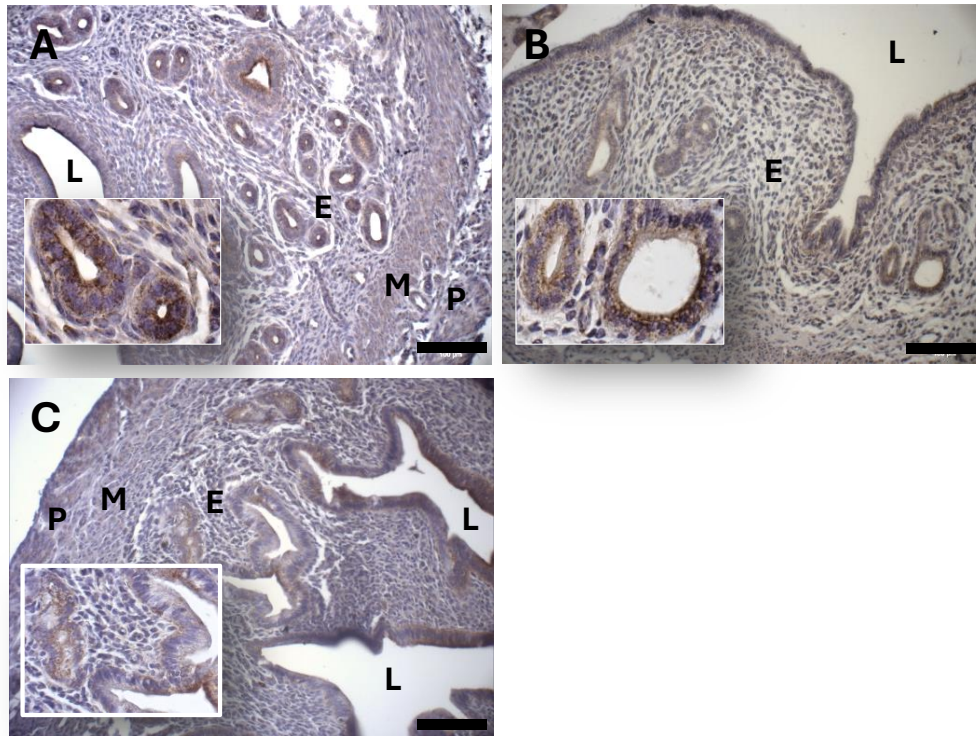


Figura 13 – Immunoistochimica con marker Tomm20 (A-C) nei campioni di corna uterine di topo nei gruppi controllo (A), DHEA (B) e DHEA/LC-ALC (C). Gli insets mostrano i dettagli dell'epitelio ghiandolare. L: lume; E: endometrio; M: miometrio; P: perimetrio. LM, Mag. 10 x, bar: 100 µm; Insets: 20 x, bar: 50 µm.

4.2.5 Danno glicativo (MG-AGE)

Le corna uterine del gruppo di controllo mostrano la presenza di MG-AGE collocata in particolare nel citoplasma delle cellule epiteliali luminali e ghiandolari, con una lieve diffusione nello stroma endometriale (fig. 14A e inset). Invece il gruppo DHEA presenta una massiccia presenza di MG-AGE, più alta rispetto al gruppo di controllo, e qui presente anche nella tonaca muscolare (fig. 14B e inset). Il gruppo trattato con carnitina mostra una ridotta espressione di MG-AGE (fig. 14C e inset).

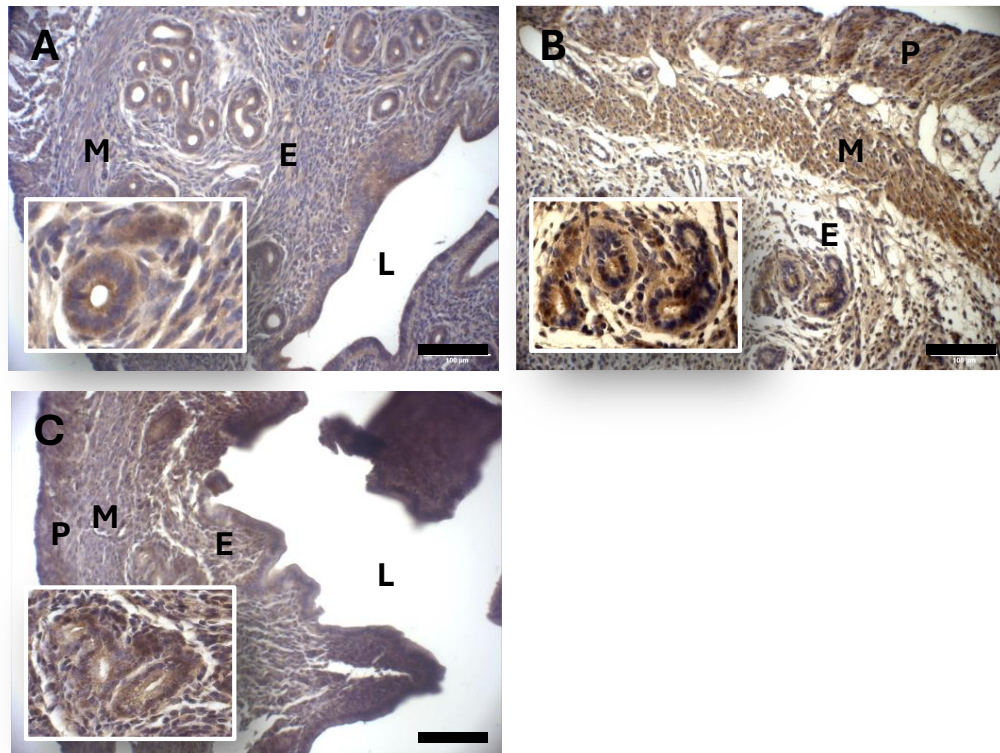


Figura 14 – Immunoistochimica con marker MG-AGE (A-C) nei campioni di corna uterine di topo nei gruppi controllo (A), DHEA (B) e DHEA /LC-ALC (C). Gli insets mostrano i dettagli dell'epitelio ghiandolare. L: lume; E: endometrio; M: miometrio; P: perimetrio. LM, Mag. 10 x, bar: 100 μm ; Insets: 20 x, bar: 50 μm .

4.3 Ovidotti

4.3.1 Ipertrofia, iperplasia e fibrosi oviduttale

Le indagini istologiche, eseguite sulla porzione ampollare degli ovidotti murini, hanno evidenziato in tutti i tre gruppi un'organizzazione microscopica dell'organo ben preservata. Nel gruppo CTR la colorazione ematossilina-eosina delle sezioni trasversali dei campioni mette in luce la tipica organizzazione in tre strati: quello più interno, la tonaca mucosa, quello intermedio, la tonaca muscolaris e la tonaca mucosa, quello più esterno (fig. 15). La tonaca mucosa è caratterizzata da un epitelio composto da cellule colonnari, con numerose ciglia, e la sottostante lamina propria. La tonaca mucosa è abbondantemente convoluta (fig. 15A-D). Lo spessore medio di epitelio oviduttale, tonaca mucosa e parete ampollare è rispettivamente $19,132 \pm 5,982 \mu\text{m}$, $28,943 \pm 5,323 \mu\text{m}$, e $63,771 \pm 8,608 \mu\text{m}$ (tabella 3).

Nel gruppo DHEA, lo spessore epiteliale aumenta a causa delle evidenti ipertrofia ed iperplasia delle cellule epiteliali, più proliferanti in questo gruppo rispetto al controllo (fig. 15E-H). Lo spessore medio di epitelio oviduttale, tonaca mucosa e parete ampollare nel gruppo DHEA è significativamente più alto rispetto al controllo, essendo, rispettivamente, $36,971 \pm 5,565 \mu\text{m}$, $42,323 \pm 1,535 \mu\text{m}$, e $86,393 \pm 11,209 \mu\text{m}$ (tabella 3).

Nel gruppo DHEA/LC-ALC, ipertrofia e iperplasia risultano ridotte, ma non significativamente se comparate al gruppo DHEA, mostrando un aspetto più simile ai controlli (fig. 15I-L). Lo spessore medio di epitelio oviduttale, tonaca mucosa e parete ampollare nel gruppo DHEA/LC-ALC è, rispettivamente, $22,585 \pm 7,814 \mu\text{m}$, $34,399 \pm 6,628 \mu\text{m}$, e $73,117 \pm 8,949 \mu\text{m}$ (tabella 3).

È osservabile un alto livello di fibrosi grazie alla colorazione Azan- Mallory e all'immunoistochimica con collagene di tipo 1 (Col1) nel gruppo DHEA (fig. 16E-H e 17D-F), dove i depositi di collagene sono presenti non solo nella tonaca mucosa, come nel controllo, ma anche nella tonaca muscolare. Nel gruppo DHEA/LC-ALC (fig. 16I-L e 17G-I), l'aspetto fibrotico risulta essere attenuato se comparato al gruppo DHEA, con la presenza di una colorazione più debole, quindi più simile al controllo. L'analisi morfometrica mostra un aumento significativo di Col1 nel gruppo DHEA, comparato ai controlli (rispettivamente $14,431$ vs. $151,102 \pm 6,069$, $p < 0.05$; tabella 4), con un leggero decremento nel gruppo DHEA/LC-ALC ($12,856$, $p > 0.05$; tabella 4).

Tabella 3 – Analisi morfometrica di epitelio, tonaca mucosa e parete ampollare della porzione ampollare degli ovidotti. I valori sono espressi come media \pm DS. Le differenze sono state valutate con ANOVA seguito da Tukey test HSD post hoc. Gli apici indicano una differenza significativa nella stessa riga ($p < 0,05$).

	CONTROLLO	DHEA	DHEA/LC-ALC
EPITELIO	19,132 \pm 5,982 ^a	36,971 \pm 5,565 ^b	22,585 \pm 7,814 ^{a,b}
MUCOSA	28,943 \pm 5,323 ^a	42,323 \pm 1,535 ^b	34,399 \pm 6,628 ^{a,b}
PARETE	63,771 \pm 8,608 ^a	86,393 \pm 11,209 ^b	73,117 \pm 8,949 ^{a,b}
AMPOLLARE			

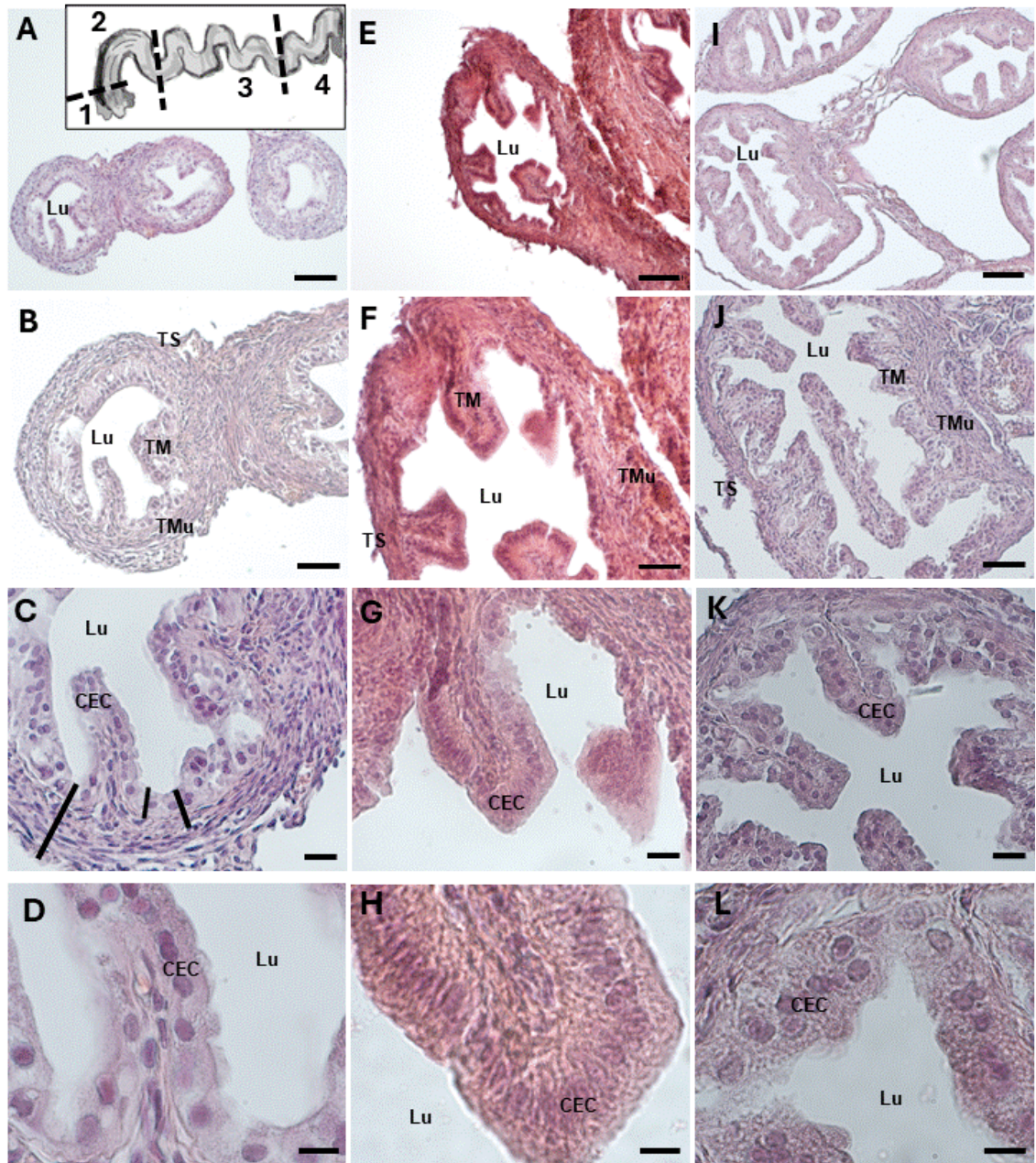


Figura 15 - Colorazione in ematossilina-eosina della porzione ampollare degli ovidotti nei gruppi controllo (A-D), DHEA (E-H), DHEA/LC-ALC (I-L). (A, E, I): immagini di microscopia ottica a basso ingrandimento del lume (Lu); l'inset in (A) indica le 4 parti di cui si compone l'ovidotto, per evidenziarne la porzione ampollare (1: infundibulo; 2: ampolla; 3: istmo; 4: porzione intramurale). (B, F, J): tonaca mucosa (TM), tonaca muscolare (TMu), e tonaca sierosa (TS). (C, G, K, D, H, L): immagini ad alto ingrandimento dell'epitelio luminale, costituito da cellule colonnari ciliate (CEC); le barre nere in (C) evidenziano lo spessore delle strutture comparate nella Tabella 3 (da sinistra a destra: parete ampollare, epitelio, mucosa). (A, E, I): LM, mag. 10×; bar: 100 μm. (B, F, J): LM, mag. 20×; bar: 50 μm. (C, G, K): LM, mag. 40×; bar: 20 μm. (D, H, L): LM, mag. 100x, bar 10 μm.

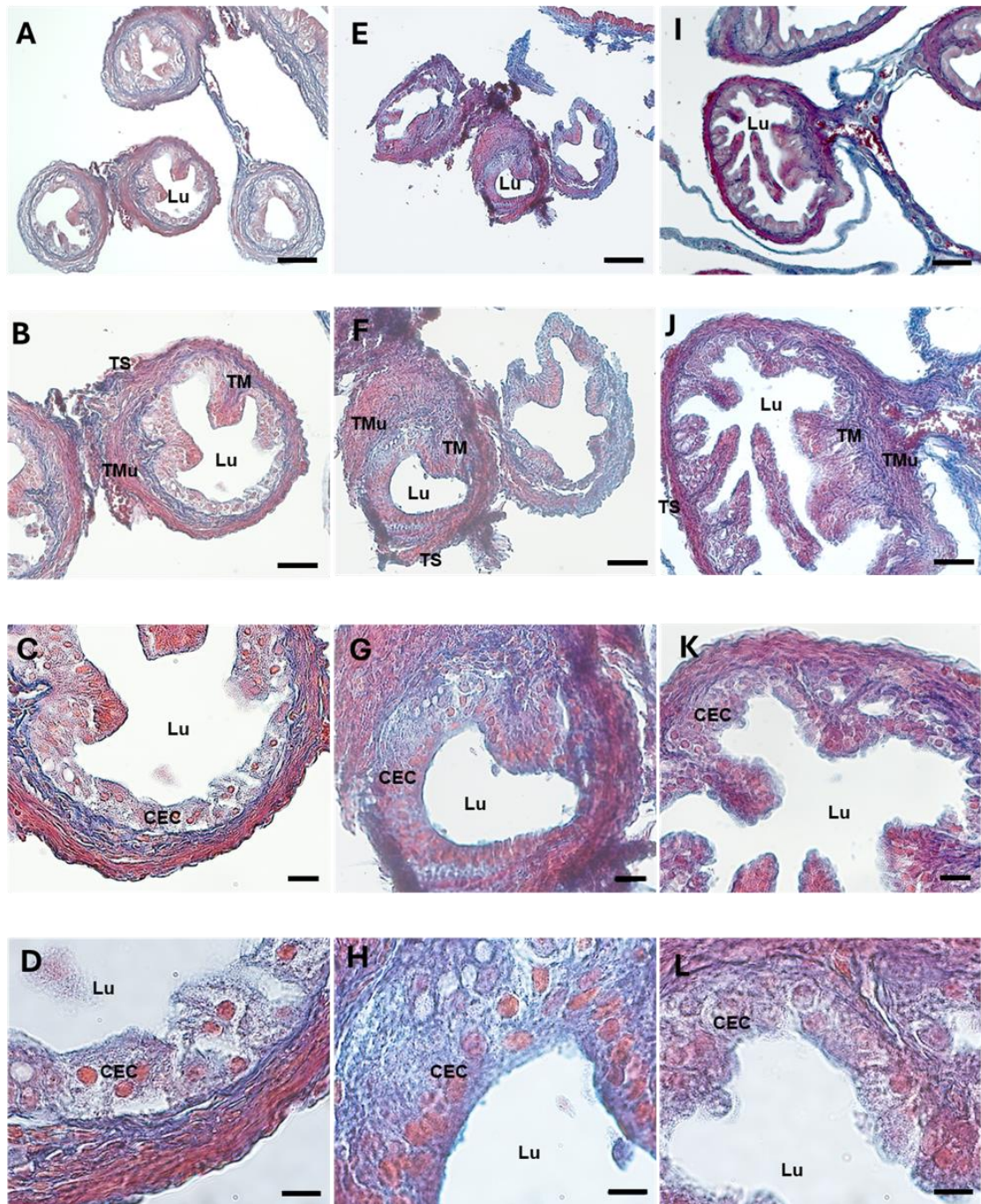


Figura 16 -Colorazione Azan-Mallory tricromica della porzione ampollare degli ovidotti di topo nei gruppi controllo (A–D), DHEA (E–H), DHEA/LC-ALC (I–L). (A, E, I): immagini di microscopia ottica a basso ingrandimento del lume (Lu). (B, F, J): tonaca mucosa (TM), tonaca muscolare (TMu), e tonaca sierosa (TS). (C, D, G, H, K, L): immagini ad altro ingrandimento di epitelio luminale costituito da cellule ciliate colonnari (CEC). (A, E, I): LM, mag. 10×; bar: 100 μ m. (B, F, J): LM, mag. 20×; bar: 50 μ m. (C, G, K): LM, mag. 40×; bar: 20 μ m. (D, H, L): mag. 100×; bar 10 μ m.

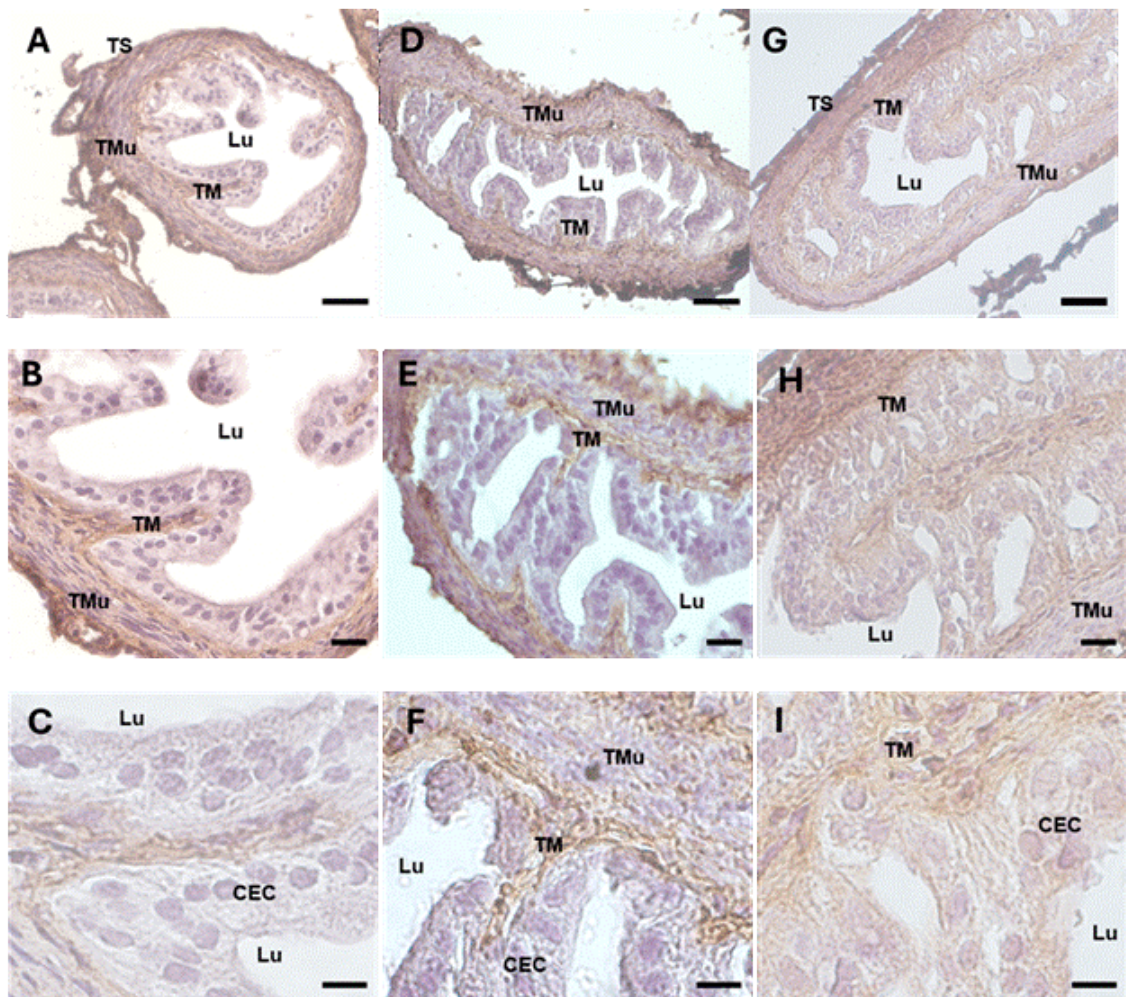


Figura 17 – Immunoistochimica con marker *Col1* della porzione ampollare degli ovidotti di topo nei gruppi controllo (A – C), DHEA (D – F), e DHEA/LC-ALC (G – I). (A, B, D, E, G, H): immagini in microscopia ottica a basso ingrandimento di lume (Lu), tonaca mucosa (TM), tonaca muscolare (TMu), Tonaca sierosa (TS). (C, F, I): immagini ad alto ingrandimento dell'epitelio luminale composto da cellule colonnari ciliate (CEC). (A, D, G): LM, mag. 20×; bar: 50 μm. (B, E, H): LM, mag. 40×; bar: 20 μm. (C, F, I): LM, mag. 100×; bar: 10 μm.

Tabella 4 – Analisi semi-quantitativa dei marker immunoistochimici valutati sulla porzione ampollare di ovidotti di topo nei tre gruppi. I valori sono espressi come media ± SD della media dell'intensità dei pixel. Le differenze sono state valutate con ANOVA seguito da Tukey test HSD post hoc. Gli apici indicano una differenza significativa nella stessa riga ($p < 0,05$).

	CONTROLLO	DHEA	DHEA/LC-ALC
Col-1	114,198 ± 14,431 ^a	151,102 ± 6,069 ^b	134,757 ± 12,856 ^{a,b}
17β-HSD IV	112,175 ± 18,9 ^a	159,320 ± 10,313 ^b	140,502 ± 16,471 ^b
4-HNE	87,178 ± 6,318 ^a	151,149 ± 1,590 ^b	148,670 ± 5,831 ^{a,b}
Tomm20	163,698 ± 2,331 ^a	128,366 ± 3,474 ^b	155,314 ± 9,732 ^a
MG-AGE	126,053 ± 12,826 ^a	140,427 ± 5,868 ^b	133,279 ± 15,217 ^{a,b}

4.3.2 Steroidogenesi (17 β -HSD IV)

L'analisi immunoistochimica del 17 β -HSD IV, enzima steroidogenico che inattiva l'estradiolo, rivela un innalzamento della sua espressione nella mucosa ampollare del gruppo DHEA (fig. 18D-F) (159.320 ± 10.313) se comparato ai controlli (fig. 18A-C) ($112,175 \pm 18,9$, $p < 0.05$, Tabella 4). Nel gruppo DHEA/LC-ALC, l'espressione di 17 β -HSD IV è ancora evidente, specialmente nella lamina propria (fig. 18G-I), con una riduzione non significativa rispetto al gruppo DHEA ($140,502 \pm 16,471$, $p < 0.05$, tabella 4).

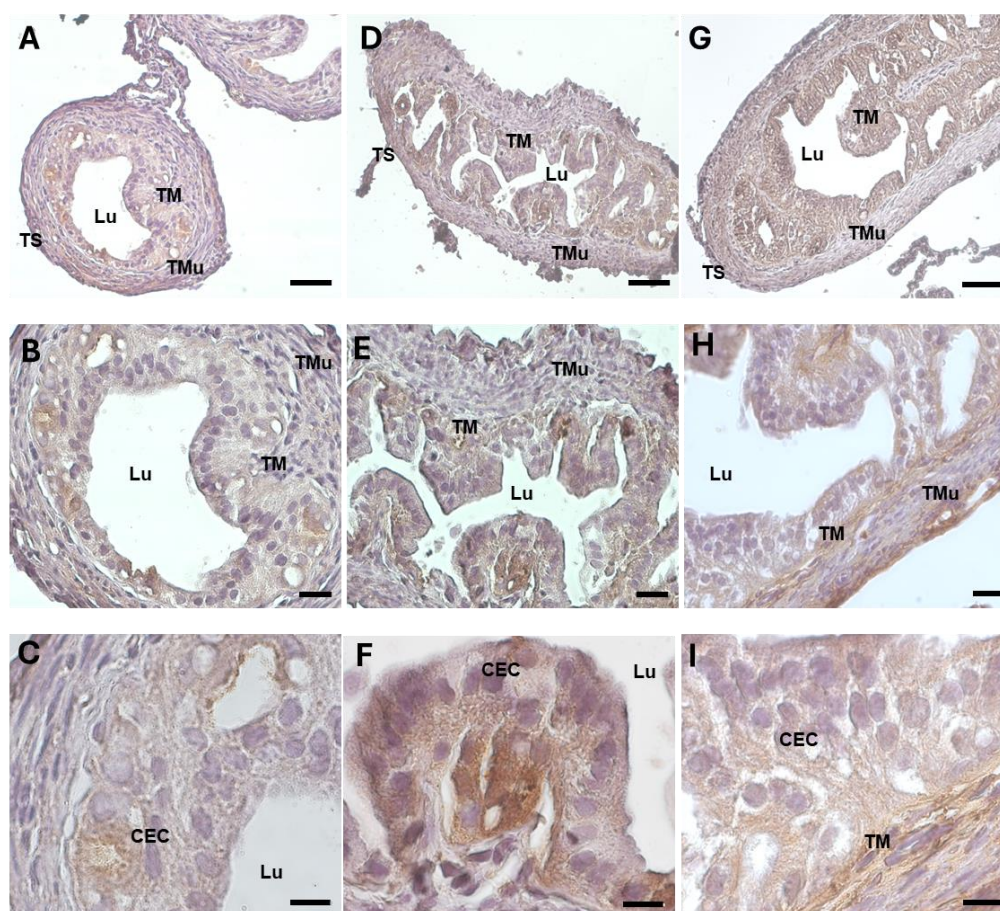


Figura 18 - Immunoistochimica con marker 17 β -HSD IV della porzione ampollare di ovidotti di topo nei gruppi controllo (A – C), DHEA (D – F), e DHEA/LC-ALC (G – I). (A, D, G, B, E, H): immagini in microscopia ottica a basso ingrandimento di lume (Lu), tonaca mucosa (TM), tonaca muscolare (TMu), e tonaca sierosa (TS). (C, F, I): immagini ad alto ingrandimento di epitelio luminale composto da cellule colonnari ciliate (CEC). (A, D, G): mag. 20 \times ; bar: 50 μ m. (B, E, H): LM, mag. 40 \times ; bar: 20 μ m. (C, F, I): LM, mag. 100 \times ; bar: 10 μ m.

4.3.3 Danno ossidativo (4-HNE)

Il danno ossidativo negli ovidotti è stato valutato esaminando l'espressione della proteina 4-idrossinonenale (4-HNE), un marker di perossidazione lipidica e stress ossidativo. Mentre nel gruppo di controllo l'HNE è debolmente rappresentato ($87,178 \pm 6,318$, tabella 4), la presenza della proteina è molto evidente nella mucosa ampollare del gruppo DHEA (fig. 19D-F) ($151,149 \pm 1,590$, $p < 0.001$, tabella 4). Il marker mostra una discreta, ma non significativa diminuzione nel gruppo DHEA/LC-ALC rispetto al gruppo DHEA (fig. 19G-I) ($148,670 \pm 5,831$, $p < 0.05$, tabella 4).

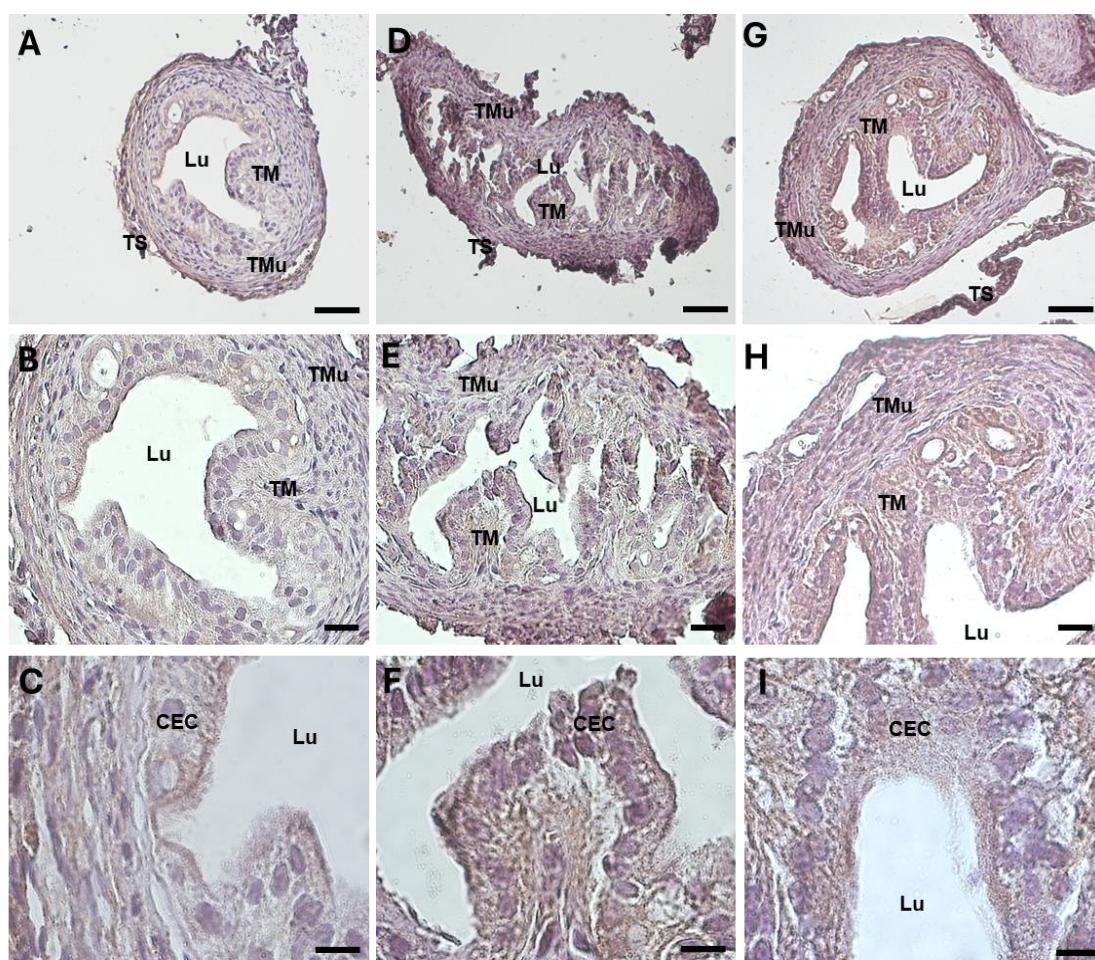


Figura 19 – Immunoistochimica con marker 4-HNE della porzione ampollare di ovidotti di topo nei gruppi controllo (A – C), DHEA (D – F), e DHEA/LC-ALC (G – I). (A, D, G, B, E, H): immagini di microscopia ottica a basso ingrandimento di lume (Lu), tonaca mucosa (TM), tonaca muscolare (TMu), tonaca sierosa (TS). (C, F, I): immagini ad alto ingrandimento di epitelio luminale composto da cellule colonnari ciliate. (A, D, G): LM, mag. 20×; bar: 50 μ m. (B, E, H): mag. 40×; bar: 20 μ m. (C, F, I): mag. 100×; bar: 10 μ m.

4.3.4 Danno mitocondriale (Tomm20)

L'attività mitocondriale degli ovidotti è stata investigata mediante l'utilizzo del marker Tomm20, una della traslocasi della membrana mitocondriale esterna. Tomm20 è visibilmente rappresentato negli ovidotti del gruppo di controllo, in particolare nella tonaca mucosa (fig. 20A-C) ($163,698 \pm 2,331$, tabella 4). Al contrario, l'immunocolorazione risulta significativamente ridotta nel gruppo DHEA (fig. 20D-F) ($128,366 \pm 3,474$, $p < 0.01$). Dopo il trattamento con carnitine, i livelli di Tomm20 risultano essere comparabili a quelli osservati nel gruppo di controllo (fig. 20G-I) ($155,314 \pm 9,732$, $p < 0.01$).

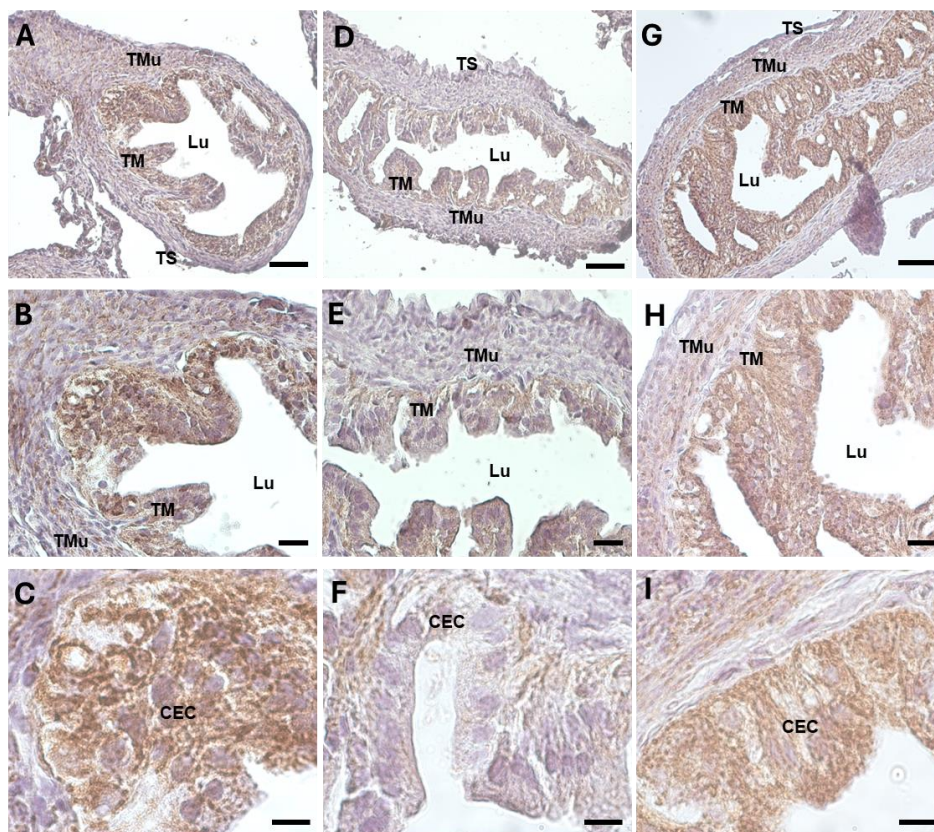


Figura 20 – Immunistoichimica con marker Tomm20 della porzione ampollare di ovidotti di topo nei gruppi controllo (A – C), DHEA (D – F), e DHEA/LC-ALC (G – I). (A, D, G, B, E, H): immagini a basso ingrandimento di lume (Lu), tonaca mucosa (TM), tonaca muscolare (TMu), tonaca sierosa (TS). (C, F, I): immagini ad alto ingrandimento di epitelio luminale composto da cellule epiteliali ciliate. (A, D, G): LM, mag. 20×; bar: 50 μ m. (B, E, H): LM, mag. 40×; bar: 20 μ m. (C, F, I): LM, mag. 100×, bar: 10 μ m.

4.3.5 Danno glicativo (MG-AGE)

Il metilgliosale (MG-AGE) appare vistosamente accumulato nella tonaca mucosa degli ovidotti del gruppo DHEA (fig. 21D-F), rispetto al controllo, dove si trova maggiormente nelle cellule epiteliali (fig. 21A-C) (rispettivamente, $140,427 \pm 5,868$ e $126,053 \pm 12,862$, $p < 0.05$, tabella 4). Si è osservata una riduzione nei livelli di stress glicativo nel gruppo DHEA/LC-ALC, come evidenziato dalla colorazione meno intensa (fig. 21G-I) ($133,279 \pm 15,217$, tabella 4).

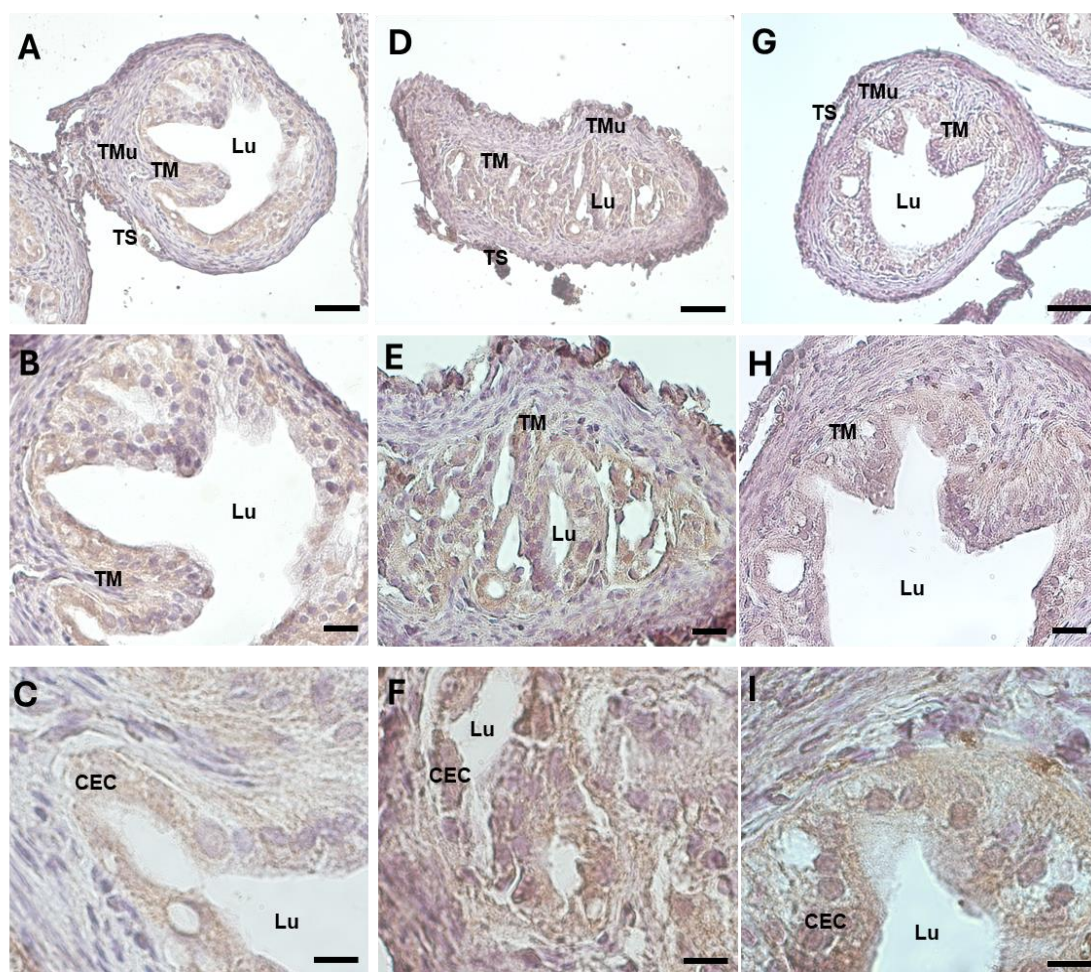


Figura 21 – Immunistoichimica con marker MG-AGE della porzione ampollare di ovidotti di topo nei gruppi controllo (A – C), DHEA (D – F), e DHEA/LC-ALC (G – I). (A, D, G, B, E, H): immagini a basso ingrandimento di lume (Lu), tonaca mucosa (TM), tonaca muscolare (TMu), tonaca sierosa (TS). (C, F, I): immagini ad alto ingrandimento di epitelio luminale composto da cellule epiteliali ciliate. (A, D, G): LM, mag. 20×; bar: 50 μ m. (B, E, H): LM, mag. 40×; bar: 20 μ m. (C, F, I): LM, mag. 100×, bar: 10 μ m.

4.3.6 Valutazione dei cambiamenti ultrastrutturali negli ovidotti

4.3.6.1 Gruppo CTR

L'epitelio della porzione ampollare degli ovidotti, analizzato al TEM, si presenta come colonnare semplice e costituito da cellule secretorie ciliate e non ciliate. Le ciglia e i microvilli si estendono a partire dalla parte luminale della cellula. I microvilli sulla superficie apicale delle cellule non ciliate sono corti e spessi, mentre invece quelli delle cellule ciliate sono lunghi e sottili (fig. 22A). Le ciglia motili, essendo protrudenti verso il lume, consistono di un evidente assonema di 9 doppietti esterni di microtubuli, che circondano il complesso centrale con 2 microtubuli interni (arrangiamento 9 + 2) (fig. 22A-D). In tutto il lume ampollare è presente una secrezione granulare filamentosa, prodotta dalle cellule secretorie non ciliate; la secrezione occupa lo spazio tra le ciglia delle cellule ciliate ed intimamente associata alle ciglia. Il meccanismo di secrezione è apocrino (fig. 22A). Il citoplasma contiene diversi mitocondri sia di forma allungata che ovale, con creste lamellari; sono visibili il reticolo endoplasmatico rugoso (RER) ben sviluppato e complessi di Golgi con un gran numero di vescicole (fig. 22D). Aggregati di corpi multivescicolari di dimensioni ridotte e poche vescicole appaiono all'interno del citoplasma. Nel citoplasma apicale ci sono numerosi granuli secretori elettrondensi (fig. 22A). I nuclei, con contorni irregolari, sono situati nella porzione basale delle cellule non ciliate. All'interno del nucleo la cromatina appare abbondante e uniformemente distribuita, con la presenza occasionale di patch di eterocromatina organizzata in zolle o localizzata in forma di patch sotto la membrana nucleare (fig. 22B). I complessi giunzionali tra le cellule epiteliali vicine sono ben sviluppati e le cellule epiteliali vicine sono connesse da *zonulae occludens* apicali, seguite dalle *zonulae adhaerens* (fig. 22A e 22C-D).

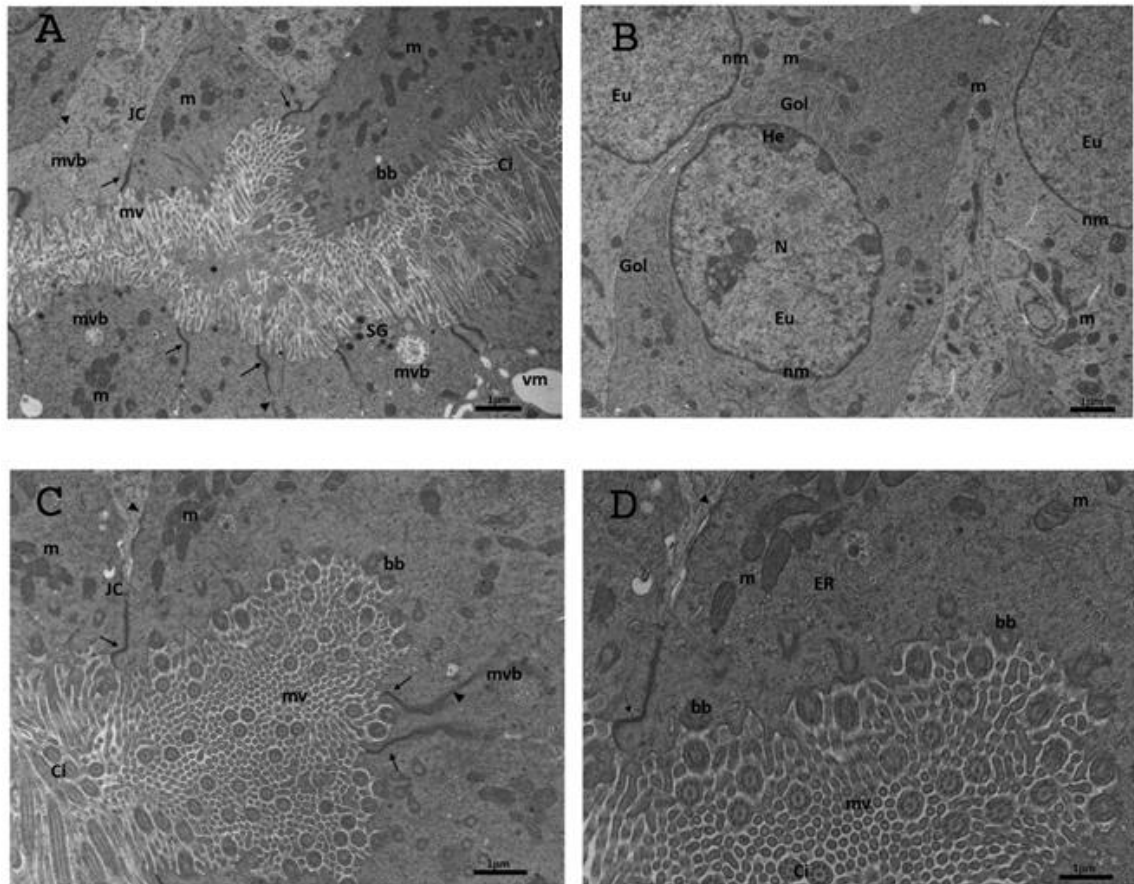


Figura 22 – Micrografie rappresentative al TEM della porzione ampollare di ovidotti di topo nel gruppo di controllo. (A) Ultrastruttura della tonaca mucosa (TM) dell'epitelio colonnare, in cui sono visibili ciglia (Ci) e microvilli (mv) che si estendono dalla porzione luminale della cellula. Il citoplasma contiene numerosi mitocondri (m) di forma ovale e allungata, con creste lamellari; granuli secretori (SGs) elettrondensanti e complessi giunzionali connessi alle zonulae occludens apicali (freccie), seguite dalle zonulae adhaerens (punta di freccia); corpi multivesicolari (mvb); secrezioni filamentose granulari (asterisco). Bar: 1 μ m; (B) CECs di TM mostrano un apparato di Golgi ben sviluppato (Gol) e nuclei ben definiti (N). L'eterocromatina (He) è organizzata in clumps o localizzata in patch marginali sotto la membrana nucleare tra l'eucromatina (Eu) dispersa. Bar: 1 μ m; (C) la superficie della TM mostra numerose ciglia motili (Ci) e microvilli (mv) lunghi e corti, che protrudono verso il lume. I complessi giunzionali tra le cellule epiteliali vicine sono ben sviluppati; corpi basali (basal body, bb) Bar: 1 μ m. (D) Immagine ad alto ingrandimento della superficie della TM. ER: reticolo endoplasmatico. Bar: 1 μ m.

4.3.6.2 Gruppo DHEA

L'analisi ultrastrutturale della porzione ampollare degli ovidotti del gruppo DHEA mostra una tonaca mucosa con epitelio colonnare semplice, con cellule ciliate e non-ciliate (fig. 23A). Le ciglia sono meno abbondanti rispetto al gruppo di controllo, anche se è visibile la migrazione dei corpi basali verso la superficie apicale, dove inizia la formazione delle ciglia (fig. 23A-B). I mitocondri si presentano di forma sia allungata che ovale, e sono sparsi nel citoplasma

(fig. 23A e 23C). RER e apparato di Golgi sono ben sviluppati. I microvilli si presentano come corti, robusti e di forma irregolare, proiettati dalla superficie apicale di ogni cellula (fig. 23B). Le cellule secretorie contengono molti granuli secretori aggregati tra loro; questi sono localizzati all'apice delle cellule e contengono particelle di dimensioni molto ridotte, con una matrice riflettente gli elettroni (fig. 23B). Nel gruppo DHEA il lume ampollare contiene meno secrezioni granulari filamentose rispetto al gruppo di controllo, eccetto per alcuni frammenti di membrana e rare gocce di secrezione segregate (fig. 23B). Nuclei dalla forma rotondeggiante-ameboide sono localizzati nella porzione basale delle cellule e mostrano un'abbondante organizzazione di eterocromatina elettrondensa, con nucleoli densi e membrana nucleare meno elettrondensa rispetto a quella del gruppo di controllo (fig. 23C). La tonaca mucosa è ben preservata e le giunzioni intercellulari sono ben organizzate come nel controllo (fig. 23A-B). Tuttavia, si osserva la presenza di spazi intercellulari dilatati (*dilated intercellular spaces*, DIS), confermando la presenza di un'evidente iperplasia e ipertrofia, come osservato dalle indagini istologiche (fig. 23D-C, *inset*). Si osservano piccole vescicole endocitiche nella porzione apicale del citoplasma (fig. 23B). Si segnala la presenza di numerosi vacuoli mitofagici e vescicole (fig 23B, C, D, inset della fig. 23D).

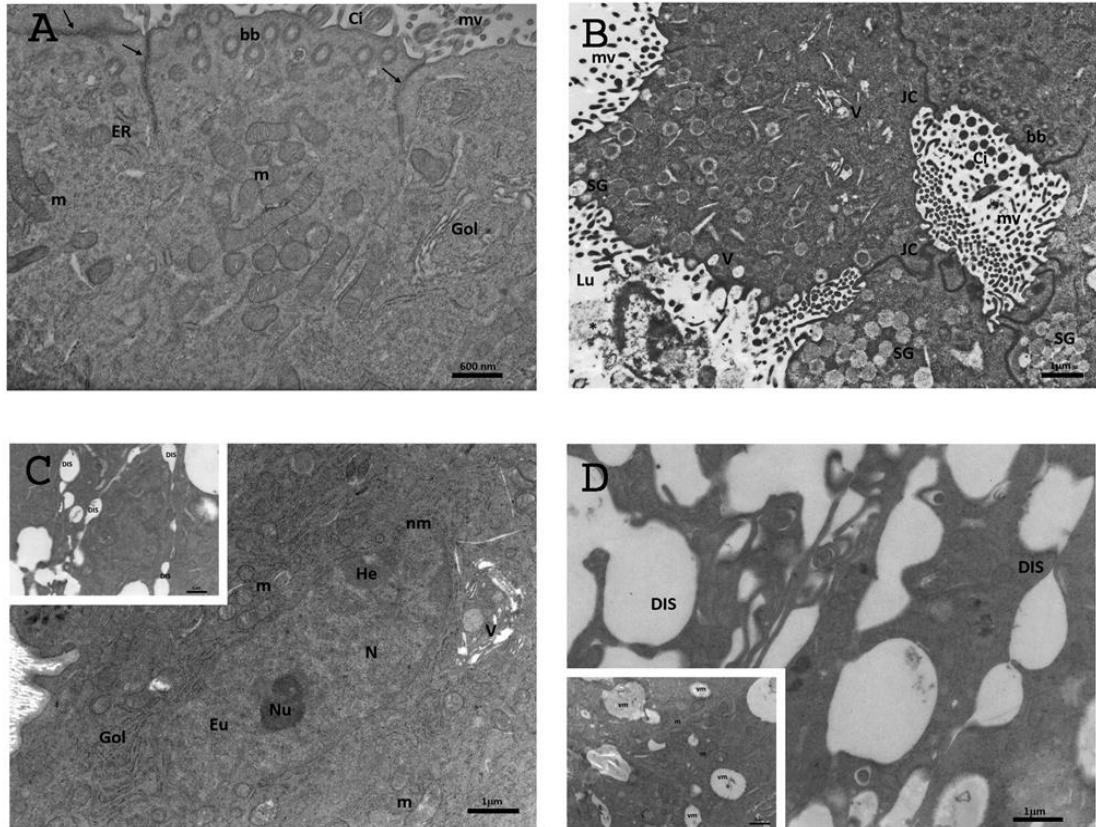


Figura 23 - Micrografie rappresentative al TEM della porzione ampollare di ovidotti di topo nel gruppo DHEA. (A) Ultrastruttura dell'epitelio colonnare della TM, in cui sono visibili numerosi mitocondri (m) di forma rotonda e allungata, un apparato di Golgi (Gol) ben sviluppato ed elementi tubulari del reticolo endoplasmatico (ER); ciglia motili (Ci); corpi multivescicolari (mvb); zonulae occludens (frecce); corpi basali (bb). Bar: 600 μ m. (B) cellule secretorie contenenti molti granuli secretori (SGs) collocate all'apice delle cellule. Il lume (Lu) contiene frammenti di membrana e goccioline di secreto (asterischi); piccole vescicole (V); microvilli (mv); complessi giunzionali (Jc); corpi basali (bb); ciglia (Ci). Bar: 1 μ m; (C) immagine ad alto ingrandimento di CEC con un nucleo (N) evidente che contiene patch di eterocromatina (He) organizzata in cluster sotto la membrana nucleare (nm), circondata da mitocondri (m) e vescicole (V). Bar: 1 μ m. Inset. La tonaca mucosa è caratterizzata da spazi intercellulari dilatati (DISs)). Bar: 1 μ m; (D) dettaglio degli spazi intercellulari dilatati (DISs). Bar: 1 μ m; Inset. Vacuoli mitofagici (vm). Bar: 1 μ m.

4.3.6.3 Gruppo DHEA/LC-ALC

Dopo la somministrazione del mix di carnitine LC-ALC l'analisi dell'epitelio ampollare della porzione ampollare degli ovidotti ha mostrato la presenza di un'abbondante popolazione di cellule ciliate; queste posseggono ciglia lunghe e ben preservate, interdisperse tra i microvilli alla loro superficie apicale (fig. 24A-D). Dalla sezione trasversale delle ciglia (fig. 24C-D), si osserva la tipica conformazione con nove coppie di microtubuli esterni che circondano il

complesso centrale con due microtubuli. Sono stati individuati i corpi basali che formano le ciglia (fig. 24B-D). Sul lato luminale della mucosa sono visibili tanti lunghi microvilli. Nel citoplasma è presente un gran numero di mitocondri ben preservati, particolarmente nella zona sopranucleare, dove ci sono creste lamellari elettrondense ben visibili (fig. 24A-D). Il reticolo endoplasmatico e l'apparato di Golgi sono presenti (fig. 24A, 24C, 24D). La collocazione intracellulare dei granuli è tipicamente confinata al citoplasma apicale e sopranucleare (fig. 24B), tralasciando pochi e isolati granuli che si trovano altrove nel citoplasma, con il loro contenuto elettrone-riflettente. Non si osserva attività secretoria. Nuclei dai contorni irregolari si trovano occasionalmente nella parte apicale delle cellule ciliate; questi sono delimitati da una membrana nucleare continua ed elettrondensa. L'eucromatina appare abbondante e uniformemente distribuita, a volte associata in cluster con l'eterocromatina, oppure organizzata marginalmente in patch sotto la membrana nucleare (fig. 24A-C); talvolta sono visibili nucleoli densi. I complessi giunzionali tra le cellule epiteliali vicine ben costituiti, formati, come viene descritto nel gruppo di controllo, da *zonulae occludens* seguite da *zonulae adherens* (fig. 24A, 24C, 24D). Non si osserva la presenza di spazi intercellulari dilatati (*dilated intercellular spaces*, DIS), come non ci sono vacuoli mitofagici, ma sono presenti solo poche vescicole.

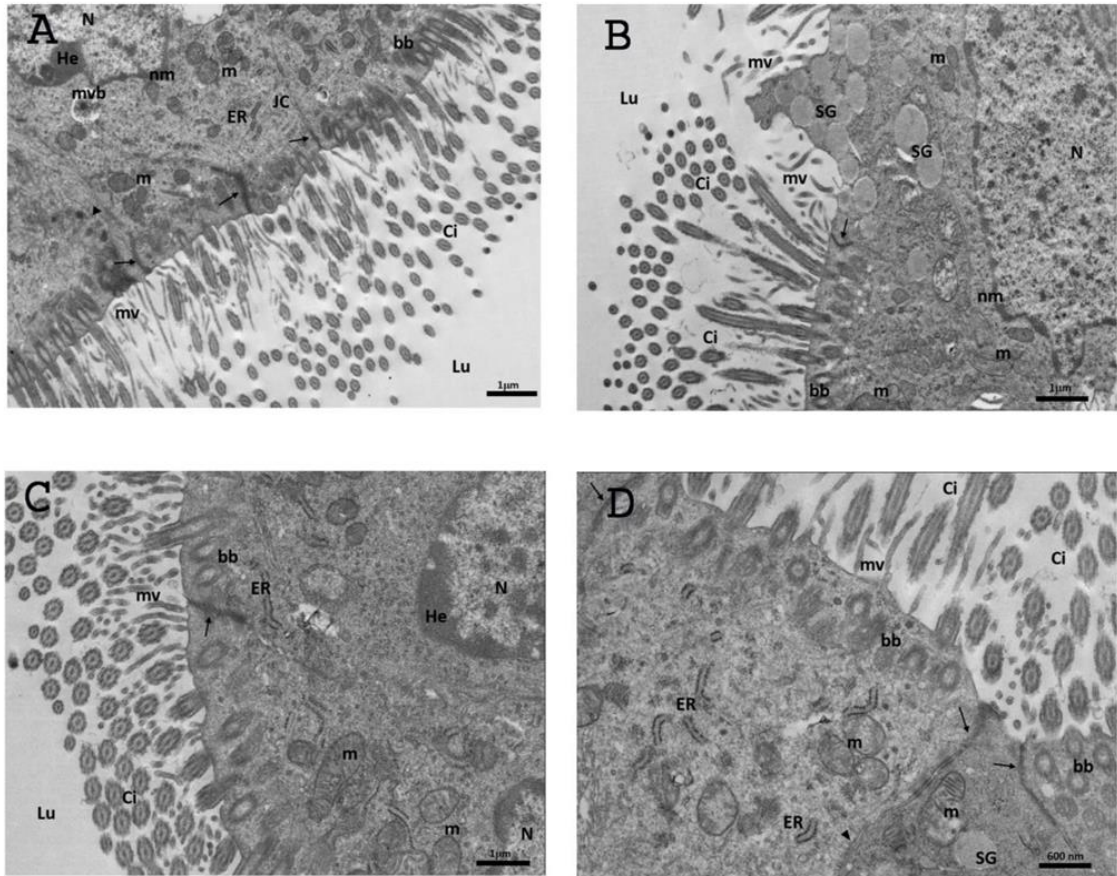


Figura 24 - Micrografie rappresentative al TEM della porzione ampollare di ovidotti di topo nel gruppo DHEA/LC-ALC. (A) Micrografie della tonaca mucosa dove sono visibili cellule ciliate con un'abbondante popolazione di ciglia lunghe e ben preservate (Ci) interposti tra i microvilli (mv). Nel citoplasma sono visibili mitocondri ben preservati (m), reticolo endoplasmatico (ER) e apparato di Golgi (Gol). I nuclei sono visibili, con un'abbondante eucromatina (Eu) ed eterocromatina (He), organizzata in clumps o localizzata come patches sotto la membrana nucleare (nm); complessi giunzionali (JC); corpi multivescicolari (mvb); corpi basali (bb). Bar: 1 μm; (B) Cellule epiteliali che mostrano la collocazione dei granuli secretori (SGs), tipicamente confinati al citoplasma apicale. Nel citoplasma è visibile un nucleo con abbondante eucromatina (Eu) uniformemente distribuita insieme all'eterocromatina (He) organizzata in clumps; mitocondri (m); corpi basali (bb); zonulae occludens (frecce). Bar: 1 μm. (C) La superficie della tonaca mucosa mostra un gran numero di mitocondri (m) ben preservati, con creste lamellari elettrondense, cisterne di reticolo endoplasmatico (ER), e nuclei (N) ben visibili; ciglia (Ci); microvilli (mv); lume (Lu); corpi basali (bb). Bar: 3 μm; (D) Micrografie ad alto ingrandimento di CECs dove sono visibili numerose ciglia (Ci), microvilli (mv), mitocondri (m), reticolo endoplasmatico (ER), corpi basali (bb), zonulae occludens (frecce), e zonulae adhaerens (punta di freccia). Bar: 600 nm.

4.4 Cervello

4.4.1 Degenerazione cellulare

Le analisi a livello cerebrale sono state eseguite su due porzioni adiacenti, ma distinte: l'isocorteccia (o area somatosensoriale primaria) ed il giro dentato dell'ippocampo. Nelle sezioni di isocorteccia del gruppo di controllo è riconoscibile la tipica struttura dell'organo, ricoperto dalla pia madre, e costituito da sette strati di neuroni e glia, visibili in parte nelle immagini a basso ingrandimento (fig. 25A-C); nelle sezioni del gruppo DHEA è evidente la presenza di degenerazione neuronale (fig. 25F, cerchi rossi), migliorata poi dal trattamento con carnitine (fig. 25I, cerchi blu). Per quanto riguarda il giro dentato dell'ippocampo, la sua organizzazione a forma di V, costituita da uno strato molecolare esterno, povero di neuroni, da uno strato mediale di cellule granulari, strettamente impacchettate tra loro, e da un ilo interno, scarsamente popolato di cellule, è chiaramente visibile nelle sezioni a basso ingrandimento dei tre gruppi di studio (fig. 26A, 26D, 26G); nello strato mediale del gruppo DHEA si nota un evidente distacco delle cellule granulari le une dalle altre, a causa della loro degenerazione (fig. 26F), la quale, appare migliorata dopo la somministrazione del trattamento con carnitine, pur essendo ancora visibile una lieve lassità cellulare, con alterazione morfologica (fig. 26I).

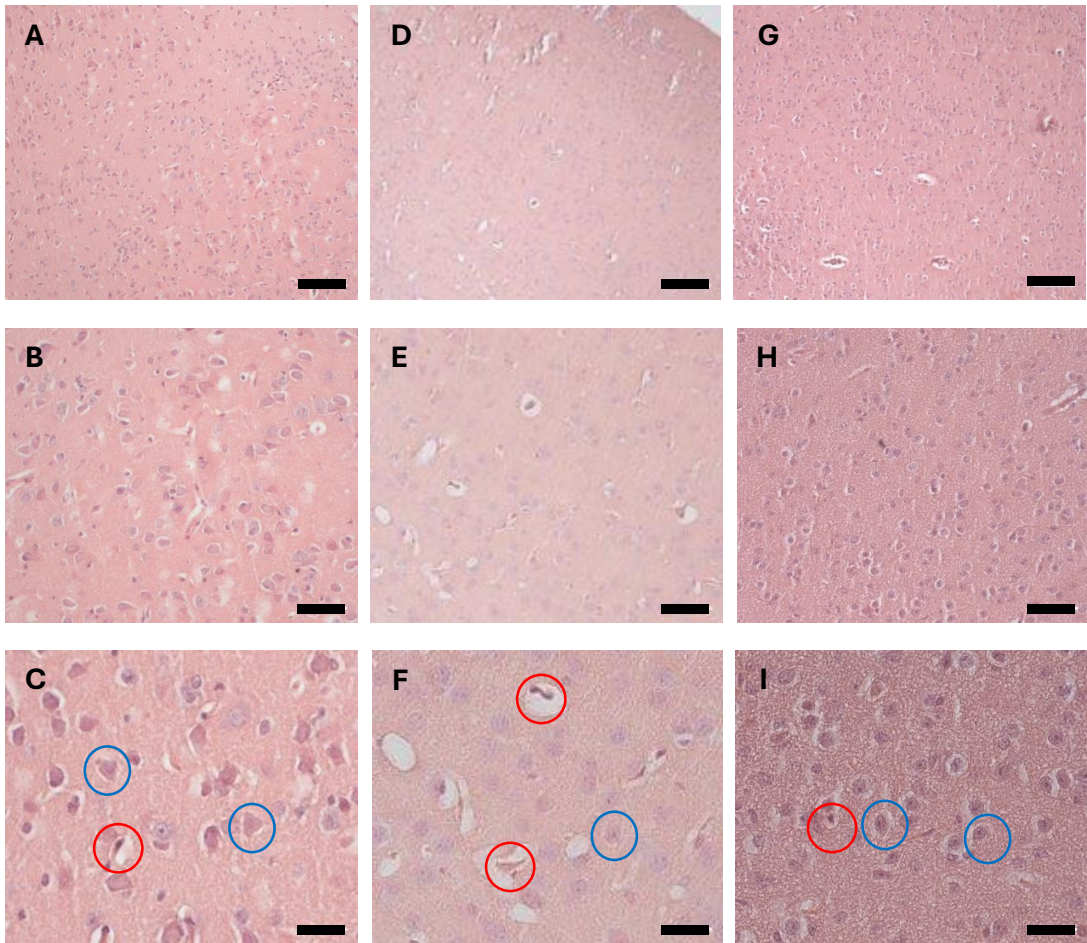


Figura 25 - Colorazione in ematossilina-eosina delle sezioni di isocorteccia di topo nei gruppi controllo (**A-C**), DHEA (**D-F**), DHEA/LC-ALC (**G-I**). (**A, D, G**): immagini di microscopia ottica a basso ingrandimento dell'isocorteccia. (**B, C, E, F, H, I**): immagini ad alto ingrandimento dei neuroni. Cerchi rossi: neuroni degenerati; cerchi blu: neuroni normali. (**A, D, G**): LM, mag. 10×; bar: 100 μm . (**B, E, H**): LM, mag. 20×; bar: 50 μm . (**C, F, I**): LM, mag. 40×; bar: 20 μm .

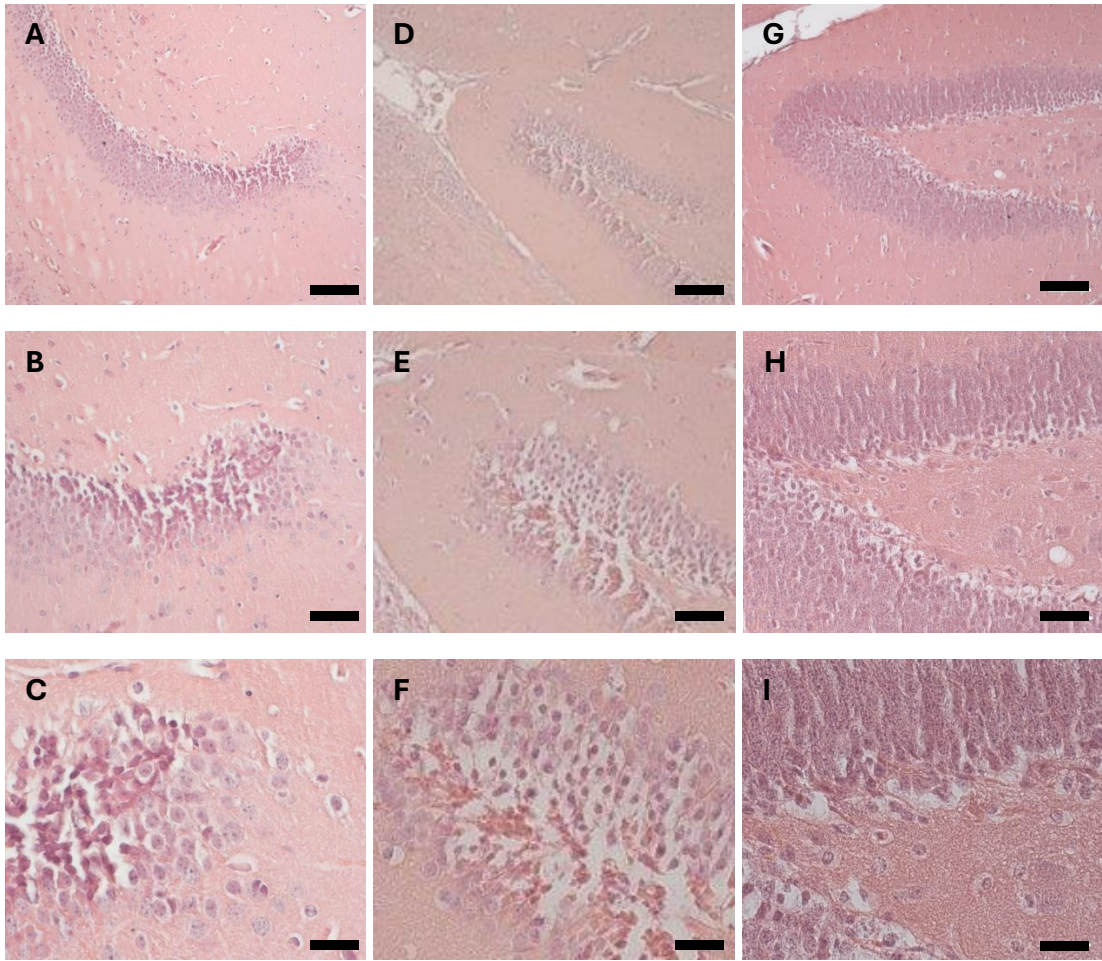


Figura 26 - Colorazione in ematossilina-eosina delle sezioni di giro dentato dell'ippocampo di topo nei gruppi controllo (A-C), DHEA (D-F), DHEA/LC-ALC (G-I). (A, D, G): immagini di microscopia ottica a basso ingrandimento della tipica struttura a "V". (B, C, E, F, H, I): immagini ad alto ingrandimento delle cellule granulari dello strato mediale. (A, D, G): LM, mag. 10×; bar: 100 μm. (B, E, H): LM, mag. 20×; bar: 50 μm. (C, F, I): LM, mag. 40×; bar: 20 μm.

4.4.2 Danno ossidativo (Sirt-1)

L'indagine della presenza di danno ossidativo a livello cerebrale è stata effettuata mediante l'analisi del marker Sirt-1. Nel gruppo di controllo questo è localizzato prevalentemente nel nucleo delle cellule dell'isocorteccia e del giro dentato, visibile con un'intensa colorazione (Fig. 27A-B, 28A-B); nel gruppo DHEA il marker appare distribuito sia nel nucleo che nel citoplasma di entrambe le porzioni (fig. 27C-D, 28C-D), e la sua presenza torna ad essere maggiormente visibile, anche se in maniera meno evidente, nel nucleo delle cellule delle sezioni del gruppo DHEA/LC-ALC di isocorteccia e giro dentato (fig. 27E-F, 28E-F).

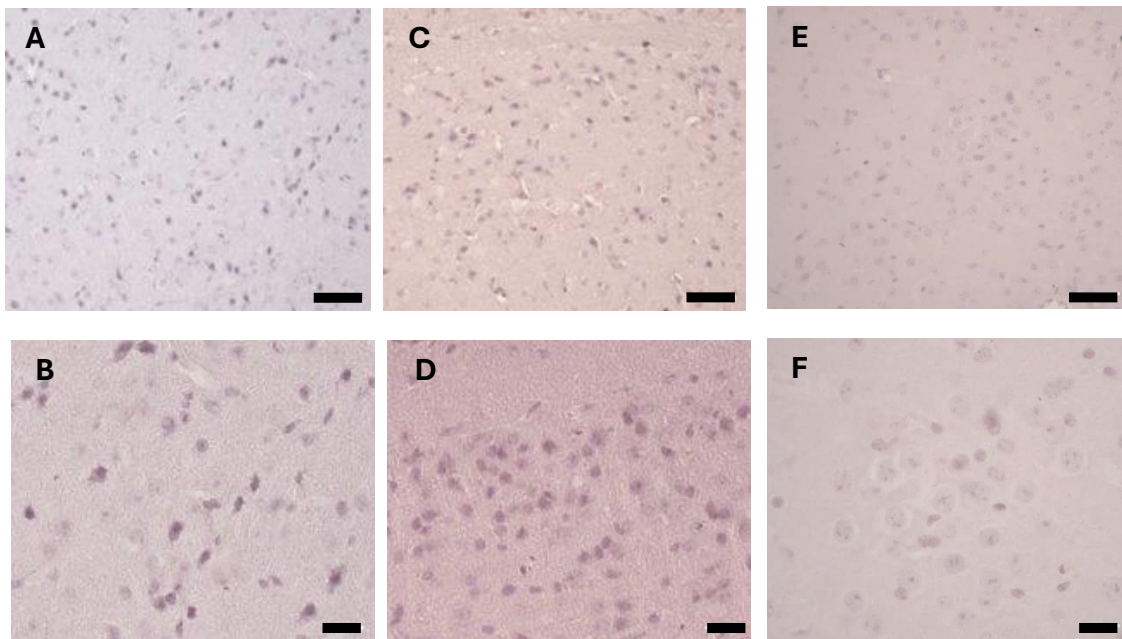


Figura 27 - Immunohistochimica con marker *Sirt-1* dell'isocorteccia di topo nei gruppi controllo (A – B), DHEA (C – D), e DHEA/LC-ALC (E – F). (A, C, E): immagini a basso ingrandimento dell'isocorteccia. (B, D, F): immagini ad alto ingrandimento delle strutture neuronali. (A, C, E): LM, mag. 20×; bar: 50 μ m. (B, D, F): LM, mag. 40×; bar: 20 μ m.

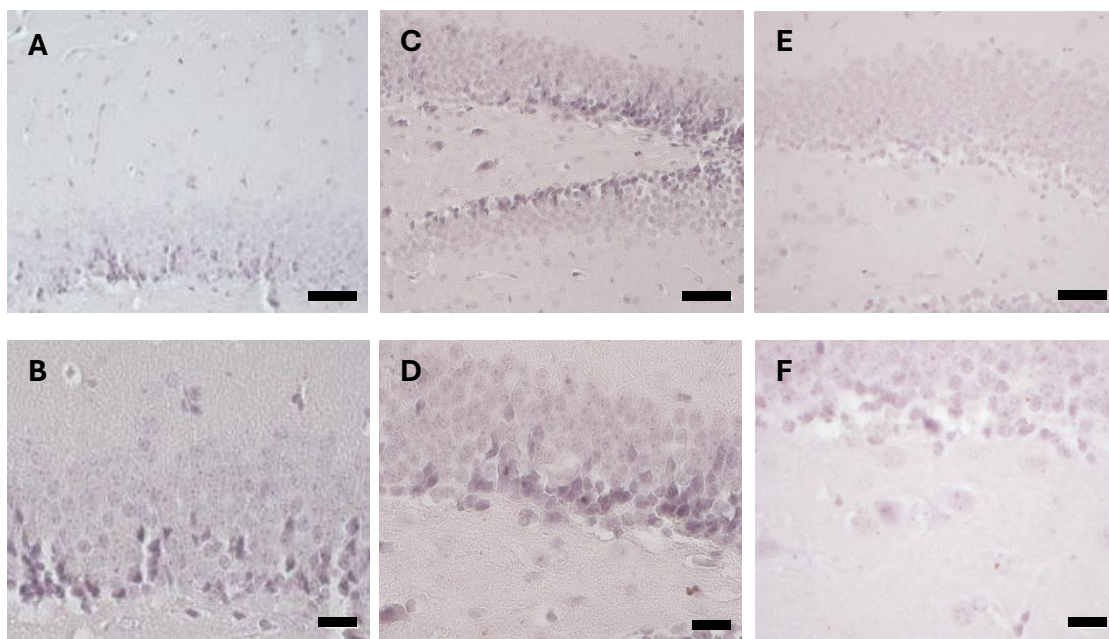


Figura 28 - Immunohistochimica con marker *Sirt-1* del giro dentato dell'ippocampo di topo nei gruppi controllo (A – B), DHEA (C – D), e DHEA/LC-ALC (E – F). (A, C, E): immagini a basso ingrandimento

del giro dentato. **(B, D, F)**: immagini ad alto ingrandimento della classica struttura a "V". **(A, C, E)**: LM, mag. 20×; bar: 50 μm. **(B, D, F)**: LM, mag. 40×; bar: 20 μm.

4.4.3 Danno glicativo (MG-AGE)

La presenza di stress glicativo nel comparto cerebrale è stata analizzata con la ricerca del marker MG-AGE. Questo risulta essere poco rappresentato nel gruppo di controllo dell'isocorteccia e del giro dentato, ma molto presente nelle sezioni di entrambe le porzioni del gruppo DHEA, visibile grazie all'intensa colorazione (fig. 29D-F, 30D-F); nel gruppo DHEA/LC-ALC MG-AGE appare in modo più attenuato (fig. 29G-I, 30G-I), sintomo di un ridotto livello di stress glicativo.

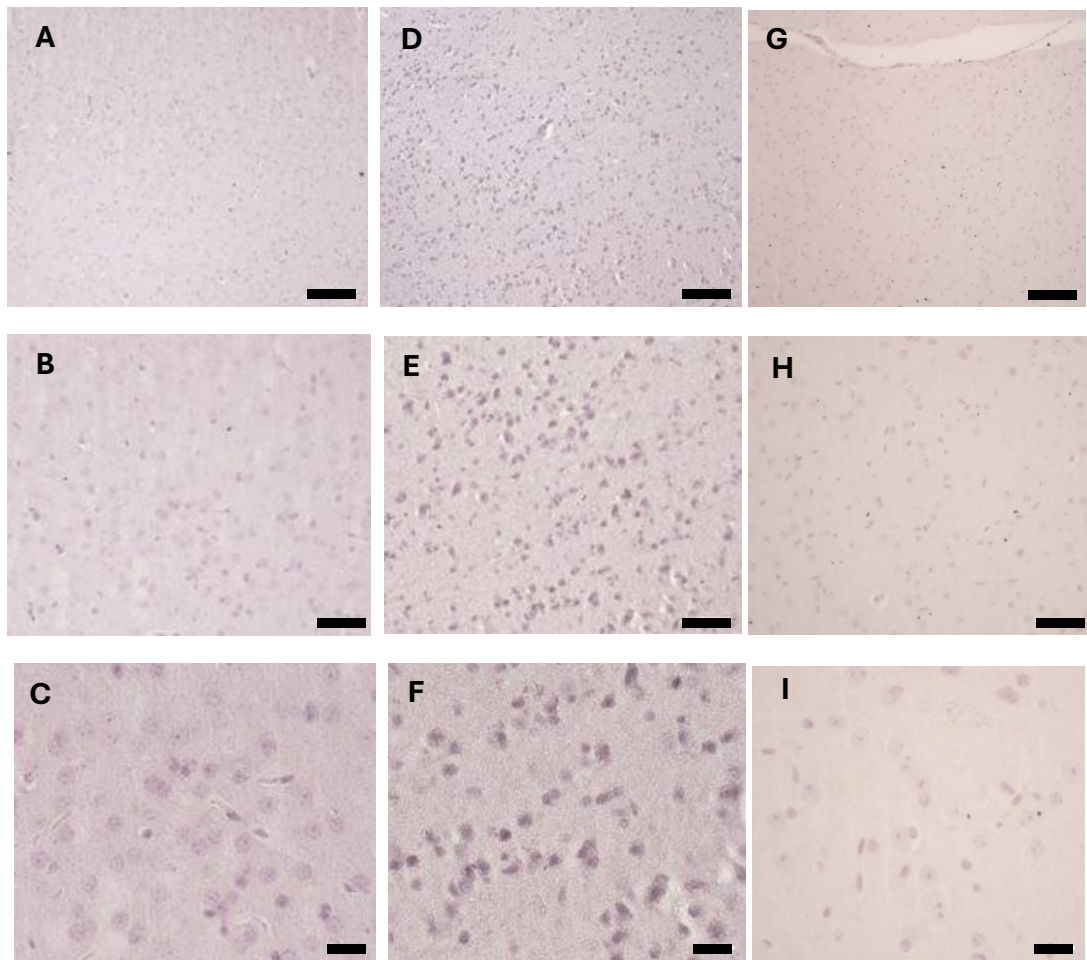


Figura 29 - Immunohistochimica con marker MG-AGE dell'isocorteccia di topo nei gruppi controllo (**A – C**), DHEA (**D – F**), e DHEA/LC-ALC (**G – I**). **(A, D, G, B, E, H)**: immagini a basso ingrandimento dell'isocorteccia **(C, F, I)**: immagini ad alto ingrandimento delle strutture neuronali corticali. **(A, D, G)**: LM, mag. 10×; bar: 100 μm. **(B, E, H)**: LM, mag. 20×; bar: 50 μm. **(C, F, I)**: LM, mag. 40×; bar: 20 μm.

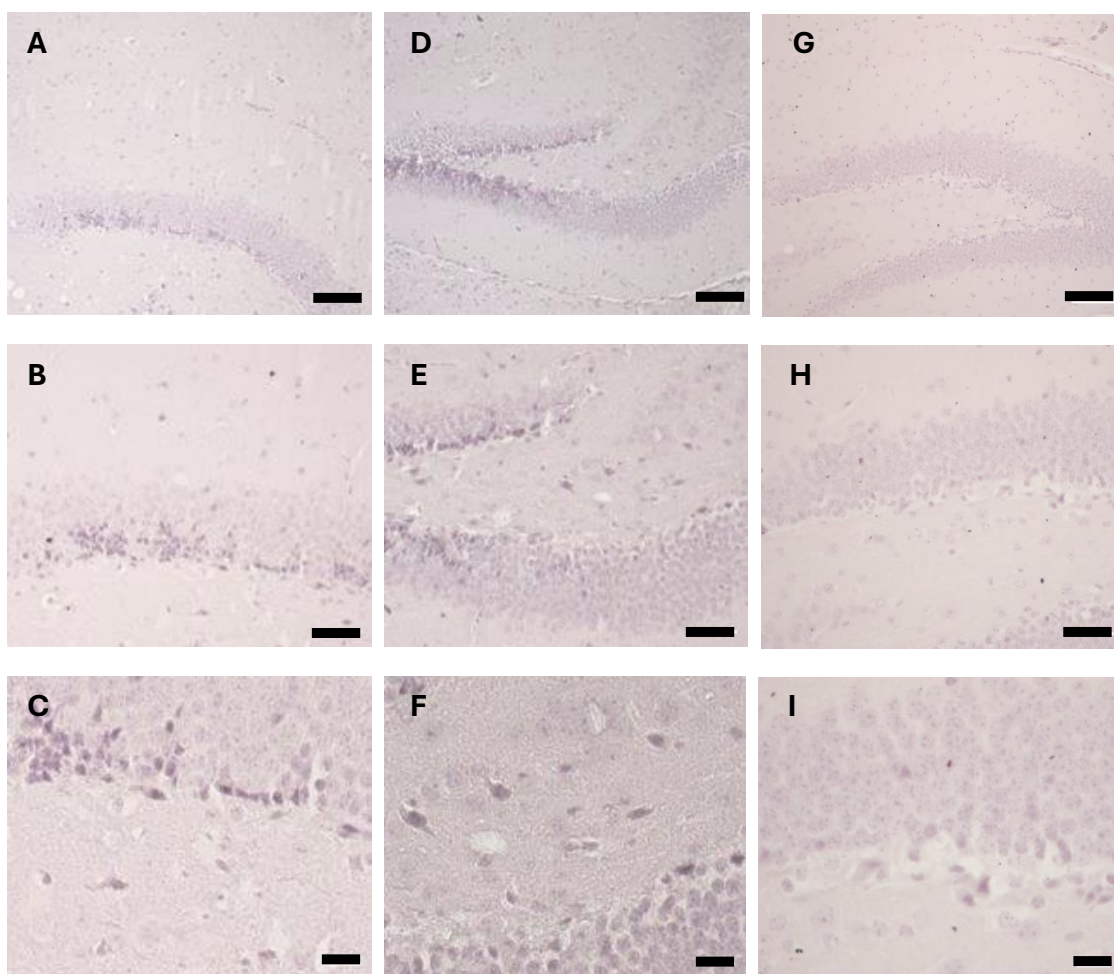


Figura 30 - Immunohistochimica con marker MG-AGE del giro dentato dell'ippocampo di topo nei gruppi controllo (A – C), DHEA (D – F), e DHEA/LC-ALC (G – I). (A, D, G, B, E, H): immagini a basso ingrandimento che mostrano la classica struttura a “V” dell'ippocampo. (C, F, I): immagini ad alto ingrandimento delle cellule granulari dello strato mediale. (A, D, G): LM, mag. 10×; bar: 100 μ m. (B, E, H): LM, mag. 20×; bar: 50 μ m. (C, F, I): LM, mag. 40×; bar: 20 μ m.

4.5 Fegato

4.5.1 Fibrosi epatica

Le analisi istologiche sulle sezioni di fegato nei tre gruppi di studio hanno evidenziato un'architettura microscopica d'organo ben conservata. Nelle sezioni del gruppo di controllo colorate con ematossilina-eosina (fig. 31A-D) sono riscontrabili gli elementi caratteristici dell'organizzazione epatica: è visibile parte di un lobulo epatico, riconoscibile grazie alla presenza della vena centrale, delle vene interlobulari e dei sinusoidi epatici. Gli epatociti mostrano una struttura ben conservata (fig. 31D). Nel gruppo DHEA l'organizzazione microscopica è mantenuta, ma gli epatociti appaiono essere in degenerazione, quindi necrotici, e vacuolizzati, presentando il cosiddetto effetto "ballooning" (fig. 31E-H). Nel gruppo trattato con carnitine la struttura degli epatociti appare migliorata, simile a quella visibile nel gruppo di controllo (Fig. 31I-L). Un alto livello di fibrosi d'organo è messo in evidenza dalla colorazione con tricromica di Mallory: nel gruppo DHEA è vistosa la presenza di tessuto fibrotico, visibile in blu, non solo negli spazi perivasali, ma in particolare in corrispondenza dei sinusoidi epatici, che mostrano anche un aspetto dilatato (Fig. 32E-H); nelle sezioni del gruppo DHEA/LC-ALC si riscontra una bassa presenza di fibre collagene localizzate solo negli spazi perivasali, per cui il parenchima epatico appare più simile a quello del gruppo di controllo (fig. 32I-L).

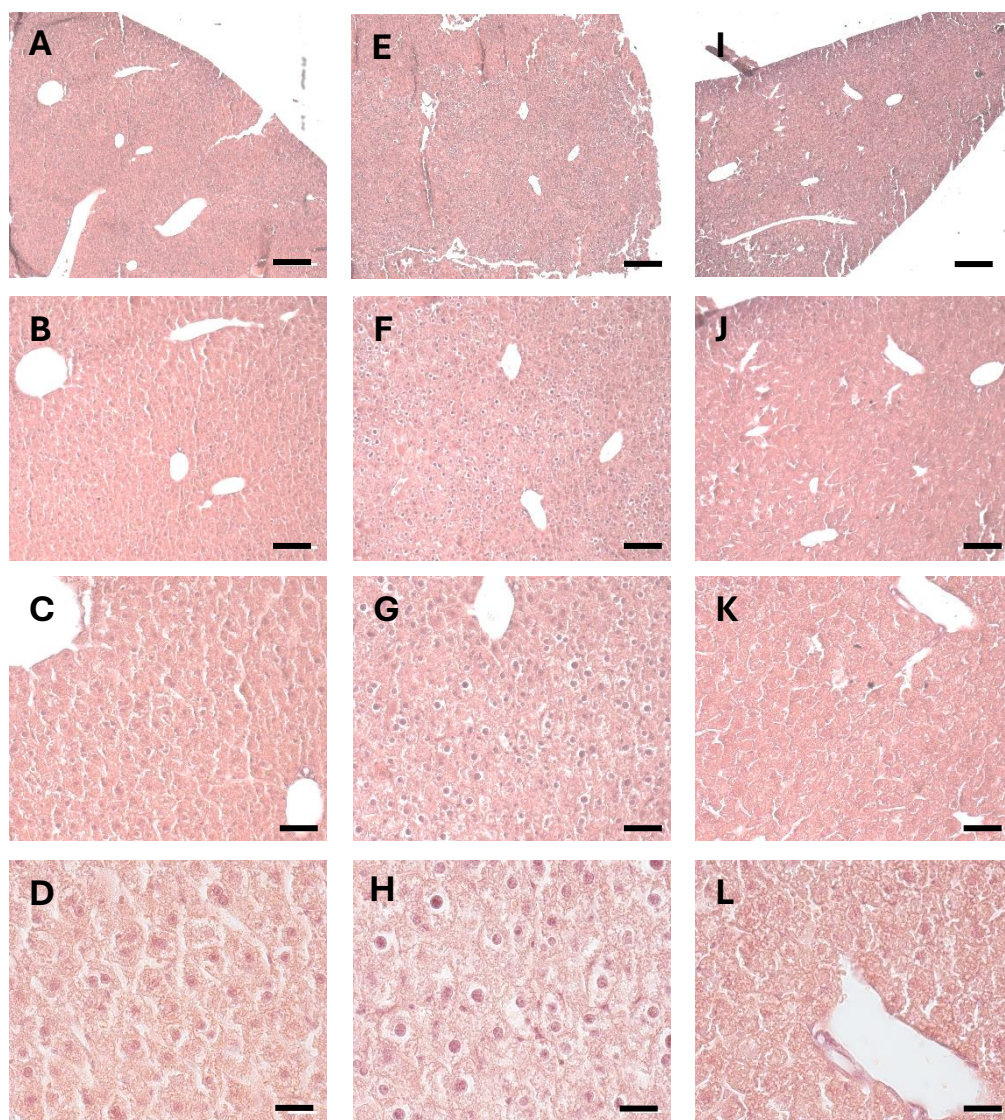


Figura 31 - Colorazione in ematossilina-eosina di fegato di topo nei gruppi controllo (**A-D**), DHEA (**E-H**), DHEA/LC-ALC (**I-L**). (**A, E, I, B, F, J**): immagini in microscopia ottica a basso ingrandimento dello stroma epatico. (**C, G, K, D, H, L**): immagini ad altro ingrandimento di cellule epatiche. (**A, E, I**): LM, mag. 5X; bar: 200 μ m. (**B, F, J**): LM, mag. 10X; bar: 100 μ m. (**C, G, K**): LM, mag. 20x; bar: 50 μ m. (**D, H, L**): LM, mag. 40x, bar 20 μ m.

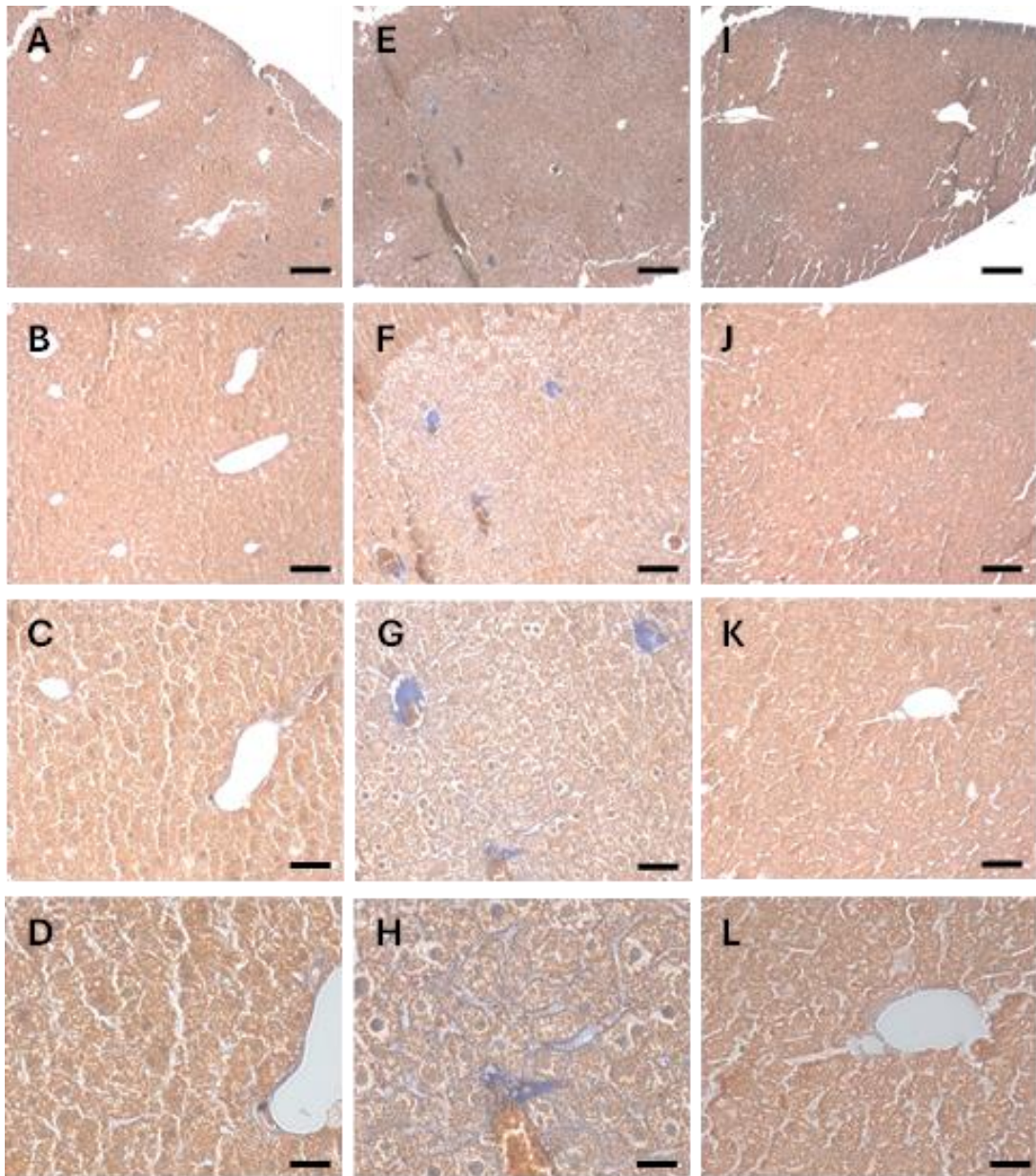


Figura 32 - Colorazione Azan-Mallory tricromica di fegato di topo nei gruppi controllo (A – D), DHEA (E-H), DHEA/LC-ALC (I -L). (A, E, I, B, F, J): immagini in microscopia ottica a basso ingrandimento dello stroma epatico. (C, G, K, D, H, L): immagini ad alto ingrandimento di cellule epatiche. (A, E, I): LM, mag. 5×; bar: 200 μm. (B, F, J): mag. 10×; bar: 100 μm. (C, G, K): LM, mag. 20×; bar: 50 μm. (D, H, L): LM, mag. 40x, bar 20 μm.

4.5.2 Danno cellulare (IL-1 β)

La presenza di infiammazione e danno cellulare nelle sezioni di fegato di topo è stata investigata mediante l'utilizzo del marker interleuchina-1 β (IL-1 β): è una citochina secreta da diverse cellule del sistema immunitario che funge da mediatore proinfiammatorio altamente potente, che porta alla vasodilatazione, promuove l'attrazione dei granulociti verso il tessuto

infiammato e induce l'espressione delle prostaglandine durante la risposta infiammatoria acuta (Galozzi *et al.*, 2021). Tale marker risulta molto rappresentato nelle sezioni del parenchima epatico del gruppo DHEA (fig. 33D-F); la colorazione risulta meno evidente, come anche l'infiammazione, nelle immagini del gruppo DHEA/LC-ALC (fig. 33G-I).

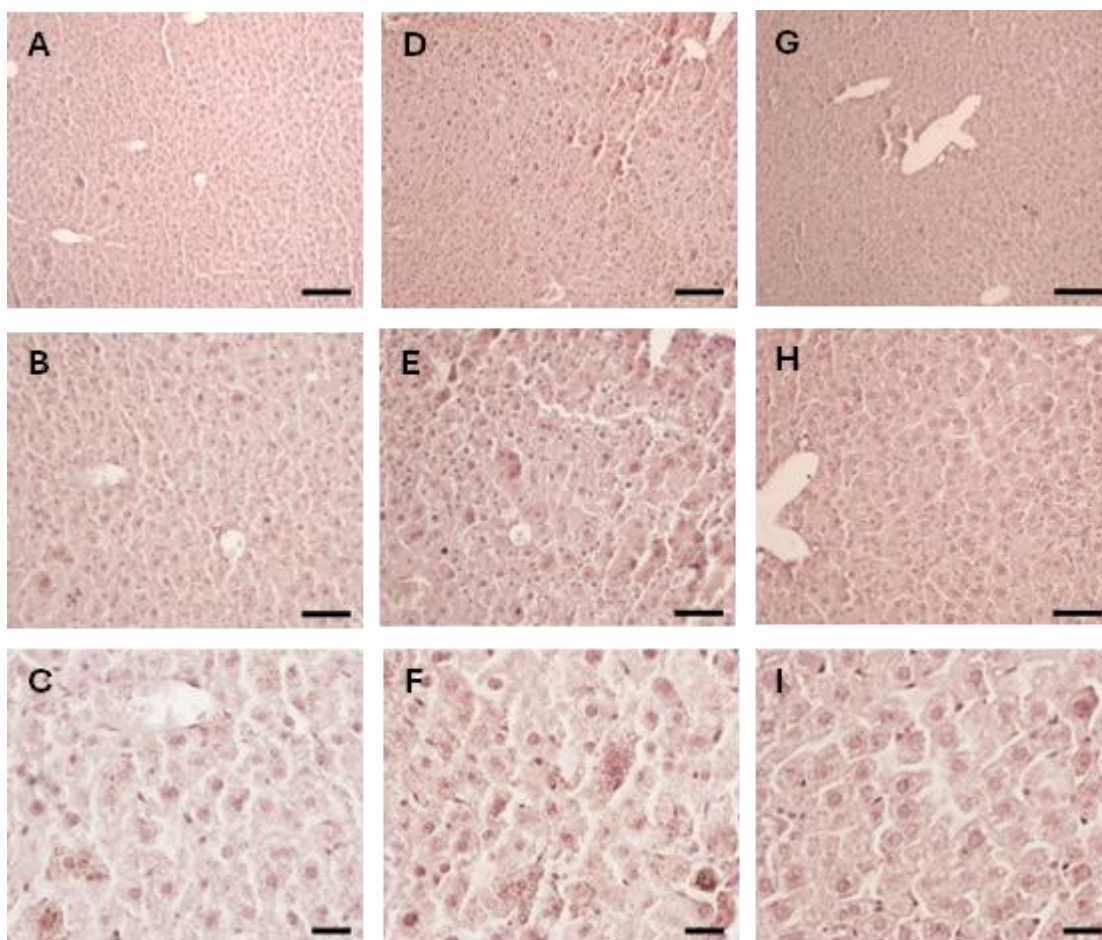


Figura 33 – Immunistochemica con marker $IL-1\beta$ di fegato di topo nei gruppi controllo (A – C), DHEA (D – F), e DHEA/LC-ALC (G – I). (A, D, G, B, E, H): immagini in microscopia ottica a basso ingrandimento dello stroma epatico. (C, F, I): immagini ad alto ingrandimento di cellule epatiche. (A, D, G): LM, mag. 10 \times ; bar 100: μ m. (B, E, H): mag. 20 \times ; bar: 50 μ m. (C, F, I): LM, mag. 40 \times ; bar: 20 μ m.

5. DISCUSSIONE

5. DISCUSSIONE

I risultati ottenuti nel presente lavoro di tesi hanno verificato la presenza di specifiche alterazioni morfo-funzionali nell'utero, negli ovidotti, nel cervello e nel fegato provenienti da un modello murino di PCOS indotto con somministrazione di DHEA, rispetto al controllo. È stata anche dimostrata un'azione protettiva della formulazione di L-carnitine, usata come supplemento orale, che ha determinato una chiara riduzione delle variazioni osservate nel modello PCOS.

Precedentemente a quanto discusso in questa tesi, gli studi iniziali del progetto si sono incentrati sull'organo protagonista della malattia: le ovaie (Di Emidio *et al.*, 2020 (A); Di Emidio *et al.*, 2020 (B)). E' stato dimostrato che la somministrazione di DHEA ha avuto gli effetti ricercati nelle gonadi: viene confermato lo status di anovulazione che accompagna la sindrome, e l'analisi della popolazione follicolare nei topi DHEA ha rivelato che è stato indotto un aumento altamente significativo dei follicoli atresici rispetto ai controlli, insieme ad una ridotta qualità ovocitaria: i dati hanno mostrato che la percentuale di ovociti in metafase II normale è diminuita di circa il 40% negli ovociti del gruppo DHEA rispetto al controllo. L'indagine morfologica delle ovaie ha mostrato un'alterata deposizione di collagene, un incremento della vascolarizzazione, accumulo di gocciole lipidiche ed un'alterata steroidogenesi; la presenza di stress di tipo glicativo è risultata chiara grazie agli aumentati livelli intraovarici di MG-AGE in associazione con un'elevata espressione del recettore degli AGE ed una deregolazione del sistema delle gliossalasi; risultava essere presente anche una sofferenza a livello mitocondriale, confermata da bassi livelli della traslocasi della membrana esterna del mitocondrio (Tomm20) (Di Emidio *et al.*, 2020 (A)). La somministrazione di L-carnitina e acetil-L-carnitina è risultata essere benefica per le gonadi con fenotipo DHEA, in quanto nelle ovaie trattate con carnitina si è osservata una diminuzione del tasso di follicoli atresici ed un aumento del tasso di ovociti in metafase II normale; anche l'analisi morfologica è risultata soddisfacente, mostrando uno stroma ovarico più compatto rispetto al gruppo DHEA, con minore accumulo di collagene e vascolarizzazione normale; stress glicativo e mitocondriali appaiono entrambe migliorati alla luce del trattamento antiossidante (Di Emidio *et al.*, 2020 (B)).

Proseguendo con lo studio dell'apparato riproduttivo nel presente progetto di ricerca, per quanto riguarda l'utero sono chiare le evidenze morfologiche che mostrano un'aumentata proliferazione dell'epitelio ghiandolare, la quale potrebbe essere responsabile

dell'allargamento delle ghiandole e dell'ispessimento delle pareti uterine (Mirabolghasemi *et al.*, 2017, Wang *et al.*, 2019). I dati evidenziano anche iperplasia dell'epitelio luminale e ghiandolare, con un aumento del numero delle ghiandole uterine tubulari semplici, e ciò potrebbe rappresentare un fattore critico nella ridotta ricettività endometriale nelle pazienti con PCOS (Ashary *et al.*, 2018, Jiang *et al.*, 2022). L'ipertrofia a livello degli ovidotti risulta essere altrettanto problematica, in quanto è associata con un aumento dello spessore del tessuto epiteliale, e ciò può causare una riduzione del lume oviduttale e della sua permeabilità, compromettendo il fisiologico funzionamento di tale tratto riproduttivo, in cui contrattilità e peristalsi sono essenziali per il trasporto di ovociti o embrioni precoci attraverso la cavità uterina, oppure per il trasporto degli spermatozoi verso l'apertura addominale degli ovidotti o delle tube di Falloppio nella donna (Hamranová *et al.*, 2023). Inoltre, abbiamo riscontrato una riduzione delle ciglia oviduttali nel gruppo DHEA, in accordo con i dati precedenti sugli effetti negativi del testosterone sul battito delle ciglia (Jackson-Bey *et al.*, 2021).

È noto che un alto livello di estrogeni accorcia la finestra d'impianto (Hu *et al.*, 2022); nei topi del gruppo DHEA i livelli di estrogeni subiscono un consistente incremento, e nei topi in gravidanza l'eccesso di androgeni causa una decrescita nei livelli di progesterone sierico ed un aumento nei livelli di estradiolo sierico (Li *et al.*, 2016). Nell'ovaio da PCOS, una carenza di progesterone o una resistenza allo stesso sono responsabili dello squilibrio ormonale endometriale, con conseguente compromissione della funzionalità endometriale ed aumento del rischio di cancro dell'endometrio (Savaris *et al.*, 2011). Inoltre, i livelli di androgeni in eccesso nella PCOS aumentano la biodisponibilità degli estrogeni a causa della conversione periferica degli androgeni in estrogeni, che a loro volta sovraregolano l'espressione del recettore endometriale degli androgeni (Xue *et al.*, 2021). In questa tesi non vengono presentate evidenze di cambiamenti ormonali, tuttavia, l'enzima 17-HSD4, coinvolto nella conversione dell'androstenedione in DHEA (Breitling *et al.*, 2001), appare essere sovraregolato sia nell'utero che negli ovidotti, come prova di uno squilibrio ormonale nei topi trattati con DHEA. L'aumento delle deposizioni di collagene rappresenta un ulteriore fenotipo dell'utero con PCOS, qui rivelato tramite tricromica di Mallory ed espressione del marker Coll1; livelli elevati di collagene di tipo I caratterizzano i disordini fibrotici del tratto riproduttivo (Hu *et al.*, 2015); nell'endometriosi questa caratteristica è stata collegata ad un'attivazione aberrante della trascrizione dei geni Coll1a1 e Coll1a2, a prova del fatto che sia un fattore critico per la ricettività endometriale (Kim *et al.*, 2019).

L'integrazione di carnitina è stata impiegata con successo nelle pazienti con PCOS con miglioramenti dei parametri ormonali e metabolici, aumento del consumo energetico e riduzione dei lipidi e del peso corporeo, ma la loro azione meccanicistica è ancora oggetto di studio. Il *pool* di carnitina endogena è formato dagli esteri della carnitina a catena corta acetil-L-carnitina (ALC) e propionil-L-carnitina (PLC); quando somministrate per via esogena, ALC e PLC hanno una biodisponibilità maggiore rispetto alla L-carnitina (LC) (Placidi *et al.*, 2022). Dagli studi precedenti si è visto che la somministrazione orale di LC ed ALC allevia le disfunzioni ovariche associate alla PCOS (Di Emidio *et al.*, 2020 (B)); in questa tesi si dimostra che il trattamento con carnitine riduce l'anormale iperplasia epiteliale presente negli epiteli ghiandolare e luminale, l'ipertrofia, la fibrosi e l'alterazione ghiandolare presente negli uteri del gruppo DHEA.

Un importante aspetto di tale studio è l'osservazione del danno molecolare-ossidativo nell'utero e negli ovidotti degli animali con PCOS, evidenziato dagli elevati livelli di addotti proteici costituiti dal 4-HNE. Si è constatato che la somministrazione di LC-ALC allevia lo stress ossidativo in tutti i compartimenti. Inoltre, il ridotto contenuto mitocondriale di Tomm20 indica che le alterazioni redox correlate al gruppo DHEA osservate qui possono essere correlate al danno ai mitocondri; in accordo con l'ipotesi che marcatori metabolici mitocondriali anomali e geni correlati sono associati e partecipano alla comparsa della PCOS (Zhang *et al.*, 2019), nei due organi del gruppo DHEA sono stati osservati bassi livelli di Tomm20.

Una scoperta rilevante di questa ricerca è la dimostrazione che anche lo stress glicativo è coinvolto nella disfunzione uterina e oviduttale associata alla PCOS, supportando il ruolo cruciale degli AGE in questa sindrome (Tatone *et al.*, 2021). Studi recenti affermano che gli AGE sono coinvolti nell'eccesso di produzione degli androgeni nella PCOS poiché modulano le attività degli enzimi cruciali della steroidogenesi (Merhi *et al.*, 2019, Lin *et al.*, 2019); gli AGE possono interferire con la segnalazione intracellulare dell'insulina e potenzialmente influenzare la funzione ovarica e la crescita follicolare, contribuendo all'anovulazione (Rutkowska *et al.*, 2016); inoltre, gli AGE sono attivamente coinvolti in un ciclo a feedback positivo, che sfocia nello stress ossidativo; quest'ultimo promuove l'ultimo passaggio della glicazione avanzata, accelerando quindi l'accumulo di AGE; gli AGE, a loro volta, attivano percorsi proinfiammatori e portano alla generazione di ROS reattivi (Papachristoforou *et al.*, 2020). Uno dei precursori degli AGE più potenti è MG, una -oxo aldeide derivata

dall'autossidazione del glucosio, dalla perossidazione lipidica e dalla via dei polioli; oltre alla sua attività come precursore degli AGE, MG ha effetti deleteri sulla respirazione mitocondriale, sulla proliferazione, sulla sopravvivenza e sull'equilibrio redox (Sibbersen *et al.*, 2020); non visibile nello stroma uterino, la deposizione di MG-AGE è aumentata in tutti i compartimenti uterini nei topi DHEA, ed il suo accumulo viene ridotto dall'integrazione di LC-ALC.

Nel presente studio abbiamo anche eseguito un'analisi ultrastrutturale sulle sezioni trasversali degli ovidotti murini per dare uno sguardo più da vicino alla condizione microscopica dell'organo. Nello strato della mucosa, le cellule epiteliali ciliate hanno mostrato, in tutti i gruppi, la presenza di mitocondri ben conservati, nuclei, ER, apparati di Golgi, corpi multivescicolari e microvilli. Tuttavia, l'analisi TEM ha rivelato una ridotta densità della copertura ciliare e una maggiore presenza di vacuoli mitofagici nel gruppo DHEA. Entrambi sono segni di un trasporto inefficiente delle cellule germinali e di un loro sostegno energetico sbilanciato (Antonouli *et al.*, 2020, Xia *et al.*, 2018). Inoltre, il gruppo DHEA ha mostrato la presenza anomala di DIS tra cellule epiteliali vicine. Questo fenomeno potrebbe essere responsabile dell'ispessimento dello strato di mucosa, osservato nel modello di PCOS, e che non è stato osservato nei controlli e nei topi trattati con carnitina. I complessi giunzionali sono responsabili della stretta adesione cellulare, fornendo una barriera fisica. Il DIS è un segno distintivo dei complessi giunzionali danneggiati, inducendo un'alterata permeabilità paracellulare e limitando la capacità del tessuto di resistere direttamente al danno (Orlando *et al.*, 2009).

È da prendere in considerazione il fatto che l'iperplasia potrebbe evolvere in forme atipiche, progredendo in un carcinoma in situ, che potrebbe diventare potenzialmente invasivo (Albores-Saavedra *et al.*, 1997). Insieme alla superficie epiteliale ovarica, il tessuto oviduttale è considerato essere il candidato prediletto per il cancro ovarico sieroso di alto grado. Tuttavia, la relazione tra PCOS e cancro ovarico è ancora oggetto di dibattito. Considerando i nostri risultati morfologici, la somministrazione orale di LC-ALC nella dieta mostra una grande efficacia nel prevenire l'iperfibrosi e l'ipertrofia oviduttale.

In questa tesi si è provata anche la presenza di alterazioni strutturali a livello dell'isocorteccia e del giro dentato dell'ippocampo, dove si osserva una massiccia degenerazione neuronale nel gruppo DHEA; attualmente si sa molto poco su quanto l'iperandrogenismo possa influenzare le funzioni cognitive della donna, ma tale dato strutturale potrebbe coadiuvare il fatto che le

donne con PCOS totalizzano un punteggio inferiore nei test di fluidità verbale, memoria verbale e abilità manuale rispetto ai controlli di pari età senza sindrome; diversi studi minori hanno suggerito differenze nelle prestazioni cognitive e nei risultati dell'imaging cerebrale delle pazienti con PCOS (Huddleston *et al.*, 2022). Anche in tale sede è stata indagato il ruolo dello stress ossidativo, dato che il cervello, con il suo elevato consumo di ossigeno e la presenza di membrane altamente soggette ad attacchi perossidativi, è altamente suscettibile a tale tipo di stress, anche a causa della scarsa capacità di autoriparazione delle popolazioni neuronali post-mitotiche; inoltre, gli alti livelli di ioni metallici redox-attivi e le difese antiossidanti relativamente basse spiegano l'elevata vulnerabilità del cervello al danno ossidativo. Sebbene lo stress ossidativo sia principalmente coinvolto nei disturbi neurodegenerativi, i suoi effetti sulle connessioni neuronali dell'ippocampo, dell'amigdala e della corticale sono noti per causare deficit comportamentali e cognitivi legati a disturbi neuropsichiatrici, tra cui ansia e depressione (Salim *et al.*, 2017). Sono stati analizzati i livelli di Sirtuina-1; tra tutte le forme esistenti, Sirt1 è la più ampiamente studiata e ben caratterizzata; localizzata normalmente soprattutto nel nucleo, ma meno frequentemente nel citoplasma, presente nelle strutture cerebrali, in particolare nell'ipotalamo, questa proteina utilizza la nicotinamide adenina dinucleotide (NAD^+) come co-substrato nelle sue reazioni enzimatiche: è una deacetilasi dipendente da NAD^+ , che rimuove i gruppi acetile dai substrati proteici per aggiungerli all'ADP-ribosio, prodotto della scissione di NAD^+ ; quest'ultimo è un dinucleotide con un nucleotide che contiene un'adenina e l'altro contiene nicotinamide (Hu *et al.*, 2018). Oltre a essere il co-substrato limitante la velocità per gli enzimi dipendenti da NAD^+ , questo può essere utilizzato come coenzima nelle reazioni redox metaboliche. NAD^+ esiste in due forme, la forma ossidata come NAD^+ e la forma ridotta come NADH. NAD^+/NADH svolge un ruolo critico nella glicolisi e nella respirazione cellulare per la produzione di ATP. Nella glicolisi, NAD^+ viene ridotto a NADH; nella fosforilazione ossidativa e nella respirazione cellulare, il NADH viene ossidato a NAD^+ dalla catena di trasporto degli elettroni (ETC); pertanto, le concentrazioni di NAD^+ fluttuano con lo stato metabolico cellulare e la disponibilità di nutrienti (Hu *et al.*, 2018). I livelli di NAD^+ sono aumentati durante la crisi energetica, come la restrizione calorica, e sono diminuiti in condizioni di carico energetico elevato, come le diete ricche di grassi. Il fatto che l'attività enzimatica di Sirt-1 dipenda dai livelli di NAD^+ consente a Sirt-1 di agire come un sensore metabolico che accoppia lo stato metabolico cellulare alle risposte regolatrici. Sirt-1 svolge quindi un ruolo chiave nella regolazione dell'omeostasi energetica e dei ritmi circadiani, ed

ha anche un ruolo protettivo nelle malattie neurologiche; è correlata a condizioni che sovente vengono associate alla PCOS, come obesità, che può portare come conseguenza al diabete di tipo II (Hu *et al.*, 2018). In un altro studio si è visto come bassi livelli di Sirt-1 nucleare, ma elevati livelli citoplasmatici, siano associati ad uno stato di depressione in topi modello di PCOS; questa condizione è stata associata ad una riduzione della fosforilazione dei sensori energetici, della chinasi epatica B1 (LKB1) e dell'adenosina monofosfato chinasi (AMPK), insieme a uno squilibrio dei marcatori autofagici come Beclin-1, proteina associata al microtubulo I/II catena leggera 3, enzima 7 dell'autofagia I/II catena leggera 3, l'enzima 7 dell'autofagia e il recettore selettivo dell'autofagia P62: queste anomalie sono state attenuate dal trattamento con sulforafano, potente molecola antiossidante appartenente alla famiglia dei solforati, come evidenziato dalla traslocazione nucleare di Sirt-1 e dalla repressione delle proteine a valle, tra cui FOXO1, NF- κ B e dalla produzione di TNF- α (Kamel *et al.*, 2024). A conferma di ciò, nel nostro studio sono visibili elevati livelli di Sirt-1, sia nell'isocorteccia che nel giro dentato dei campioni provenienti dal modello della sindrome, a testimonianza della sua implicazione nella manifestazione della malattia.

Come già trattato per gli organi riproduttivi femminili, anche nel cervello allo stress ossidativo si accompagna lo stress glicativo, osservabile grazie alla marcata presenza di MG-AGE nelle sezioni di isocorteccia e giro dentato del cervello proveniente dai topi trattati con DHEA.

Dopo il trattamento con carnitine le evidenze neuronali, dal punto di vista morfologico, ossidativo e glicativo, tornano a rispecchiare quelle dei controlli, testimonianza del fatto che l'integrazione di antiossidanti può ristabilire una situazione di equilibrio, ma servono ulteriori studi per confermare i dati funzionali, soprattutto sull'aspetto della salute mentale della donna con PCOS.

A conferma della presenza di alterazioni a livello metabolico sono state eseguite indagini sul fegato proveniente dal modello murino di PCOS, dove si evince un alto grado di sofferenza epatocitaria; gli epatociti presentano il cosiddetto effetto "balloning", secondo il quale appaiono essere di dimensioni ridotte rispetto alla norma e circondati da un ampio spazio vuoto, per effetto della necrosi (De León-Nava *et al.*, 2016). È stata evidenziata la presenza di accumulo di fibre collagene negli spazi perivasali e intorno ai sinusoidi epatici delle sezioni di fegato provenienti dai topi modello di PCOS; la spiegazione di ciò potrebbe risiedere nella natura delle cellule di Ito: queste, conosciute come cellule stellate epatiche, sono periciti che si trovano nello spazio di Disse, piccola area situata tra i sinusoidi e gli epatociti; nel fegato

normale le cellule stellate si trovano in uno stato quiescente e rappresentano il 5-8% del totale delle cellule epatiche (Geerts, 2001); ogni cellula ha lunghe protrusioni che dal corpo cellulare raggiungono i sinusoidi epatici; in seguito a danno possono attivarsi e andare incontro ad un particolare fenomeno di proliferazione noto come “transizione miofibroblastica”: da cellule stellate divengono miofibroblasti, dotati di contrattilità e in grado di attivare processi infiammatori; possono anche secernere matrice extracellulare e collagene, che progressivamente forma dei setti fibrotici, che conducono allo status di fibrosi; questo processo è in grado di automantenersi attivo grazie alla natura autocrina e paracrina delle cellule stellate, e può essere amplificato dal coinvolgimento di altre cellule vicine, come i colangiociti e gli epatociti, che vengono reclutati e producono essi stessi mediatori chimici che contribuiscono all’aumento del segnale e all’aumento delle fibre collagene (Winau *et al.*, 2007).

La correlazione tra disturbi epatici e PCOS è poco presente in letteratura, ma è stato proposto che le epatochine, proteine del sangue prodotte nel fegato, possano contribuire allo sviluppo o all'aggravamento dell'insulino-resistenza nella PCOS, poiché molte di esse, tra cui fetuina-A, FGF-21 e SEPP1, sono risultate disregolate nelle donne con PCOS (Stefanaki *et al.*, 2023). Dalle nostre analisi il trattamento con carnitine risulta essere funzionale. Inoltre, è stata confermata la presenza di uno stato infiammatorio, classico per la sindrome, anche a livello epatico grazie alla presenza dell’interleuchina-1 β nello stroma epatico del gruppo DHEA; ciò conferma la presenza generica di infiammazione cronica di basso grado nei soggetti con PCOS, e poiché le malattie epatiche come la steatosi epatica non alcolica (*nonalcoholic fatty liver disease*, NAFLD) e la steatoepatite non alcolica (*nonalcoholic steatohepatitis*, NASH) sono note patologie con infiammazione degli epatociti, lo stato di infiammazione di basso grado delle donne con PCOS potrebbe contribuire o riflettere un certo grado di danno alle cellule epatiche (Chen *et al.*, 2016). Il trattamento a base di antiossidanti appare essere una soluzione valida anche a livello epatico.

6. CONCLUSIONI e PROSPETTIVE FUTURE

6. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

I risultati provenienti dagli studi oggetto di questa tesi sperimentale, svolti presso il laboratorio di Biotecnologie della Riproduzione dell'Università degli Studi dell'Aquila, evidenziano che gli uteri e gli ovidotti provenienti da un modello murino di PCOS indotta con DHEA sono affetti da iperfibrosi, iperplasia e ipertrofia; il cervello ed il fegato provenienti dagli stessi animali presentano chiari segni di degenerazione cellulare. Le alterazioni legate a stress ossidativo e glicativo sono associabili all'accumulo di metilglicosale e alla presenza di perossidazione lipidica. La supplementazione orale di carnitine riduce le alterazioni osservate nel gruppo DHEA.

Le analisi al TEM degli ovidotti confermano che una supplementazione a base di carnitine riporta ad un aspetto delle cellule ciliate oviduttali comparabile a quello dei controlli, come anche dei mitocondri ben preservati, dalle numerose cellule giunzionali e da una copertura continua di cellule ciliate nel gruppo DHEA/LC-ALC; inoltre, si riduce la presenza di vacuoli mitofagici e scompaiono gli spazi intercellulari dilatati.

Dal punto di vista riproduttivo, considerando che il lume oviduttale è il sito dove gli spermatozoi fecondano l'ovocita e che il conseguente trasporto degli embrioni nell'utero è diretto dagli ovidotti, e che l'utero stesso ha il ruolo di sostenere la crescita dell'embrione, le scoperte di questo lavoro potrebbero essere utili per un protocollo di trattamento alternativo nei casi di infertilità femminile legata alla PCOS.

Le alterazioni morfologiche a livello cerebrale, legate a degenerazione neuronale, stress ossidativo e glicativo nei topi modello di PCOS, possono trovare giovamento in trattamenti a base di antiossidanti, come le carnitine, e possono dunque essere un valido supporto ai fenomeni correlati come ansia e depressione, tipicamente manifestate dalle donne che soffrono della sindrome.

La riduzione della neuroinfiammazione, rilevata a livello cerebrale, viaggia di pari passo con il miglioramento della situazione metabolica, osservata nel nostro caso a livello epatico, dove l'infiammazione cronica di basso grado, tipica della PCOS, ha manifestato i suoi effetti portando ad una alterazione strutturale dell'organo; sarebbe interessante indagare lo status ossidativo e glicativo anche a livello epatico con l'analisi di ulteriori markers. Le analisi su tale organo hanno confermato per l'ennesima volta il coinvolgimento sistemico degli organi femminili in toto, non solo riproduttivi, da parte della PCOS.

In conclusione, il presente lavoro di tesi sostiene che le carnitine, noto antiossidante utilizzato come integratore alimentare, potrebbero risultare benefiche nella riduzione delle alterazioni morfo-funzionali rilevate in diversi organi degli animali trattati con DHEA.

La prosecuzione di questo progetto si realizzerà con lo studio ultrastrutturale di cervello e fegato, e di altri organi del modello murino di PCOS, come rene e pancreas. Si investigherà inoltre la presenza di alterazioni ultrastrutturali negli ovociti, per valutare la qualità ovocitaria nella PCOS.

7. BIBLIOGRAFIA

“National Institute of Health (NIH)-Evidence based... – Google Scholar.” <https://scholar.google>. National Institute of Health (NIH)- Evidence based works hop on Polycystic Ovary Syndrome.

Advani K, Batra M, Tajpuriya S, Gupta R, Saraswat A, Nagar HD, Makwana L, Kshirsagar S, Kaul P, Ghosh AK, et al. Efficacy of combination therapy of inositols, antioxidants and vitamins in obese and non-obese women with polycystic ovary syndrome: An observational study. *J. Obs. Obstet. Gynaecol.* 2020; 40, 96–101.

Agarwal A, Sengupta P, Durairajanayagam D. Role of L-carnitine in female infertility. *Reprod Biol Endocrinol.* 2018; 26;16(1):5.

Albores-Saavedra J, Gersell D, Gilks CB, Henson DE. Terminology of endocrine tumors of the uterine cervix. *Archives 749 of pathology & laboratory medicine.* 1997; 121(1), 34.

Al-Gubory KH, Fowler PA, Garrel C. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010; 42(10):1634-50.

Alhasaniah AH. l-carnitine: Nutrition, pathology, and health benefits. *Saudi J Biol Sci.* 2023; 30(2):103555.

Aliabadi E, Soleimani Mehranjani M, Borzoei Z, Talaei-Khozani T, Mirkhani H, Tabesh H. Effects of L-carnitine and L-acetyl-carnitine on testicular sperm motility and chromatin quality. *Iran J Reprod Med.* 2012; 10(2):77-82.

Antonouli S, Palmerini MG, Bianchi S, Rossi G, Cecconi S, Belli M, Bernardi S, Khalili MA, Familiari G, Nottola SA, Macchi-739 arelli G. Repeated hyperstimulation affects the ultrastructure of mouse fallopian tube epithelium. *J Reprod Dev.* 2020; 740 66(4):387-397.

Ashary N, Tiwari A, Modi D. Embryo Implantation: War in Times of Love. *Endocrinology.* 2018; 159: 1188–1198.

Awonuga AO, Camp OG, Abu-Soud HM. A review of nitric oxide and oxidative stress in typical ovulatory women and in the pathogenesis of ovulatory dysfunction in PCOS. *Reprod Biol Endocrinol.* 2023; 21(1):111.

Azziz R, et al. The Androgen Excess and PCOS Society criteria for the polycystic ovary syndrome: the complete task force report. *Fertil Steril.* 2009; 91(2):456–88.

Baracat EC, Baracat MCP, José M SJ Jr. Are there new insights for the definition of PCOS? *Gynecol Endocrinol.* 2022; 38(9):703-704.

Barrea L, Arnone A, Annunziata G, Muscogiuri G, Laudisio D, Salzano C, Pugliese G, Colao A, Savastano S. Adherence to the Mediterranean Diet, Dietary Patterns and Body Composition in Women with Polycystic Ovary Syndrome (PCOS). *Nutrients.* 2019; 11(10):2278.

Breitling R, Marijanović Z, Perović D, Adamski J. Evolution of 17 α -HSD Type 4, a Multifunctional Protein of α -Oxidation. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2001; 171, 205–210.

Breitling R, Marijanović Z, Perović D, Adamski J. Evolution of 17 β -HSD Type 4, a Multifunctional Protein of β -Oxidation. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2001; 171, 205–210.

Buist NR. Historical Perspective on Clinical Trials of Carnitine in Children and Adults. *Ann Nutr Metab.* 2016; 68 Suppl 3:1-4.

Castro JP, Jung T, Grune T, Siems W. 4-Hydroxynonenal (HNE) Modified Proteins in Metabolic Diseases. *Free. Radic. Biol. Med.* 2017; 111, 309–315.

Chen MJ, Ho HN. Hepatic manifestations of women with polycystic ovary syndrome. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2016; 37:119-128.

Cochran L, Nadolny R, Garcia K, Kluglein KA, Yagoda A, Gandhi P, Dressel J, Prol B, Peralta R, Shipp A, Costin JM. Available Treatments and Adjunctive Therapies for Polycystic Ovarian Syndrome (PCOS) Patients of Reproductive Age: A Scoping Review. *Cureus.* 2024; 16(9):e70501.

Collins TJ. ImageJ for microscopy. *Biotechniques.* 2007; 43(1 Suppl):25-30.

Conway G. journal of, and undefined 2014, “The polycystic ovary syndrome: a position statement from the European Society of Endocrinology,” *Eur J Endocrinol.* 2014; 171(4):P1-29.

Cowan S, Lim S, Alycia C, Pirotta S, Thomson R, Gibson-Helm M, Blackmore R, Naderpoor N, Bennett C, Ee C, Rao V, Mousa A, Alesi S, Moran L. Lifestyle management in polycystic ovary syndrome - beyond diet and physical activity. *BMC Endocr Disord.* 2023; 16;23(1):14.

Coy P, García-Vázquez F.A, Visconti P.E, Avilés M. Roles of the oviduct in mammalian fertilization. *Reproduction.* 2012; 144, 649–660.

De León-Nava MA, Álvarez-Delgado C, Donis-Maturano L, Hernández-Ruiz J, Manjarrez-Reyna AN, Cruz-Avilés E, Leon-Cabrera S, Morales-Montor J, Fragoso JM, Escobedo G. A non-hepatotropic parasite infection increases mortality in the acetaminophen-induced acute liver failure murine model: possible roles for IL-5 and IL-6. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2016; 111(12):757-764.

De Rubeis M, Mascitti IA, Cocciolone D, Placidi M, Vergara T, Di Emidio G, Macchiarelli G, Tatone C, Nottola SA, Palmerini MG. Morphological and Redox/Glycative Alterations in the PCOS Oviducts: Modulating Effects of Carnitines in PCOS Mice. *Biology (Basel).* 2024; 13(12):964

Di Emidio G, Placidi M, Rea F, Rossi G, Falone S, Cristiano L, Nottola S, D'Alessandro AM, Amicarelli F, Palmerini MG, Tatone C. Methylglyoxal-Dependent Glycative Stress and Deregulation of SIRT1 Functional Network in the Ovary of PCOS Mice. *Cells.* 2020; 14;9(1):209. (A)

Di Emidio G, Rea F, Placidi M, Rossi G, Cocciolone D, Virmani A, Macchiarelli G, Palmerini MG, D'Alessandro AM, Artini PG et al. Regulatory Functions of L-Carnitine, Acetyl, and Propionyl L-Carnitine in a PCOS Mouse Model: Focus on Antioxidant/Antiglycative Molecular Pathways in the Ovarian Microenvironment. *Antioxidants.* 2020; 9, 867. (B)

Diamanti-Kandarakis E, Christakou C, Marinakis E. Phenotypes and environmental factors: their influence in PCOS. *Curr Pharm Des.* 2012; 18(3):270–82.

Dulohery K, Trottmann M, Bour S, Liedl B, Alba-Alejandr I, Reese S, Hughes, B, Stief CG, Kölle, S. How do elevated levels of testosterone affect the function of the human fallopian tube and fertility? New insights. *Mol. Reprod. Dev.* 2020; 87, 30–44.

Escobar-Morreale HF. Polycystic ovary syndrome: definition, aetiology, diagnosis and treatment. *Nature Rev Endocrinol.* 2018; 14(5):270–84.

Fausser et al., “Consensus on women’s health aspects of polycystic ovary syndrome (PCOS): the Amsterdam ESHRE/ASRM-Sponsored 3rd PCOS Consensus Workshop Group,” *Fertil Steril*, 97 1 2012. *FERTN STERT.* 2011; 09. 024.

Fenkeci SM, Fenkeci V, Oztekin O, Rota S, Karagenc N. Serum total L-carnitine levels in non-obese women with polycystic ovary syndrome. *Hum. Reprod.* 2008; 23, 1602–1606.

Ferriman D, Gallwey JD. Clinical assessment of body hair growth in women. *J Clin Endocrinol Metab.* 1961; 21:1440-7.

Forslund M, Melin J, Alesi S, Piltonen T, Romualdi D, Tay CT, Witchel S, Pena A, Mousa A, Teede H. Different kinds of oral contraceptive pills in polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Endocrinol.* 2023;189(1):S1-S16.

Furat Rençber S, Kurnaz Ozbek S, Eraldemir C, Sezer Z, Kum T, Ceylan S, Guzel E. Effect of resveratrol and metformin on ovarian reserve and ultrastructure in PCOS: An experimental study. *J Ovarian Res.* 2018; 11, 55.

Galozzi P, Bindoli S, Doria A, Sfriso P. The revisited role of interleukin-1 alpha and beta in autoimmune and inflammatory disorders and in comorbidities. *Autoimmun Rev.* 2021; 20(4):102785.

Garg D, Merhi Z. Advanced glycation end products: link between diet and ovulatory dysfunction in PCOS? *Nutrients.* 2015; 7(12):10129-44.

Garg D, Merhi Z. Relationship between advanced glycation end products and steroidogenesis in PCOS. *Reprod Biol Endocrinol.* 2016; 14:71.

Geerts A. History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis.* 2001; 21(3):311-35.

Geiszt M, Kapus A, Németh K, Farkas L, Ligeti E. Regulation of capacitative Ca²⁺ influx in human neutrophil granulocytes. Alterations in chronic granulomatous disease. *J Biol Chem.* 1997; 17;272(42):26471-8.

Genazzani AD, Lanzoni C, Ricchieri F, Santagni S, Rattighieri E, Chierchia E, Monteleone P, Jasonni VM. Acetyl-L-carnitine (ALC) administration positively affects reproductive axis in hypogonadotropic women with functional hypothalamic amenorrhea. *J Endocrinol Invest.* 2011; 34(4):287-91.

Gibson-Helm M, Teede H, Dunaif A, Dokras A. Delayed diagnosis and lack of information associated with dissatisfaction in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endo & Metab.* 2017; 102: 604-612.

González F, Rote NS, Minium J, Kirwan JP. reactive oxygen species-induced oxidative stress in the development of insulin resistance and hyperandrogenism in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91(1):336-40.

Goodarzi MO, Azziz R. Diagnosis, epidemiology, and genetics of the polycystic ovary syndrome. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2006; 20(2):193-205.

Guerra JVS, Dias MMG, Brilhante AJVC, Terra MF, García-Arévalo M, Figueira ACM. Multifactorial basis and therapeutic strategies in metabolism-related diseases. *Nutrients.* 2021; 13(8):2830.

Guyton AC; Hall JE, *Fisiologia Medica.* Tredicesima edizione, Edra, 2017.

Hamranová N, Hocinec N, Záhumenský J, Csöbönyeiová M, Klein M, Feitscherová C, Varga I. Traditional and contemporary 726 views on the functional morphology of the fallopian tubes and their importance for gynecological practice. *Ceska Gynkol.* 2023; 727 88(1):33-43.

Hansda SR, Haldar C. Uterine anomalies in cell proliferation, energy homeostasis and oxidative stress in PCOS hamsters, *M. auratus*: Therapeutic potentials of melatonin. *Life Sci.* 2021; 281:119755.

Herrera E, Barbas C. Vitamin E: action, metabolism and perspectives. *J Physiol Biochem.* 2001; 57(1):43-56.

https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/polycystic-ovary-syndrome?utm_medium=email&utm_source=transaction

- Hu J, Zeng B, Jiang X, Hu L, Meng Y, Zhu Y, Mao M. The Expression of Marker for Endometrial Stem Cell and Fibrosis Was Increased in Intrauterine Adhesions. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2015; 8, 1525–1534.
- Hu M, Li J, Zhang Y, Li X, Brännström M, Shao LR, Billig H. Endometrial Progesterone Receptor Isoforms in Women with Polycystic Ovary Syndrome. *Am. J. Transl. Res.* 2018; 10, 2696–2705.
- Huddleston HG, Casaletto KB, Jaswa EG, Rasgon NL, Maki PP, Cedars MI, Pasch L. Endophenotypic correlates of cognitive function in reproductive-age individuals with polycystic ovary syndrome. *F S Rep.* 2022; 3(4):372-379.
- Igbo EJ, Okoliko U, Aminu I, Kopada A, Olorunnado S, Akinola OB. Structural Changes in the Medial Prefrontal Cortex and Anterior Cingulate Cortex of Dehydroepiandrosterone-Induced Wistar Rat Model of Polycystic Ovarian Syndrome. *Basic Clin Neurosci.* 2022; 13(5):695-708.
- Imani B, Eijkemans MJ, te Velde ER, Habbema JD, Fauser BC: Predictors of patients remaining anovulatory during clomiphene citrate induction of ovulation in normogonadotropic oligoamenorrhic infertility. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998; 83:2361-5.
- Jackson-Bey T, Colina J, Isenberg BC, Coppeta J, Urbanek M, Kim JJ, Woodruff TK, Burdette JE, Russo A, Reply: Exposure of human fallopian tube epithelium to elevated testosterone results in alteration of cilia gene expression and beating. *Hum. Reprod.* 2021; 36, 1725.
- Jackson-Bey T, Colina J, Isenberg BC, Coppeta J, Urbanek M, Kim JJ, Woodruff TK, Burdette JE, Russo A. Reply: Exposure of 719 human fallopian tube epithelium to elevated testosterone results in alteration of cilia gene expression and beating. *Hum Reprod.* 2021; 36(6):1725.
- Jiang N-X, Li X-L. The Disorders of Endometrial Receptivity in PCOS and Its Mechanisms. *Reprod. Sci.* 2022; 29, 2465–2476.
- Johnson NP: Metformin use in women with polycystic ovary syndrome. *Ann Transl Med.* 2014; 2:56
- Kamel AS, El-Sayed SS, El Sayed NS. Sulforaphane's role in Redefining autophagic Responses in depression associated with polycystic ovarian syndrome: Unveiling the SIRT1/AMPK/LKB1 pathway connection. *Eur J Pharmacol.* 2024; 969:176477.
- Karabulut AB, Cakmak M, Kiran RT, Sahin I. Oxidative stress status, metabolic profile and cardiovascular risk factors in patients with polycystic ovary syndrome. *Med-Science.* 2012; 1:27-34.
- Kim TH, Yoo J-Y, Choi K-C, Shin J-H, Leach RE, Fazleabas AT, Young SL, Lessey BA, Yoon H-G, Jeong J-W Loss of HDAC3 Results in Nonreceptive Endometrium and Female Infertility. *Sci. Transl. Med.* 2019; 11, eaaf7533.
- Lakshmi JN, Babu AN, Kiran SM, Nori LP, Hassan N, Ashames A, et al. Herbs as a source for the treatment of polycystic ovarian syndrome: A systematic review. *BioTech.* 2023; 12:4.
- Legro RS, Arslanian SA, Ehrmann DA, Hoeger KM, Murad MH, Pasquali R, Welt CK; Endocrine Society. Diagnosis and treatment of polycystic ovary syndrome: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013; 98(12):4565-92.
- Li S-Y, Song Z, Song M-J, Qin J-W, Zhao M-L, Yang Z-M. Impaired Receptivity and Decidualization in DHEA-Induced PCOS Mice. *Sci. Rep.* 2016; 6, 38134.
- Lin SY, Yang Y-C, Chang CY-Y, Lin C-C, Hsu W-H, Ju S-W, Hsu C-Y, Kao C-H. Risk of Polycystic Ovary Syndrome In Women Exposed to Fine Air Pollutants and Acidic Gases: A Nationwide Cohort Analysis. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2019; 16, 4816.

Liu J, Head E, Kuratsune H, Cotman CW, Ames BN. Comparison of the effects of L-carnitine and acetyl-L-carnitine on carnitine levels, ambulatory activity, and oxidative stress biomarkers in the brain of old rats. *Ann N Y Acad Sci.* 2004; 1033:117-31.

Liu Y, et al. Oxidative stress markers in the follicular fluid of patients with polycystic ovary syndrome correlate with a decrease in embryo quality. *J Assist Reprod Genet.* 2021; 38(2):471–7.

Lowenstein EJ. Diagnosis and management of the dermatologic manifestations of the polycystic ovary syndrome. *Dermatol Ther.* 2006; 19(4):210-23.

Manco M, et al. Insulin dynamics in young women with polycystic ovary syndrome and normal glucose tolerance across categories of body mass index. *PLoS ONE.* 2014; 9(4):e92995.

McCann MR, George De la Rosa MV, Rosania GR, Stringer KA. L-Carnitine and Acylcarnitines: Mitochondrial Biomarkers for Precision Medicine. *Metabolites.* 2021; 11: 51.

Merhi Z. Crosstalk between Advanced Glycation End Products and Vitamin D: A Compelling Paradigm for the Treatment of Ovarian Dysfunction in PCOS. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2019; 479: 20–26.

Minari TP, Tácito LHB, Yugar LBT, Ferreira-Melo SE, Manzano CF, Pires AC, Moreno H, Vilela-Martin JF, Cosenso-Martin LN, Yugar-Toledo JC. Nutritional Strategies for the Management of Type 2 Diabetes Mellitus: A Narrative Review. *Nutrients.* 2023; 15(24):5096.

Mirabolghasemi G, Kamyab Z. Changes of The Uterine Tissue in Rats with Polycystic Ovary Syndrome Induced by Estradiol Valerate. *Int. J. Fertil. Steril.* 2017; 11: 47–55.

Motta AB. Dehydroepiandrosterone to induce murine models for the study of polycystic ovary syndrome. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2010; 119, 105–111.

Murri M, Luque-ramírez M, Insenser M, Ojeda-ojeda M, Escobar- morreale HF. Circulating markers of oxidative stress and polycystic ovary syndrome (PCOS): a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update.* 2013; 19(3):268–88.

Neff AM, Yu J, Taylor RN, Bagchi IC, Bagchi MK. Insulin Signaling Via Progesterone-Regulated Insulin Receptor Substrate 2 is Critical for Human Uterine Decidualization. *Endocrinology.* 2020; 161(1):bqz021.

Orlando AL, Orlando CR. Dilated Intercellular Spaces as a Marker of GERD. *Current Gastroenterology Reports.* 2009; 11:190–194.

Palmerini MG, Macchiarelli G, Cocciolone D, Mascitti IA, Placidi M, Vergara T, Di Emidio G, Tatone C. Modulating Morphological and Redox/Glycative Alterations in the PCOS Uterus: Effects of Carnitines in PCOS Mice. *Biomedicines.* 2023; 11(2):374.

Palomba S. Is fertility reduced in ovulatory women with polycystic ovary syndrome? An opinion paper. *Hum Reprod.* 2021; 36(9):2421-2428.

Papachristoforou E, Lambadiari V, Maratou E, Makrilakis K. Association of Glycemic Indices (Hyperglycemia, Glucose Variability, and Hypoglycemia) with Oxidative Stress and Diabetic Complications. *J. Diabetes Res.* 2020; 7489795.

Pinto J, Cera N, Pignatelli D. Psychological symptoms and brain activity alterations in women with PCOS and their relation to the reduced quality of life: a narrative review. *J Endocrinol Invest.* 2024; 47(7):1-22.

Piperi C, Adamopoulos C, Dalagiorgou G, Diamanti-Kandarakis E, Papavassiliou AG. Crosstalk between advanced glycation and endoplasmic reticulum stress: emerging therapeutic targeting for metabolic Diseases. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012; 97(7):2231– 42.

Placidi M, Di Emidio G, Virmani A, D'Alfonso A, Artini PG, D'Alessandro AM, Tatone C. Carnitines as Mitochondrial Modulators of Oocyte and Embryo Bioenergetics. *Antioxidants*. 2022; 11: 745.

Polak K, Czyzyk A, Simoncini T, and Meczekalski B, "New markers of insulin resistance in polycystic ovary syndrome," *J Endocrinol Investi*. 2017; 40(1):1-8.

Reuter SE, Evans AM. Carnitine and acylcarnitines: Pharmacokinetic, pharmacological and clinical aspects. *Clin. Pharmacokinet*. 2012; 51: 553–572.

Rocha AL, Oliveira FR, Azevedo RC, et al: Recent advances in the understanding and management of polycystic ovary syndrome. *F1000Res* 26;8, 2019. pii: F1000 Faculty Rev-565.

Rosenthal N, Brown S. The mouse ascending: perspectives for human-disease models. *Nat Cell Biol*. 2007; 9(9):993-9.

Ruberte J, Carretero A, Navarro M, Morphological Mouse Phenotyping: Anatomy, Histology and Imaging, Elsevier, Inc. in cooperation with Editorial Medica Panamericana, S.A., 2017.

Rugarli C, *Medicina interna sistematica*. Ottava edizione. Edra, 2021.

Rutkowska AZ, Diamanti-Kandarakis E. Do Advanced Glycation End Products (AGEs) Contribute to the Comorbidities of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS)? *Curr. Pharm. Des*. 2016; 22: 5558–5571.

Salim S. Oxidative Stress and the Central Nervous System. *J Pharmacol Exp Ther*. 2017; 360(1):201-205.

Samimi M, Jamilian M, Ebrahimi FA, Rahimi M, Tajbakhsh B, Asemi Z. Oral carnitine supplementation reduces body weight and insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Clin. Endocrinol*. 2016; 84: 851–857.

Sana Y. SONOGRAPHIC ASSESSMENT OF PRIMARY INFERTILITY IN WOMEN HAVING PCOS: Sonographic Assessment of PCOS Infertility in Women. *Pakistan BioMedical Journal*. 2022; 03-06.

Savaris RF, Groll JM, Young SL, DeMayo FJ, Jeong J-W, Hamilton AE, Giudice LC, Lessey BA Progesterone Resistance in PCOS Endometrium: A Microarray Analysis in Clomiphene Citrate-Treated and Artificial Menstrual Cycles. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 2011; 96: 1737–1746.

Seaver LC, Imlay JA. Are respiratory enzymes the primary sources of intracellular hydrogen peroxide? *J Biol Chem*. 2004; 19;279(47):48742-50.

Shang K, Jia X, Qiao J, Kang J, Guan Y. Endometrial abnormality in women with polycystic ovary syndrome. *Reprod Sci*. 2012; 19(7):674-83.

Sibbersen C, Johannsen M. Dicarbonyl Derived Post-Translational Modifications: Chemistry Bridging Biology and Aging-Related Disease. *Essays Biochem*. 2020; 64: 97–110.

Siddiqui S, Mateen S, Ahmad R, Moin S. A brief insight into the etiology, genetics, and immunology of polycystic ovarian syndrome (PCOS). *J Assist Reprod Genet*. 2022; 39(11):2439-2473.

Smyk W, Papapostoli I, Żorniak M, Sklavounos P, Blukacz Ł, Madej P, Koutsou A, Weber SN, Friesenhahn-Ochs B, Cebula M, Bosowska J, Solomayer EF, Hartleb M, Milkiewicz P, Lammert F, Stokes CS, Krawczyk M. Liver phenotypes in PCOS: Analysis of exogenous and inherited risk factors for liver injury in two European cohorts. *Liver Int*. 2023; 43(5):1080-1088.

Spremović Radenović S, Pupovac M, Andjić M, Bila J, Srećković S, Gudović A, Dragaš B, Radunović N. Prevalence, Risk Factors, and Pathophysiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) in Women with Polycystic Ovary Syndrome (PCOS). *Biomedicines*. 2022; 10(1):131.

- Stadtman ER, Berlett BS. Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Chem Res Toxicol.* 1997; 10(5): 485-94
- Stefanaki K, Ilias I, Paschou SA, Karagiannakis DS. Hepatokines: the missing link in the development of insulin resistance and hyperandrogenism in PCOS? *Hormones (Athens).* 2023; 22(4): 715-724.
- Steiber A, Kerner J, Hoppel CL. Carnitine: a nutritional, biosynthetic, and functional perspective. *Mol Aspects Med.* 2004; 25(5-6):455-73.
- Stein IF, Leventhal ML. Amenorrhea associated with bilateral poly-cystic ovaries. *Am J Obstet Gynecol.* 1935; 29(2):181–191
- Tal R, Tal O, Seifer BJ, Seifer DB. Antimüllerian hormone as predictor of implantation and clinical pregnancy after assisted conception: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril.* 2015; 103(1):119-30.e3.
- Tatone C, Di Emidio G, Placidi M, Rossi G, Ruggieri S, Tacaliti C, D'Alfonso A, Amicarelli F, Guido M. AGEs-Related Dysfunctions in PCOS: Evidence from Animal and Clinical Research. *J. Endocrinol.* 2021, 251, R1–R9.
- Unfer V, Nestler JE, Kamenov ZA, Prapas N, Facchinetti F. Effects of Inositol(s) in Women with PCOS: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials. *Int J Endocrinol.* 2016:1849162.
- Varghese F, Bukhari AB, Malhotra R, De A. IHC Profiler: An Open Source Plugin for the Quantitative Evaluation and Automated Scoring of Immunohistochemistry Images of Human Tissue Samples. *PLoS ONE* 2014, 9, e96801.
- Vidal-Cevallos P, Mijangos-Trejo A, Uribe M, Tapia NC. The Interlink Between Metabolic-Associated Fatty Liver Disease and Polycystic Ovary Syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2023; 52(3):533-545.
- Wang J, Wu D, Guo H, Li M. Hyperandrogenemia and Insulin Resistance: The Chief Culprit of Polycystic Ovary Syndrome. *Life Sci.* 2019; 236: 116940.
- Winau F, Hegasy G, Weiskirchen R, Weber S, Cassan C, Sieling PA, Modlin RL, Liblau RS, Gressner AM, Kaufmann SH. Ito cells are liver-resident antigen-presenting cells for activating T cell responses. *Immunity.* 2007; 26(1):117-29.
- Xia W, Zhang D, Ouyang J, Liang Y, Zhang H, Huang Z, Liang G, Zhu Q, Guan X, Zhang J. Effects of pelvic endometriosis and 742 adenomyosis on ciliary beat frequency and muscular contractions in the human fallopian tube. *Reprod Biol Endocrinol.* 2018; 743 16(1):48.
- Xie, Q, Xiong, X, Xiao, N, He, K, Chen, M, Peng, J, Su, X, Mei, H, Dai, Y, Wei, D, et al. Mesenchymal Stem Cells Alleviate DHEA-Induced Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) by Inhibiting Inflammation in Mice. *Stem Cells Int.* 2019; 9782373.
- Xu J, Jackson CW, Khoury N, Escobar I, Perez-Pinzon MA. Brain SIRT1 Mediates Metabolic Homeostasis and Neuroprotection. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018; 9:702.
- Xue Z, Li J, Feng J, Han H, Zhao J, Zhang J, Han Y, Wu X, Zhang Y. Research Progress on the Mechanism between Polycystic Ovary Syndrome and Abnormal Endometrium. *Front. Physiol.* 2021; 12:788772
- Yarmolinskaya M, Bulgakova O, Abashova E, Borodina V, Tral T. The effectiveness of resveratrol in treatment of PCOS on the basis of experimental model in rats. *Gynecol Endocrinol.* 2021; 37(sup1):54-57.
- Zeber-Lubecka N, Ciebiera M, Hennig EE. Polycystic Ovary Syndrome and Oxidative Stress-From Bench to Bedside. *Int J Mol Sci.* 2023; 24(18):14126.
- Zehravi M, Maqbool M, Ara I. Polycystic ovary syndrome and infertility: an update. *Int J Adolesc Med Health.* 2021; 34(2):1-9.

Zhang J, Bao Y, Zhou X, Zheng L. Polycystic ovary syndrome and mitochondrial dysfunction. *Reprod Biol Endocrinol.* 2019; 737 17(1):67.

Zhao W, Liu K, Zhang Y, Sun Zeringue E, Meng L, Ma H. The efficacy of orally administered L-carnitine in alleviating ovarian dysfunctions has laid the foundation for targeted in vivo use: A study employing self-control and propensity score matching. *Front. Endocrinol. (Lausanne).* 2024; 15:1440182.

Zhao J, Li D, Tang H, Tang L. Association of vascular endothelial growth factor polymorphisms with polycystic ovarian syndrome risk: a meta-analysis. *Reprod Biol Endocrinol.* 2020;18(1):18

Zheng R, Qing P, Han M, Song J, Hu M, Ma H, Li J. The Effect of Acupuncture on Glucose Metabolism and Lipid Profiles in Patients with PCOS: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2021:5555028.

Ringraziamenti