



# UNIVERSITÀ DI PARMA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICO-VETERINARIE

Corso di Laurea magistrale a ciclo unico in Medicina Veterinaria

## **RUOLO DELL'ANGIOGENESI NELLA FUNZIONE RIPRODUTIVA: FOCUS NELLA BOVINA**

**ROLE OF ANGIOGENESIS IN THE REPRODUCTIVE FUNCTION:  
FOCUS IN CATTLE**

Relatore:

Chiar. ma Prof. ssa Giuseppina Basini

Laureanda:

Elena Biondi

**Anno Accademico 2020-2021**



# INDICE

<b>ABSTRACT .....</b>	<b>1</b>
<b>RIASSUNTO .....</b>	<b>2</b>
<b>1. INTRODUZIONE.....</b>	<b>3</b>
1.1 ANGIOGENESI .....	3
1.2 ANGIOGENESI GERMOGLIANTE.....	4
1.2.1 REGOLAZIONE DEL PROCESSO ANGIOGENICO .....	6
1.3 ANGIOGENESI PER INTUSSUSCEZIONE .....	13
<b>2. ANGIOGENESI NELL'APPARATO RIPRODUTTORE FEMMINILE .....</b>	<b>15</b>
2.1 OVAIO .....	15
2.1.1 ANATOMIA E FISIOLOGIA .....	15
2.1.2 ANGIOGENESI OVARICA.....	19
2.1.3 ANGIOGENESI OVARICA NELLA BOVINA.....	26
2.2 UTERO.....	29
2.2.1 ANATOMIA.....	29
2.2.2 ANGIOGENESI ENDOMETRIALE .....	31
2.2.3 ANGIOGENESI ENDOMETRIALE NELLA BOVINA DURANTE IL CICLO ESTRALE .....	36
2.3 PLACENTA .....	38
2.3.1 ANATOMIA E FUNZIONE .....	38
2.3.2 ANGIOGENESI PLACENTARE .....	43
2.3.3 ANGIOGENESI PLACENTARE NELLA BOVINA .....	52
<b>3. CONCLUSIONI.....</b>	<b>55</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>56</b>

# ABSTRACT

Angiogenesis is a process that leads to the development of new blood vessels generated from existing ones. It is mediated by several factors, including VEGF, FGF and angiopoietins, but can also be influenced by other elements, such as immune cells or the presence of oxidative stress.

Within the body it occurs mainly during the development of diseases, including tumours, or during wound healing. An exception is represented by the organs of the female reproductive system, where, in addition to the cyclical changes they undergo, there are also vascular changes.

During folliculogenesis and the development of the corpus luteum, the growth of new vessels is essential for follicular growth and the selection of the dominant follicle that will then ovulate, as well as for the maintenance of the corpus luteum.

In the uterine, the role of angiogenesis is especially important in menstruating species (such as women and primates), where after menstruation angiogenesis is essential for the restoration of uterine wall integrity.

During pregnancy both maternal and fetal blood flow play a key role in ensuring adequate fetal and consequently maternal growth. It is therefore useful that the changes that occur during the various stages of gestation are accompanied by vascular changes to meet fetal needs.

Within this thesis, an in-depth description was carried out on the angiogenic mechanisms that occur in bovine species in which reproductive management is of considerable importance.

# RIASSUNTO

L'angiogenesi è un processo che porta allo sviluppo di nuovi vasi sanguigni generati da vasi già esistenti. È un processo mediato da diversi fattori, tra cui VEGF, FGF e angiopoietine, ma che può essere influenzata anche da altri elementi, come le cellule immunitarie o la presenza di stress ossidativo.

All'interno dell'organismo il processo angiogenico avviene soprattutto durante lo sviluppo di patologie, tra cui tumori, o durante la guarigione delle ferite. Un'eccezione è rappresentata dagli organi dell'apparto riproduttore femminile, dove, accanto ai cambiamenti ciclici a cui sono sottoposti si assiste anche a cambiamenti vascolari.

Durante la follicologenesi e lo sviluppo del corpo luteo la crescita di nuovi vasi l'angiogenesi è fondamentale per la crescita follicolare e la selezione del follicolo dominante che andrà poi incontro ad ovulazione, così come è fondamentale per il mantenimento del corpo luteo.

A livello uterino il ruolo dell'angiogenesi si esplica soprattutto nelle specie con ciclo mestruale (come donna e primati), in cui in seguito alla mestruazione l'angiogenesi risulta fondamentale per la ricostituzione dell'integrità della parete uterina.

Durante la gravidanza i flussi sanguigni sia materni che fetali risultano avere un ruolo fondamentale per garantire un adeguato accrescimento fetale e di conseguenza materno. È utile quindi che ai cambiamenti che avvengono nelle varie fasi della gestazione siano associati anche cambiamenti vascolari che consentano di rispondere alle necessità fetali.

All'interno di questo elaborato è stato effettuato un approfondimento sui meccanismi angiogenici che avvengono nella bovina dove la gestione riproduttiva è di notevole importanza.

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 ANGIOGENESI

I vasi sanguigni sono strutture fondamentali per l'organismo, che raggiungono ogni organo per garantire alle cellule i giusti apporti di nutrienti e ossigeno, favorendo anche la circolazione e distribuzione di fluidi e molecole (Karamysheva 2008).

Nel processo di vascolarizzazione esistono due meccanismi che portano alla formazione di nuovi vasi sanguigni: la vasculogenesi e l'angiogenesi (Zucchelli, Majid e Foldes 2019).

Per vasculogenesi si intende la formazione di vasi sanguigni ex novo. Questo processo avviene durante lo sviluppo embrionale, attraverso la differenziazione di precursori delle cellule endoteliali, gli emangioblasti, in cellule endoteliali (EC) ed angioblasti, la cui aggregazione porta alla formazione del plesso vascolare primario, costituito da sottili capillari. Con la formazione di questo plesso termina la vasculogenesi. Lo sviluppo di ulteriori vasi sanguigni, non solo durante lo sviluppo embrionale, ma anche durante la vita adulta avviene attraverso meccanismi di angiogenesi (Karamysheva 2008) (Zucchelli, Majid e Foldes 2019).

Per angiogenesi infatti si intende la formazione di nuovi vasi ematici a partire da vasi sanguigni già esistenti (Zucchelli, Majid e Foldes 2019). È un processo strettamente regolato, che avviene fisiologicamente in ambienti ischemici, ipossici, privi di nutrienti dove è necessario ripristinare il flusso ematico per poter garantire la funzione di un tessuto (Eelen G 2020), la sua riparazione e il suo rimodellamento, come succede, ad esempio, durante la guarigione di ferite, l'ovulazione o lo sviluppo embrionale (Nowak-Sliwinska P 2018).

Il controllo dell'angiogenesi è mediato da un equilibrio tra fattori inibitori e di crescita. Nel momento in cui questo equilibrio viene a mancare, si ha un'alterazione di questo processo che può manifestarsi in modo eccessivo o insufficiente, contribuendo allo sviluppo di numerose patologie in diversi organi e apparati (About angiogenesis| The Angiogenesis Foundation s.d.). Una eccessiva angiogenesi è stata riconosciuta come fattore comune in patologie come neoplasie, psoriasi, artrite, ma anche in malattie congenite ed ereditarie. D'altro canto una insufficiente crescita vascolare può contribuire a stati patologici quali ischemia cardiaca e cerebrale, stress respiratorio, pre-eclampsia e molti altri disturbi (Carmeliet 2003).

Esistono due tipi di angiogenesi: l'angiogenesi germogliante (sprouting angiogenesis - SA) e l'angiogenesi per intussuscezione (intussusceptive angiogenesis - IA). L'angiogenesi germogliante è il processo, conosciuto da tempo, attraverso cui, tramite alcune fasi, si arriva alla formazione di un nuovo vaso partendo da un vaso già esistente (Figura 1). L'angiogenesi per intussuscezione è invece un processo che porta a sviluppo e rimodellamento di vasi partendo dalla divisione interna di un plesso capillare preesistente (Figura 2) (Djonov V 2000) (Serenelli 2012).

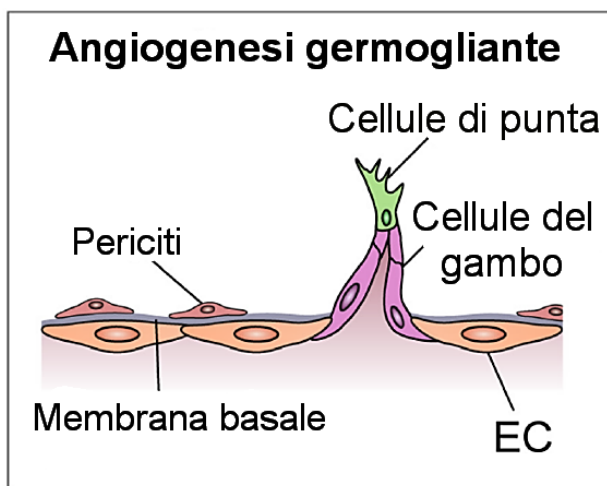


Figura 1 Angiogenesi germogliante (Eelen G 2020)

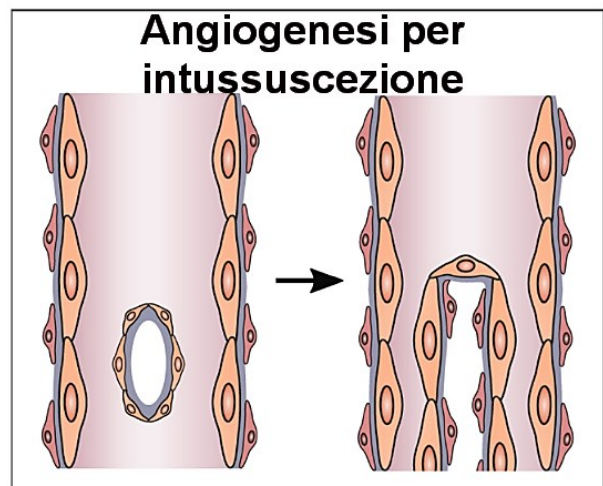


Figura 2 Angiogenesi per intussuscezione (Eelen G 2020)

## 1.2 ANGIOGENESI GERMOGLIANTE

Normalmente negli individui adulti i vasi sanguigni sono quiescenti e raramente formano nuove ramificazioni. Nonostante questo però, le cellule endoteliali (EC) mantengono la capacità di percepire e rispondere a stimoli angiogenici, facendo così iniziare il processo di crescita di nuovi vasi (Potente, Gerhardt e Carmeliet 2011).

L'angiogenesi germogliante avviene attraverso alcune fasi principali:

1. Attivazione delle cellule endoteliali (EC) e degradazione della membrana basale (BM)
2. Germinazione e proliferazione delle cellule endoteliali
3. Formazione del lume vascolare
4. Stabilizzazione dei nuovi vasi con nuova membrana basale e periciti  
(Senger e Davis 2011)

Condizioni di ipossia e carenza di nutrienti a livello del microambiente portano ad un aumento di fattori proangiogenici (di cui il principale è rappresentato dal fattore di crescita endoteliale vascolare - VEGF) che vanno ad agire sulle cellule endoteliali, attivandole (Eelen G 2020). Queste, per poter iniziare la loro migrazione al fine di formare un nuovo vaso, devono essere liberate dalla matrice extracellulare in cui sono comprese: per fare questo, rilasciano metalloproteasi di matrice (MMPs), molecole ad azione proteolitica che degradano la membrana basale e le cellule murali. Queste MMPs sono importanti nella regolazione del processo angiogenico perché, oltre a favorire il rilascio delle EC, durante la degradazione della matrice liberano altri fattori proangiogenici sequestrati in quest'ultima. D'altra parte però hanno anche la capacità di generare molecole antiangiogeniche, necessarie a prevenire una inappropriata angiogenesi. Le EC attivate rilasciano anche angiopoietina-2, fattore che favorisce ulteriormente il distacco delle cellule murali (Potente, Gerhardt e Carmeliet 2011). Con la degradazione della matrice inoltre si ha l'esposizione di alcune sue componenti che aiutano le EC nella loro migrazione e forniscono loro una provvisoria struttura di supporto (Carmeliet 2003).

Le cellule endoteliali, una volta liberate dalla matrice extracellulare, per esplorare l'ambiente circostante e consentire la nascita di un nuovo vaso devono estendersi e muoversi, andando così a creare un primario vaso immaturo. Questo evento richiede una continua riorganizzazione cellulare (Bentley e Chakravartula 2017): la proliferazione e la migrazione nel microambiente avvengono infatti grazie a cambiamenti morfologici e fenotipici delle EC, indotti dai segnali angiogenici, con i quali si vanno a selezionare le cellule di punta (tip cells) e le cellule del gambo (stalk cells) (Hisamichi N 2020). Le cellule di punta sono cellule caratterizzate da numerosi prolungamenti definiti filopodi, attraverso i quali guidano il processo di angiogenesi sondando l'ambiente circostante, attratte dallo stimolo proangiogenico (Potente, Gerhardt e Carmeliet 2011). Le cellule del gambo seguono le cellule di punta e assicurano l'allungamento del nuovo vaso nascente, rappresentandone i futuri elementi costitutivi e mediandone la formazione del lume (Betz, et al. 2016) (Eelen G 2020). L'individuazione delle cellule della punta e del gambo non è fissa, ma è un evento dinamico ed entrambe le tipologie cellulari possono cambiare la propria funzione e attività, al fine di garantire che le EC più adatte guidino la formazione del vaso nascente (Betz, et al. 2016) (Eelen G 2020).



Il vaso immaturo così formato necessita di un lume vascolare per diventare funzionale. La formazione del lume avviene tramite coalescenza di vacuoli intracellulari presenti nelle diverse EC e tramite riorganizzazione delle EC stesse (Potente, Gerhardt e Carmeliet 2011) (Hisamichi N 2020): queste inizialmente manifestano una polarità apicale-basale ma in seguito, la membrana apicale espone glicoproteine cariche negativamente che conferiscono un segnale repulsivo, aprendo il lume vascolare (Potente, Gerhardt e Carmeliet 2011).

Una volta che si è formato il lume, avviene la maturazione della parete vascolare, tramite reclutamento di cellule murali, periciti, matrice extracellulare e cellule muscolari lisce. Inoltre le EC si differenziano in modo tessuto-specifico, per poter soddisfare al meglio le esigenze del tessuto in cui si trovano e l'omeostasi locale (D'Andrea LD 2006) (Potente, Gerhardt e Carmeliet 2011).

Una volta che la vascolarizzazione del tessuto è ripristinata, i livelli di fattori proangiogenici diminuiscono e le cellule endoteliali ristabiliscono il loro fenotipo quiescente (Eelen G 2020).

### **1.2.1 REGOLAZIONE DEL PROCESSO ANGIOGENICO**

L'angiogenesi è un evento complesso, indotto e stimolato da diverse molecole. Il processo è attivato da fattori proangiogenici come VEGF (fattore di crescita endoteliale vascolare), PDGF (fattore di crescita di derivazione piastrinica), bFGF (fattore di crescita dei fibroblasti), angiopoietina 1, e inibito da fattori anti-angiogenici come angiostatina, endostatina, angiopoietina 2. Queste molecole pro e anti-angiogeniche devono essere mantenute in equilibrio per poter mantenere l'omeostasi vascolare (Parmar D 2021).

Le molecole che favoriscono e inducono questo evento sono molto numerose e possono essere distinte in tre categorie principali:

- a. Molecole che agiscono direttamente e in modo specifico sulle cellule endoteliali, quali VEGF e angiopoietine
- b. Molecole che attivano altre cellule bersaglio oltre alle cellule endoteliali (un esempio è rappresentato da FGF)
- c. Molecole ad azione indiretta, che hanno effetto nel processo angiogenico andando a stimolare il rilascio di altri fattori da parte di cellule endoteliali, macrofagi e anche cellule tumorali. Ne è un esempio il TGF (fattore di crescita trasformante) (Liekens, De Clercq e Neyts 2001)

## VEGF

È ormai riconosciuto che VEGF (fattore di crescita endoteliale vascolare) svolga un ruolo centrale nella cascata di eventi che regolano il processo di angiogenesi (Karamysheva 2008).

Questa molecola, espressa e presente in numerosi tessuti, tra cui encefalo, fegato, milza, è rilasciata da diversi tipi di cellule (Liekens, De Clercq e Neyts 2001) ed esplica la sua azione tramite la capacità di indurre vasodilatazione, aumentare la permeabilità vasale e favorire la proliferazione e la migrazione delle cellule endoteliali e il rilascio da parte di queste cellule di MMPs garantendo la degradazione della ECM (Hillen F 2007).

La trascrizione di VEGF è indotta da differenti fattori di crescita e citochine, quali PDGF (fattore di crescita di derivazione piastrinica), TGF $\alpha$  (fattore di crescita trasformante), FGF (fattore di crescita dei fibroblasti), IL-2, EGF (fattore di crescita dell'epidermide), anche se uno dei principali segnali di trascrizione è rappresentato dal grado di ossigenazione tissutale: condizioni di ipossia inducono rapidamente l'espressione di VEGF, mentre situazioni di normossia portano ad un ridotto rilascio di VEGF tramite meccanismi di down regulation (Liekens, De Clercq e Neyts 2001) (Karamysheva 2008).

Esistono diverse isoforme di VEGF: isoforme solubili e isoforme legate alla matrice extracellulare. Le prime mediano l'aumento di dimensione e l'allargamento dei vasi, mentre le seconde ne favoriscono la ramificazione. VEGF rilasciato da cellule tumorali, mieloidi o altre cellule stromali, presenta un'azione paracrina contribuendo alla ramificazione dei vasi e rendendo i vasi tumorali anormali, mentre VEGF rilasciato dalle cellule endoteliali ad azione autocrina partecipa nel mantenimento dell'omeostasi vascolare (Carmeliet P 2011).

Nei mammiferi alla famiglia del VEGF appartengono 6 polipeptidi: VEGF-A (o chiamato semplicemente VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E (che ha derivazione virale) e PLGF (fattore di crescita placentare). Ad oggi è stato individuato anche un altro fattore, VEGF-F, isolato dal veleno del Mocassino acquatico (*Agkistrodon piscivorus*), che però non svolge alcun ruolo nel processo angiogenico (Liekens, De Clercq e Neyts 2001) (Uccelli, et al. 2019).

- VEGF-A: è stata la prima molecola ad essere individuata ed ha un ruolo dominante e principale nella regolazione dell'angiogenesi, controllando la crescita vascolare sia in condizioni fisiologiche che patologiche (Apte, Chen e Ferrara 2019) (Uccelli, et al. 2019). È secreto, in condizioni di ridotta ossigenazione, non solo dalle cellule endoteliali ma

anche da altre tipologie cellulari quali cellule tumorali, macrofagi, cheratinociti, leucociti, astrociti, cellule dell'epitelio bronchiale e alveolare, e da molte altre tipologie cellulari (Melincovici, et al. 2018)

- VEGF-B: è espresso sia durante la fase embrionale, dove contribuisce allo sviluppo del sistema vascolare e del miocardio, sia nella vita adulta, dove promuove la sopravvivenza delle cellule neuronali e possiede effetti metabolici. Dal punto di vista angiogenico ha una ridotta attività, limitata ad alcuni tessuti, tra cui quello cardiaco. (Carmeliet P 2011) (Melincovici, et al. 2018)
- VEGF-C e VEGF-D: presentano proprietà simili. Vengono espressi nella vita embrionale, mentre nella vita adulta si trovano soprattutto a livello cardiaco, polmonare, intestinale, tiroideo, placentare e uterino. Non svolgono un ruolo nell'angiogenesi, ma sono entrambi coinvolti nel processo di linfoangiogenesi, il processo di crescita di nuovi vasi linfatici (Carmeliet P 2011) (Melincovici, et al. 2018)
- VEGF-E: è una molecola prodotta da Parapoxvirus, virus che infetta i piccoli ruminanti, ma che è anche in grado di infettare l'uomo. Favorisce la permeabilità vascolare e ha effetto mitogeno sulle cellule endoteliali (Melincovici, et al. 2018)
- PLGF: il fattore di crescita placentare fa parte della famiglia VEGF ed è stato identificato per la prima volta nel tessuto placentare. È infatti prevalentemente presente nella placenta, dove favorisce crescita, differenziazione e invasione dei trofoblasti e l'impianto della blastocisti, e nell'utero, dove si localizza a livello di epitelio ghiandolare e luminale, cellule stromali materne e cellule stromali predeciduali presenti durante il ciclo ovarico. Oltre a queste localizzazioni si trova a bassi livelli anche nel cuore, nel polmone, nella tiroide, nel fegato, nelle ossa e nel muscolo scheletrico. Presenta 4 isoforme: PLGF-1, PLGF-2, PLGF-3 e PLGF-4. Le isoforme 1 e 3 sono forme diffusibili e agiscono in modo paracrino, mentre le isoforme 2 e 4 sono associate alla membrana cellulare e agiscono in modo autocrino. PLGF agisce aumentando l'attività di VEGF, ed esplica la sua azione principalmente in condizioni patologiche, a seguito di fenomeni ischemici o infiammatori (Chau K 2017) (Melincovici, et al. 2018).

Questi fattori di crescita agiscono legandosi a tre specifici recettori tirosina-chinasici: VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3. VEGFR-1 e VEGFR-2 sono presenti principalmente a livello di endotelio vascolare, mentre VEGFR-3 è presente sulle cellule dell'endotelio dei vasi linfatici. Oltre a questi tre specifici recettori i membri della famiglia delle VEGF hanno la capacità di

legarsi anche ad altre tipologie recettoriali, in particolare alle neuropiline 1 e 2 (NP-1 e NP-2) (Melincovici, et al. 2018).

- VEGFR-1: questo recettore è in grado di legare VEGF-A, VEGF-B e PLGF. È presente sulle cellule endoteliali ma anche su cellule infiammatorie, monociti, cellule muscolari lisce, trofoblasti e altre tipologie cellulari. Svolge la sua azione soprattutto in condizioni patologiche, favorendo l'infiammazione, la chemiotassi, il rilascio di citochine e di fattori di crescita (Melincovici, et al. 2018). Rispetto a VEGFR-2 ha una maggior affinità di legame con VEGF-A, ma l'interazione con questa molecola non è in grado di indurre il processo di angiogenesi in modo efficiente: si ritiene infatti che VEGFR-1 vada piuttosto a modulare sia in senso positivo che negativo il processo angiogenico. Da un lato infatti, quando VEGFR-1 si lega a VEGF-A lo sequestra, modulando la concentrazione di VEGF in grado di legarsi a VEGFR-2, dall'altro, quando si lega a molecole quali PLGF, rende maggiormente disponibile la quota di VEGF-A in grado di legarsi a VEGFR-2, favorendo così l'inizio del processo (Karamysheva 2008) (Uccelli, et al. 2019) (Carmeliet P 2011);
- VEGFR-2: è un recettore che svolge un ruolo chiave nel processo di angiogenesi ed ematopoiesi (Ferrara N 2003). È localizzato nelle cellule endoteliali sia dei vasi sanguigni che linfatici, nelle cellule ematopoietiche, nei megacariociti, nei neuroni, nelle cellule dei dotti pancreatici e nelle cellule tumorali (Melincovici, et al. 2018). Presenta una elevata affinità con VEGF-A e VEGF-E, ed una bassa affinità con VEGF-C e VEGF-D (Melincovici, et al. 2018). L'interazione con VEGF-A ha un ruolo fondamentale nel processo di angiogenesi: il loro legame infatti dà inizio ad una serie di segnali di trasduzione che portano ad aumento della permeabilità vascolare, proliferazione, invasione e sopravvivenza delle EC e formazione del lume vascolare. (Hillen F 2007) (Karamysheva 2008) (Marech , et al. 2016);
- VEGFR-3: l'attività di questo recettore si esplica in particolar modo a livello linfatico. Infatti svolge un ruolo chiave nella genesi dei vasi linfatici, sia durante lo sviluppo embrionale che nella vita adulta, andando a legare i fattori di crescita VEGF-C e VEGF-D (Melincovici, et al. 2018) (Karamysheva 2008);
- Neuropiline: NP-1 e NP-2 sono recettori transmembrana presenti sulle EC a cui è in grado di legarsi VEGF. NP-1 è espresso soprattutto nelle arterie, e la sua cooperazione con VEGFR-2 intensifica il processo di angiogenesi, favorendo infiammazione, aumento

di permeabilità vascolare e la migrazione delle cellule endoteliali. NP-2 è invece presente nelle vene e nei vasi linfatici (Uccelli, et al. 2019).

### FGF

FGF (fattore di crescita dei fibroblasti), è stato uno dei primi fattori di angiogenesi ad essere individuato, ed è implicato in numerose funzioni biologiche. La famiglia delle FGF consta di 23 componenti (FGF-1 e FGF-2 sono i più conosciuti e implicati nei processi di angiogenesi) che si legano a recettori tirosina-chinasici FGFR, di cui se ne conoscono almeno quattro (Hillen F 2007) (Carmeliet P 2011).

FGF è presente in basse concentrazioni in quasi tutti gli organi ed è prodotto da numerose tipologie cellulari, tra cui macrofagi, fibroblasti, cellule endoteliali, cellule gliali e anche cellule tumorali (Liekens, De Clercq e Neyts 2001) (Hillen F 2007). Si è visto inoltre che bassi livelli di FGF sono indispensabili per mantenere l'integrità vascolare, in quanto i recettori FGFR se non più stimolati portano a disintegrazione dei vasi (Carmeliet P 2011).

Il gene che codifica per FGF-2 può portare alla produzione di molecole sia ad alto che a basso peso molecolare, ma entrambe le isoforme hanno tutte proprietà angiogeniche, inducendo proliferazione cellulare e chemiotassi (Liekens, De Clercq e Neyts 2001).

In condizioni fisiologiche e in assenza di stimoli FGF è legato alla matrice extracellulare; durante il processo angiogenico, ad esempio in seguito ad ipossia, questo fattore di crescita viene liberato in seguito alla degradazione della matrice da parte delle MMPs (Omorpos, Gao, et al. 2021). Una volta rilasciato esplica la sua azione permettendo la proliferazione e la migrazione delle cellule endoteliali, la degradazione della matrice e il processo di adesione tra le cellule. È anche in grado di indurre indirettamente l'angiogenesi stimolando altre tipologie cellulari a rilasciare fattori angiogenici (Hillen F 2007) (Carmeliet P 2011).

### PDGF

PDGF (fattore di derivazione piastrinica) sono una famiglia di fattori di crescita che vanno ad agire su diverse tipologie cellulari: fibroblasti, periciti, cellule muscolari lisce, cellule gliali e altre cellule di derivazione mesenchimale (Raica e Cimpean 2010) (Omorpos, Gao, et al. 2021). Appartengono a questa famiglia di fattori di crescita quattro diverse catene polipeptidiche (A-B-C-D) che formano quattro omodimeri e un eterodimero, che possono legare due tipologie

recettoriali, PDGFR- $\alpha$  e PDGFR- $\beta$  (Marech , et al. 2016). PDGF ha un ruolo nella guarigione delle ferite, ma è espresso anche in tessuti ad elevata replicazione come placenta, ovaie, tessuti embrionali e tumori (Raica e Cimpean 2010).

Nel processo angiogenico questo fattore di crescita agisce in sinergia con altri fattori promuovendo il reclutamento di cellule perivascolari e contribuendo alla stabilizzazione dei nuovi vasi: viene espresso sulle cellule di punta e nell'endotelio, creando un gradiente di concentrazione con conseguente richiamo, proliferazione e incorporazione dei periciti nella parete cellulare. (Andrae, Gallini e Betsholtz 2008) (Karamysheva 2008) (Raica e Cimpean 2010).

### ANGIOPOIETINE

La famiglia delle angiopoietine comprende 4 ligandi ANG-1, ANG-2, ANG-3 (presente nel topo) e ANG-4 e due recettori ad attività tirosina-chinasica, Tie-1 e Tie-2 (Marech , et al. 2016) (Parmar D 2021). Queste molecole, in particolar modo ANG-1 e ANG-2, hanno un ruolo nel processo angiogenico, andando ad agire in modo opposto: ANG-1 è un agonista del recettore Tie-2, mentre ANG-2 è un antagonista competitivo (Marech , et al. 2016).

ANG-1 è espressa nelle cellule mesenchimali, tra cui periciti e cellule muscolari lisce, che vanno a formare la parete dei vasi. Nel processo angiogenico ANG-1 viene rilasciato dai periciti e agisce favorendo l'interazione delle EC con i periciti stessi, la deposizione della membrana basale, la riorganizzazione del citoscheletro, contribuendo così alla stabilizzazione del vaso (Karamysheva 2008) (Marech , et al. 2016).

ANG-2 invece, in condizioni di ipossia, infiammazione, iperglicemia viene rilasciato dalle cellule di punta e legandosi al recettore Tie-2, antagonizza il legame e gli effetti di ANG-1, inducendo così il distacco dei periciti, aumentando la permeabilità vascolare e favorendo la migrazione delle EC (Carmeliet P 2011) (Akwii, et al. 2019). Studi hanno dimostrato però che il suo ruolo nell'angiogenesi dipende anche dalla presenza di VEGF: in presenza di questo fattore di crescita ANG-2 stimola il processo angiogenico, mentre in sua assenza induce solo regressione vascolare (Karamysheva 2008).

## HIF

Come detto in precedenza, l'ipossia è una delle condizioni che maggiormente inducono il processo di angiogenesi. Per poter rispondere alla carenza di ossigeno i tessuti attivano numerosi geni al fine di indurre il processo di angiogenesi e garantire il metabolismo e la sopravvivenza cellulare. HIF (fattore inducibile da ipossia) è uno dei principali responsabili della risposta all'ipossia e della regolazione dell'omeostasi dell'O<sub>2</sub>. In condizioni di normossia questo fattore viene degradato da proteine O<sub>2</sub> dipendenti, mentre in carenza di ossigeno induce la trascrizione di geni bersaglio legandosi ad elementi di risposta all'ipossia (HRE) presenti nei promotori. Per HIF i geni bersaglio sono rappresentati da quei geni che, una volta attivati, permettono alla cellula di rispondere alla condizione di ipossia: trasportatori del glucosio, enzimi e fattori di crescita angiogenici ed ematopoietici. Per quanto riguarda l'angiogenesi HIF favorisce il processo inducendo la trascrizione di fattori angiogenici (VEGF, PLGF, ANG-1, ANG-2 e altri ancora) e regolando l'attività di citochine e recettori. Si suppone che quando i livelli di ossigeno siano ristabiliti HIF venga nuovamente degradato, inibendo la trascrizione di fattori proangiogenici e bloccando così il processo (Zimna e Maciej 2015) (De Heer EC 2020).

## Fattori inibitori dell'angiogenesi

Accanto a questi fattori pro-angiogenici, ne esistono altri che regolano negativamente il processo di angiogenesi (Hillen F 2007).

- Trombospondina-1 (TPS-1): questa molecola appartiene ad una classe di proteine multidominio che interagiscono con numerose altre molecole (Lawler e Lawler 2012). Viene espressa in particolare nei fibroblasti stromali, nelle cellule endoteliali e nelle cellule tumorali ed è coinvolta nei processi di aggregazione piastrinica, infiammazione e regolazione dell'angiogenesi. In quest'ultimo caso la concentrazione di TPS-1 aumenta in risposta a fattori di crescita ed ipossia (Grant MA 2005): il suo rilascio porta inibizione della migrazione delle EC, ridotta biodisponibilità di VEGF e induzione dell'apoptosi cellulare (Lawler e Lawler 2012);
- Endostatina: è un frammento carbossi-terminale del collagene XVIII (Liekens, De Clercq e Neyts 2001). Viene considerato inibitore endogeno dell'angiogenesi in quanto sopprime l'espressione dei fattori di crescita, in particolare modo VEGF, interferisce con

la trasduzione di segnali indotti da FGF, inibisce la migrazione cellulare e induce apoptosi (Grant MA 2005);

- Angiostatina: questa molecola deriva dalla proteolisi del plasminogeno, è abbondante nel plasma dei soggetti sani dove viene generata principalmente dalle piastrine, ma anche dai macrofagi. Nel processo di angiogenesi agisce come inibitore endogeno riducendo la proliferazione e la migrazione delle EC e inducendo l'arresto del ciclo cellulare (Radziwon-Balicka, et al. 2013).

### **1.3 ANGIOGENESI PER INTUSSUSCEZIONE**

Al contrario dell'angiogenesi germogliante, che è studiata e conosciuta da tempo, l'angiogenesi per intussuscezione (IA) è un processo individuato più recentemente, e descritto per la prima volta nel rimodellamento postnatale dei capillari polmonari. È un processo poco studiato, anche se sembra svolgere un ruolo importante nella crescita di letti vascolari (Hillen F 2007) (De Spiegelaere W 2012).

In questa tipologia di angiogenesi la nascita di nuovi vasi sanguigni avviene per divisione di un vaso preesistente, grazie alla formazione di un pilastro transluminale (Hillen F 2007). Durante questo processo si ha una prima fase in cui le pareti endoteliali dei lati opposti di un vaso migrano l'una verso l'altra entrando in contatto e formando un pilastro transluminale a livello del quale avviene poi una riorganizzazione delle giunzioni interendoteliali che porta alla perforazione centrale del pilastro stesso. A questo punto le cellule mesenchimali, i periciti e i miofibroblasti depositano matrice extracellulare e ricoprono la parete dei pilastri appena formati. I due pilastri crescono di diametro e le cellule endoteliali si ritraggono, formando così due nuovi vasi separati (Hillen F 2007) (De Spiegelaere W 2012). A seconda degli stimoli, il pilastro in estensione può svilupparsi con l'obiettivo di modificare l'angolo di ramificazione di un vaso, duplicare un vaso o portare all'interruzione (potatura) di un vaso ridondante o energeticamente inefficiente (Mentzer e Konerding 2014).

Questo tipo di crescita vascolare è un processo che avviene molto rapidamente, anche nell'arco di poche ore o minuti (Hillen F 2007), e richiede un ridotto fabbisogno metabolico, in quanto, a differenza dell'angiogenesi germogliante, la proliferazione e la migrazione delle cellule endoteliali sono ridotte al minimo e le proteine della matrice extracellulare permettono una rapida rigenerazione dei vasi (De Spiegelaere W 2012) (Saravanan, et al. 2020)



L'angiogenesi per intussuscezione si ritiene possa essere indotta da diversi stimoli, anche se il reale meccanismo non è ancora chiaro. Tra i principali fattori si hanno alterazioni emodinamiche e cambiamenti dello shear stress (stress da taglio) (Hillen F 2007), ma accanto a questi si hanno anche possibili stimoli molecolari quali VEGF, angiopoietine, PDGFB e FGF2 (Hillen F 2007) (De Spiegelaere W 2012).

I precisi meccanismi molecolari che avvengono durante l'angiogenesi per intussuscezione sono ancora poco noti in quanto questo processo avviene all'interno di un vaso sanguigno ed è quindi difficile da visualizzare e si hanno, inoltre, pochi modelli sperimentali a disposizione (Saravanan, et al. 2020).

## 2. ANGIOGENESI NELL'APPARATO RIPRODUTTORE FEMMINILE

Negli organismi adulti la crescita vascolare è un evento limitato a processi infiammatori, patologie, in particolar modo alterazioni neoplastiche, e guarigione delle ferite, in quanto normalmente la maggior parte degli organi non necessita della formazione di nuovi vasi sanguigni (Jabbour 2009). Un'eccezione è rappresentata dall'apparato riproduttivo femminile: ovaio, utero e placenta infatti subiscono continui e ciclici cambiamenti, crescendo in modo rapido e regolare, tramite processi autolimitanti e ordinati (Reynolds, Grazul-Bilska e Redmer 2002).

Gli organi dell'apparato riproduttivo sono tra i più vascolarizzati e rispetto ad altri distretti, per unità di tessuto, ricevono tra i maggiori tassi di flusso ematico (Reynolds, Grazul-Bilska e Redmer 2002). La vascolarizzazione e la crescita dei vasi sanguigni sono infatti indispensabili per il corretto funzionamento di questi organi (Jabbour 2009). Ciò fa comprendere come anche il processo di angiogenesi sia strettamente correlato alle funzioni di questo apparato: contribuisce infatti ai numerosi processi che avvengono nell'ovaio e nell'endometrio tra cui follicologenesi, decidualizzazione, impianto e sviluppo dell'embrione (Rizov, Andreeva e Dimova 2017).

### 2.1 OVAIO

#### 2.1.1 ANATOMIA E FISIOLOGIA

##### Anatomia

L'ovaio, che rappresenta la gonade femminile, è un organo pari dotato di attività endocrina e gametogenica. È collocato in cavità addominale a livello della regione lombare. Presenta una componente connettivale, lo stroma, e un rivestimento esterno, l'epitelio superficiale, costituito da un unico strato di cellule cubiche. Lo stroma è formato due strati distinti: la zona midollare (o zona vascolare) ricca di vasi, e la zona corticale (o zona parenchimatosa) nella quale sono presenti le strutture follicolari. La zona vascolare è caratterizzata dalla presenza di vasi sanguigni, derivati delle arterie e dalle vene ovariche, vasi linfatici, fasci di fibre muscolari lisce e nervi, immersi nel tessuto connettivale. La zona corticale presenta uno stroma denso, caratterizzato dalla presenza di fibre reticolari, cellule fusiformi e cellule muscolari lisce, nel quale sono immersi i follicoli ovarici nei vasi stadi di maturazione e i corpi lutei. Sono presenti

anche numerosi vasi sanguigni, esili, di tipo capillare o precapillare, disposti soprattutto intorno ai follicoli (Barone 2003).

I follicoli ovarici sono strutture formate da un oocita circondato da cellule superficiali specializzate. In base alle caratteristiche morfologiche e alla loro attività i diversi follicoli presenti in un ovaio vengono distinti in

- Follicoli primordiali: equivalgono alla forma più immatura del follicolo e costituiti solamente dall'oocita e da un singolo strato di cellule appiattite. Sono molto numerosi nella fase neonatale ma durante lo sviluppo molti vanno incontro a degenerazione e scompaiono (Barone 2003) (Sjaastad, Sand e Hove 2013);
- Follicoli primari: sono caratterizzati da un unico strato di cellule follicolari, prima cubiche poi prismatiche, che circondano l'oocita. A separare oocita e cellule follicolari è presente la zona pellucida, una struttura formata da proteoglicani e glicoproteine, che viene secreta dall'oocita stesso (Barone 2003);
- Follicoli secondari: questi follicoli presentano un considerevole aumento delle dimensioni principalmente a seguito delle successive divisioni cellulari. In questa fase le cellule si dispongono attorno all'oocita formando più strati andando a costituire uno strato definito granulosa. Anche l'oocita aumenta le sue dimensioni e la zona pellucida risulta essere più ispessita (Barone 2003) (Bortolami, Callegari e Beghelli 2006);
- Follicoli terziari: le cellule follicolari si dissociano e vanno a creare uno spazio, definito antra, nel quale si accumula liquido follicolare, secreto dalle cellule stesse. Contemporaneamente attorno all'oocita si crea un ammasso di cellule della granulosa, che formano così il cumolo ooforo. Anche all'esterno della granulosa si verificano delle modificazioni con formazione di due strati connettivali vascolarizzati, la teca interna e la teca esterna. Lo strato tecale è separato dalla granulosa dalla membrana basale, che impedisce ai vasi nella teca di raggiungere le cellule della granulosa (Bortolami, Callegari e Beghelli 2006);
- Follicolo maturo: è un follicolo che ha raggiunto le massime dimensioni ed è pronto all'ovulazione, momento in cui si ha la rottura del follicolo stesso e il rilascio dell'oocita (Bortolami, Callegari e Beghelli 2006).

Un'altra struttura importante presente a livello ovarico è il corpo luteo (CL), ghiandola endocrina derivante dalla parete del follicolo collassato. Dopo l'ovulazione le pareti del follicolo formano delle pieghe e la cavità si riempie di essudato. In una prima fase di sviluppo si assiste ad una importante neoformazione di capillari e il CL viene definito corpo emorragico. Successivamente la parete si ispessisce rapidamente e si sviluppa verso il centro, formando una organizzazione di cellule ghiandolari. Il corpo luteo non è una struttura permanente ma va incontro a regressione: si riduce di volume e si ritira verso la superficie ovarica, diventando corpo albicante (Barone 2003).

La vascolarizzazione dell'ovaio è garantita dall'arteria ovarica, che origina dall'aorta addominale. Questo vaso in prossimità dell'ilo dell'ovaio si suddivide in numerosi rami che si distribuiscono prima alla zona vascolare, diventando più sottili e numerosi a livello della zona parenchimatosa e raggiungendo tutte le strutture ovariche.

Il ritorno venoso è sostenuto dalla vena ovarica, formata dall'anastomosi delle vene che drenano il sangue dalla zona parenchimatosa a quella vascolare. Durante il suo decorso la vena ovarica riceve il sangue proveniente dalle vene tubariche e da un ramo uterino. La vena di destra sbocca nella vena cava caudale a livello del rene, mentre la vena di sinistra può terminare sia nella vena cava che nella vena renale omolaterale. (Barone 2003) (Bortolami, Callegari e Beghelli 2006).

### *Fisiologia del ciclo ovarico*

Il ciclo ovarico è un evento fisiologico periodico, sottoposto ad un controllo ormonale, che porta alla liberazione di una cellula uovo. Viene suddiviso in due fasi: la fase follicolare e la fase luteale.

Durante la fase follicolare, si assiste alla crescita e maturazione dei follicoli, che da follicoli primordiali diventano follicoli dominanti. Il reclutamento follicolare avviene in seguito al rilascio da parte dell'ipotalamo di GnRH (fattore di rilascio delle gonadotropine), che esplica la sua azione sull'ipofisi, inducendo la liberazione da parte di questa ghiandola di FSH (ormone follicolo-stimolante) e LH (ormone luteinizzante) (Pelagalli, Castaldo, et al. 2014).

L'FSH si lega ai recettori presenti sulle cellule della granulosa, andando a stimolandone l'accrescimento. LH invece agisce sulle cellule della teca, inducendo la produzione di androgeni che vengono poi convertiti in estrogeni dalle cellule della granulosa (Sjaastad, Sand e Hove 2013) (Pelagalli, Castaldo, et al. 2014). I follicoli in accrescimento iniziano a produrre inibina,

una proteina che agisce con meccanismo di feedback negativo a livello ipofisario andando ad inibire la secrezione di FSH. Il continuo aumento di estrogeni ed inibina determina un calo importante della secrezione di FSH: questo innesca l'atresia follicolare ed evita che vengano reclutati ulteriori follicoli (Sjaastad, Sand e Hove 2013). Contemporaneamente si verifica un aumento di LH, che si traduce in crescenti livelli di estrogeni in circolo che aumentano rapidamente soprattutto al termine della fase follicolare. Questo rapido incremento comporta un feedback positivo a livello ipotalamico determinando il picco preovulatorio di LH. In questo momento si ha anche stimolazione nella liberazione di FSH, i cui livelli ematici rimangono però bassi a causa della presenza di inibina in circolo. Il picco di LH determina una serie di modifiche a livello ovarico che terminano con l'ovulazione e la liberazione dell'ovocita (Pelagalli, Castaldo, et al. 2014) (Sjaastad, Sand e Hove 2013).

In seguito all'ovulazione inizia la fase luteinica, caratterizzata da una riorganizzazione delle cellule follicolari con formazione del corpo luteo (CL), che sotto lo stimolo di LH produce progesterone. Il corpo luteo aumenta le sue dimensioni fino alla metà della fase luteinica: a questo punto se si è instaurata una gravidanza il corpo luteo permane e continua a produrre progesterone; se la gravidanza non si è instaurata il CL degenera in un processo definito luteolisi, con conseguente diminuzione del progesterone in circolo. Questo calo si traduce in un feedback positivo a livello ipotalamico con aumento della secrezione di GnRH e inizio di un nuovo ciclo ovarico (Figura 3) (Sjaastad, Sand e Hove 2013) (Pelagalli, Castaldo, et al. 2014).

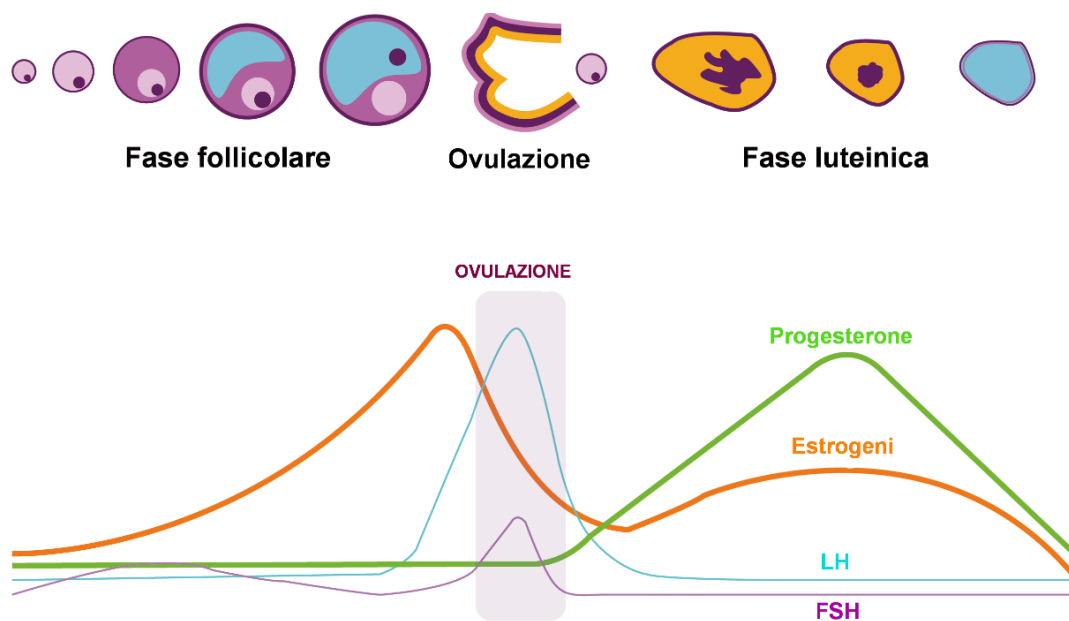


Figura 3 Regolazione ormonale del ciclo ovarico (Alma Res s.d.)

## 2.1.2 ANGIOGENESI OVARICA

Nell'ovaio, i cambiamenti che avvengono sia a livello follicolare che luteale sono accompagnati da importanti variazioni del letto vascolare (Plendl 2000), necessarie per garantire un adeguato e corretto apporto di metaboliti, ossigeno e ormoni durante tutte le fasi di follicologenesi, ovulazione, luteogenesi e luteolisi (Devesa J 2019).

I follicoli preantrali, ovvero i follicoli primordiali e primari, sono avascolari e non presentano un proprio supporto sanguigno ma ricevono nutrienti e ossigeno tramite diffusione passiva dai vasi sanguigni localizzati nello stroma circostante (Robinson, Woad, et al. 2009) (Martelli, et al. 2017). Alcuni studi hanno però dimostrato che una piccola rete di vasi sanguigni, costituita da singole anse capillari, sembra essere presente attorno a ciascuno di questi follicoli preantrali suggerendo che la crescita di un letto vascolare per ciascun follicolo sia necessaria allo sviluppo follicolare stesso (Herrmann G 1998) (Martelli, et al. 2017). Infatti un idoneo apporto vascolare è fondamentale per la selezione e la maturazione del follicolo dominante, mentre i follicoli con insufficiente vascolarizzazione non sono in grado di crescere adeguatamente, rischiando di diventare atresici (Devesa J 2019).

Non sono ancora compresi i meccanismi con cui i follicoli primari reclutino il plesso capillare. È probabile che un ruolo fondamentale sia svolto da VEGF, di cui è stata dimostrata la presenza in ovociti di follicoli primordiali e primari nell'uomo e nel ratto, anche se non è ancora stato chiarito cosa stimoli la sua espressione. Altre molecole che si ipotizza possano intervenire in questa prima fase di reclutamento vascolare sono PDGF e FGF2, presenti entrambi sia nei follicoli primordiali che primari (Robinson, Woad, et al. 2009) (Bruno JB 2009).

L'angiogenesi follicolare inizia quindi nella fase di passaggio da follicolo primario a follicolo secondario, nel momento in cui si ha lo sviluppo dello strato della teca (Fraser HM 2000). A livello tecale, infatti, vanno a formarsi due plessi capillari concentrici: le arteriole e le venule si ramificano andando a creare una rete di vasi di piccole dimensioni nello strato tecale interno, che poggia sulla membrana basale, e una rete nello strato tecale esterno caratterizzata da vasi di calibro maggiore. (Douglas NC 2005) (Martelli, et al. 2017). Questi capillari però non attraversano la membrana basale e non raggiungono le cellule della granulosa che rimangono avascolari e ricevono nutrienti e ormoni tramite diffusione dai vasi presenti nello strato della teca (Douglas NC 2005).

Durante la crescita follicolare si assiste ad un aumento dell'angiogenesi, che raggiunge livelli massimi nella tarda fase preantrale e all'inizio della fase antrale (Fraser 2006). In particolare si nota non solo un aumento della vascolarizzazione, ma anche un aumento della densità vascolare, della tortuosità e del calibro dei vasi (Plendl 2000).

Anche se il processo di angiogenesi si manifesta nello strato tecale, le cellule della granulosa esplicano un ruolo importante per l'accrescimento vascolare, in quanto producono fattori angiogenici che vanno a stimolare i vasi presenti nella teca (Tamanini e De Ambrogi 2004). Tra le principali molecole angiogeniche che intervengono in questa fase di crescita vascolare si ha la presenza di VEGF, espresso non solo nelle cellule della granulosa dei follicoli preantrali, ma anche nelle cellule della teca nei follicoli antrali. In questa fase di maturazione VEGF contribuisce allo sviluppo follicolare e alla funzione steroidogenica. Infatti, oltre ad indurre la crescita vascolare, questo fattore contribuisce ad aumentare la permeabilità dei capillari e questo da un lato porta ad un aumento del fluido antrale dei follicoli in crescita (fluido che deriva in parte dal plasma), e dall'altro l'aumentata permeabilità vasale contribuisce ad una maggiore distribuzione di precursori necessari alla sintesi degli ormoni. Infatti è stato dimostrato che i follicoli con una maggior concentrazione di VEGF presentano anche maggiori livelli di estrogeni (Lam e Haines 2005) (Rizov, Andreeva e Dimova 2017). Accanto a VEGF, in questa fase intervengono anche FGF-2, il quale presenta un'azione antiapoptotica sulle cellule della granulosa e IGF-2 (fattore di crescita insulino-simile) che presenta effetti indiretti sul meccanismo angiogenico, andando a stimolare la produzione di VEGF nelle cellule tecali e ANG-1, la cui espressione aumenta nei follicoli antrali (Bruno JB 2009) (Rizov, Andreeva e Dimova 2017).

La crescita dei follicoli antrali gonadotropine-dipendenti, è caratterizzata dall'aumento del liquido follicolare a livello antrale, dalla divisione delle cellule della granulosa e della teca e dall'espansione del plesso capillare (Douglas NC 2005). Questa espansione del letto vascolare, in particolar modo nella teca interna, corrisponde ad un periodo di rapida crescita e differenziazione follicolare (Geva E 2000) e risulterebbe fondamentale per la selezione del follicolo dominante e lo sviluppo preovulatorio (Robinson, Woad, et al. 2009). La vascolarizzazione sembra infatti essere un discriminante per la dominanza follicolare: studi hanno dimostrato che i follicoli dominanti hanno un grado di vascolarizzazione maggiore

rispetto ai follicoli non dominanti e questo comporta anche una maggior disponibilità e assorbimento di gonadotropine, fondamentali per la crescita dei follicoli (Plendl 2000).

La maggior parte dei follicoli antrali, che non hanno raggiunto lo stadio di follicoli dominanti, vanno incontro ad atresia attraverso meccanismi di apoptosi (Douglas NC 2005). Durante questo processo atresico uno dei primi eventi a cui si assiste è una ridotta proliferazione delle cellule endoteliali dei capillari, che si traduce nella riduzione e degenerazione del letto vascolare e nell'interruzione dell'apporto di metaboliti (Plendl 2000) (Tamanini e De Ambrogi 2004).

Al momento dell'ovulazione si assiste alla degradazione della membrana basale del follicolo dominante, che separa le cellule della granulosa dalle cellule della teca, con conseguente rottura della parete del follicolo e collassamento dello stesso. Questi eventi portano ad invasione dei vasi tecali nello strato della granulosa e sanguinamento dei capillari nella teca interna con migrazione del tessuto connettivo e delle cellule endoteliali verso la granulosa, favorendo così il processo di formazione del corpo luteo (CL) (Plendl 2000) (Geva E 2000) (Figura 4).

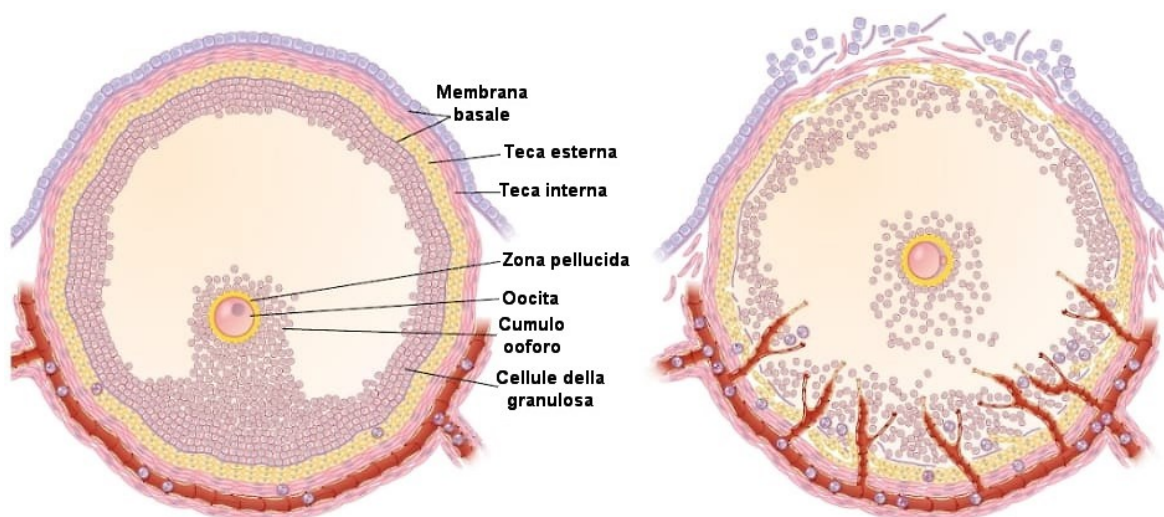


Figura 4 Rottura della membrana basale e invasione dei vasi tecali nello strato della granulosa (Duffy DM 2019)

Il meccanismo di luteinizzazione è caratterizzato da una marcata proliferazione cellulare, con tassi di accrescimento intorno al 40%. È importante notare come questo incremento riguarda non solo la componente cellulare steroidogena, ma interessa principalmente la componente endoteliale: dalla migrazione delle CE dei vasi presenti nella teca deriva quindi una importante rete vascolare all'interno del CL che garantisce la presenza di almeno un capillare per ogni



cellula luteale. Questo risulta fondamentale per la sopravvivenza e la funzione ormonale del CL, in quanto la presenza di numerosi vasi favorisce un adeguato apporto di molecole necessarie alla steroidogenesi e contribuisce ad una più rapida ed efficiente distribuzione in circolo del progesterone (Woad e Robinson 2016) (Tropea, et al. s.d.).

Risultano fondamentali, nell'ottica di mantenimento e funzionalità del corpo luteo, tutti quei fattori che mantengono e regolano l'angiogenesi. Anche in questo caso un ruolo essenziale è svolto da VEGF, la cui presenza è elevata soprattutto nella fase luteale precoce e media e nelle fasi iniziali della gravidanza. Se il concepimento non è avvenuto si assiste ad una riduzione nell'espressione di questo fattore nella tarda fase luteale. VEGF viene prodotto dalle cellule steroidogeniche luteali e questo suggerisce che questo fattore possa avere un'azione autocrina di modulazione della steroidogenesi. (Tropea, et al. s.d.). L'importanza di VEGF nella funzione steroidogenica del corpo luteo è suggerita da studi che dimostrano come la neutralizzazione di questo fattore causi marcata riduzione della vascolarizzazione e della produzione di progesterone (Woad e Robinson 2016).

Altre molecole che intervengono nel mantenimento vascolare del corpo luteo sono le angiopoietine. Si è visto che nel passaggio da follicolo a corpo luteo è espressa maggiormente ANG-2, che agisce in sinergia con VEGF nella formazione dei nuovi capillari, mentre ANG-1 interviene nella stabilizzazione di questi ultimi. Nella fase luteale tardiva invece, quando il CL va incontro a regressione, ANG-2 contribuisce alla degenerazione vascolare, inibendo la stabilità data da ANG-1. Accanto a questi fattori angiogenici tradizionali l'angiogenesi luteale è favorita e sostenuta anche da EG-VEGF, un fattore di crescita specifico prodotto da cellule endoteliali delle ghiandole endocrine. A livello di corpo luteo è poco presente nelle fasi iniziali della luteinizzazione, mentre è altamente espresso nelle fasi luteali medie e tardive dove agisce aumentando la permeabilità vascolare, e questo si ipotizza possa aumentare e sostenere la funzione steroidogenica. (Tropea, et al. s.d.).

Il corpo luteo può permanere nel caso in cui si sviluppi gravidanza, o andare incontro a regressione. Durante la luteolisi si assiste ad una diminuzione del peso luteale e ad una massiccia regressione vascolare. In particolar modo regrediscono i capillari più piccoli, mentre i vasi di calibro maggiore sono mantenuti, probabilmente per favorire il riassorbimento del tessuto luteale. Quello che avviene durante la luteolisi a livello vascolare è soprattutto una

degenerazione delle cellule endoteliali, che disgregandosi vanno a creare un'ostruzione a livello luminale, portando alla disintegrazione del vaso (Plendl 2000).

### *Immunità e angiogenesi ovarica*

Ovulazione e sviluppo del corpo luteo sono spesso associati a processi infiammatori. (Robinson 2013) (Lu, et al. 2019). Infatti durante gli eventi che promuovono e seguono l'ovulazione si verifica vasodilatazione, aumento di permeabilità, cambiamenti del letto vascolare e richiamo e infiltrazione di leucociti. (Duffy DM 2019).

Prima del picco di LH a livello ovarico è presente un pool limitato di leucociti. Subito dopo l'ovulazione e nelle ore successive invece si assiste ad un importante afflusso di cellule immunitarie provenienti dal torrente circolatorio (Duffy DM 2019). Si ipotizza che anche queste cellule possano concorrere alla formazione del CL e al processo angiogenico che avviene in questa sede (Lu, et al. 2019).

Tra le principali cellule immunitarie che sono presenti a livello ovarico si hanno i macrofagi. Questi rappresentano la popolazione immunitaria maggiormente presente nell'ovaio e sono importanti nel mantenimento dell'integrità vascolare dei vasi ovarici e nella vascolarizzazione del CL (Robinson 2013) (Lu, et al. 2019). I macrofagi sono tra i principali produttori di metalloproteasi di matrice, molecole che risultano fondamentali per la degradazione della matrice extracellulare, contribuendo alla migrazione delle cellule endoteliali. Oltre a questo sono in grado di rilasciare TNF $\alpha$  (fattore di necrosi tumorale), fattore infiammatorio in grado di favorire la produzione di VEGF e dei rispettivi recettori (Lu, et al. 2019).

Accanto ai macrofagi, durante il reclutamento cellulare a livello ovarico, si ha il richiamo di granulociti neutrofili, rilevati principalmente a livello del corpo luteo (Lu, et al. 2019), i quali concorrono all'angiogenesi grazie alla loro capacità di produrre numerosi fattori che contribuiscono a questo processo: in particolar modo rilasciano VEGF, TNF $\alpha$ , metalloproteasi e IL-8 (Ribatti e Crivellato 2009).

Anche gli eosinofili sono stati rilevati a livello ovarico, soprattutto nelle fasi iniziali della luteogenesi, ma diminuiscono rapidamente durante lo sviluppo e la regressione del CL. Non è ancora chiaro il loro ruolo nel processo angiogenico, ma sembra che possano regolare l'espressione di VEGF attraverso la produzione di HIF-1 $\alpha$  (Lu, et al. 2019).

### Stress ossidativo e angiogenesi ovarica

I radicali liberi dell'ossigeno (ROS) sono specie instabili e altamente reattive, prodotte dal metabolismo cellulare, che diventano stabili acquisendo elettroni da altre molecole, quali proteine, acidi nucleici, lipidi, carboidrati, innescando così reazioni che provocano danni cellulari con il rischio di contribuire allo sviluppo di malattie (Freitas C 2017) (Lu, et al. 2018). I principali radicali liberi conosciuti sono l'anione superossido ( $O_2^-$ ), il perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ) e l'anione idrossile ( $OH^-$ ) (Agarwal, Gupta e Sharma 2005).

È stata dimostrata la presenza di ROS in diversi tratti dell'apparato riproduttivo, dove possono agire favorendo i processi fisiologici, ma giocando anche un importante ruolo nello sviluppo di patologie (Agarwal, Gupta e Sharma 2005). A livello ovarico, i ROS sembrano essere coinvolti nella follicologenesi, steroidogenesi, mantenimento del CL, luteolisi, e maturazione dell'ocita. Oltre a modulare questi meccanismi, i ROS sono anche coinvolti nei processi angiogenici che avvengono a livello ovarico, contribuendo alla crescita follicolare (Lu, et al. 2018). È stato infatti dimostrato che i ROS stimolano l'espressione di VEGF in cellule endoteliali, muscolari lisce e macrofagi. D'altra parte VEGF favorisce un aumento intracellulare di ROS, contribuendo alla migrazione delle cellule endoteliali e alla loro proliferazione (Kim e Byzova 2014).

Dato il loro potenziale e importante coinvolgimento in numerose malattie, le cellule hanno sviluppato sistemi antiossidanti per limitare la produzione e l'azione dei ROS. Gli antiossidanti vengono distinti in antiossidanti enzimatici, rappresentati da enzimi quali superossido dismutasi, glutazione perossidasi e glutazione riduttasi, che bloccano e neutralizzano i ROS limitando la loro possibilità di danneggiare le cellule, e antiossidanti non enzimatici, di cui fanno parte molecole quali vitamine C ed E, zinco, selenio, taurina, carotene, che vengono assunti con la dieta. A livello ovarico è presente un delicato equilibrio tra ROS e antiossidanti: così come è stata dimostrata la presenza di ROS a livello di cellule della granulosa e luteali, è stata dimostrata anche la presenza di antiossidanti a livello di granulosa, follicoli in crescita e liquido follicolare (Agarwal, Gupta e Sharma 2005).

## Ossido nitrico e angiogenesi

Un'altra molecola che sembra svolgere un ruolo importante a livello ovarico è l'ossido nitrico (NO). L'ossido nitrico è un gas inorganico che diffonde attraverso le membrane biologiche grazie alla sua elevata solubilità. La sintesi di questa molecola avviene grazie a un enzima, l'ossido nitrico sintasi (NOS) di cui si conoscono tre diverse isoforme: ossido nitrico sintasi neuronale (nNOS), endoteliale (eNOS) ed inducibile (iNOS) (Tamanini, Basini, et al. 2003).

A livello ovarico l'ossido nitrico viene prodotto non solo dalle cellule ovariche, ma anche da cellule endoteliali e macrofagi. La localizzazione delle tre isoforme è differente in base alla specie: nei ratti ad esempio eNOS è presente in particolar modo a livello di cellule della granulosa e della teca, nello stroma e nei vasi sanguigni, mentre iNOS è localizzata nelle cellule dei follicoli primari e secondari e nel corpo luteo. Nei topi invece entrambe le isoforme iNOS e eNOS sono presenti nella granulosa e nella teca. Nell'uomo l'isoforma eNOS è espressa principalmente nelle cellule della granulosa e nelle cellule del corpo luteo (Budani MC 2021).

L'ossido nitrico nell'ovaio è coinvolto in diversi processi: agisce sull'asse ipotalamo-ipofisi stimolando la secrezione di GnRH (Tamanini, Basini, et al. 2003), inibisce la funzione steroidogenica andando a ridurre la produzione di ormoni da parte delle cellule follicolari in diverse specie grazie alla sua attività inibitoria sull'enzima aromatasi, enzima fondamentale nel processo steroidogenico (Basini e Grasselli 2015) (Budani MC 2021) ed è coinvolto nella crescita follicolare, dove può avere effetti anti e pro-apoptotici in base alla concentrazione. Infatti si è visto che bassi livelli di NO favoriscono la crescita dei follicoli immaturi e preovulatori, mentre elevati livelli permettono lo sviluppo del follicolo dominante ma inducono l'apoptosi delle cellule della granulosa, contribuendo all'atresia dei follicoli (Nath e Maitra 2019).

NO viene anche considerato un mediatore dell'angiogenesi: agisce inibendo l'apoptosi, favorendo la proliferazione delle cellule endoteliali, sembra aumentare l'espressione di VEGF e FGF, induce la rottura della matrice extracellulare e stimola la migrazione delle cellule endoteliali (Cooke JP 2002). Il suo ruolo nell'angiogenesi ovarica non è ancora chiaro, in quanto in alcune specie, quali bovino, cavallo e pecora, NO favorisce la selezione follicolare regolata da fattori angiogenici, mentre nella specie suina, ad esempio, si è osservata una negativa correlazione tra VEGF e elevati livelli di NO (Basini e Grasselli 2015).

### 2.1.3 ANGIOGENESI OVARICA NELLA BOVINA

Il ciclo ovarico nella bovina ha una durata media di circa 21 giorni ed è caratterizzato da due o tre ondate follicolari. Circa l'80% delle bovine da latte presenta un ciclo a due ondate follicolari, mentre l'80% delle vacche e delle bovine da carne hanno tre ondate (Bagnato, et al. 2013).

Subito dopo l'ovulazione si verifica un picco di FSH che porta al reclutamento di una coorte di follicoli, i quali inizialmente, nelle prime 48 ore, crescono con lo stesso ritmo ma, successivamente, un certo numero di follicoli crescerà maggiormente rispetto agli altri. Il quarto giorno di ciclo il follicolo con dimensioni maggiori devierà diventando il follicolo dominante. Questo follicolo per diventare tale deve essere di almeno 8 mm di diametro: si ritiene che questo sia il diametro minimo per garantire un adeguato numero di recettori per l'LH a livello di cellule della granulosa. Il follicolo dominante inibisce la crescita degli altri follicoli della stessa coorte grazie alla produzione di inibina, ormone che blocca la secrezione di FSH. Al momento della deviazione del follicolo dominante i livelli di FSH sono bassi, e rimangono tali nei due giorni successivi alla deviazione, per poi aumentare gradualmente fino ad arrivare ad un picco che induce l'inizio di una nuova onda follicolare. Nelle bovine a due ondate la seconda ondata inizia intorno al 9°-10° giorno di ciclo e il follicolo che poi andrà incontro ad ovulazione devierà dopo 4-5 giorni. Nelle bovine a tre ondate invece la seconda ondata partirà l'8°-9° giorno del ciclo, mentre la terza ondata inizierà intorno al 15°-16° giorno (Bagnato, et al. 2013).

Per garantire la selezione follicolare e lo sviluppo del corpo luteo deve essere presente un adeguato sistema di regolazione, che dipende non solo dalle stimolazioni ormonali ma anche dalla crescita di vasi sanguigni che consentono un adeguato apporto funzionale (Berisha e Schams 2005) (Berisha, Schams e Rodler, et al. 2016). Sono numerosi i cambiamenti emodinamici che si verificano durante il ciclo estrale, nei quali l'angiogenesi svolge un ruolo fondamentale (Varughese, Brar e Ghuman 2017).

Uno studio (Jiang JY 2003) ha dimostrato che nei bovini i follicoli ovarici di piccole dimensioni presentano un numero ridotto di capillari nello strato tecale interno, mentre i follicoli di dimensioni maggiori sono più vascolarizzati. Inoltre nel follicolo dominante i capillari si presentano in plessi più organizzati ed uniformi rispetto ai follicoli destinati ad atresia. Lo stesso studio ha dimostrato che l'angiogenesi aumenta durante la crescita follicolare ed è inizialmente evidente nella regione apicale dello strato tecale interno del follicolo, poi si manifesta anche nella regione basale.

Dopo l'ovulazione il flusso ematico è inizialmente ridotto, ma successivamente aumenta, dal secondo al quinto giorno, parallelamente alla crescita del corpo luteo, fino ad arrivare allo sviluppo finale del corpo luteo in cui è presente almeno un capillare per ogni cellula luteale (Berisha e Schams 2005).

Nelle strutture ovariche del bovino la secrezione e distribuzione dei diversi fattori angiogenici varia durante lo sviluppo follicolare (Jiang JY 2003).

Per quanto riguarda VEGF la sua concentrazione al livello di cellula della teca e della granulosa e anche a livello di liquido follicolare cresce in modo considerevole durante la crescita follicolare. Nei follicoli preovulatori è maggiormente espresso nelle cellule della granulosa. La massima espressione di questo fattore si ha però con lo sviluppo del corpo luteo, in particolar modo durante la prima fase luteale, che corrisponde ad un periodo di importante angiogenesi. La sua secrezione è ridotta a partire dal 7° giorno di formazione del CL, e decresce fino alla luteolisi (Berisha, Schams e Rodler, et al. 2016).

Altro importante fattore espresso nel follicolo è FGF. L'espressione di FGF-1 nei bovini è elevata soprattutto a livello tecale, dove la sua concentrazione aumenta nei follicoli di maggiori dimensioni, mentre rimane a livelli più bassi nelle cellule della granulosa. Nel corpo luteo la presenza di FGF-1 aumenta soprattutto verso la metà della fase luteale, mentre FGF-2 è elevato soprattutto durante la prima fase della formazione del corpo luteo, per poi diminuire intorno al 5° - 7° giorno dalla formazione del corpo luteo e aumentare nuovamente nella fase luteale finale (Berisha e Schams 2005).

Anche il fattore di crescita insulino-simile (IGF) risulta essere importante per la crescita follicolare, ma soprattutto per quella luteale nella bovina, in quanto va a stimolare la produzione di ossitocina e progesterone da parte del CL. La sua massima espressione è infatti dimostrata nella prima fase dello sviluppo del corpo luteo, decrescendo poi fino alla fase luteale tardiva (Berisha e Schams 2005) (Berisha, Schams e Rodler, et al. 2016).

Altri due fattori angiogenici di cui è stata studiata la variazione nelle strutture dell'ovaio bovino sono le angiopoietine e HIF (fattore inducibile da ipossia). Per quanto riguarda le angiopoietine, sia ANG-1 che ANG-2 vengono espresse all'interno dei follicoli e nel corpo luteo.

HIF è presente sia nello strato della teca che nello strato della granulosa e la sua concentrazione aumenta durante la crescita e maturazione follicolare. Nel corpo luteo i suoi livelli crescono

durante la iniziale fase di crescita luteale, per poi decrescere durante il ciclo estrale (Berisha, Schams e Rodler, et al. 2016).

Alcuni studi (Isobe N 2008) (Stassi, et al. 2019) hanno dimostrato come l'angiogenesi e in particolar modo l'espressione di VEGF possano svolgere un ruolo nello sviluppo delle cisti follicolari ovariche.

Le cisti ovariche rappresentano una delle patologie più frequenti nell'allevamento bovino: viene considerata ciste ovarica una ciste di dimensioni maggiori di 25 mm, con parete sottile, che persistono in assenza di corpo luteo per oltre 10 giorni (Bagnato, et al. 2013) (Spagnolo 2020). La presenza di cisti ovariche è una condizione patologica, risultato di una alterazione nell'asse ipotalamo-ipofisi-ovaio che porta ad una mancata ovulazione del follicolo dominante che si accresce e diventa cistico, andando a determinare una possibile condizione di anaestro e interferendo con la funzionalità ovarica fisiologica (Stassi, et al. 2019) (Spagnolo 2020). Gli studi sopracitati hanno ipotizzato che VEGF possa avere un ruolo nella patogenesi di questa patologia: infatti è stata dimostrato che le cisti ovariche presentano una vascolarizzazione molto sviluppata e un aumento del liquido follicolare. VEGF, la cui presenza è stata identificata nelle cellule della granulosa e della teca dei follicoli cistici, può contribuire alla formazione delle cisti andando a stimolare la permeabilità vascolare, favorendo così l'afflusso di siero nell'antro follicolare e l'aumento di dimensione del follicolo cistico, e contribuendo ad una rete vascolare molto sviluppata (Isobe N 2008) (Stassi, et al. 2019).

## 2.2 UTERO

### 2.2.1 ANATOMIA

#### Anatomia

L'utero è un organo cavo, situato nella regione lombare, deputato alla gravidanza. Sotto il controllo ormonale garantisce l'impianto, lo sviluppo embrionale e fetale e il parto.

Si presenta di dimensioni ridotte fino alla pubertà, mentre nei soggetti adulti la sua dimensione e consistenza varia in base alle fasi del ciclo sessuale (Barone 2003).

Esternamente l'utero viene suddiviso in corna, corpo e collo, i quali presentano conformazioni differenti in base alla specie. Le corna, mancanti nella specie umana, sono collocate in prossimità dell'ovaio, accolgono lo sbocco della tuba uterina e si uniscono al corpo dell'utero. Presentano dimensioni notevoli soprattutto nella scrofa, dove possono raggiungere anche 1 metro di lunghezza, e nella bovina, mentre hanno dimensioni più ridotte nella cagna e nella cavalla (Barone 2003) (Bortolami, Callegari e Beghelli 2006). Il corpo presenta una struttura cilindroide ed è compresso dorso-ventralmente. Rappresenta la quasi totalità dell'organo nella donna, nella cavalla presenta la stessa lunghezza delle corna (circa 16 centimetri), mentre è di dimensioni ridotte nelle altre specie, dove varia dai 3 ai 5 centimetri. Al corpo segue poi il collo, caratterizzato da una parete particolarmente spessa, che mette in comunicazione l'utero con la vagina (Barone 2003) (Bortolami, Callegari e Beghelli 2006).

La parete uterina presenta a considerare tre tonache differenti, che andando dall'esterno all'interno, sono perimetrio, miometrio ed endometrio (Bortolami, Callegari e Beghelli 2006).

Il perimetrio è costituito da tessuto connettivo denso ed elastico, aderisce allo strato muscolare del miometrio e presenta nel suo spessore fibre elastiche, vasi e nervi (Bortolami, Callegari e Beghelli 2006).

Il miometrio nei mammiferi è costituito da un primo strato superficiale, caratterizzato da fasci di fibre muscolari lisce che presentano un andamento longitudinale, a cui segue uno strato medio, definito anche strato vascolare, in quanto presenta un importante plesso sanguigno. Questo strato è di dimensioni ridotte fino alla pubertà, aumentando poi di consistenza nella vita adulta. La componente vascolare si sviluppa notevolmente durante il ciclo estrale e mestruale e ancora di più durante la gravidanza. Più internamente si ha lo strato profondo del



miometrio, che presenta fasci con andamento circolare, con scarsa componente connettivale frammista a fibre elastiche (Barone 2003) (Bortolami, Callegari e Beghelli 2006).

Lo strato più interno della parete uterina è rappresentato dall'endometrio, che costituisce la mucosa uterina vera e propria. L'endometrio è costituito da un epitelio colonnare, che comprende cellule cigliate e cellule non cigliate di tipo secernente, e da una tonaca propria della mucosa, definita anche stroma endometriale, che si presenta ispessita ed è formata da connettivo lasso, diverse tipologie cellulari (fibroblasti, leucociti, mastociti) e fibre di collagene. Nello spessore dell'endometrio sono presenti anche numerose ghiandole uterine, di tipo tubulare semplice o poco ramificate, le cui variazioni dipendono dall'attività ovarica. A livello endometriale è presente anche una importante rete vascolare, data da arterie basali provenienti dal plesso miometriale, da cui dipartono arteriole e plessi capillari che alimentano sia le aree perighiandolari sia le zone più superficiali dell'endometrio stesso, dove è presente una rete capillare particolarmente ricca. Nella donna sono presenti arterie con un decorso particolarmente spiralato, dette arterie spirali, che risultano fondamentali per il processo mestruale (Barone 2003).

L'irrorazione sanguigna dell'utero è garantita principalmente da due arterie uterine, destra e sinistra. Un contributo alla vascolarizzazione è dato anche dal ramo uterino dell'arteria ovarica, che irrorla la porzione delle corna uterine in prossimità della tuba, e dal ramo uterino dell'arteria vaginale, che irrorla il collo e una piccola parte del corpo. Nella maggior parte dei mammiferi le arterie uterine derivano dall'iliaca interna. Nelle specie che presentano un solo feto per gravidanza i rami uterini formano anastomosi sottili, mentre nelle specie con parti multipli si sviluppa una ricca rete di anastomosi. Dalle arterie del perimetrio dipartono rami che raggiungono prima il miometrio poi l'endometrio (Barone 2003).

Le vene presenti nella parete uterina vanno a formare numerose anastomosi, che a livello del perimetrio confluiscono nella vena uterina e negli affluenti uterini delle vene ovarica e vaginale (Bortolami, Callegari e Beghelli 2006).

## 2.2.2 ANGIOGENESI ENDOMETRIALE

Nei mammiferi adulti di sesso femminile l'utero ha un ruolo centrale per l'impianto e lo sviluppo dell'embrione. Per poter garantire un ambiente adeguato e favorevole per una nuova gestazione il tessuto uterino, in particolar modo l'endometrio è sottoposto a continui cicli di proliferazione e degenerazione, sotto stimoli ormonali, durante i quali avvengono fenomeni di apoptosi, degenerazione della matrice extracellulare e angiogenesi.

Importanti alterazioni morfologiche a livello endometriale avvengono soprattutto nell'uomo e nei primati, specie in cui, in assenza di gravidanza, si manifesta sfaldamento dell'endometrio, un fenomeno definito mestruazione. Nei mammiferi non primati, che non presentano quindi un ciclo mestruale, i mutamenti a carico dell'endometrio sono inferiori rispetto all'uomo, anche se alcuni studi hanno evidenziato come fenomeni di rimodellamento endometriale si manifestino durante il ciclo estrale in bovini, cani, equini e suini (Billhaq, Lee e Lee 2020).

Il ciclo mestruale nei primati viene suddiviso in tre fasi, fase proliferativa, secretoria e mestruale, durante le quali l'angiogenesi svolge un ruolo importante (Sivridis e Giatromanolaki 2004). Sia la fase proliferativa che la fase secretoria sono caratterizzate da crescita vascolare, mentre in seguito alla mestruazione i vasi vengono riparati, per permettere al sanguinamento uterino di cessare (Weston e Rogers 2000).

Durante la fase proliferativa, che corrisponde alla fase follicolare a livello ovarico, si verifica una rigenerazione ed un accrescimento dello strato endometriale dell'utero sotto stimolazione estrogenica, con un aumento della componente stromale e ghiandolare (Thiyagarajan, Basit e Jeanmonod 2021) (Critchley HOD 2020). Accanto ad un accrescimento tissutale si assiste anche ad una proliferazione vascolare (Critchley HOD 2020) attraverso cui le arterie spirali si allungano e si collegano con il plesso capillare subepiteliale (Weston e Rogers 2000).

Alla fase proliferativa segue la fase secretoria, durante la quale, sotto controllo del progesterone, l'endometrio si prepara all'eventuale impianto. Il progesterone da un lato induce un rallentamento nella proliferazione delle cellule endometriali, dall'altro stimola lo sviluppo e la secrezione ghiandolare (Thiyagarajan, Basit e Jeanmonod 2021). Dal punto di vista vascolare si osserva un incremento importante della densità vascolare, pari al doppio rispetto alla fase proliferativa, e un aumento della permeabilità vasale (Malamitsi-Puchner, et al. 2004). Le arteriole spirali accrescono e si avvolgono maggiormente su loro stesse, mentre i capillari subepiteliali maturano ulteriormente (Demir, Yaba e Huppertz 2010).

In assenza di fecondazione e gravidanza e a seguito della regressione del corpo luteo, la caduta dei livelli di estradiolo e soprattutto di progesterone dà inizio alle mestruazioni (Critchley HOD 2020). Queste comportano lo sfaldamento e la perdita dei due terzi dello strato superficiale dell'endometrio (Smith 2001) e presentano le caratteristiche di un processo infiammatorio: si manifesta vasocostrizione, con conseguente ipossia e necrosi e afflusso di cellule immunitarie (Weston e Rogers 2000) (Critchley HOD 2020). La vasocostrizione si manifesta principalmente a carico dei vasi presenti tra miometrio ed endometrio, favorendo così la necrosi dello strato più superficiale del tessuto uterino, mentre le arterie presenti nello strato più profondo della parete uterina non subiscono costrizione e questo risulta fondamentale per poter poi garantire la ricostruzione del letto vascolare al termine delle mestruazioni stesse (Albrecht ED 2003).

Durante le varie fasi del ciclo mestruale è stata ipotizzata una variazione ciclica dei livelli circolanti di fattori angiogenici (Demir, Yaba e Huppertz 2010). Durante la fase proliferativa è stata dimostrata la presenza di VEGF nelle cellule epiteliali e stromali, ma non è stato dimostrato un aumento della sua sintesi durante questa fase, anche se, secondo alcuni studi, in seguito all'ovulazione, la sua quantità è diminuita significativamente a livello stromale, rimanendo presente solo a livello epiteliale (Smith 2001) (Demir, Yaba e Huppertz 2010). Un aumento della secrezione di VEGF si ha a partire dall'inizio della fase secretoria, fino a raggiungere concentrazioni pari a tre volte quelle presenti nella fase proliferativa del ciclo (Malamitsi-Puchner, et al. 2004) (Demir, Yaba e Huppertz 2010). Questo incremento giustificerebbe l'aumentata densità vascolare e l'aumentata permeabilità riscontrate durante la fase secretoria (Malamitsi-Puchner, et al. 2004).

Oltre a VEGF anche FGF è stato riscontrato a livello endometriale. In particolare viene espresso dalle cellule ghiandolari, stromali, dalla lamina basale dei vasi sanguigni e dalla matrice extracellulare dell'endometrio (Albrecht ED 2003). È stato dimostrato che si ha un picco della sua concentrazione durante la tarda fase proliferativa, dove FGF potrebbe contribuire all'angiogenesi capillare (Malamitsi-Puchner, et al. 2004).

Per quanto riguarda le angiopoietine, bassi livelli di ANG-1 sono stati identificati nei fibroblasti presenti nella porzione stromale dell'endometrio, e la sua secrezione tende a diminuire sia durante la fase proliferativa che secretoria. Per quanto riguarda ANG-2 invece si è riscontrata una ridotta sintesi durante la fase proliferativa, con un aumento nella successiva fase secretoria (Smith 2001).

Accanto a questi fattori proangiogenici, l'endometrio contiene anche molecole che inibiscono l'angiogenesi tra cui trombospodina-1, endostatina, angiostatina, fattore 4 piastrinico, TGF- $\beta$  (fattore di crescita trasformante  $\beta$ ) e inibitori tissutali delle metalloproteasi. La presenza di questi fattori inibitori permette una stretta regolazione dell'angiogenesi endometriale fisiologica (Smith 2001).

### *Stress ossidativo e ossido nitrico a livello endometriale*

Anche nell'utero, così come descritto precedentemente nell'ovaio, la presenza di stress ossidativo e ossido nitrico svolgono un ruolo importante nelle diverse fasi del ciclo endometriale (Lu, et al. 2018). È stata evidenziata una variazione dei livelli di ROS e antiossidanti, in particolare modo superossido dismutasi (SOD), durante il ciclo mestruale: più precisamente, durante la tarda fase secretoria, in seguito alla caduta di estrogeni e progesterone, è stata dimostrata una diminuzione dei livelli di SOD e un aumento dei livelli di ROS (Gupta S 2008) (Lu, et al. 2018): questi cambiamenti possono far ipotizzare che lo stress ossidativo sia coinvolto nel processo della mestruazione (Agarwal, Gupta e Sharma 2005). I ROS sono presenti anche nelle altre fasi del ciclo, dove favoriscono l'angiogenesi e di conseguenza la rigenerazione endometriale. Livelli controllati di ROS sono quindi necessari alla funzione uterina, ma se presenti in concentrazioni eccessive può portare allo sviluppo di molte patologie, quali pre-eclampsia ed endometriosi (Lu, et al. 2018).

Per quanto riguarda l'ossido nitrico, questo fattore agisce controllando la funzione uterina sia a livello vascolare che miometriale ed endometriale (Rosselli 1997) (Agarwal, Gupta e Sharma 2005). L'ossido nitrico sintasi, sia nella sua forma endoteliale che inducibile, è presente non solo nelle cellule endoteliali, ma anche nelle cellule epiteliali ghiandolari e la sua presenza è stata rilevata soprattutto nella tarda fase secretoria, indicando il possibile coinvolgimento di NO nello sfaldamento endometriale (Agarwal, Gupta e Sharma 2005) (Gupta S 2008). La mestruazione è preceduta da regressione endometriale, vasocostrizione e successiva vasodilatazione e nei primi giorni di sanguinamento l'emostasi si verifica soprattutto grazie a vasocostrizione e non ad aggregazione piastrinica. Il fatto che NO induca vasodilatazione e inibizione piastrinica fa pensare che possa avere un ruolo nel sanguinamento mestruale (Cameron IT 1998).

## *Ruolo dell'immunità nell'angiogenesi e rimodellamento vascolare nell'endometrio al momento dell'impianto*

Nella specie umana durante il ciclo mestruale si assiste ad una serie di cambiamenti morfologici, secretori, vascolari e immunitari all'interno dell'utero che portano ad un periodo di recettività, della durata di circa 4 giorni, che si verifica 5-7 giorni dopo l'ovulazione. Questo periodo è fondamentale per la fase di impianto dell'embrione (Chen X 2017).

A livello endometriale sono presenti differenti tipologie di cellule immunitarie durante il ciclo mestruale e la gravidanza. La concentrazione di leucociti aumenta intorno alla metà della fase secretoria del ciclo, e questo suggerisce come queste cellule possano avere un ruolo fondamentale nella gravidanza, andando a mediare l'impianto, lo sviluppo della placenta, l'immunità e anche il rimodellamento vascolare. Durante la fase proliferativa del ciclo la componente leucocitaria rappresenta circa il 5% delle cellule stromali uterine, per poi aumentare durante la fase secretoria, fino a rappresentare, ad inizio gravidanza, circa il 25-40% della popolazione cellulare (Morelli, et al. 2015) (Chen X 2017). In assenza di gravidanza, il numero di leucociti presenti a livello endometriale si riduce in seguito alla mestruazione (Plaisier 2011). Se invece si instaura una gravidanza, nel primo trimestre, la componente immunitaria è costituita soprattutto da cellule Natural Killer uterine, che rappresentano circa il 70% dei leucociti, seguite dai macrofagi (~20%), linfociti T (10-20%), pochi linfociti B e cellule dendritiche (Morelli, et al. 2015).

Le cellule Natural Killer uterine sono coinvolte nell'immunomodulazione, nel controllo dell'invasività del trofoblasto, nella decidualizzazione e anche nel rimodellamento vascolare e nella promozione dell'angiogenesi (Plaisier 2011) (Morelli, et al. 2015) (Chen X 2017). In particolare, queste cellule immunitarie sono risultate essere una delle principali fonti di citochine necessarie al corretto impianto e sviluppo placentare. Tra queste citochine sono presenti anche fattori di crescita con attività angiogenica, tra cui VEGF, PLGF e angiopoietine (Chen X 2017) (Rizov, Andreeva e Dimova 2017).

I macrofagi presenti a livello endometriale all'inizio e durante la gravidanza sono coinvolti anch'essi nel rimodellamento vascolare precoce delle arterie spirali e nei tessuti, nell'angiogenesi, nella crescita della placenta e nell'apoptosi delle pareti vascolari e trofoblastiche (Plaisier 2011) (Morelli, et al. 2015). I macrofagi uterini hanno la capacità di

secernere fattori di crescita con attività angiogenica tra cui PDGF, IGF, FGF, TGF- $\beta$  (Torry, et al. 2007) (Chen X 2017). Durante la gravidanza, accanto ai macrofagi presenti nell'endometrio, sono presenti anche macrofagi a livello placentare, definiti cellule di Hofbauer, che sono in grado di esprimere il fattore di crescita VEGF, elemento che suggerirebbe il loro coinvolgimento nell'angiogenesi al confine feto-placentare (Torry, et al. 2007). I macrofagi sono anche in grado di inibire l'angiogenesi tramite la secrezione di fattori antiangiogenici (Rizov, Andreeva e Dimova 2017).

Anche i linfociti possono avere un ruolo nell'angiogenesi e nel rimodellamento vascolare durante la gravidanza, ma il loro ruolo non è ancora del tutto chiaro. In seguito all'impianto i linfociti circondano l'embrione e secernono citochine tra cui TNF- $\alpha$ , che sembra stimolare la produzione di fattori angiogenici, tra cui VEGF da parte dei fibroblasti dell'endometrio, agendo in modo indiretto sulla permeabilità vascolare placentare e il processo angiogenico. Altre citochine rilasciate dai linfociti, come IFN- $\gamma$  e IL-12, sembrano invece avere un'attività anti-angiogenica in vitro (Torry, et al. 2007).

Infine le cellule dendritiche potrebbero avere un coinvolgimento dell'angiogenesi deciduale, rilasciando fattori vasoattivi e VEGF, controllando la risposta angiogenica soprattutto al momento dell'impianto dell'embrione (Blois, Klapp e Barrientos 2011).

### **2.2.3 ANGIOGENESI ENDOMETRIALE NELLA BOVINA DURANTE IL CICLO ESTRALE**

La bovina è un animale poliestrale che presenta cicli estrali tutto l'anno. Il ciclo estrale ha una durata di 21 giorni e in base agli eventi ovarici e ai cambiamenti comportamentali dell'animale viene suddiviso in

- Proestro;
- Estro;
- Metaestro;
- Diestro.

Estro e proestro corrispondono alla fase follicolare a livello ovarico, quindi al periodo che va da dalla regressione del corpo luteo all'ovulazione, mentre metaestro e diestro equivalgono alla fase luteale, durante il quale si ha la persistenza del corpo luteo (Sjaastad, Sand e Hove 2013) (Espejel e Medrano 2017).

Durante il ciclo estrale, oltre ai cambiamenti descritti a livello ovarico, si assistono anche a modificazioni a carico dell'utero. Nella bovina, durante l'estro e il metaestro, fasi che dal punto di vista ormonale sono influenzate dall'azione degli estrogeni, l'endometrio si trova in uno stato proliferativo e si assiste ad un progressivo ispessimento dello strato endometriale: all'inizio della fase estrale l'endometrio si presenta sottile, con una componente stromale ridotta, ghiandole poco numerose e lume ristretto. Successivamente si verifica un aumento della componente cellulare sia stromale che ghiandolare, con edema e incremento della componente vascolare. Al termine della fase estrale la componente stromale dell'endometrio si presenta densa, con ghiandole più numerose e allungate e un epitelio pseudostratificato (Espejel e Medrano 2017).

Durante diestro e metaestro, fasi in cui si ha predominanza progestinica dal punto di vista ormonale e l'endometrio si trova in uno stato secretorio, si raggiunge il massimo spessore di questo tessuto, con i vasi sanguigni che aumentano ulteriormente di diametro e le ghiandole che presentano una importante capacità secretoria (Espejel e Medrano 2017).

Nonostante non si abbiano informazioni dettagliate sul processo angiogenico che avviene a livello endometriale nei bovini durante il ciclo estrale, uno studio (Tasaki, et al. 2010) ha dimostrato come l'espressione del fattore VEGF, importante stimolatore angiogenico, e dei suoi

recettori varia durante il ciclo estrale. Secondo questa ricerca VEGF è espresso maggiormente durante l'estro e l'inizio della fase luteale, suggerendo che questo fattore possa giocare un ruolo nella crescita endometriale che si ha in questa fase, stimolato anche dagli alti livelli di estrogeni.

Per quanto riguarda i recettori su cui agisce questo fattore, l'espressione del recettore VEGFR-1 è risultata rimanere invariata durante tutto il ciclo estrale e questo potrebbe suggerire un coinvolgimento costante dell'azione mediata da questo recettore soprattutto nel mantenere la normale vascolarizzazione endometriale durante il ciclo estrale, mentre per quanto riguarda il recettore VEGFR-2, la sua presenza è stata riscontrata essere maggiore durante la media e tarda fase luteale piuttosto che durante l'estro (Tasaki, et al. 2010).



## 2.3 PLACENTA

### 2.3.1 ANATOMIA E FUNZIONE

#### Anatomia

La placenta è l'organo che, durante la gravidanza, permette e garantisce gli scambi materno-fetali. Si forma in seguito all'impianto, momento in cui la blastocisti prende rapporto con la mucosa uterina, e presenta una componente materna, data dalla mucosa uterina stessa, e una componente fetale, rappresentata dal corion (annesso embrionale più esterno che circonda non solo l'embrione ma anche gli altri invogli fetali).

Inizialmente si presenta come una spessa proliferazione di cellule derivate dal trofoblasto, tessuto cellulare derivante dalla blastocisti che fornisce un iniziale nutrimento all'embrione senza però partecipare alla formazione di quest'ultimo. Successivamente si ha la penetrazione di tessuto connettivo-vascolare che porta alla formazione di un elevato numero di villi coriali (Figura 5), che andranno a rapportarsi con la mucosa dell'utero (Barone 2003) (Pelagalli, Castaldo, et al. 2014) (Sapere.it s.d.) .

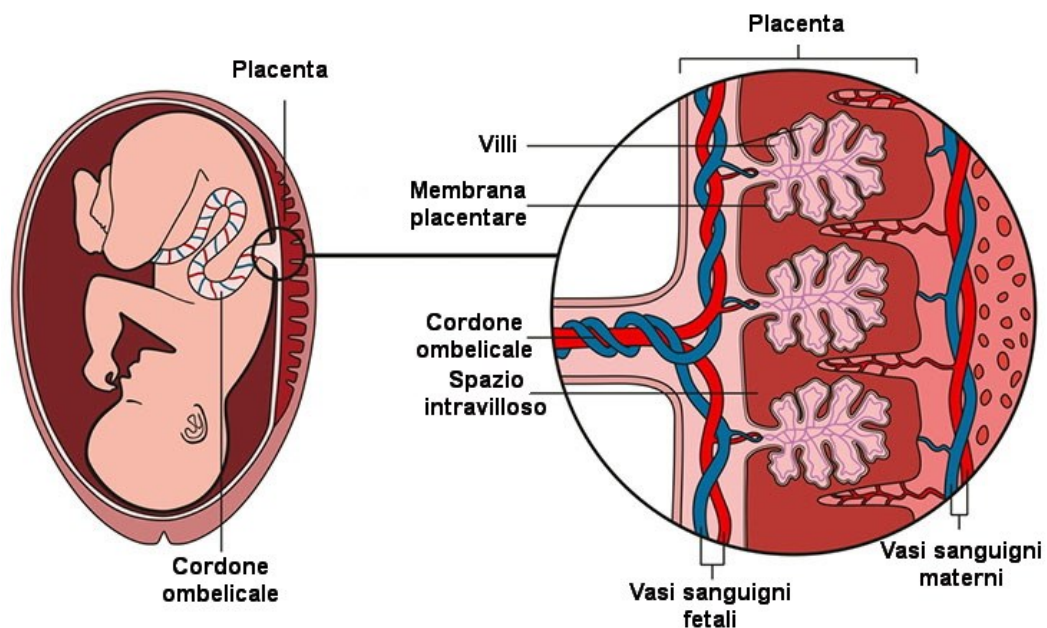


Figura 5 Organizzazione dei villi coriali nella placenta umana (Pazienti.it s.d.)

I mammiferi placentati presentano placente con diverse caratteristiche, distinguibili in base a diversi aspetti: vascolarizzazione del corion, distribuzione dei villi coriali, rapporto tra componente fetale e mucosa uterina e modificazione della mucosa uterina al momento del parto (Pelagalli, Castaldo, et al. 2014).

In base alla vascolarizzazione del corion si parla di onfaloplacenta (o placenta corio-vitellina), nella quale i vasi che irrorano i villi provengono dal sacco vitellino, e di allantoplacenta (o placenta corio-allantoidea), in cui la rete vascolare proviene dall'allantoide. L'onfaloplacenta è tipica dei marsupiali e di alcuni vertebrati inferiori, come i selaci, mentre nei mammiferi placentati è presente solo negli stati iniziali e viene sostituita rapidamente dall'allantoplacenta (Barone 2003).

A seconda di come i villi coriali si dispongono sulla superficie del corion, le placente possono essere distinte in:

- Placenta diffusa: i villi ricoprono in modo abbastanza uniforme tutta la superficie del corion e formano piccole cripte nella mucosa uterina. Sono caratteristiche di Equidi e Suidi;
- Placenta cotiledonare: si ha un raggruppamento dei villi in placche ben definite e robuste, definite cotiledoni, che prendono rapporto con aree della mucosa uterine, definite caruncole. Caruncole e cotiledoni vanno a formare strutture isolate, denominate placentomi, di numero variabile in base alla specie animale (nei Bovidi se ne contano più di 100). Questo tipo di placentazione è tipica dei Ruminanti;
- Placenta zonata: i villi in questa tipologia di placenta sono organizzati a formare un anello a livello equatoriale del corion, mentre le estremità rimangono lisce e libere. Questa placenta è specifica dei Carnivori;
- Placenta discoidale: in questo caso i villi occupano solamente un'area circolare (disco placentare) della placenta, mentre la maggior parte dell'organo rimane liscia. Nel disco placentare i villi sono molto sviluppati, fino a formare una struttura labirintica o trabecolare. È la placenta caratteristica dei Primati, compreso l'uomo, e dei Roditori (Barone 2003) (Pelagalli, Castaldo, et al. 2014).

In base alla relazione con la mucosa uterina, il corion può rapportarsi con essa in diversi modi, dal semplice accollamento all'erosione totale dei vari stati della parete uterina. In base a questo rapporto si distinguono:

- Placenta epiteliocoriale: in questo tipo di placenta l'epitelio coriale è a contatto con l'epitelio della mucosa uterina, la quale mantiene la sua integrità. Si ha quindi una semplice apposizione della componente fetale e materna e la barriera placentare è

completa. È caratteristica di Equidi, Suidi e Bovini (Barone 2003) (Pelagalli, Castaldo, et al. 2014);

- Placenta sindesmocoriale: placenta caratteristica dei piccoli Ruminanti (Capra e Pecora), nella quale si assiste ad una parziale erosione dell'epitelio della mucosa uterina in alcuni punti, in cui il corion si trova a diretto contatto con lo strato connettivale della mucosa uterina (Barone 2003) (Pelagalli, Castaldo, et al. 2014);
- Placenta endoteliochoriale: i villi coriali corrodono l'epitelio uterino e lo strato connettivale, entrando così a contatto direttamente con l'endotelio dei vasi materni. Questo rapporto è tipico della placentazione dei Carnivori (Pelagalli, Castaldo, et al. 2014);
- Placenta emocoriale: si assiste alla distruzione dell'endotelio dei capillari materni, con conseguente formazione di lagune sanguigne nella mucosa uterina che circondano i villi coriali. Questa caratteristica è tipica delle placente dei Primati, Insettivori, Roditori e Lagomorfi (Barone 2003) (Pelagalli, Castaldo, et al. 2014).

Infine, a seconda del tipo di placenta, al momento del parto si può assistere alla eventuale presenza di perdite ematiche più o meno importanti. Nelle placente in cui si ha solo una semplice apposizione delle strutture fetali e materne, in cui non si ha erosione della mucosa, al momento del parto il distacco della placenta non comporta sanguinamenti. In questi casi la placenta viene definita adeciduata, ed è caratteristica di Equidi, Suidi e Ruminanti.

Nelle specie, tra cui Primati e Carnivori, in cui si verifica erosione della mucosa uterina da parte del corion, al momento del parto si verificheranno anche perdite ematiche, con espulsione di parte della mucosa uterina. Queste placente vengono dette deciduate (Pelagalli, Castaldo, et al. 2014).

La placenta è un organo altamente vascolarizzato. La circolazione sanguigna placentare è costituita da una rete di vasi fetali e una rete di vasi materni, strettamente intrecciate ma indipendenti, in modo che il sangue materno e quello fetale non si mescolino mai.

I vasi presenti nel versante placentare provengono dalle arterie ombelicali. Nelle placente diffuse e discoidali si ha la presenza di numerosi e sottili vasi, che assumono un aspetto flessuoso, mentre nelle placente cotiledonari i vasi derivati dalle arterie sono meno flessuosi e ciascuno di essi termina in un cotiledone. Sia nei villi che nei cotiledoni i vasi principali

decorrono in posizione centrale ed emettono rami collaterali che vanno a formare un ricco plesso capillare che si porta fino a contatto con l'epitelio. Il drenaggio venoso è garantito da venule che si uniscono in vasi maggiori satelliti delle arterie (Barone 2003).

La componente materna della vascolarizzazione placentare è sostenuta da diramazioni delle arterie uterine, che si presentano meno numerose ma di calibro maggiore nelle placente discoidali rispetto alle placente cotiledonari e diffuse. Nelle placente adeciduate i vasi si organizzano in arborizzazioni simili a quelle presenti a livello cotiledonare, ma orientate in senso inverso ai vasi cotiledonari, in modo che i due tipi di sangue circolino in senso opposto. Nelle placente deciduate, come le emocoriali, i vasi materni decorrono sulla superficie dell'organo da cui dipartono rami terminali si aprono beanti negli spazi intervillosi (Barone 2003).

### Funzione della placenta

La placenta è un organo essenziale per la vita fetale. Al suo interno avvengono costantemente scambi respiratori e metabolici tra i liquidi materni e fetali, resi possibili dalla permeabilità selettiva data dalla barriera placentare. Svolge anche un ruolo protettivo, impedendo il passaggio, in certi casi, di sostanze o microrganismi dannosi (Barone 2003) (Pelagalli, Castaldo, et al. 2014).

Sia in direzione materno-fetale che fetto-materna si assiste al passaggio di numerose tipologie di sostanze quali ossigeno, acqua, elettroliti, vitamine, lipidi, glucidi (provenienti dalla madre) e talvolta si può assistere anche al passaggio di farmaci e microrganismi (virus, batteri o parassiti). Altre molecole che intervengono durante questi scambi e che sono prodotti dal feto sono anidride carbonica, acqua, cataboliti, elettroliti e ormoni (Pelagalli, Castaldo, et al. 2014). Il passaggio di sostanze tra i due versanti avviene con modalità differenti: le sostanze liposolubili, tra cui ossigeno e anidride carbonica, attraversano la barriera placentare tramite diffusione, mentre molecole più complesse, come amminoacidi, vitamine, necessitano di un trasporto attivo (Sjaastad, Sand e Hove 2013).

Nelle specie che presentano placente deciduate (Primate e Carnivori) durante la vita fetale si assiste anche al passaggio di immunoglobuline dalla madre al feto durante le ultime fasi della gravidanza, contribuendo in questo modo ad una iniziale capacità immunitaria del feto. Nelle altre specie, che presentano placente adeciduate, non si assiste al passaggio di anticorpi

durante la gravidanza, se non in quantità non significative. In queste specie le immunoglobuline saranno assunte dal neonato solo al momento della nascita tramite l'assunzione del colostro (Sjaastad, Sand e Hove 2013) (Pelagalli, Castaldo, et al. 2014).

La placenta, oltre a garantire gli scambi tra la madre e il feto, presenta anche una funzione endocrina, in quanto è in grado di produrre diversi ormoni, tra cui gonadotropine corioniche, progesterone, estrogeni, lattogeno placentare e relaxina (Sjaastad, Sand e Hove 2013) (Pelagalli, Castaldo, et al. 2014).

Le gonadotropine corioniche, o ormoni gonadotropi, sono ormoni prodotti dai tessuti corionici, tipici dei primati (hGC) e della cavalla (eGC), che presentano un'azione simile all'LH, stimolando la sintesi di progesterone da parte del corpo luteo. L'eGC, se somministrata in altre specie a fini terapeutici (ad esempio quando si ha necessità di stimolare l'accrescimento follicolare) presenta un effetto follicolostimolante FSH-simile. Il compito di queste gonadotropine è quello di disciplinare la produzione di ormoni steroidei placentari ed ovarici (Bortolami, Callegari e Beghelli 2006) (Sjaastad, Sand e Hove 2013).

Il lattogeno placentare è un ormone di natura peptidica che esplica la sua azione stimolando e inducendo lo sviluppo morfo-funzionale nella mammella, favorendo la crescita degli alveoli mammari. La sua concentrazione ematica aumenta soprattutto dalla prima metà della gravidanza in poi (Bortolami, Callegari e Beghelli 2006) (Sjaastad, Sand e Hove 2013).

La relaxina è un ormone prodotto sia dalla placenta che dalle ovaie. Durante la gravidanza, in particolar modo nel periodo fetale, in associazione all'azione del progesterone, previene le contrazioni uterine, ma la sua massima attività si esplica al momento del parto, dove induce un rilassamento del tessuto connettivo a livello di sinfisi pubica, cervice e utero favorendo così il passaggio del feto nel canale del parto (Bortolami, Callegari e Beghelli 2006) (Sjaastad, Sand e Hove 2013).

Accanto a questi ormoni la placenta secerne anche progesterone ed estrogeni. Il progesterone è un ormone fondamentale per il mantenimento della gravidanza in tutte le specie di mammiferi. In alcuni casi (donna, cavalla, gatta e pecora) il progesterone viene inizialmente prodotto dal corpo luteo, il quale viene sostituito dalla placenta in questo compito a partire almeno dalla seconda metà della gravidanza. In altri animali (scrofa, capra e bovina) la produzione placentare di progesterone non permette la completa sostituzione del

progesterone prodotto dal corpo luteo, il quale rimane funzionante per tutta la gravidanza. Infine la placenta è in grado di secernere anche estrogeni, la cui concentrazione aumenta progressivamente soprattutto nelle fasi finali della gravidanza. Gli estrogeni consentono un adeguato sviluppo dei feti e dell'utero, rendendo quest'ultimo più suscettibile all'azione dell'ossitocina al momento del parto (Bortolami, Callegari e Beghelli 2006) (Sjaastad, Sand e Hove 2013).

### **2.3.2 ANGIOGENESI PLACENTARE**

Nei mammiferi la placenta svolge un ruolo importante e il suo corretto sviluppo è fondamentale per poter garantire la sintesi ormonale, la crescita fetale e gli scambi fisiologici tra madre e feto. Tutte queste funzioni sono promosse dallo sviluppo di un'ampia rete vascolare (Reynolds, Grazul-Bilska e Redmer 2002) (Espinosa 2011). L'importanza della vascolarizzazione placentare è da tempo riconosciuta ed è evidenziabile nello stretto rapporto che si ha tra il peso fetale, le dimensioni della placenta e il tasso di flusso sanguigno a livello uterino e ombelicale nel corso delle gravidanze fisiologiche in numerose specie di mammiferi (Reynolds e Redmer, *Angiogenesis in the placenta* 2001). I flussi sanguigni tra madre e feto si sviluppano al momento dell'impianto ed aumentano periodicamente durante la gestazione (Chen DB 2014). La concentrazione vascolare della componente endometriale aumenta gradualmente nel corso della gravidanza, mentre nei tessuti placentari fetali la densità vascolare rimane costante fino a metà gestazione, per poi aumentare in modo significativo successivamente (Reynolds, Grazul-Bilska e Redmer 2002) (Espinosa 2011).

Durante la gravidanza quindi, sia l'utero che il feto, richiedono un continuo e sempre maggiore apporto di sangue e questo adattamento si evidenzia principalmente tramite vasodilatazione, aumento della permeabilità e crescita di nuovi vasi (Zygmunt, et al. 2003). A livello placentare, sia sul versante materno che fetale, si assiste ad un'estesa angiogenesi, che risulta essere una componente fondamentale per l'incremento del flusso sanguigno che si verifica nel corso di tutta la gestazione (Reynolds e Redmer 2001) (Espinosa 2011).

Un adeguato flusso di sangue risulta quindi fondamentale per un corretto sviluppo del feto e condizioni di ridotta vascolarizzazione placentare, con conseguente ridotto apporto di ossigeno e nutrienti, sono associate a tassi ridotti di crescita fetale e placentare (Reynolds, Borowicz e Vonnahme, et al. 2005). Un'alterata vascolarizzazione placentare risulta anche essere tra le più comuni cause di complicazioni durante la gravidanza, sia negli animali che nell'uomo: è stato

dimostrato che disturbi nella circolazione sanguigna sono associati ad un maggior tasso di morbilità e mortalità perinatale, e, nell'uomo, a patologie quali pre-eclampsia e ritardo di crescita intrauterino (IUGR) (Zygmunt, et al. 2003) (Chen DB 2014) (Bardin, Murthi e Alfaidy 2015).

Questo fa capire come i fattori che influenzano la vascolarizzazione placentare abbiano un impatto importante sulla sopravvivenza e crescita neonatale (Reynolds e Redmer, *Angiogenesis in the placenta* 2001).

### Angiogenesi nella placenta umana

Nei primati, uomo compreso, le fasi principali della placentazione comprendono l'invasione del trofoblasto, la sua vascolarizzazione, fondamentale per poter stabilire la circolazione fetoplacentare, e il rimodellamento vascolare sul versante materno (Wulff, et al. 2003). Il trofoblasto, in seguito all'impianto, si differenzia in citotrofoblasto, strato più interno costituito da cellule mononucleate, e sinciziotrofoblasto, strato più esterno formato da cellule polinucleate (Treccani s.d.). Il sinciziotrofoblasto invade il tessuto materno, comportando la digestione e degradazione della parete delle arteriole spirali, dalle cui terminazioni, che risultano così aperte, il sangue fuoriesce e circola intorno ai villi (Figura 6). Il trofoblasto è un tessuto che si presenta avascolare e necessita quindi dello sviluppo di una rete di vasi sanguigni per poter garantire gli scambi materno-fetali (Wulff, et al. 2003).

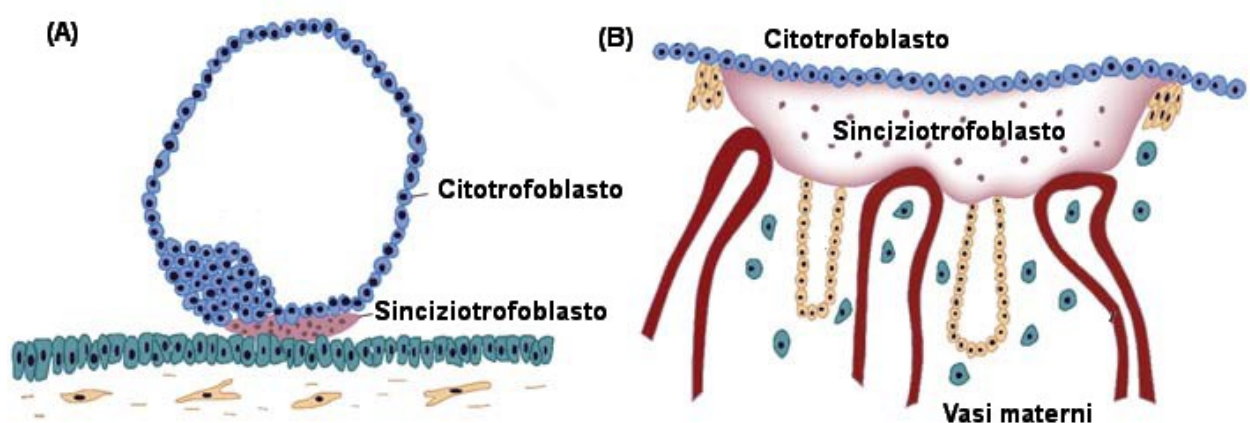


Figura 6 Sviluppo precoce della placenta nell'uomo. (A) Il trofoblasto, in seguito all'impianto si differenzia in sinciziotrofoblasto e citotrofoblasto. (B) Il sinciziotrofoblasto invade la parete uterina ed entra in contatto con i vasi materni (Wulff, et al. 2003)

Il processo angiogenico che avviene a livello placentare durante la gravidanza umana viene definito da alcuni studi come bifasico e caratterizzato da una iniziale angiogenesi germogliante (o ramificata), che porta alla formazione del plesso vascolare, seguita poi, a partire dalla 24°-26° settimana di gestazione, da angiogenesi non ramificata, nella quale si osserva un allungamento dei vasi precedentemente formati (Figura 7). Studi hanno dimostrato che la crescita capillare è più lenta durante la prima metà della gravidanza, quando predomina l'angiogenesi germogliante, e più rapida in seguito, quando si verifica angiogenesi non ramificata (Kaufmann P 2004) (Barut, et al. 2010) (Espinosa 2011) (Gourvas V 2012) (Chen DB 2014).

Nell'uomo la vascolarizzazione della placenta inizia a partire dal 21° giorno dopo il concepimento e inizialmente è il risultato di un processo di vasculogenesi, piuttosto che di angiogenesi (Kaufmann P 2004) (Demir R 2006) (Barut, et al. 2010). Infatti, già dal 15° giorno può essere dimostrata, a livello dello stroma dei villi, la presenza di cellule emangioblastiche, precursori delle cellule endoteliali, che aggregandosi andranno a formare, dal 21° giorno di gravidanza, tubi endoteliali, all'interno dei quali, dal 28° giorno, sarà visibile il lume. In questo momento all'interno di questi vasi immaturi sono riconoscibili anche le prime cellule staminali ematopoietiche, le quali però non sono ancora circolanti perché la connessione fra la circolazione fetale e embrionale attraverso il cordone ombelicale non si verifica prima del 32°-35° giorno di gravidanza. Attorno ai capillari placentari così formati si deposita inizialmente uno strato di periciti e successivamente, a partire dalla 6° settimana di gravidanza, anche la lamina basale. Lo sviluppo di nuovi capillari sanguigni può essere rilevato fino alla 10°-12° settimana di gestazione. (Zygmunt, et al. 2003) (Kaufmann P 2004).

Dal 32° giorno di gestazione fino alla 25° settimana i vasi formati tramite vasculogenesi vanno a formare una primitiva rete capillare. In questa fase si assiste a fenomeni di angiogenesi germogliante, che avvengono principalmente nei villi di calibro maggiore rispetto a villi di piccolo calibro (villi mesenchimali), dove si verifica soprattutto angiogenesi non ramificata. Con il progredire della gravidanza e l'aumento di dimensione dei villi si nota un incremento del processo angiogenico che porta allo sviluppo di una fitta rete capillare localizzata sotto la superficie villosa (Kaufmann P 2004).

Nel terzo mese di gravidanza alcuni vasi centrali presenti nei villi intermedi immaturi aumentano di dimensione (fino a 100  $\mu\text{m}$  e più) e si circondano di una tonaca adventizia, derivata da processi di fibrosi nello stroma circostante centrale, e di precursori di cellule



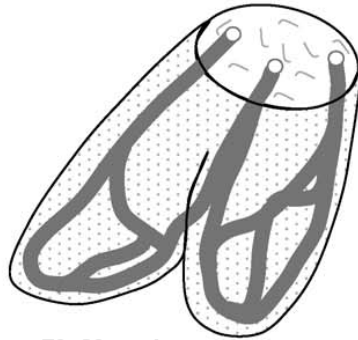
muscolari lisce. Questi vasi costituiranno i precursori delle vene e delle arterie dei villi, i quali, in seguito a questi processi fibrotici presenteranno un nucleo stromale fibroso, diventando villi staminali (Kaufmann P 2004).

Contemporaneamente, tra la 15° e la 32° settimana dopo il concepimento, i capillari presenti nelle porzioni più prossimali dei villi staminali più grandi vanno incontro a regressione, tant'è che entro il termine della gestazione solo pochi capillari rimangono nei villi di dimensione maggiore. In contrasto con questo fenomeno, nei nuovi villi mesenchimali e intermedi immaturi che si formano si verifica lo sviluppo di nuovi plessi capillari tramite un equilibrio di angiogenesi ramificata e non. Nell'arco di qualche settimana, ciascun nuovo villo formato diventa villo staminale. Questi riarrangiamenti permettono ai villi e alla loro rete vascolare di continuare ad espandersi perifericamente (Kaufmann P 2004).

Dalla 24-26° settimana di gestazione fino al termine, si assiste al passaggio dal processo di angiogenesi germogliante ad angiogenesi non germogliante, nel quale si verifica allungamento dei vasi. Questa fase coincide con lo sviluppo di villi intermedi maturi, specializzati negli scambi gassosi tra la madre e il feto (Barut, et al. 2010) (Gourvas V 2012). In questi villi si assiste ad una ridotta proliferazione trofoblastica e ad una aumentata proliferazione delle cellule endoteliali: questo si traduce in un tasso di crescita del villo inferiore rispetto alla crescita capillare con conseguente avvolgimento dei vasi capillari stessi. Con il progredire della gravidanza i capillari si avvolgono maggiormente, si gonfiano andando a formare sinusoidi che sporgono sulla superficie del trofoblasto, creando una membrana sincizio-capillare e contribuendo alla formazione dei villi terminali. Ciascun villo terminale è formato da una o due anse capillari e rappresentano i siti definitivi in cui avvengono gli scambi gassosi (Zygmunt, et al. 2003) (Kaufmann P 2004) (Gourvas V 2012).

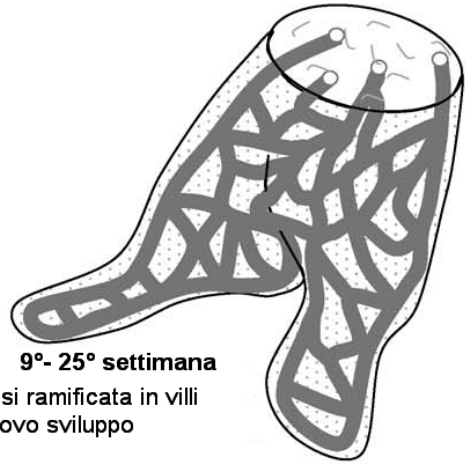


**5°- 6° settimana**  
Vasculogenesi

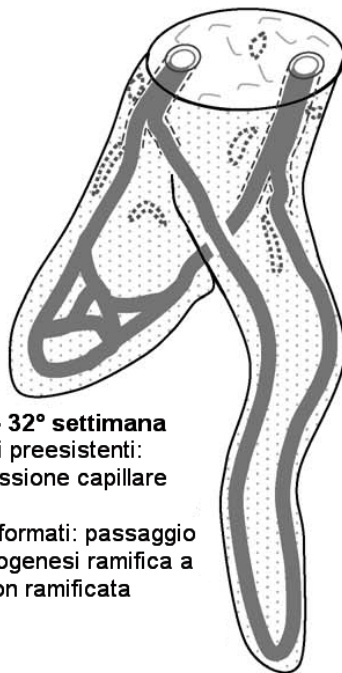


**7°- 9° settimana**

Prevalenza di angiogenesi ramificata in villi preesistenti e di nuovo sviluppo

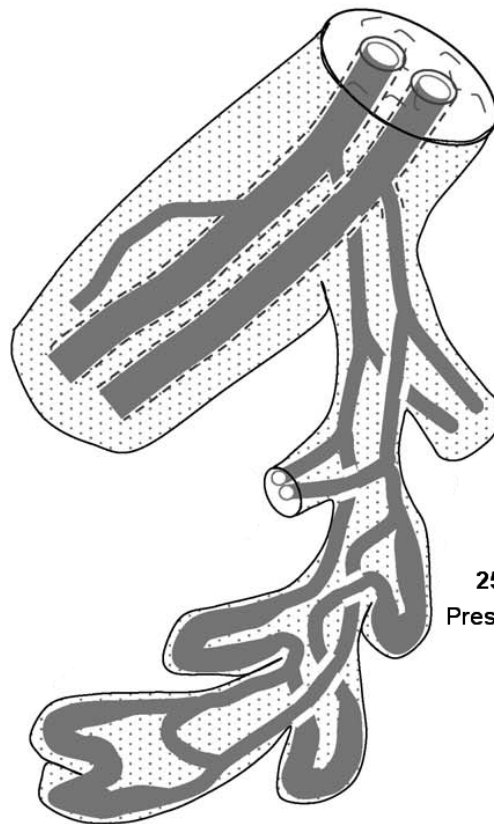


**9°- 25° settimana**



**20°- 32° settimana**  
Villi preesistenti:  
regressione capillare

Villi neoformati: passaggio da angiogenesi ramificata a non ramificata



**25°- 40° settimana**

Presenza di angiogenesi non ramificata

*Figura 7 Fasi di sviluppo della vascolarizzazione placentare. Si identificano tre processi differenti: vasculogenesi, angiogenesi germogliante (o ramificata) e angiogenesi non ramificata (Kaufmann P 2004)*

La vasculogenesi e l'angiogenesi che avvengono durante lo sviluppo della rete vascolare placentare sono regolati da fattori crescita, che vengono espressi sia dal trofoblasto, dove indirizzano la formazione dei vasi placentari e la morfogenesi della placenta, sia dalla placenta stessa (Zygmunt, et al. 2003) (Chen DB 2014). Tra i fattori principali che regolano questi eventi si hanno VEGF, le angiopoietine, PLGF e FGF-2 (Wulff, et al. 2003) (Chen DB 2014).

La presenza di VEGF all'interno dei tessuti placentari sembra svolgere un ruolo nel determinare l'angiogenesi e lo sviluppo della rete vascolare all'interno dei villi nel primo trimestre, mentre la sua espressione negli ultimi periodi della gravidanza sembra essere necessario per il mantenimento dell'integrità dei vasi e la loro permeabilità (Sherer e Abulafia 2001). La sua espressione è evidente soprattutto durante le prime fasi della gravidanza a livello del trofoblasto villosa, mentre i suoi recettori VEGFR-1 e VEGFR-2 sono espressi sia sulle cellule endoteliali villose che sul citotrofoblasto, suggerendo che questo fattore possa essere coinvolto non solo nella vasculogenesi/angiogenesi ma anche nel processo di invasione del trofoblasto (Zygmunt, et al. 2003) (Kaufmann P 2004). Studi hanno dimostrato che l'inattivazione di geni che codificano per VEGF o per i suoi recettori portano a mortalità embrionale come conseguenza di anomalie di sviluppo vascolare, mentre altre ricerche hanno visto che l'espressione di VEGF a livello trofoblastico è risultata essere inferiore in campioni di tessuti alla 8°-9° settimana di gestazione da aborti spontanei ricorrenti: questi elementi suggeriscono e confermano l'importanza di questo fattore durante le iniziali fasi di vasculogenesi placentare (Torry, et al. 2007) (Chen DB 2014) (Rizov, Andreeva e Dimova 2017).

Mentre VEGF si ipotizza possa avere un ruolo importante soprattutto nella vasculogenesi, in particolar modo sul versante fetoplacentare, le angiopoietine sembrano essere coinvolte anche nei processi di rimodellamento vascolare, in particolar modo dei vasi materni, ma che sul versante placentare fetale (Wulff, et al. 2003), principalmente controllando la stabilizzazione dei vasi attraverso un equilibrio tra ANG-1, ANG-2 e il loro recettore Tie-2 (Kaufmann P 2004).

È stato ipotizzato che l'azione sinergica tra VEGF e le angiopoietine, insieme ai rispettivi recettori, medi diverse fasi dello sviluppo placentare:

- VEGF e il suo recettore VEGFR-1, ANG-1 e Tie-2 sembrano essere coinvolti nella differenziazione e l'invasione del trofoblasto;

- VEGF e il recettore VEGFR-2, in associazione con ANG-1 e Tie-2 sembrano favorire l'inizio e la regolazione dello sviluppo vascolare fetoplacentare;
- ANG-2 e Tie-2 sembrerebbero essere coinvolti soprattutto nella stabilizzazione e rimodellamento dei vasi materni (Wulff, et al. 2003).

Anche PLGF è stato riconosciuto come importante fattore che media sia l'angiogenesi placentare che l'attività del trofoblasto. La sua espressione infatti è stata rilevata sia nel trofoblasto villosa che nei vasi sanguigni di calibro maggiore (Sherer e Abulafia 2001) (Zygmunt, et al. 2003). In gravidanze fisiologiche i suoi livelli aumentano durante il secondo semestre di gestazione, raggiungendo un picco tra la 28° e 32° settimana, per poi scendere al momento del parto (Sherer e Abulafia 2001) (Charnock-Jones DS 2004).

Infine, anche FGF-2 sembra avere un ruolo nella vascolarizzazione placentare nell'uomo. La sua presenza è stata rilevata a livello uterino in molte specie, uomo compreso, e si ipotizza che questa sua localizzazione possa poi rappresentare un segnale importante nella crescita vascolare tramite angiogenesi al momento dell'impianto: infatti i suoi recettori sono stati identificati nel citotrofoblasto e questo ha portato ad ipotizzare che FGF2 regoli non solo il processo angiogenico ma anche la proliferazione del citotrofoblasto stesso (Torry, et al. 2007). Sia i tessuti materni che fetali esprimono FGF-2 durante il corso di tutta la gravidanza e ciò suggerisce che questo fattore possa avere un ruolo importante nella differenziazione dei tessuti vascolari e non (Espinosa 2011).

Molti fattori che agiscono nello sviluppo vascolare della placenta sono guidati dalla concentrazione di O<sub>2</sub>, che deve essere finemente regolata in quanto sia condizioni di ipossia eccessive che di iperossia possono avere conseguenze negative nello sviluppo placentare e nella gravidanza. L'ipossia risulta essere un elemento fondamentale per la crescita placentare: incentiva l'invasione del trofoblasto, la sua differenziazione e stimola l'angiogenesi e la vasculogenesi, attraverso l'induzione e il rilascio di fattori angiogenici come VEGF. Il fattore inducibile dell'ipossia (HIF) che viene rilasciato in condizioni di carenza di ossigeno, è espresso ad inizio gravidanza sia dal citotrofoblasto che dal sinciziotrofoblasto e i suoi livelli aumentano soprattutto durante il terzo mese di gestazione, per poi diminuire.

Condizioni di ipossia cronica sono tuttavia associate a disturbi nella placentazione e nello sviluppo embrionale e fetale: studi sui topi hanno dimostrato che livelli elevati di HIF sono

associati a difetti nella formazione dei villi coriali e ad apoptosi delle cellule endoteliali (Krause BJ 2011) (Shaman, Premkumar e Agarwal 2013).

### *Ruolo dello stress ossidativo e dell'ossido nitrico nella vascolarizzazione placentare*

A livello placentare lo stress ossidativo si manifesta come risultante di un temporaneo sbilanciamento tra l'aumentata produzione di radicali liberi dell'ossigeno e l'attività di molecole antiossidanti (Shaman, Premkumar e Agarwal 2013).

Tra i ROS prodotti a livello placentare si hanno soprattutto i radicali superossido ( $O_2^-$ ), perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ), ossido nitrico (NO), monossido di carbonio (CO) e perossinitrito ( $ONOO^-$ ) (Shaman, Premkumar e Agarwal 2013) (Wu, Tian e Lin 2015). Le variazioni di ossigeno che si hanno a livello placentare durante la gravidanza possono contribuire alla produzione di ROS e allo stress ossidativo. A inizio gravidanza lo sviluppo di una rete vascolare nella placenta è correlata ad un aumento dei livelli di ossigeno, che si traduce in un significativo incremento di ROS. Questo incremento si manifesta anche nei mesi di gravidanza successivi, come conseguenza dell'aumento di richieste metaboliche del feto e dell'aumento dei mitocondri placentari (Pereira, et al. 2015).

Durante la gravidanza si assiste ad elevate condizioni di stress, a cui la placenta si adegua gradualmente grazie anche all'azione degli antiossidanti (Lu, et al. 2018). Fino alla 10°-12° settimana non avviene produzione di antiossidanti da parte della placenta stessa, ma successivamente, in concomitanza con un aumento di  $O_2$  si assiste ad una maggior espressione di queste molecole, sia antiossidanti enzimatici che non. Quelli maggiormente espressi sono superossido dismutasi (SOD), catalasi, glutatione perossidasi, tiolo e disolfuro ossidoperossidasi e vitamine C ed E (Shaman, Premkumar e Agarwal 2013).

Per quanto riguarda la funzione dell'ossido nitrico durante la gravidanza e la placentazione, studi hanno dimostrato che questa molecola agisce non solo mediando l'angiogenesi e il tono vascolare, ma svolgendo anche un ruolo nell'impianto, nell'invasione del trofoblasto e nello sviluppo dell'embrione. A livello placentare è stata dimostrata la presenza sia dell'isoforma endoteliale che dell'isoforma inducibile dell'ossido nitrico sintasi. L'isoforma inducibile è espressa soprattutto nell'interfaccia feto-materna ad inizio gravidanza e dalle cellule Hofbauer, raggiungendo poi un picco a metà gestazione. L'isoforma endoteliale, nel primo trimestre della gravidanza, è espressa invece nelle cellule del sinciziotrofoblasto, nell'endotelio dei capillari

villosi immaturi e nel trofoblasto villoso, per poi aumentare e localizzarsi solamente nell'endotelio vascolare e nel sinciziotrofoblasto con il progredire della gravidanza (Krause BJ 2011) (Shaman, Premkumar e Agarwal 2013). Il ruolo di NO durante la fase di angiogenesi placentare è più conosciuto rispetto al suo ruolo durante l'iniziale vasculogenesi. La produzione di NO è indotta sia da VEGF che dalle angiopoietine, che agiscono stimolando l'espressione di eNOS, e la loro azione angiogenica risulta essere mediata da NO stesso. L'importanza di NO durante il processo di vascolarizzazione placentare è sottolineata anche da studi che dimostrano che in animali con carenza di eNOS si assiste ad una crescita vascolare alterata con ridotto sviluppo e disorganizzazione dei vasi. Inoltre l'inibizione di NOS e la delezione del gene che regola la trascrizione di eNOS è associata da una ridotta risposta angiogenica sia a livello placentare che embrionale (Krause BJ 2011).

### **2.3.3 ANGIOGENESI PLACENTARE NELLA BOVINA**

Nella gestione degli allevamenti bovini un elemento importante è rappresentato dall'ottimizzazione delle prestazioni riproduttive. Gli animali possono presentare differenti problemi riproduttivi, tra cui la perdita embrionale precoce, evento che porta a bassi tassi di concepimento (50-60%) nonostante alti tassi di fecondazione (90%). Il corretto sviluppo e funzionamento della placenta risultano essere quindi un elemento fondamentale per il successo dell'impianto e della gestazione (Sousa, et al. 2008) (Chiumia, et al. 2020).

Nella specie bovina la gravidanza ha una durata di circa 280 giorni. La fecondazione ha luogo 48 ore dopo la fine dell'estro a livello dell'ovidutto e la blastocisti giunge in utero intorno al quinto giorno. Inizialmente si trova libera nel corno uterino, circondata dal latte uterino, poi successivamente, intorno all'inizio della quarta settimana di gestazione il trofoblasto entra in contatto con la mucosa uterina. Al trentesimo giorno appaiono i primi abbozzi placentari che rivestono tutta la superficie del corion, con conseguente sviluppo dei cotiledoni, gruppi di villi corionallantoici, in corrispondenza delle caruncole presenti sul versante materno, che continueranno ad aumentare notevolmente di dimensione nelle settimane successive (Van Aarle, et al. s.d.) (Barone 2003). Queste strutture, date dall'unione di cotiledoni e caruncole, come già indicato in precedenza, vengono definite placentomi (Figura 8-9). All'interno di cotiledoni placentari ogni villo è costituito da uno strato esterno di trofoblasto, tessuto mesenchimale e vasi sanguigni, mentre la caruncola materna è formata dall'epitelio della mucosa uterina, stroma e vasi ematici. Nella placenta bovina si ha la presenza di circa 100-140 placentomi, di cui i più sviluppati si trovano in corrispondenza del conceptus, dove è avvenuto l'impianto dell'embrione (Leiser, et al. 1997) (Haeger, Hambruch e Pfarrer 2019). Anche nella bovina, così come nella donna, i villi vengono classificati in villi staminali, intermedi e terminali e presentano al loro interno vasi sanguigni distinguibili in arterie e vene staminali, arteriole e venule intermedie e capillari terminali (Haeger, Hambruch e Pfarrer 2019).

Nella bovina la placenta risulta essere completamente sviluppata a partire dal 170° giorno di gestazione, a seguito del quale si assiste ad un rallentamento della sua crescita con una riorganizzazione e un'espansione soprattutto nelle porzioni più periferiche del placentoma (Leiser, et al. 1997). Questo è dimostrato anche dal fatto che si assiste ad un aumento di peso di caruncole e cotiledoni di 24 e 10 volte dal 100° giorno di gestazione al 250°. Nonostante la crescita placentare rallenti nella seconda metà della gravidanza, le funzioni della placenta

aumentano in questo periodo, in risposta ad un incremento della crescita del feto e delle sue richieste (Reynolds, Borowicz e Vonnahme, et al. 2005). Per poter soddisfare queste condizioni è fondamentale che sia presente a livello placentare un adeguato flusso sanguigno (Reynolds, Borowicz e Caton, et al. 2010). Nella placenta della bovina si assiste ad una continua crescita del letto vascolare durante tutta la gestazione, con associati anche costanti aumenti di flusso ematici uterini (incremento di circa 4 volte dalla metà alla fine della gestazione) e ombelicali (Reynolds, Millaway, et al. 1987) (Reynolds, Borowicz e Vonnahme, et al. 2005).

L'angiogenesi e il rilascio di fattori angiogenici risultano quindi essere essenziali per la crescita dei vasi placentari, per il mantenimento di un adeguato apporto di sostanze e per poter garantire quindi una giusta crescita fetale (Reynolds, Millaway, et al. 1987).

Alcuni studi hanno dimostrato come viene espresso il fattore di crescita VEGF all'interno della placenta bovina durante la gravidanza. È stata valutata la presenza di VEGF sia sul versante placentare materno che sul versante fetale con una localizzazione nell'epitelio uterino, nelle ghiandole uterine, a livello di trofoblasto e nel tessuto vascolare. La presenza di VEGF all'interno delle strutture che compongono il placentoma potrebbe indicare diverse funzioni svolte da questo fattore: gli studi ipotizzano che VEGF possa svolgere un ruolo non solo nell'indirizzare meccanismi di angiogenesi e aumentare la permeabilità vascolare, ma potrebbe anche influenzare la migrazione delle cellule trofoblastiche giganti favorendo gli scambi materno-fetali, avere azione chemiotattica sulle cellule endoteliali dei capillari e agire favorendo l'attività steroidogenica delle cellule trofoblastiche.

Ad inizio gravidanza e fino a metà gestazione è stata dimostrata da questi studi la presenza di VEGF sia a livello del trofoblasto che dell'epitelio uterino. In particolar modo a livello endometriale prima dell'impianto è stata rilevata una bassa immunoreazione per VEGF, che è poi aumentata al momento dell'impianto e nelle fasi successive ad esso. Tra il 15° e il 18° giorno di gravidanza è stato evidenziato un aumento di numerosità dei vasi sanguigni all'interno dell'endometrio materno, indice che VEGF possa migliorare il grado di vascolarizzazione endometriale al momento dell'impianto, elemento fondamentale per il successo dell'impianto stesso. Anche a livello del trofoblasto durante la fase di impianto è stata rilevata la presenza di VEGF e dei suoi recettori, suggerendo che il rilascio di questo fattore dalle cellule trofoblastiche potrebbe avere un effetto paracrino sulla vascolarizzazione endometriale, favorendone l'angiogenesi. Dalla seconda metà della gestazione fino al termine è stato rilevato un calo di espressione di VEGF, che ha continuato a mostrare elevate concentrazioni solo nelle zone di



crescita delle caruncole. In questa fase tardiva della gravidanza entrambi i recettori sono stati identificati nelle cellule endoteliali materne, mentre solo VEGFR-2 è stato evidenziato nelle cellule endoteliali fetali: questa localizzazione può suggerire che in questa fase tardiva VEGF svolga un ruolo nel mediare la permeabilità dei vasi sanguigni materni (Pfarre, et al. 2006) (Sousa, et al. 2008) (Hayashi, et al. 2019).

Una maggiore espressione di VEGF, di circa il 25%, è stata rilevata nelle gravidanze gemellari rispetto alle gravidanze con un solo feto. Nelle gravidanze gemellari è stata riscontrata una maggior massa placentare, un maggior flusso sanguigno a livello uterino e un aumento dei fabbisogni per poter garantire l'accrescimento di entrambi i feti. In quest'ottica si ritiene che una maggior concentrazione di VEGF nel caso di bovine con gemelli sia una conseguenza di queste maggiori richieste vascolari per garantire sviluppo e nutrizione anche del secondo feto e una risposta ad una maggior angiogenesi conseguente ad un maggior volume placentare (Echternkamp, et al. 2006).

Nelle bovine, così come anche nella specie umana, l'utero non è sterile, ma presenta un microbioma che potrebbe andare ad influenzare le capacità riproduttive della madre. Durante la gravidanza l'instaurarsi di infezione batteriche da parte di agenti patogeni può portare a perdita della gravidanza stessa. La presenza di batteri all'interno dell'utero e della placenta durante la gravidanza può però avere anche azione sulla promozione dell'angiogenesi e della vascolarizzazione che avviene in queste sedi. La presenza di batteri, appartenenti ai generi *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Enterococcus* produttori di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sono stati identificati a livello di ovidutto e di utero. L'ipotetica presenza di questi batteri nei siti di attacco placentare e dove producono quantità importanti di ROS (tra cui appunto H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) potrebbe portare alla produzione di fattori di trascrizione che contribuiscono ad un aumento di fattori di crescita, in particolar modo VEGF, con conseguente miglioramento dell'angiogenesi placentare e maggior probabilità di riuscita della gravidanza. Se così fosse ci sarebbe una corrispondenza positiva tra la presenza di batteri e lo sviluppo fetale e placentare. Questo però solo se la concentrazione batterica risulta bassa, per evitare lo sviluppo di batteri opportunisti che potrebbero causare infezione (Owens, et al. 2020).

### 3. CONCLUSIONI

L'apparato riproduttore negli individui di sesso femminile è di fondamentale importanza per il perpetuarsi di ciascuna specie ed è quindi necessario che tutti i meccanismi e gli elementi necessari al suo corretto funzionamento avvengano nel modo più ottimale e fisiologico possibile. Da questo elaborato di tesi si evince come, tra questi elementi, la vascolarizzazione e l'adeguato flusso sanguigno siano fattori indispensabili per il corretto sviluppo e la corretta funzione di ciascun organo di questo apparato. Durante il ciclo estrale o mestruale (in base alla specie considerata) sono numerose le variazioni strutturali e morfologiche che si manifestano, e che sono accompagnate da processi angiogenici necessari a garantire l'adeguato apporto sanguigno e nutrizionale durante ciascun cambiamento.

Tenendo conto delle numerose cellule e fattori che sono coinvolti nel processo angiogenico, si può evincere come sia complicata la fine regolazione dell'angiogenesi.

Ad oggi molti studi riguardanti il processo angiogenico che avviene all'interno dell'apparato riproduttore sono stati effettuati al fine di evidenziare i meccanismi che avvengono nella specie umana, per poter anche comprendere al meglio il ruolo di questo processo nello sviluppo di patologie.

Anche nei nostri animali domestici, sia da compagnia che da reddito, la funzione riproduttiva svolge un ruolo molto importante, e anch'essi sono soggetti a patologie a carico di questo apparato. L'intenzione di inserire in questo elaborato un approfondimento sulla bovina è data dal mio interesse nei confronti di questa specie, nel quale l'apparato riproduttore ha un ruolo essenziale. Ad oggi molti studi sulla bovina si basano su ciò che, dal punto di vista angiogenico, avviene durante i normali processi fisiologici.

Una approfondimento sullo stadio dei meccanismi di angiogenesi in corso di patologie riproduttive, non solo nella bovina ma anche in altre specie domestiche, potrebbe aiutare a comprendere i vari meccanismi patogenetici che portano allo sviluppo di disfunzioni del tratto riproduttivo.

# BIBLIOGRAFIA

- Alma Res* s.d. <https://www.almares.it/importanza-fsh-indicazioni-fertilita-valori-corretti-cause-alti-follicologenesi/>.
- About angiogenesis* | *The Angiogenesis Foundation*. s.d. <https://angio.org/about-angiogenesis/>.
- Agarwal, A, S Gupta, e RK Sharma. «Role of oxidative stress in female reproduction.» *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2005.
- Akwii, RG, MdS Sajib, FT Zahra, e CM Mikelis. «Role of Angiopoietin-2 in vascular physiology and pathophysiology.» *Cell*, 2019.
- Albrecht ED, Pepe GJ. «Steroid hormone regulation of angiogenesis in the primate endometrium.» *Frontiers in Bioscience*, 2003: 416 - 429.
- Andrae, J, R Gallini, e C Betsholtz. «Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine.» *Genes & Development*, 2008: 1276 - 1312.
- Apte, RS, DS Chen, e N Ferrara. «VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development.» *Cell*, 2019: 1248 - 1264.
- Bagnato, A, et al. «Gestione clinica della riproduzione bovina.» 90 - 92. *Le Point Veterinaire Italie*, 2013.
- Bardin, N, P Murthi, e N Alfaidy. «Normal and pathological placental angiogenesis.» *BioMed Research International*, 2015.
- Barone, B. «Annessi fetali e placenta.» In *Anatomia comparata dei mammiferi domestici. Vol. 4 Splancnologia. Apparacchio uro-genitale, feto e i suoi annessi, peritoneo e topografia addominale*. Edagricole, 2003.
- Barone, B. «Apparacchio genitale femminile.» Cap. Parte I - Cap. 3 in *Anatomia comparata dei mammiferi domestici. Vol. 4 Splancnologia. Apparacchio uro-genitale, feto e i suoi annessi, peritoneo e topografia addominale*, 223 - 364. Edagricole, 2003.
- Barone, B. «Embriogenesi e formazione degli annessi.» Cap. Parte II - Cap. 1 in *Anatomia comparata dei mammiferi domestici. Vol. 4 Splancnologia. Apparacchio uro-genitale, feto e i suoi annessi, peritoneo e topografia addominale*, 413 - 451. Edagricole, 2003.

- Barut, F, et al. «Intrauterine growth restriction and placental angiogenesis.» *Diagnostic Pathology*, 2010.
- Basini, G, e F Grasselli. «Nitric oxide in follicle development and oocyte competence.» *Reproduction*, 2015: R1 - R9.
- Bentley, K, e S Chakravartula. «The temporal basis of angiogenesis.» *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2017.
- Berisha, B, D Schams, D Rodler, e MV Pfaffl. «Angiogenesis in the ovary – The most important regulatory event for follicle and corpus luteum development and function in cow - An overview.» *Anatomia, histologia, embryologia*, 2016: 124 - 130.
- Berisha, B, e D Schams. «Ovarian function in ruminants.» *Domestic Animal Endocrinology*, 2005: 305 - 317.
- Betz, C, A Lenard, HG Belting, e M Affolter. «Cell behaviors and dynamics during angiogenesis.» *Development*, 2016: 2249 - 2260.
- Billhaq, DH, SH Lee, e S Lee. «The potential function of endometrial-secreted factors for endometrium remodeling during the estrous cycle.» *Animal Science Journal*, 2020.
- Blois, SM, BF Klapp, e G Barrientos. «Decidualization and angiogenesis in early pregnancy: unravelling the functions of DC and NK cells.» *Journal of Reproductive Immunology*, 2011: 86 - 92.
- Bortolami, R, E Callegari, e V Beghelli. «Anatomia e fisiologia degli animali domestici.» Cap. 8 - Apparato urogenitale, 317 - 384. Edagricole, 2006.
- Bruno JB, Matos MHT, Chaves RN, Celestino JJH, Saraiva MVA, Lima-Verde LB, Araújo VR, Figueiredo JR. «Angiogenic factors and ovarian follicle development.» *Animal Reproduction*, 2009: 371 - 379.
- Budani MC, Tiboni GM. «Novel insights on the role of nitric oxide in the ovary: a review of the literature.» *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2021.
- Cameron IT, Campbell S. «Nitric oxide in the endometrium.» *Human Reproduction Update*, 1998: 565 - 569.

- Carmeliet P, Jain KR. «Molecular mechanisms and application of angiogenesis.» *Nature*, 2011: 298 - 307.
- Carmeliet, P. «Angiogenesis in health and disease.» *Nature Medicine*, 2003: 653-660.
- Charnock-Jones DS, Kaufmann P, Mayhew TM. «Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. I. Molecular Regulation.» *Placenta*, 2004: 103 - 113.
- Chau K, Hennessy A, Makris A. «Placental growth factor and pre-eclampsia.» *Journal of human hypertension*, 2017: 782 - 786.
- Chen DB, Zheng J. «Regulation of placental angiogenesis.» *Microcirculation*, 2014: 15 - 25.
- Chen X, Man GCW, Liu Y, Wu F, Huang J, Li TC, Wang CC. «Physiological and pathological angiogenesis in endometrium at the time of embryo implantation.» *American Journal of Reproductive immunology*, 2017.
- Chiumia, D, et al. «Vascular endothelial growth factor A and VEGFR-1 change during preimplantation in heifers.» *International Journal of Molecular Sciences*, 2020.
- Cooke JP, Losordo DW. «Nitric oxide and angiogenesis.» *Circulation*, 2002: 2133 - 2135.
- Critchley HOD, Maybin JA, Armstrong GM, Williams ARW. «Physiology of the Endometrium and Regulation of Menstruation.» *Physiological Reviews*, 2020: 1149 - 1179.
- D'Andrea LD, Del Gatto A, Pedone C, Benedetti E. «Peptide-based molecules in angiogenesis.» *Chemical biology & drug design*, 2006: 115 - 126.
- De Heer EC, Jalving M, Harris AL. «HIFs, angiogenesis, and metabolism: elusive enemies in breast cancer.» *The journal of clinical investigation*, 2020: 5074 - 5087.
- De Spiegelaere W, Casteleyn C, Van den Broeck W, Plendl J, Bahramsoltani M, Simoens P, Djonov V, Cornillie P. «Intussusceptive angiogenesis: a biologically relevant form of angiogenesis.» *Journal of vascular research*, 2012: 390 - 404.
- Demir R, Kayisli UA, Cayli S, Huppertz B. «Sequential steps during vasculogenesis and angiogenesis in the very early human placenta.» *Placenta*, 2006: 535 - 539.
- Demir, R, A Yaba, e B Huppertz. «Vasculogenesis and angiogenesis in the endometrium during menstrual cycle and implantation.» *Acta Histochemica*, 2010: 203 - 214.

- Devesa J, Caicedo D. «The role of growth hormone on ovarian functioning and ovarian angiogenesis.» *Frontiers of endocrinology*, 2019.
- Djonov V, Schmid M, Tschanz SA, Burri PH. «Intussusceptive Angiogenesis Its Role in Embryonic Vascular Network Formation.» *Circulation Research*, 2000: 286 -292.
- Douglas NC, Nakhuda GS, Sauer MV, Zimmermann RC. «Angiogenesis and ovarian function.» *J Fertil Reprod*, 2005: 7 - 15.
- Duffy DM, Ko C, Jo M, Brannstrom M, Curry TE. «Ovulation: parallels with inflammatory Process.» *Endocrine Reviews*, 2019: 369 - 416.
- Echternkamp, SE, KA Vonnahme, JA Green, e Ford SP. «Increased vascular endothelial growth factor and pregnancy-associated glycoproteins, but not insulin-like growth factor-I, in maternal blood of cows gestating twin fetuses.» *Journal of Animal Science*, 2006: 2057 - 2064.
- Eelen G, Treps L, Li X, Carmeliet P. «Basic and therapeutic aspects of angiogenesis updated.» *Circulation research*, 2020: 310-329.
- Espejel, MC, e A Medrano. «Histological cyclic endometrial changes in dairy cows: an overview.» *Journal of Dairy & Veterinary Sciences*, 2017.
- Espinosa, C.R. «Angiogénesis en la placenta de los animales domésticos.» *Angiogénesis placentaria*, 2011: 131 - 138.
- Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. «The biology of VEGF and its receptors.» *Nature Medicine*, 2003: 669 - 676.
- Fraser HM, Lunn SF. «Angiogenesis and its control in the female reproductive system.» *British Medical Bulletin*, 2000: 787 - 797.
- Fraser, HM. «Regulation of the ovarian follicular vasculature.» *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2006.
- Freitas C, Neto AC, Matos L, Silva E, Ribeiro Â, Silva-Carvalho JL, Almeida H. «Follicular fluid redox involvement for ovarian follicle growth.» *Journal of Ovarian Research*, 2017.
- Gargett CE, Rogers PAW. «Human endometrial angiogenesis.» *Reproduction*, 2001: 181 - 186.

- Geva E, Jaffe RB. «Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology and pathology.» *Fertility and Sterility*, 2000: 429 - 438.
- Gourvas V, Dalpa E, Vrachnis N, Sifakis S. «Placental angiogenesis and fetal growth restriction.» *From Preconception to Postpartum*, 2012: 179 - 186.
- Grant MA, Kalluri R. «Structural basis for the functions of endogenous angiogenesis inhibitors.» *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 2005: 399 - 410.
- Gupta S, Sekhon L, Aziz N, Agarwal A. «The impact of oxidative stress on female reproduction and ART: an evidence-based review.» *Infertility and Assisted Reproduction*, 2008: 178 - 186.
- Haeger, JD, N Hambruch, e C Pfarrer. «Placental development and its control in cattle.» *Bioscientifica Proceedings*, 2019.
- Hayashi, KG, M Hosoe, S Fujii, H Kanahara, e R Sakumoto. «Temporal expression and localization of vascular endothelial growth factor family members in the bovine uterus during peri-implantation period.» *Theriogenology*, 2019: 56 - 64.
- Herrmann G, Spanel-Borowski K. «A sparsely vascularised zone in the cortex of the bovine ovary.» *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 1998: 143 - 146.
- Hillen F, Griffioen AW. «Tumor vascularization: sprouting angiogenesis and beyond.» *Cancer metastasis review*, 2007: 489 - 502.
- Hisamichi N, Tomohiro I, Nobuyuki T. «Mechanisms of new blood-vessel formation and proliferative heterogeneity of endothelial cells.» *International Immunology*, 2020: 295 - 305.
- Isobe N, Kitabayashi M, yoshimura Y. «Expression of vascular endothelial growth factor receptors in bovine cystic follicles.» *Reproduction in domestic animals*, 2008: 267 - 271.
- Jabbour, HN. «Vascular function in female reproduction.» *Reproduction*, 2009: 867 - 868.
- Jiang JY, Macchiarelli G, Tsang BK, Sato E. «Capillary angiogenesis and degeneration in bovine ovarian antral follicles.» *Reproduction*, 2003: 211 - 223.
- Karamysheva, AF. «Mechanisms of angiogenesis.» *Biochemistry*, 2008: 751 - 762.

- Kaufmann P, Mayhewb TM, Charnock-Jones DS. «Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. II. Changes during normal pregnancy.» *Placenta*, 2004: 114 - 126.
- Kim, YW, e TV Byzova. «Oxidative stress in angiogenesis and vascular disease.» *Blood*, 2014: 625 - 631.
- Krause BJ, Hanson MA, Casanello P. «Role of nitric oxide in placental vascular development and function.» *Placenta*, 2011: 797 - 805.
- Lam, PM, e C Haines. «Vascular endothelial growth factor plays more than an angiogenic role in the female reproductive system.» *Fertility and Sterility*, 2005: 1775 - 1778.
- Lawler, PR, e J Lawler. «Molecular basis for the regulation of angiogenesis by Thrombospondin-1 and -2.» *Cold spring harbor perspectives in medicine*, 2012.
- Leiser, R, et al. «Fetal villosity and microvasculature of the bovine placentome in the second half of gestation.» *Journal of anatomy*, 1997: 517 - 527.
- Liekens, S, E De Clercq, e J Neyts. «Angiogenesis: regulators and clinical applications.» *Biochemical Pharmacology*, 2001: 253 - 270.
- Lu, E, C Li, J Wang, e C Zhang. «Inflammation and angiogenesis in the corpus luteum.» *The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 2019: 1967 - 1974.
- Lu, J, Z Wang, J Cao, Y Chen, e Y Dong. «A novel and compact review on the role of oxidative stress in female reproduction.» *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2018.
- Malamitsi-Puchner, A, A Sarandakou, J Tziotis, A Stavreus-Evers, A Tzonou, e BM Landgren. «Circulating angiogenic factors during periovulation and the luteal phase of normal menstrual cycles.» *Fertility and Sterility*, 2004: 1322 - 1327.
- Marech , I, et al. «Classical and non-classical proangiogenic factors as a target of antiangiogenic therapy in tumor microenvironment.» *Cancer letter*, 2016: 216 - 226.
- Martelli, A, et al. «Insights into ovarian follicle angiogenesis: morphological and chronological vascular remodeling from primordial to ovulating follicles.» *SM Vacular Medicine*, 2017.



- Melincovici, CS, et al. «Vascular endothelial growth factor (VEGF) - key factor in normal and pathological angiogenesis.» *Romanian journal of morphology and embryology*, 2018: 455 - 467.
- Mentzer, SA, e MA Konerding. «Intussusceptive angiogenesis: expansion and remodeling of microvascular networks.» *Angiogenesis*, 2014: 499 - 509.
- Morelli, S, M Mandal, LT Goldsmith, BN Kashani, e Ponzio NM. «The maternal immune system during pregnancy and its influence on fetal development.» *Research and Reports in Biology*, 2015: 171 - 189.
- Nath, P, e S Maitra. «Physiological relevance of nitric oxide in ovarian functions: an overview.» *General and Comparative Endocrinology*, 2019: 35 - 44.
- Nowak-Sliwinska P, et al. «Consensus guidelines for the use and interpretation of angiogenesis assays.» *Angiogenesis*, 2018: 425-532.
- Omorphos, NP, C Gao, SS Tan, e MS Sangha. «Understanding angiogenesis and the role of angiogenic growth factors in the vascularisation of engineered tissues.» *Molecular Biology Report*, 2021: 941 - 950.
- Omorphos, NP, C Gao, SS Tan, e MS Sangha. «Understanding angiogenesis and the role of angiogenic growth factors in the vascularisation of engineered tissues.» *Molecular Biology Reports*, 2021: 941 - 950.
- Owens, CE, KM Daniels, AD Ealy, KF Knowlton, e RR Cockrum. «Graduate Student Literature Review: Potential mechanisms of interaction between bacteria and the reproductive tract of dairy cattle.» *Journal of Dairy Science*, 2020: 10951-10960.
- Parmar D, Apte M. «Angiopoietin inhibitors: A review on targeting tumor angiogenesis.» *European Journal of Pharmacology*, 2021.
- Pazienti.it*. s.d. <https://www.pazienti.it/contenuti/anatomia/placenta>.
- Pelagalli, GV, L Castaldo, C Lucini, M Patruno, e P Scocco . «Gametogenesi.» Cap. 2 in *Embriologia Morfogenesi e anomalie dello sviluppo*, di Castaldo L, Lucini C, Patruno M, Scocco P Pelagalli GV, 9 - 30. Idelson-Gnocchi, 2014.

- Pelagalli, GV, L Castaldo, C Lucini, M Patruno, e P Scocco. «Gli Annessi Embrionali.» Cap. 11 in *Embriologia Morfogenesi e Anomalie della Sviluppo*, di Castaldo L, Lucini C, Patruno M, Scocco P Pelagalli GV, 123 - 135. Idelson-Gnocchi, 2014.
- Pereira, RD, NE De Long, RC Wang, FT Yazdi, AC Holloway, e S Raha. «Angiogenesis in the placenta: the role of reactive oxygen species signaling.» *BioMed Research International*, 2015.
- Pfarre, CD, et al. «Localization of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors VEGFR-1 and VEGFR-2 in bovine placentomes from implantation until term.» *Placenta*, 2006: 889 - 898.
- Plaisier, M. «Decidualisation and angiogenesis.» *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 2011: 259 - 271.
- Plendl, J. «Angiogenesis and vascular regression in the ovary.» *Anatomia, histologia, hembryologia*, 2000: 257 - 266.
- Potente, M, H Gerhardt, e P Carmeliet. «Basic and therapeutic aspects of angiogenesis.» *Cell*, 2011: 873 - 887.
- Radziwon-Balicka, A, C Ramer, C Moncada de la Rosa, B Zielnik-Drabik, e P Jurasz. «Angiostatin inhibits endothelial MMP-2 and MMP-14 expression: a hypoxia specific mechanism of action.» *Vascular pharmacology*, 2013: 280 - 291.
- Raica, M, e AM Cimpean. «Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)/PDGF receptors (PDGFR) axis as target for antitumor and antiangiogenic therapy.» *Pharmaceuticals*, 2010: 572 - 599.
- Reynolds, LP, AT Grazul-Bilska, e DA Redmer. «Angiogenesis in the female reproductive organs: pathological implication.» *International journal of experimental pathology*, 2002: 151 - 163.
- Reynolds, LP, DS Millaway, JD Kirsch, JE Infeld, e DA Redmer. «Angiogenic activity of placental tissues of cows.» *Journal of reproduction and fertility*, 1987: 233 - 240.
- Reynolds, LP, e DA Redmer. «Angiogenesis in the placenta.» *Biology of Reproduction*, 2001: 1033 - 1040.
- Reynolds, LP, et al. «Animal models of placental angiogenesis.» *Placenta*, 2005: 689 - 708.

- Reynolds, LP, et al. «Uteroplacental vascular development and placental function: an update.» *The International Journal of Developmental Biology*, 2010: 355 - 365.
- Ribatti, D, e E Crivellato. «Immune cells and angiogenesis.» *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2009: 2822 - 2833.
- Rizov, M, P Andreeva, e I Dimova. «Molecular regulation and role of angiogenesis in reproduction.» *Taiwanese journal of obstetrics & gynecology*, 2017: 127 - 132.
- Robinson, RS. «The critical importance of ovarian angiogenesis.» *Reproduction, Fertility and Development*, 2013.
- Robinson, RS, KJ Woad, AJ Hammond, M Laird, MG Hunter, e GE Mann. «Angiogenesis and vascular function in the ovary.» *Reproduction*, 2009: 869 - 881.
- Rosselli, M. «Nitric oxide and reproduction.» *Molecular Human Reproduction*, 1997: 639 - 641.
- Sapere.it. s.d. <https://www.sapere.it/enciclopedia/trofoblasto.html>.
- Saravanan, S, S Vimalraj, K Pavani, R Nikarika, e VN Sumantran. «Intussusceptive angiogenesis as a key therapeutic target for cancer therapy.» *Life Science*, 2020.
- Senger, DR, e GE Davis. «Angiogenesis.» *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2011.
- Serenelli, G. *Antiangiogenesi e cellule staminali tumorali*. 2012. <https://www.dottnet.it/articolo/10063/antiangiogenesi-e-cellule-staminali-tumorali>.
- Shaman, A, BJ Premkumar, e A Agarwal. «Placental vascular morphogenesis and oxidative stress.» In *Studies on Women's Health*, di Aziz N, Rizk B Agarwal A, 95 - 113. 2013.
- Sherer, DM, e O Abulafia. «Angiogenesis during implantation, and placental and early embryonic development.» *Placenta*, 2001: 1 - 13.
- Sivridis, E, e A Giatromanolaki. «New insights into the normal menstrual cycle-regulatory molecules.» *Histology and Histopathology*, 2004: 511 - 516.
- Sjaastad, OV, O Sand, e K Hove. «Fisiologia degli animali domestici.» Cap. 19, 676 - 726. Casa Editrice Ambrosiana, 2013.
- Smith, SK. «Regulation of angiogenesis in the endometrium.» *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 2001: 147 - 151.

- Sousa, LMMC, DB Campos, J Buratini Jr, M Binelli, e PC Papa. «Growth factors and steroidogenesis in the bovine placenta.» *Animal Reproduction*, 2008: 3 - 15.
- Spagnolo, M. 2020. <https://ruminantiamese.ruminantia.it/i-fattori-di-rischio-delle-cisti-ovariche-nella-bovina-da-latte/>.
- Stassi, AF, et al. «Contribution of the VEGF system to the follicular persistence associated with bovine cystic ovaries.» *Theriogenology*, 2019: 52 - 65.
- Tamanini, C, e M De Ambrogi. «Angiogenesis in developing follicle and corpus luteum.» *Reproduction in Domestic Animal*, 2004: 206 - 216.
- Tamanini, C, G Basini, F Grasselli, e M Tirelli. «Nitric oxide and the ovary.» *Journal of Animal Science*, 2003: E1 - E7.
- Tasaki, Y, R Nishimura, M Shibaya, HY Lee, TJ Acosta, e K Okuda. «Expression of VEGF and its receptors in the bovine endometrium throughout the estrous cycle: effect of VEGF on prostaglandin production in endometrial cells.» *Journal of Reproduction and Development*, 2010: 223 - 229.
- Thiyagarajan, DK, H Basit, e R Jeanmonod. *Physiology, Menstrual Cycle*. 2021. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500020/?report=classic>.
- Torry, DS, et al. «Angiogenesis in implantation.» *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 2007: 303 - 315.
- Treccani . s.d. [https://www.treccani.it/enciclopedia/dal-concepimento-alla-nascita\\_%28Universo-del-Corpo%29/](https://www.treccani.it/enciclopedia/dal-concepimento-alla-nascita_%28Universo-del-Corpo%29/).
- Tropea, T, et al. *La funzione luteale e i suoi fattori di modulazione*. s.d. [http://www.sidr.it/cms/view/repronews/elenco\\_numeri/7\\_2\\_maggio\\_2005/elenco\\_news/la\\_funzione\\_luteale\\_e\\_i\\_suoi\\_fattori\\_di\\_modulazione/s6468/c22337.html](http://www.sidr.it/cms/view/repronews/elenco_numeri/7_2_maggio_2005/elenco_news/la_funzione_luteale_e_i_suoi_fattori_di_modulazione/s6468/c22337.html).
- Uccelli, A, et al. «Vascular endothelial growth factor biology for regenerative angiogenesis.» *Swiss Medical Weekly*, 2019.
- «La riproduzione nel bovino.» In *Compendio di Riproduzione animale*, di P Van Aarle, et al., 13. Intervet, s.d.

- Varughese, EE, PS Brar, e SS Ghuman. «Vascularization to preovulatory follicle and corpus luteum-a valuable predictor of fertility in dairy cows.» *Theriogenology*, 2017: 59 - 68.
- Weston, G, e PA Rogers. «Endometrial angiogenesis.» *Baillière's best practice & research. Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 2000: 919 - 936.
- Woad, KJ, e RS Robinson. «Luteal angiogenesis and its control.» *Theriogenology*, 2016: 221 - 228.
- Wu, F, FJ Tian, e Y Lin. «Oxidative stress in placenta: health and diseases.» *BioMed Research International*, 2015.
- Wulff, C, M Weigand, R Kreienberg, e HM Fraser. «Angiogenesis during primate placentation in health and disease.» *Reproduction*, 2003: 569 - 577.
- Zimna, A, e K Maciej. «Hypoxia-inducible factor-1 in physiological and pathophysiological angiogenesis: applications and therapies.» *BioMed research international*, 2015.
- Zucchelli, E, QA Majid, e G Foldes. «New artery of knowledge: 3D models of angiogenesis.» *Vascular Biology*, 2019: 135 - 143.
- Zygmunt, M, F Herr, K Münstedt, U Lang, e OD Liang. «Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy.» *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 110 (2003): S10 - S18.