



Articolo

# Impatto dei vaccini mRNA e inattivati contro il COVID-19 sulla riserva ovarica

Enes Karaman<sup>1,\*</sup>, Adem Yavuz<sup>2</sup>, Erol Karakas<sup>3</sup>, Esra Balcioglu<sup>4</sup>, Busra Karaca<sup>5</sup>, Hande Nur Doganay<sup>6</sup>, Koray Gorkem Sacinti<sup>7</sup> e Orhan Yildiz<sup>8</sup>

- <sup>1</sup> Dipartimento di Ostetricia e Ginecologia, Facoltà di Medicina, Università Nigde Omer Halisdemir, 51240 Nigde, Turchia
- <sup>2</sup> Facoltà di Scienze della Salute, Università della Cappadocia, 50400 Nevşehir, Turchia
- <sup>3</sup> Op. Dott. Erol Karakas Clinica di Ginecologia-Ostetricia-Estetica Genitale e Salute Sessuale, 38140 Kayseri, Turchia
- <sup>4</sup> Dipartimento di Istiologia ed Embriologia, Facoltà di Medicina, Università di Erciyes, 38030 Kayseri, Turchia Hakan Cetinsaya Centro di Buona Pratica Clinica e Ricerca, 38030 Kayseri, Turchia
- <sup>5</sup> Clinica di ostetricia e ginecologia, Ospedale universitario di formazione e ricerca Nigde Omer Halisdemir, 51100 Nigde, Turchia
- <sup>7</sup> Clinica di ostetricia e ginecologia, Ospedale di formazione e ricerca di Aksaray, 68200 Aksaray, Turchia
- <sup>8</sup> Dipartimento di microbiologia clinica e malattie infettive, Facoltà di medicina, Università di Erciyes, 38030 Kayseri, Turchia
- \* Corrispondenza: eneskaraman@ohu.edu.tr ; Tel.: +90-538-063-3838

**Abstract:** **Obiettivi:** Questo studio mirava a chiarire gli effetti dei vaccini a RNA messaggero (mRNA) e del vaccino contro la malattia da coronavirus inattivato 2019 (COVID-19) sull'istologia ovarica e sulla riserva nei ratti. **Metodi:** Trenta ratti albini Wistar femmine, di età compresa tra 16 e 24 settimane, sono stati divisi casualmente in tre gruppi ( $N=10$ ): gruppi di controllo, vaccino a mRNA e vaccino inattivato. Ogni gruppo vaccinale ha ricevuto due dosi (il giorno 0 e il giorno 28) a dosi equivalenti a quelle umane. Quattro settimane dopo la seconda vaccinazione, sono stati prelevati tessuti ovarici per l'analisi. **Risultati:** È stata eseguita un'analisi immunoistochimica per valutare l'espressione del fattore di crescita trasformante beta-1 (TGF-β1), del fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF), della caspasi-3 e dell'ormone antimulleriano (AMH) nei follicoli ovarici. Entrambi i vaccini hanno indotto aumenti significativi nell'espressione di TGF-β1, VEGF e caspasi-3, con effetti più pronunciati nel gruppo del vaccino a mRNA. Al contrario, l'espressione di AMH nelle cellule della granulosa dei follicoli primari, secondari e antrali ha mostrato marcate riduzioni ( $P<0,001$ ). Il conteggio dei follicoli primordiali, primari e secondari è diminuito significativamente nel gruppo del vaccino inattivato rispetto ai controlli e ulteriormente nel gruppo del vaccino mRNA rispetto al gruppo inattivato ( $P<0,001$ ). Inoltre, il gruppo del vaccino mRNA ha mostrato una diminuzione dei follicoli antrali e preovulatori e un aumento dei follicoli atretici rispetto agli altri gruppi ( $P<0,05$ ). Il livello sierico di AMH è diminuito con la vaccinazione a mRNA rispetto al gruppo di controllo e a quello inattivato. **Conclusioni:** I nostri risultati suggeriscono che sia i vaccini a mRNA che quelli inattivati contro il COVID-19 possano avere un impatto negativo sulla riserva ovarica nei ratti, principalmente attraverso un'accelerazione della perdita follicolare e alterazioni nei percorsi apoptotici durante la folliculogenesi. Alla luce di queste osservazioni in un modello di ratto, sono necessarie ulteriori indagini sugli effetti dei vaccini sulla riserva ovarica umana.



Redattori accademici: Yashdeep Phanse e Apostolos P. Georgopoulos

Ricevuto: 30 gennaio 2025

Revisionato: 8 marzo 2025

Accettato: 21 marzo 2025

Pubblicato: 24 marzo 2025

**Citazione:** Karaman, E.; Yavuz, A.; Karakas, E.; Balcioglu, E.; Karaca, B.; Doganay, H.N.; Sacinti, K.G.; Yildiz, O. Impatto dell'mRNA e dei vaccini COVID-19 inattivati sulla riserva ovarica. *Vaccin* **2025**, *13*, 345. <https://doi.org/10.3390/vaccini13040345>

**Copyright:** © 2025 degli autori.

Titolare della licenza MDPI, Basilea, Svizzera.

Questo articolo è un articolo open access distribuito secondo i termini e le condizioni della licenza Creative Commons Attribution (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Parole chiave:** ratto; vaccino a mRNA; vaccini inattivati contro il COVID-19; riserva ovarica; atresia follicolare

## 1. Introduzione

Il COVID-19, attribuito al nuovo coronavirus SARS-CoV-2 (Sindrome respiratoria acuta grave), identificato per la prima volta nel dicembre 2019, ha scatenato una crisi sanitaria globale [1]. In seguito alla divulgazione del genoma virale da parte degli scienziati cinesi nel gennaio 2020, originato dai primi casi di polmonite a Wuhan, la comunità scientifica globale si è rapidamente mobilitata per sviluppare contromisure [2]. Nel dicembre 2022, dodici vaccini avevano ricevuto l'approvazione dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), impiegando diversi approcci tecnologici [3]. I vaccini contro il COVID-19 rappresentano ancora un approccio efficace per proteggersi dal COVID-19 e sono raccomandati per le donne in età riproduttiva [4]. Nonostante la loro comprovata efficacia, nuovi studi hanno rilevato irregolarità mestruali a seguito della somministrazione di vaccini COVID-19 che utilizzano vettori mRNA e adenovirus, sebbene alcuni studi non riportino alcuna associazione significativa [5–7]. Ciò ha spinto ad avviare indagini sui potenziali collegamenti tra questi vaccini e disturbi della salute riproduttiva [8–11].

Il successo della riproduzione dipende da una complessa interazione di processi biologici, in cui le ovaie e i follicoli ovarici svolgono un ruolo fondamentale [12]. Le funzioni primarie delle ovaie includono la produzione e il rilascio periodico di ovociti, nonché la secrezione di ormoni steroidei [13,14]. I follicoli ovarici, l'unità funzionale delle ovaie, sono costituiti da ovociti, cellule della granulosa (GC) e cellule della teca (TC) [14]. Sviluppo follicolare, che sostiene i processi fisiologici dell'estro e dell'ovulazione [15], inizia con la trasformazione dei follicoli primordiali nel pool follicolare in crescita, avanzando attraverso stadi progressivamente maturi [16]. Questa crescita culmina nell'emersione di un follicolo dominante, che rilascia un ovocita maturo, oppure porta all'atresia follicolare [17]. La transizione dai follicoli primordiali a quelli primari, nota come reclutamento iniziale, è regolata da una serie di fattori paracrini indipendenti dall'ormone follicolo-stimolante (FSH). Durante il reclutamento ciclico, livelli elevati di FSH circolante promuovono la sopravvivenza di una coorte di follicoli antrali (2-5 mm di diametro), prevenendone la morte per apoptosi [18].

La funzionalità delle ovaie e dei follicoli ovarici è mantenuta attraverso l'angiogenesi continua, il processo mediante il quale nuovi vasi sanguigni si sviluppano dalla vascolatura preesistente [19]. Il VEGF è considerato un mediatore critico nel reclutamento vascolare necessario per il nutrimento del follicolo [20]. Inoltre, la segnalazione tramite la famiglia del fattore di crescita trasformante beta (TGF- $\beta$ ), che include gli isoformi AMH e TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ 1-3), svolge un ruolo fondamentale nella regolazione della folliculogenesi ovarica, influenzata da fattori sia intra- che extraovarici [21]. L'ormone antimulleriano (AMH), secreto dalle cellule della granulosa (GC) dei follicoli in via di sviluppo, è noto per sopprimere l'attivazione dei follicoli primordiali nei topi [22] e per moderare la crescita follicolare guidata dall'FSH [23]. Il TGF- $\beta$ 1, in particolare, inibisce notevolmente l'attivazione dei follicoli primordiali e induce l'apoptosi degli ovociti [24]. L'apoptosi, il principale processo cellulare che porta all'atresia follicolare ovarica, presenta in modo prominente la caspasi-3 come suo principale enzima effettore [25].

Precedenti studi osservazionali che analizzavano campioni di sangue di donne in età riproduttiva affette da COVID-19 hanno riportato risultati incoerenti per quanto riguarda gli ormoni sessuali e la riserva ovarica [26]. D'altra parte, la maggior parte dei dati riguardanti l'impatto dei vaccini COVID-19 sulla fertilità femminile deriva da indagini sugli esiti della riproduzione assistita tra le donne infertili [27]. Tuttavia, gli effetti diretti dei vaccini contro il COVID-19 sui follicoli ovarici e sulla riserva ovarica non sono ancora stati completamente chiariti all'interno del tessuto ovarico stesso. Nel nostro studio, miriamo a indagare gli effetti dei vaccini mRNA e inattivati contro il COVID-19 sui follicoli ovarici e sulla riserva ovarica quantificando l'espressione di TGF- $\beta$ 1, VEGF, caspasi-3 e AMH, nonché le fasi di sviluppo follicolare nel tessuto ovarico di ratto dopo la vaccinazione.

## 2. Materiali e metodi

### 2.1. Dichiarazione etica

Il protocollo dello studio ha ricevuto l'approvazione etica dal Comitato etico locale per gli esperimenti sugli animali dell'Università di Erciyes (approvazione n. 22/041, data: 2 marzo 2022) ed è stato condotto presso il Centro di ricerca e applicazione sperimentale dell'Università di Erciyes (DEKAM).

### 2.2. Animali da esperimento e cura

Trenta ratti albini Wistar femmine, di età compresa tra 16 e 24 settimane e del peso di 240±In questo studio sono stati utilizzati 30 g. Tutte le procedure sperimentali sono state condotte in conformità con la Dichiarazione Universale dei Diritti degli Animali. I ratti sono stati alloggiati in stanze climatizzate, impostate a una temperatura di 22±1°C con un ciclo luce/buio di 12 ore. Ogni gabbia era composta da un massimo di quattro ratti. Avevano accesso a volontà a mangime standard in pellet e acqua di rubinetto per tutta la durata dello studio.

### 2.3. Procedura di vaccinazione

I ratti sono stati suddivisi in modo casuale in tre gruppi di dieci animali ciascuno: Gruppo I (gruppo di controllo), Gruppo II (gruppo del vaccino a mRNA) e Gruppo III (gruppo del vaccino inattivato). Nei ratti del gruppo di controllo, è stata somministrata per via intramuscolare solo una soluzione di NaCl allo 0,9%, il diluente dei vaccini, a una dose di 0,4 mL nei giorni di somministrazione del vaccino (giorni 0 e 28). Per i gruppi vaccinati, il dosaggio e lo schema di somministrazione rispecchiavano quelli utilizzati negli esseri umani. Nel gruppo del vaccino mRNA, il vaccino mRNA BNT162b2 (Pfizer-BioNTech/Comirnaty, Magonza, Germania) è stato ricostituito con 1,8 mL di soluzione di NaCl allo 0,9% e somministrato per via intramuscolare in due dosi da 0,3 mL ciascuna, il giorno 0 e il giorno 28. Analogamente, il gruppo del vaccino inattivato ha ricevuto due dosi intramuscolari del vaccino CoronaVac (Sinovac Life Sciences, Pechino, Cina), ciascuna dose da 0,5 mL, con lo stesso schema del giorno 0 e del giorno 28. La dose di vaccino utilizzata nel nostro studio è stata determinata in conformità con le linee guida normative stabilite, tra cui le linee guida della Food and Drug Administration (FDA) del 2006 (Linee guida per l'industria: considerazioni sugli studi di tossicità per lo sviluppo di vaccini preventivi e terapeutici per indicazioni di malattie infettive) [28], le linee guida dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) del 2014 (Linee guida sulla valutazione non clinica degli adiuvanti dei vaccini e dei vaccini adiuvati, Serie di rapporti tecnici dell'OMS, TRS 987, Allegato 2) [29] e la linea guida ICH S5 (R3) dell'Agenzia europea per i medicinali (EMA) del 2020 (Rilevamento della tossicità per la riproduzione dei prodotti farmaceutici per uso umano) [30]. Queste linee guida raccomandano, ove possibile, che gli animali ricevano la dose umana massima indipendentemente dal peso corporeo.

### 2.4. Raccolta dei tessuti

Quattro settimane dopo la somministrazione della seconda dose di vaccino, tutti i ratti sono stati soppressi mediante dislocazione cervicale in anestesia generale, indotta con 50 mg/kg di ketamina cloridrato al 10% (Ketasol; Richter Pharma, Wels, Austria) in associazione a 10 mg/kg di xilazina al 2% (Rompun; Bayer Healthcare, Berlino, Germania). Dopo l'eutanasia, è stata eseguita un'ovarectomia bilaterale su ciascun ratto.

### 2.5. Procedura istologica

I tessuti ovarici sono stati prima fissati in una soluzione di formaldeide al 10%, poi disidratati attraverso una serie graduata di alcoli, chiarificati in xilene e infine inclusi in paraffina. Sezioni di 5µLe sezioni istologiche sono state sottoposte a colorazione di routine con ematossilina ed eosina (H&E) e tricromica di Masson (MT). Tutti i vetrini sono stati esaminati al microscopio ottico Olympus BX51 (Tokyo, Giappone) e le immagini sono state

catturato utilizzando una fotocamera digitale Olympus DP72. L'analisi istologica è stata condotta da un istologo esperto che non era a conoscenza delle assegnazioni del gruppo di studio [31].

#### 2.6. Analisi istologica e classificazione dei follicoli

Sono state preparate sezioni seriali dai tessuti ovarici inclusi in blocchi di paraffina. Una sezione su dieci è stata colorata con ematossilina ed eosina (H&E) per il conteggio dei follicoli. Solo i follicoli con nuclei chiaramente visibili sono stati contati per garantire l'accuratezza. La valutazione ha anche considerato l'integrità della membrana basale, lo strato della teca, la disposizione delle cellule della granulosa (GC) e la struttura dell'ovocita. Sulla base di criteri stabiliti, i follicoli sono stati classificati in sei tipi: primordiali (PrmF), primari (PriF), secondari (SF), antrali (AF), preovulatori (PF) [32] e follicoli atretici (ATF) [13].

I follicoli in cui l'ovocita è circondato da una singola fila di GC squamosi (appiattiti) sono stati classificati come PrmF; i follicoli in cui l'ovocita è circondato da una singola fila di GC composti prevalentemente da GC cuboidali con alcuni GC squamosi o solo GC cuboidali sono stati classificati come PriF; senza un antro visibile, i follicoli circondati da più di uno strato di GC cuboidali sono stati contati come SF; gli AF precoci con una o due piccole aree di fluido follicolare (antro) e gli AF con un antro grande insieme sono stati contati come AF; e i più grandi dei tipi follicolari e i follicoli con uno strato definito di cellule del cumulo della granulosa sono stati contati come PF [32]. Inoltre, i follicoli con ovociti irregolarmente degenerati e GC picnotici sono stati considerati come ATF [13].

#### 2.7. Analisi immunoistochimica

La colorazione immunoistochimica è stata eseguita utilizzando il metodo avidina-biotina perossidasi, come descritto nel protocollo del sistema di colorazione ImmunoCruz™ (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, TX, USA). Sezioni di 5 micron sono state deparaffinate, reidratate e inizialmente incubate in soluzione salina tamponata con fosfato (PBS) tre volte per 5 minuti ciascuna a temperatura ambiente. Per sopprimere l'attività perossidasica endogena, i vetrini sono stati trattati con perossido di idrogeno al 3% in metanolo per 30 minuti. Il legame aspecifico è stato bloccato incubando le sezioni in siero di capra normale al 10% per 10 minuti a temperatura ambiente. Le sezioni sono state quindi incubate per una notte a 4°C con anticorpi primari contro AMH (Santa Cruz Biotechnology), VEGF (Santa Cruz Biotechnology Inc.), TGF-β1 (Elabscience, Houston, TX, USA) e caspasi-3 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA). A questo sono seguiti 15 minuti di incubazione con anticorpo secondario biotinilato a temperatura ambiente e successivo trattamento con coniugato di streptavidina perossidasi per altri 15 minuti. La visualizzazione è stata ottenuta con DAB (3,3'-diamminobenzidina tetraidrocloruro) per 15 minuti, seguito da controcolorazione con ematossilina di Mayer. Le sezioni sono state disidratate con una serie alcolica, chiarificate in xilene e montate con Entellan (Merck, Darmstadt, Germania). L'imaging è stato eseguito utilizzando un microscopio ottico Olympus BX 51.

L'analisi quantitativa è stata condotta su immagini di dieci diversi campi microscopici a 40×ingrandimento per ciascun gruppo sperimentale, utilizzando il software ImageJ JS v0.5.8 (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Questa analisi si è concentrata sull'intensità dell'immunoreattività di TGF-β1, VEGF e caspasi-3 nei follicoli ovarici e di AMH nei follicoli primari (PriF), secondari (SF) e antrali (AF). Inoltre, l'apoptosi è stata valutata contando le cellule positive alla caspasi-3 in dieci campi selezionati casualmente [31].

#### 2.8. Misurazione dei livelli sierici di AMH

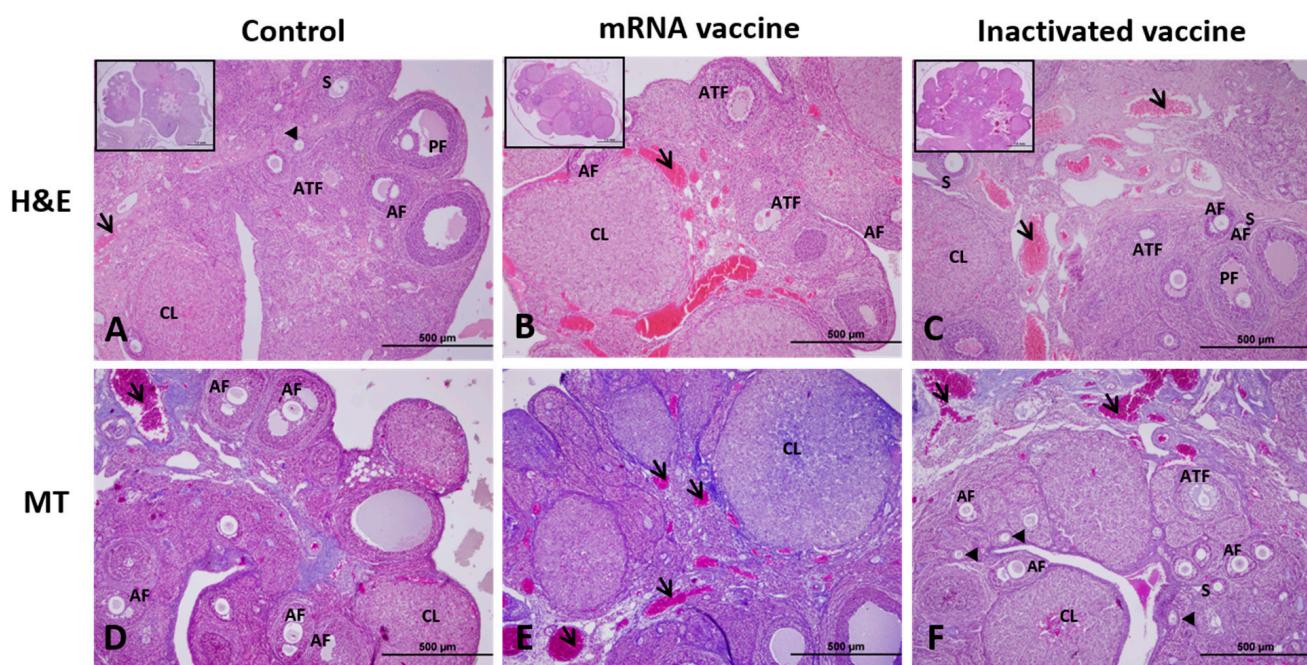
Il kit immunoenzimatico (ELISA) (201-11-1246, distretto di Baoshan, Shanghai, Cina) è stato utilizzato per misurare i livelli sierici di ormone antimulleriano (AMH). L'analisi è stata eseguita secondo le istruzioni del produttore. Le quantità sono state misurate a 450 nm in un lettore micro ELISA (BioTek ELx800, Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, VT, USA) [33].

### 2.9. Analisi statistica

Tutte le valutazioni statistiche sono state condotte utilizzando il software SPSS (versione 24). La normalità della distribuzione dei dati all'interno dei gruppi è stata valutata utilizzando i test di Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk. Per le variabili che rispettavano una distribuzione normale, le differenze tra i gruppi sono state analizzate utilizzando l'Analisi della Varianza a Un fattore (ANOVA), con confronti post-hoc condotti tramite il test di Tukey laddove sono state riscontrate differenze significative. Per le variabili che non rispettavano una distribuzione normale, le differenze intergruppo sono state esaminate utilizzando il test di Kruskal-Wallis, seguito dal test U di Mann-Whitney per l'analisi post-hoc, ove necessario.  $P$ -un valore inferiore a 0,05 è stato considerato statisticamente significativo [33].

### 3. Risultati

Quando i risultati della colorazione H&E e MT sono stati valutati al microscopio ottico, il tessuto ovarico del gruppo di controllo ha mostrato un aspetto normale, con una corteccia contenente follicoli in diverse fasi di sviluppo all'esterno e uno strato midollare con tessuto connettivo lasso e un'ampia rete vascolare all'interno (Figura 1A,D). Nel gruppo del vaccino mRNA sono state osservate aree atrofiche nella midollare ovarica e un aumento del numero e dell'ingrandimento del diametro dei vasi sanguigni (Figura 1B,E). Risultati simili sono stati osservati nella midollare ovarica nel gruppo del vaccino inattivato, sebbene non tanto quanto nel gruppo del vaccino mRNA (Figura 1C,F).



**Figura 1.** Immagini ovariche dei gruppi di controllo, vaccino mRNA e vaccino inattivato dopo ematossilina ed eosina (H&E;UN-C) e colorazioni tricromiche di Masson (MT;D-F). CL; corpo luteo, ATF; follicolo atretico, S; follicolo secondario, AF; follicolo antrale, PF: follicoli preovulatori, freccia; vaso sanguigno, punta di freccia; follicolo primario. Barre della scala: 500 $\mu$ M.

Il conteggio medio dei follicoli primordiali, primari e secondari è stato significativamente ridotto nel gruppo del vaccino inattivato rispetto ai controlli e nel gruppo del vaccino mRNA rispetto al gruppo del vaccino inattivato ( $P<0,001$ ). Allo stesso modo, i conteggi medi dei follicoli antrali (AF) e dei follicoli preovulatori (PF) erano inferiori nel gruppo del vaccino mRNA rispetto ai controlli ( $P<0,001$ ). Al contrario, il numero medio di follicoli atretici (ATF)

aumentato nel gruppo del vaccino mRNA rispetto ai gruppi di controllo e di vaccino inattivato ( $P<0,05$ ) (Tabella 1).

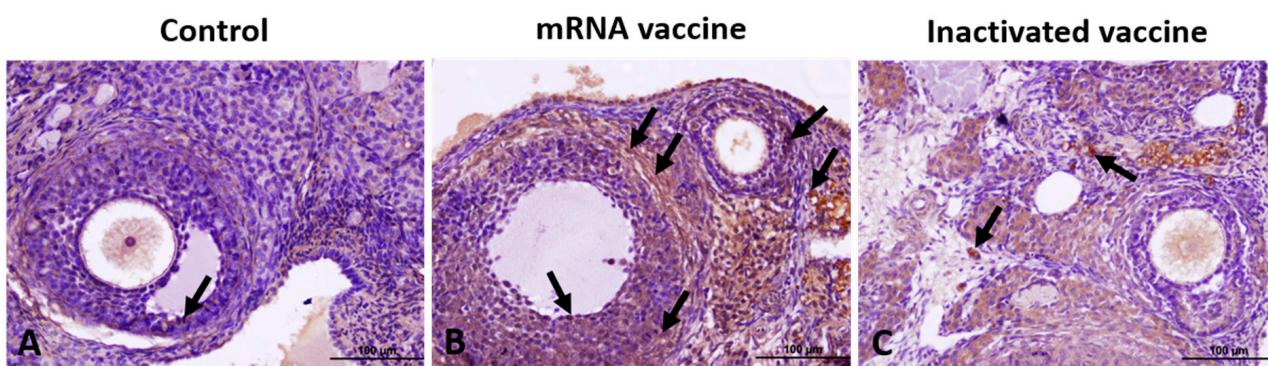
**Tabella 1.** Confronto del numero di follicoli nei gruppi di controllo, vaccino mRNA e vaccino inattivato.

Parametro	Gruppo di controllo	Gruppo Vaccino mRNA	Gruppo di vaccini inattivati	P
<b>Numero di follicoli</b>				
Primordiale	106.70±5.33UN	42.40±4.96B	70.10±12.04C	0,001
Primario	45.20±4.21UN	29.40±4.57B	38.30±5.41C	0,001
Secondario	39.60±6.09UN	25.30±2.86B	32.70±8.07C	0,001
Antrale	32.80±5.59UN	26.20±3.01B	29.40±4.30AB	0,010
Preovulatorio	18.20±1.87UN	15.00±3.12B	16.20±3.04AB	0,045
Atretico	13.90±2.07UN	26.40±5.06B	17.10±1.96UN	0,001

I dati sono espressi come media±Deviazione standard. Le stesse lettere nella stessa riga indicano una somiglianza tra i gruppi, mentre lettere diverse indicano una differenza tra i gruppi.

### 3.1. Espressione di TGF-β1, VEGF, Caspasi-3 e AMH

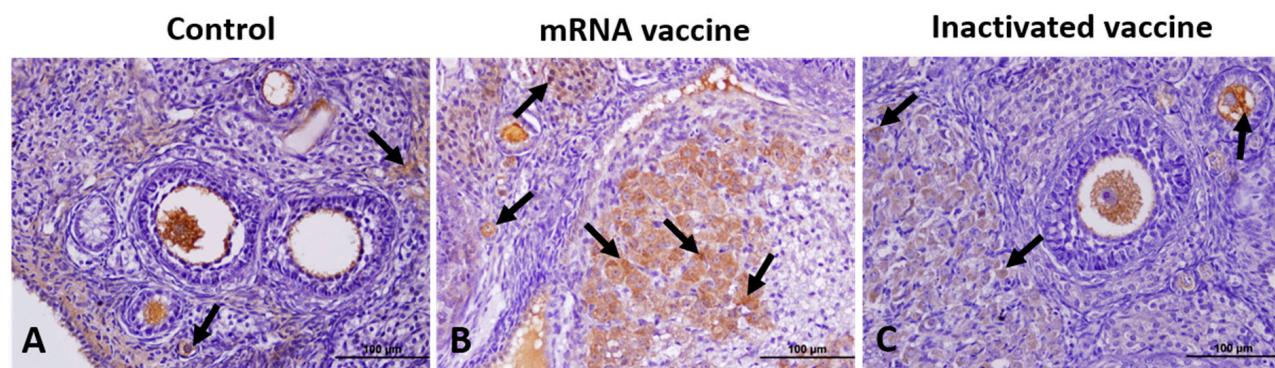
Nel gruppo di controllo, l'espressione di TGF-β1 è risultata debolmente positiva, con poche cellule positive osservate in cellule GC, cellule TC e cellule del corpo luteo (CL). Al contrario, il gruppo del vaccino a mRNA ha mostrato un'espressione di TGF-β1 notevolmente più elevata in tutte le regioni rispetto sia al gruppo di controllo che al gruppo del vaccino inattivato (Figura 2).



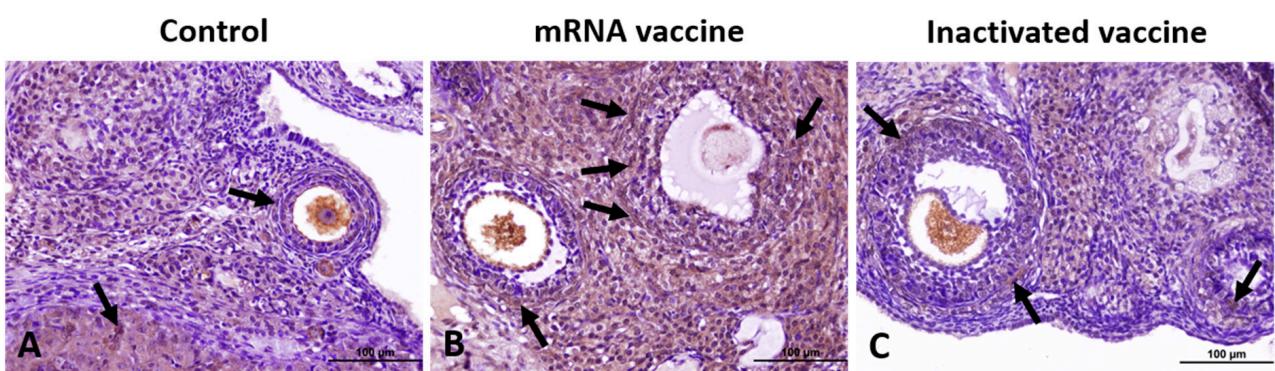
**Figura 2.** Colorazione immunoistochimica del TGF-β1 nelle sezioni ovariche del controllo (UN), vaccino a mRNA (B), e vaccino inattivato (C) gruppi. Frecce: cellule immunopositive. Barre della scala: 100μM.

L'espressione di VEGF era più bassa nel gruppo di controllo e più alta nel gruppo del vaccino a mRNA. Un'espressione minima di VEGF è stata osservata nell'epitelio germinale, nella parete vascolare, nell'oocita, nei GC e nelle cellule CL del gruppo di controllo. Nel gruppo del vaccino a mRNA, l'espressione di VEGF era significativamente elevata, in particolare nell'epitelio germinale, negli ovociti, nei GC, nello strato della teca, nella parete vascolare, nelle CL e nel fluido intrafollicolare (Figura 3).

L'espressione di caspasi-3 è risultata aumentata in entrambi i gruppi vaccinali rispetto ai controlli, con un aumento più pronunciato nel gruppo vaccinato con mRNA, caratterizzato da un'intensa colorazione di ovociti, cellule germinali e cellule stromali interstiziali. La conta cellulare positiva per caspasi-3 è risultata significativamente più elevata nei gruppi vaccinati con mRNA e inattivati rispetto ai controlli (Figura 4).

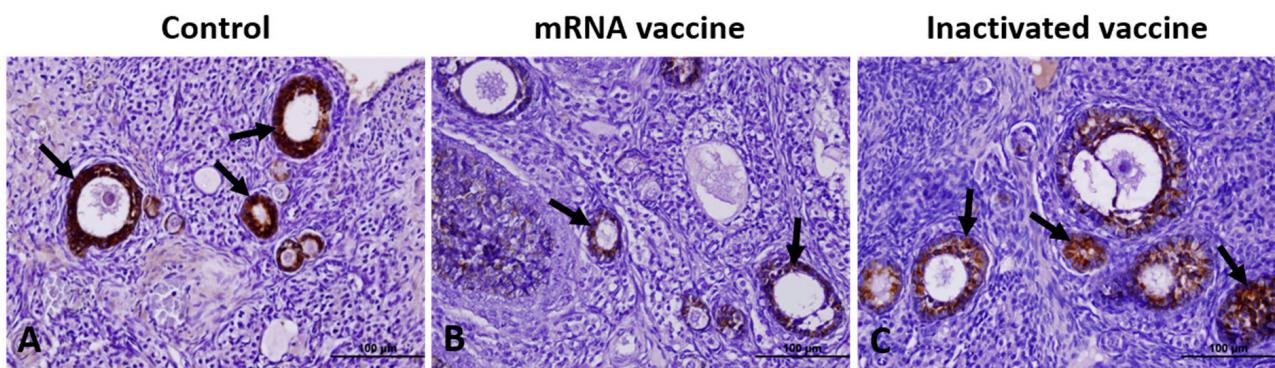


mRNA  
0μM.



**Figura 4.** Colorazione immunoistochimica della Caspasi-3 nelle sezioni ovariche del controllo (**UN**), vaccino a mRNA (**B**), e vaccino inattivato (**C**) gruppi. Frecce: cellule immunopositive. Barre della scala: 100μM.

L'espressione dell'AMH in tutti i gruppi è diminuita progressivamente dai follicoli primordiali a quelli preovulatori (Figura 5). L'espressione di AMH nei GC dei follicoli primordiali e secondari era inferiore nel gruppo del vaccino inattivato rispetto ai controlli e ulteriormente ridotta nel gruppo del vaccino mRNA ( $P < 0,001$ ). Nei follicoli antrali, l'espressione di AMH era inferiore in entrambi i gruppi vaccinali rispetto ai controlli ( $P < 0,001$ ), con il gruppo mRNA che mostra una diminuzione maggiore, sebbene statisticamente insignificante, rispetto al gruppo del vaccino inattivato ( $p > 0,05$ ).



**Figura 5.** Colorazione immunoistochimica dell'AMH nelle sezioni ovariche del controllo (**UN**), vaccino a mRNA (**B**), e vaccino inattivato (**C**) gruppi. Frecce: cellule immunopositive. Barre della scala: 100μM.

Al contrario, l'intensità dell'immunocolorazione di VEGF, TGF- $\beta$ 1 e caspasi-3 era significativamente più alta nel gruppo del vaccino inattivato rispetto ai controlli e ulteriormente elevata nel gruppo del vaccino mRNA ( $P<0,001$ ). Le intensità di immunocolorazione comparative di AMH, VEGF, TGF- $\beta$ 1 e caspasi-3 nei diversi gruppi sono riassunte nella Tabella 2.

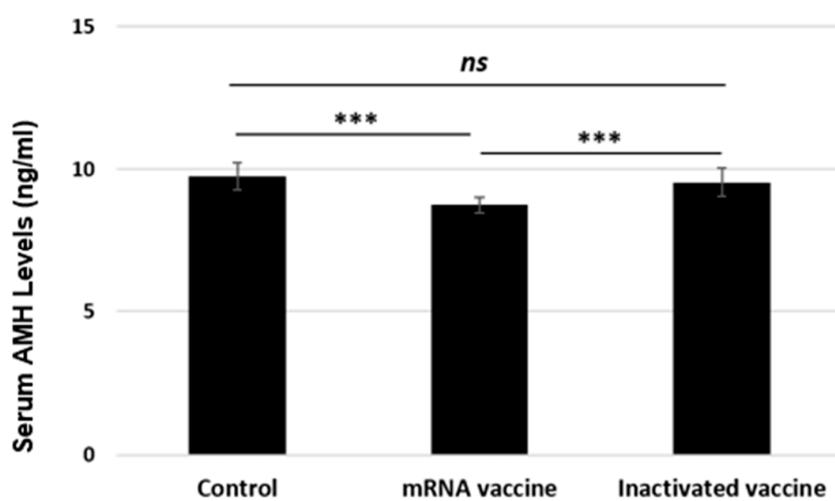
**Tabella 2.** Intensità di immunocolorazione di AMH follicolare, TGF- $\beta$ 1, VEGF e caspasi-3 nel controllo, Vaccino a mRNA e gruppi di vaccini inattivati.

Parametro	Gruppo di controllo	Gruppo Vaccino mRNA	Gruppo di vaccini inattivati	P
<b>AMH follicolare</b>				
Primario	129,09±10,30UN	100,35±20,88B	111,43±12,06C	0,001
Secondario	119,23±10,09UN	97,91±9,71B	106,20±13,67C	0,001
Antrale	104,77±14,00UN	88,68±10,38B	94,70±11,31B	0,001
TGF-beta1	85,08±7,87UN	130,78±14,58B	120,63±10,30C	0,001
<b>VEGF</b>	91,40±5,57UN	145,15±7,36B	113,46±5,57C	0,001
<b>Caspasi-3</b>	82,78±6,80UN	138,09±7,94B	98,85±8,69C	0,001

I dati sono espressi come media±Deviazione standard. Le stesse lettere nella stessa riga indicano una somiglianza tra i gruppi, mentre lettere diverse indicano una differenza tra i gruppi.

### 3.2. Livelli sierici di AMH

Dopo l'esperimento, sono stati analizzati i livelli sierici di AMH e si è scoperto che il vaccino mRNA ha ridotto significativamente il livello di AMH rispetto ai gruppi di controllo e di vaccino inattivato ( $P<0,001$ ) (Figura 6). Nel gruppo a cui è stato somministrato il vaccino inattivo, i livelli di AMH erano vicini a quelli del gruppo di controllo; pertanto, non vi era alcuna differenza tra questi due gruppi.



**Figura 6.** Confronto dei livelli sierici di AMH nei gruppi di controllo, vaccino mRNA e vaccino inattivato. ns; non significativo, \*\*\* $P<0,001$ .

## 4. Discussion

Nel nostro studio, abbiamo indagato gli effetti dei vaccini mRNA e inattivati contro il COVID-19 sui follicoli ovarici e sulla riserva ovarica in un modello di ratto, seguendo le raccomandazioni sul dosaggio delineate dalla Food and Drug Administration (FDA) [28], l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) [29] e l'Agenzia europea per i medicinali (EMA) [30] per valutare gli effetti tossici dei vaccini negli studi sugli animali. I nostri risultati hanno rivelato che VEGF follicolare, TGF- $\beta$ 1 e

L'espressione della caspasi-3, così come la conta media dei follicoli atresici (ATF), erano elevati nei gruppi vaccinati rispetto al gruppo di controllo, mentre i livelli sierici di ormone antimulleriano (AMH) sono diminuiti in tutte le forme follicolari, ad eccezione della conta media degli ATF. Questi risultati indicano coerentemente che entrambi i vaccini contro il COVID-19, in particolare il vaccino a mRNA, possono esercitare effetti tossici sui follicoli ovarici e sulla riserva ovarica nei ratti.

I membri della superfamiglia TGF- $\beta$  sono morfogeni critici per lo sviluppo [21] e regolatori chiave della follicologenesi, della meiosi degli ovociti e del rimodellamento stromale [34]. Il fattore di crescita del tessuto connettivo (CTGF), un regolatore paracrino coinvolto nella mitosi, nell'angiogenesi, nella migrazione cellulare e nel rimodellamento della matrice extracellulare, è espresso prevalentemente nelle cellule della granulosa, con TGF- $\beta$ 1 che ha dimostrato di aumentare l'espressione del CTGF nelle cellule della granulosa del ratto [35]. Sono stati inoltre segnalati livelli elevati di TGF- $\beta$ 1 nel siero nelle infezioni da COVID-19, evidenziando ulteriormente il suo coinvolgimento nella risposta tissutale sistemica e locale [36]. In un modello di insufficienza ovarica prematura indotta da radioterapia, l'espressione di TGF- $\beta$ 1 è stata osservata prevalentemente nelle cellule della granulosa dei follicoli atresici e del corpo luteo, con un'espressione trascurabile nelle cellule della teca. La densità ottica delle cellule TGF- $\beta$ 1-positive è risultata notevolmente aumentata nelle ovaie irradiate, indicando una forte risposta localizzata al danno tissutale [37]. Nel nostro studio, l'espressione di TGF- $\beta$ 1 è risultata debolmente positiva nel gruppo di controllo, con poche cellule positive identificate nelle cellule della granulosa, nelle cellule della teca e nel corpo luteo. Al contrario, i vaccini a mRNA e inattivati hanno causato un'espressione di TGF- $\beta$ 1 notevolmente elevata nei tessuti ovarici. Questi risultati suggeriscono che i vaccini contro il COVID-19, in particolare quelli a mRNA, possano potenziare i processi mediati da TGF- $\beta$ 1 come la mitosi, l'angiogenesi, la migrazione cellulare e il rimodellamento della matrice extracellulare nel tessuto ovarico, in particolare all'interno dei follicoli composti da diversi tipi e strutture cellulari. Si è osservato che la vaccinazione innesca risposte infiammatorie sistemiche, portando a un aumento della produzione di citochine, tra cui IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1  $\beta$  [38] e TGF- $\beta$ 1 [36], che svolgono un ruolo chiave nella follicologenesi, nell'angiogenesi e nell'atresia [39]. I nostri risultati indicano un'espressione elevata di TGF- $\beta$ 1, che è stata associata al rimodellamento del tessuto ovarico e alla fibrosi [21].

Il VEGF svolge un ruolo essenziale nella regolazione dell'angiogenesi ovarica sia fisiologica che patologica. Il VEGF può favorire un ambiente proangiogenico che supporta lo sviluppo follicolare o passare a uno stato antiangiogenico durante l'atresia, inibendo così la progressione follicolare [40]. È stato dimostrato che il VEGF stimola la proliferazione cellulare nei GC e negli AF, inibisce l'apoptosi e sopprime l'attivazione della caspasi-3 negli AF [41]. Nei ratti adulti non trattati, è stato riportato che la colorazione VEGF-A era assente o debole nei GC e nei TC dei follicoli preantrali e degli AF precoci, ma più forte nei GC e nei TC dei PF [42]. Nel nostro studio, l'espressione di VEGF era minima negli ovociti e nei GC nel gruppo di controllo, ma notevolmente più forte negli ovociti, nei GC che circondano l'ovocita, nel fluido intrafollicolare e nello strato della teca nel gruppo del vaccino a mRNA. Sulla base di risultati precedenti [42], che ha osservato la più alta espressione di VEGF nei PF, ci aspettavamo che l'espressione di VEGF fosse più alta nel gruppo di controllo, che presentava il maggior numero di PF. Tuttavia, l'espressione di VEGF era più bassa nel gruppo di controllo e più alta nel gruppo del vaccino a mRNA, che presentava il minor numero di PF ma il più alto numero di ATF. Ipotizziamo che questo aumento dell'espressione di VEGF in entrambi i gruppi di vaccino, in particolare nel gruppo del vaccino a mRNA, possa essere in parte dovuto all'elevata espressione di TGF- $\beta$ 1 follicolare indotta dai vaccini e in parte come risposta adattativa per supportare la follicologenesi e mantenere la funzione ovarica in condizioni microambientali alterate.

Il meccanismo cellulare alla base dell'atresia follicolare ovarica e della regressione luteale è l'apoptosi [25]. La caspasi-3 è l'esecutore più critico dei percorsi apoptotici sia endogeni che esogeni [43]. Nei ratti, la caspasi-3 è localizzata nei CL, comprese le cellule luteali dei CL sani e dei TC [25]. In particolare, non sono state osservate differenze nell'intensità o nella distribuzione della colorazione della caspasi-3 tra CL sani e apoptotici [25]. Nei follicoli, l'immunocolorazione della caspasi-3 è specifica per i GC degli ATF ed è assente nei GC dei tessuti sani.

follicoli [25]. In un modello di insufficienza ovarica prematura indotta da radiazioni, è stata osservata una minore espressione della caspasi-3 nei TC delle ovaie irradiate, con colorazione intensa nei follicoli preantrali in crescita e negli AF [37]. Allo stesso modo, in un modello di tossicità ovarica indotta da cisplatino, l'immunoreattività della caspasi-3 era positiva negli ovociti e diffusamente positiva nelle cellule stromali nel gruppo trattato con cisplatino [44]. La maggior parte dei GC e dei TC nello stesso studio presentavano anche una colorazione positiva della caspasi-3 ed erano presenti follicoli di Graaf [44]. Un altro studio ha dimostrato un numero maggiore di cellule caspasi-3-positive sia nelle strutture parenchimali che in quelle luteali delle ovaie nel gruppo cisplatino rispetto ai controlli [45]. Nel nostro studio, l'espressione della caspasi-3 è risultata aumentata sia nel gruppo trattato con mRNA che in quello trattato con vaccino inattivato rispetto ai controlli, con un'espressione più pronunciata negli ovociti, nei GC e nelle cellule stromali interstiziali nel gruppo trattato con vaccino mRNA. Questi risultati sono in parte in linea con quelli dei modelli sperimentali di tossicità ovarica indotta da cisplatino [44,45]. Di conseguenza, i nostri risultati suggeriscono che sia i vaccini mRNA che quelli inattivati contro il COVID-19 possono indurre l'apoptosi negli ovociti, nei GC e nelle cellule dello stroma interstiziale nei ratti attraverso un percorso dipendente dalla caspasi, con un effetto più pronunciato osservato in seguito alla somministrazione del vaccino mRNA.

Diversi metodi istomorfologici e biochimici, tra cui la conta di FA e ATF e le concentrazioni sieriche di ormoni, sono stati utilizzati per valutare la funzione e il danno ovarico. Tra questi, i livelli di AMH e la conta di FA sono riconosciuti come gli indicatori più sensibili e specifici della riserva ovarica [46]. L'espressione di AMH è più alta nei GC dei follicoli preantrali e nei piccoli AF, diminuisce negli AF tardivi [47–49], ed è assente nei PrmF e negli ATF [49,50]. Come membro della famiglia TGF-β, l'AMH inibisce il reclutamento follicolare iniziale [47] e riduce la sensibilità follicolare all'FSH durante il reclutamento ciclico [48]. Studi su topi femmina AMH-null hanno rivelato che l'assenza di AMH porta ad un significativo esaurimento di PrmF entro i 13 mesi di età [51]. Quando sottoposti a un protocollo di superovulazione, questi topi hanno mostrato un aumento del reclutamento di PrmF, che è stato controbilanciato da una maggiore perdita follicolare durante la transizione dai piccoli follicoli preantrali ai grandi follicoli preantrali [52]. Una recente meta-analisi [27] la valutazione degli effetti dei vaccini COVID-19 sui risultati della riproduzione assistita nelle donne infertili ha incluso sette studi che utilizzavano mRNA e vaccini inattivati [9,53–58]. La meta-analisi ha rilevato un aumento significativo della percentuale di ovociti maturi ottenuti nelle donne vaccinate [27]. L'analisi dei sottogruppi ha mostrato che il numero di ovociti recuperati era coerente in tutti gli studi che utilizzavano vaccini a mRNA, ma l'associazione positiva tra la vaccinazione e la proporzione di ovociti maturi non era significativa dopo aver escluso uno studio nell'analisi di sensibilità [27,56]. Una recente meta-analisi che valutava l'impatto dell'infezione da COVID-19 e della vaccinazione sulla riserva ovarica, misurata dai livelli di ormone antimulleriano (AMH), includeva quattro studi che indagavano i vaccini a mRNA, uno studio che valutava il vaccino russo GAM-COVID e due studi in cui il tipo di vaccino non era specificato. I risultati di questa meta-analisi hanno dimostrato un calo significativo dei livelli di AMH a seguito dell'infezione da SARS-CoV-2 nelle donne in età riproduttiva, mentre la vaccinazione contro COVID-19 è stata associata a una variazione non significativa dei livelli di AMH [59]. Tuttavia, è importante notare che i risultati non erano coerenti in tutti gli studi inclusi nella meta-analisi [59].

Inoltre, è stato dimostrato che livelli elevati di ormone follicolo-stimolante (FSH) circolante migliorano la sopravvivenza follicolare e consentono alle coorti di follicoli antrali di eludere la morte apoptotica durante il reclutamento ciclico [18]. Pertanto, sebbene i risultati della meta-analisi sulla resa degli ovociti nei cicli di fecondazione in vitro (FIVET) forniscano la prova che i vaccini mRNA e inattivati contro il COVID-19 non hanno un impatto negativo sullo sviluppo follicolare nelle pazienti sottoposte a FIVET, è essenziale considerare che il trattamento con FSH è stato somministrato in questi cicli per promuovere lo sviluppo multifollicolare.

Nel nostro studio, il numero medio di PrmF, PriF e SF, così come l'intensità dell'immunocolorazione dell'AMH in PriF e SF, erano significativamente inferiori nei campioni inattivati.

gruppo vaccinale rispetto al gruppo di controllo, con ulteriori riduzioni osservate nel gruppo vaccinale a mRNA. Inoltre, nel gruppo vaccinale a mRNA, il livello sierico di AMH è risultato ridotto. Questi risultati sottolineano la necessità di ulteriori indagini sui potenziali impatti della vaccinazione contro il COVID-19 sulla riserva ovarica in ambito clinico. Inoltre, questo studio si è concentrato sugli effetti della vaccinazione contro il COVID-19 sui follicoli ovarici e sulla riserva ovarica valutando l'espressione di TGF- $\beta$ 1, VEGF, caspasi-3 e AMH, nonché gli stadi di sviluppo follicolare nel tessuto ovarico di ratto, piuttosto che valutare la risposta immunitaria. Tuttavia, studi precedenti hanno riportato risposte immunitarie alla vaccinazione. La ricerca ha dimostrato che i ratti sviluppano una forte produzione di anticorpi neutralizzanti, risposte delle cellule T specifiche per la proteina spike e attivazione di citochine, paragonabili alle risposte immunitarie umane [60,61]. Inoltre, le valutazioni precliniche dei vaccini inattivati contro SARS-CoV-2 hanno dimostrato una sostanziale attivazione immunitaria specifica per l'antigene nei roditori, inclusa una maggiore produzione di interferone-gamma (IFN- $\gamma$ ) e titoli anticorpali simili ai dati umani [62,63].

Per garantire effetti biologicamente rilevanti, il tessuto ovarico è stato raccolto quattro settimane dopo la seconda dose del vaccino, in linea con il picco di attivazione immunitaria osservato sia negli esseri umani che nei roditori [61,64]. Inoltre, citochine infiammatorie come IL-6 e TGF- $\beta$ 1, che sono comunemente sovraregolate dopo la vaccinazione, sono state analizzate per migliorare la rilevanza traslazionale dei risultati immunoistochimici [65]. CoronaVac (Sinovac Biotech Ltd., Pechino, Cina), un vaccino inattivato contro SARS-CoV-2, è stato testato anche su topi e ratti durante gli studi preclinici, fornendo dati essenziali sulla sicurezza e sull'immunogenicità, guidando al contempo la selezione della dose [66]. Allo stesso modo, i ratti sono stati utilizzati per determinare i dati iniziali sull'immunogenicità e ottimizzare le dosi e i programmi di immunizzazione per il vaccino BBIBP-CorV sviluppato dal Centro cinese per il controllo e la prevenzione delle malattie e dal Beijing Institute of Biological Products Limited [63].

Sebbene le risposte immunitarie nei roditori potrebbero non replicare completamente quelle negli esseri umani [60,61], aumentando le citochine come IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1  $\beta$  nei topi [38] e TGF- $\beta$ 1 nell'uomo [36] e TGF- $\beta$ 1 svolgono un ruolo critico nello sviluppo follicolare, nell'apoptosi e nel rimodellamento ovarico [39]. Sono necessarie ulteriori ricerche su modelli sia umani che animali per chiarire la relazione tra vaccini COVID-19, citochine e riserva ovarica.

Questo studio è stato condotto in conformità con le linee guida stabilite [28–30], che raccomandano l'utilizzo di una singola dose in grado di indurre una risposta immunitaria in un modello animale, corrispondente alla dose umana senza aggiustamento ponderale. La scalabilità allometrica, un approccio ampiamente accettato nella ricerca sui vaccini, riconosce che le risposte immunitarie non si estendono proporzionalmente tra le specie, rendendo le valutazioni cliniche basate sulla dose più appropriate rispetto alle correzioni metaboliche. Mentre la scalabilità allometrica suggerisce che la somministrazione di una dose umana ai ratti possa determinare una risposta immunitaria più forte, il rispetto della dose clinica è essenziale per evitare effetti confondenti derivanti da un'eccessiva attivazione immunitaria [67].

L'utilizzo di ratti albini Wistar in questo studio è giustificato dal loro ruolo consolidato nella tossicologia riproduttiva e nella ricerca sulla riserva ovarica. Il loro breve ciclo estrale (4-5 giorni) consente un monitoraggio controllato dello sviluppo follicolare, dell'atresia e delle variazioni della riserva ovarica [18]. Inoltre, processi ovarici chiave come il reclutamento follicolare, la selezione e l'atresia condividono somiglianze fondamentali tra ratti ed esseri umani, rendendoli un modello adatto per le valutazioni di tossicologia riproduttiva [13,15]. Mentre la folliculogenesi negli esseri umani dura diversi mesi ed è regolata principalmente dalle gonadotropine, nei ratti il turnover follicolare è più rapido e meno dipendente dalle gonadotropine [68].

I nostri risultati indicano che sia i vaccini mRNA che quelli inattivati contro il COVID-19, in particolare il vaccino mRNA, inibiscono il reclutamento follicolare iniziale e riducono i livelli di AMH [47,48], che porta a una ridotta sensibilità follicolare all'FSH durante il reclutamento ciclico. Al contrario, il VEGF, che promuove la proliferazione delle cellule della granulosa e inibisce l'apoptosi [41], TGF- $\beta$ 1, che supporta la folliculogenesi in fase avanzata aumentando l'attività angiogena nella granulosa

cellule [69], e caspasi-3, un regolatore chiave dei percorsi apoptotici [43], sono risultati tutti elevati dopo la vaccinazione. Inoltre, entrambi i vaccini hanno portato a una riduzione di tutte le forme follicolari, ad eccezione dei follicoli atresici (ATF), rispetto al gruppo di controllo. Questi risultati suggeriscono che il vaccino a mRNA possa accelerare la deplezione follicolare aumentando il reclutamento e l'apoptosi, riducendo in definitiva il pool di follicoli primordiali e la riserva ovarica.

Sebbene questo studio fornisca informazioni sui potenziali effetti dei vaccini contro il COVID-19 sulla funzione ovarica, la sua rilevanza clinica rimane incerta. Sono necessari studi longitudinali che valutino i livelli sierici di AMH e la conta dei follicoli antrali nelle popolazioni umane per convalidare questi risultati preclinici e determinarne la rilevanza per la salute riproduttiva.

La ricerca futura dovrebbe integrare i principi di scala allometrica per perfezionare le strategie di selezione delle dosi. Stabilire una relazione dose-risposta tra diversi gruppi di dosaggio potrebbe migliorare la comprensione delle risposte immunitarie. Inoltre, analisi farmacocinetiche e farmacodinamiche per valutare la biodisponibilità dell'antigene e la distribuzione sistemica potrebbero rafforzare ulteriormente la rilevanza clinica degli studi sui vaccini. Questi approcci potrebbero migliorare l'allineamento tra i modelli preclinici e le risposte immunitarie umane, offrendo informazioni più chiare sulla sicurezza dei vaccini.

#### *Limitazioni*

Lo studio attuale presenta diverse limitazioni. In primo luogo, lo studio è stato condotto solo su ratti sani; pertanto, è necessario un gruppo di confronto di ratti infetti da SARS-CoV-2 per analizzare in modo completo le risposte immunitarie cellulari (ad esempio, cellule T CD4+ e CD8+, Treg e citochine). Tale confronto chiarirebbe l'impatto immunologico dei vaccini contro il COVID-19 sul tessuto ovarico. In secondo luogo, non sono state eseguite analisi ormonali, comprese le fluttuazioni dei livelli di estradiolo, FSH e LH. Queste valutazioni rafforzerebbero la comprensione degli effetti del vaccino sui follicoli ovarici. In terzo luogo, lo studio si è concentrato esclusivamente sugli impatti a breve termine dei vaccini contro il COVID-19 sul tessuto ovarico. La valutazione degli effetti a lungo termine, inclusi gli esiti sulla fertilità, la vitalità della prole e le risposte infiammatorie, fornirebbe approfondimenti più approfonditi. Studi futuri dovrebbero includere l'immunoistochimica o la citometria a flusso per esaminare l'infiltrazione delle cellule immunitarie nel tessuto ovarico, confrontando gruppi vaccinati e non vaccinati per determinare i meccanismi immunomediati alla base dei cambiamenti osservati. Inoltre, la valutazione della fertilità a lungo termine e della salute della prole potrebbe chiarire se le alterazioni ovariche indotte dal vaccino influenzino la funzione riproduttiva o se esistono meccanismi compensatori.

## 5. Conclusioni

Questo studio è il primo a valutare gli effetti dei vaccini mRNA e inattivati contro il COVID-19 sui follicoli ovarici e sulla riserva ovarica in un modello di ratto. I risultati dimostrano che entrambi i vaccini, in particolare quello a mRNA, sono associati a una riduzione della riserva ovarica, caratterizzata da deplezione del pool di follicoli primordiali e aumento della perdita follicolare per apoptosi durante la follicologenesi. Tuttavia, questi risultati devono essere interpretati con cautela, poiché i modelli preclinici non possono essere direttamente estrappolati alla salute riproduttiva umana. Ulteriori studi longitudinali su popolazioni umane, che includano valutazioni dei livelli di AMH e conteggi dei follicoli antrali, sono necessari per convalidare queste osservazioni e determinarne il significato clinico.

**Contributi degli autori:** Concettualizzazione, EK (Enes Karaman) ed EK (Erol Karakas); metodologia, EK (Enes Karaman), EK (Erol Karakas), OY ed EB; software, EK (Enes Karaman), BK, KGS e HND; validazione, EK (Enes Karaman), AY e OY; analisi formale, EK (Enes Karaman); indagine, EK (Enes Karaman), EK (Erol Karakas), AY e KGS; risorse, EK (Enes Karaman); cura dei dati, EK (Enes Karaman); scrittura: preparazione della bozza originale, EK (Enes Karaman), AY, EB, BK e OY; scrittura: revisione e editing, EK (Enes Karaman), AY e KGS;

visualizzazione, AY; supervisione, EK (Enes Karaman); amministrazione del progetto, EK (Enes Karaman); acquisizione finanziamenti, EK (Enes Karaman). Tutti gli autori hanno letto e accettato la versione pubblicata del manoscritto.

**Finanziamento:** Questa ricerca è stata finanziata dai progetti di ricerca scientifica dell'Università Erciyes (decisione della Commissione n.: TSA-2022-12251).

**Dichiarazione del Comitato di revisione istituzionale:** Questo studio è stato approvato dal Comitato etico per la ricerca sugli animali dell'Università Erciyes (Data: 2 marzo 2022, n.: 22/041).

**Dichiarazione di consenso informato:** In questo studio non sono stati studiati esseri umani.

**Dichiarazione di disponibilità dei dati:** I dati generati nel presente studio possono essere richiesti all'autore corrispondente.

**Ringraziamenti:** Vorremmo ringraziare Sefa Erturk e Isil Aydemir per il loro contributo nella correzione delle bozze.

**Conflitti di interessi:** Gli autori dichiarano di non avere conflitti di interesse.

## Riferimenti

1. OMS. Dashboard COVID-19. Casi di COVID-19 nel mondo. Disponibile online:<https://data.who.int/dashboards/covid19/cases> (consultato l'8 settembre 2024).
2. Zhu, N.; Zhang, D.; Wang, W.; Li, X.; Yang, B.; Canzone, J.; Zhao, X.; Huang, B.; Shi, W.; Lu, R.; et al. Un nuovo coronavirus da pazienti affetti da polmonite in Cina, 2019. *Laurea in ingegneria meccanica***2020**, 382, 727–733. [PubMed](#)
3. OMS. Monitoraggio del vaccino COVID-19. Disponibile online:<https://covid19.trackvaccines.org/agency/who/> (consultato l'8 settembre 2024).
4. Li, S.; Liu, H.; Li, D.; Chen, F. Salute riproduttiva femminile durante la pandemia di COVID-19: ultime prove e conoscenze. *Arch. Ginecologia. Ostetricia***2023**, 308, 1691–1696. [PubMed](#)
5. GOV.UK. Vaccino contro il Coronavirus: Riepilogo delle segnalazioni tramite Yellow Card. Disponibile online:<https://www.gov.uk/government/publications/coronavirus-covid-19-vaccine-adverse-reactions/coronavirus-vaccine-summary-of-yellow-card-reporting> (consultato l'8 settembre 2024).
6. Muhaidat, N.; Alshrouf, MA; Azzam, MI; Karam, AM; Al-Nazer, M.; Al-Ani, A. Sintomi mestruali dopo il vaccino COVID-19: un'indagine trasversale nella regione MENA. *Int. J. Salute delle donne***2022**, 14, 395–404.
7. Saçıntı, KG; Oruç, G.; Şükür, YE; Koç, A. Il vaccino COVID-19 non ha alcun impatto sul ciclo mestruale. *J. Ostet. Ginecologia***2022**, 42, 3403–3404. [PubMed](#)
8. Odeh-Natour, R.; Shapira, M.; Estrada, D.; Freimann, S.; Tal, Y.; Atzman, Y.; Bilgory, A.; Aslih, N.; Abu-Raya, YS; Shalom-Paz, E. Il vaccino mRNA SARS-CoV-2 nel fluido follicolare influisce sulle prestazioni dei follicoli e degli ovociti nei trattamenti di fecondazione in vitro? *Am. J. Reprod. Immunol.* **2022**, 87, e13530.
9. Bentov, Y.; Beharier, O.; Moav-Zafrir, A.; Kabessa, M.; Godin, M.; Greenfield, CS; Ketzin-Gilad, M.; Ash Broder, E.; Holzer, HEG; Wolf, D.; et al. La funzione follicolare ovarica non è alterata dall'infezione da SARS-CoV-2 o dalla vaccinazione contro il COVID-19 con mRNA BNT162b2. *Hum. Riprod.***2021**, 36, 2506–2513.
10. Requena, A.; Vergara, V.; González-Ravina, C.; Ruiz, ME; Cruz, M. Il tipo di vaccino SARS-CoV-2 non influisce sulla funzione ovarica nel ciclo di riproduzione assistita. *Fertile. Sterile***2023**, 119, 618–623.
11. Yang, L.; Neal, S.; Lee, T.; Chou, A.; Schutt, AK; Gibbons, W. Confronto della riserva ovarica femminile prima e dopo la vaccinazione contro il COVID-19. *JAMA Netw. Aperto***2023**, 6, e2318804.
12. Cruz, G.; Fernandois, D.; Paredes, AH Funzione ovarica e senescenza riproduttiva nel ratto: ruolo dell'innervazione simpatica ovarica. *Riproduzione***2017**, 153, R59–R68.
13. Gougeon, A. Regolazione dello sviluppo follicolare ovarico nei primati: fatti e ipotesi. *Endocr. Rev.***1996**, 17, 121–155.
14. Li, L.; Shi, X.; Shi, Y.; Wang, Z. Le vie di segnalazione coinvolte nello sviluppo del follicolo ovarico. *Fronte. Fisiolo***2021**, 12, 730196.
15. Kerr, JB; Myers, M.; Anderson, RA La dinamica della riserva follicolare primordiale. *Riproduzione***2013**, 146, R205–R215.
16. Matsuda, F.; Inoue, N.; Manabe, N.; Ohkura, S. Crescita follicolare e atresia nelle ovaie dei mammiferi: regolazione tramite sopravvivenza e morte delle cellule della granulosa. *J. Sviluppo di riproduzione***2012**, 58, 44–50. [\[Riferimento incrociato\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Zheng, W.; Nagaraju, G.; Liu, Z.; Liu, K. Ruoli funzionali della segnalazione del fosfatidilinositol 3-chinas (PI3K) nell'ovaio dei mammiferi. *Mol. Cell. Endocrinol.***2012**, 356, 24–30. [\[Riferimento incrociato\]](#)
18. McGee, EA; Hsueh, AJ Reclutamento iniziale e ciclico dei follicoli ovarici. *Endocr. Rev.***2000**, 21, 200–214.
19. Robinson, RS; Woad, KJ; Hammond, AJ; Laird, M.; Hunter, MG; Mann, GE Angiogenesi e funzione vascolare nell'ovaio. *Riproduzione***2009**, 138, 869–881. [\[Riferimento incrociato\]](#)

20. Yang, MY; Fortune, JE Il fattore di crescita endoteliale vascolare stimola la transizione del follicolo primario a quello secondario nei follicoli bovini in vitro. *Sviluppo Mol. Riprod.* **2007**, *74*, 1095–1104.
21. Patton, BK; Madadi, S.; Pangas, SA Controllo dello sviluppo del follicolo ovarico tramite la segnalazione della famiglia TGF-β. *Curr. Opinione. Endocr. Metab. Res.* **2021**, *18*, 102–110. [PubMed]
22. Durlinger, AL; Gruijters, MJ; Kramer, P.; Karels, B.; Ingraham, HA; Nachtigal, MW; Uilenbroek, JT; Grootegoed, JA; Themmen, AP L'ormone antimulleriano inibisce l'inizio della crescita del follicolo primordiale nell'ovaio del topo. *Endocrinologia* **2002**, *143*, 1076–1084. Riferimento incrociato]
23. Durlinger, AL; Gruijters, MJ; Kramer, P.; Karels, B.; Kumar, TR; Matzuk, MM; Rose, UM; de Jong, FH; Uilenbroek, JT; Grootegoed, JA; et al. L'ormone antimulleriano attenua gli effetti dell'FSH sullo sviluppo del follicolo nell'ovaio del topo. *Endocrinologia* **2001**, *142*, 4891–4899. Riferimento incrociato]
24. Wang, ZP; Mu, XY; Guo, M.; Wang, YJ; Teng, Z.; Mao, GP; Niu, WB; Feng, LZ; Zhao, LH; Xia, GL La segnalazione del fattore di crescita trasformante-β partecipa al mantenimento del pool di follicoli primordiali nell'ovaio del topo. *Laurea in Chimica Biologica* **2014**, *289*, 8299–8311. Riferimento incrociato]
25. Boone, DL; Tsang, BK Caspasi-3 nell'ovaio del ratto: localizzazione e possibile ruolo nell'atresia follicolare e nella regressione luteale. *Riproduzione biologica* **1998**, *58*, 1533–1539.
26. Ding, T.; Wang, T.; Zhang, J.; Cui, P.; Chen, Z.; Zhou, S.; Yuan, S.; Ma, W.; Zhang, M.; Rong, Y.; et al. Analisi del danno ovarico associato alla malattia da COVID-19 in donne in età riproduttiva a Wuhan, Cina: uno studio osservazionale. *Fronte. Med.* **2021**, *8*, 635255. [Riferimento incrociato] [PubMed]
27. Huang, J.; Fang, Z.; Liu, Y.; Xing, C.; Huang, L.; Mao, J.; Chen, H.; Huang, Z.; Xia, L.; Tang, L.; et al. Effetto della vaccinazione femminile contro la malattia da coronavirus 2019 sui risultati della riproduzione assistita: una revisione sistematica e una meta-analisi. *Fertile. Sterile.* **2023**, *119*, 772–783.
28. Food and Drug Administration (FDA). Linee guida per l'industria - Considerazioni sugli studi di tossicità per lo sviluppo di vaccini preventivi e terapeutici per malattie infettive. 2006. Disponibile online: <https://www.fda.gov/media/73986/> scarica (consultato il 3 marzo 2024).
29. Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS). Linee guida sulla valutazione non clinica degli adiuvanti vaccinali e dei vaccini adiuvati, WHO Technical Report Series, TRS 987, Allegato 2. 2014. Disponibile online: [https://cdn.who.int/media/docs/default-source/biologicals/vaccine-standardization/trs\\_987\\_annex2.pdf?sfvrsn=ea91caca\\_3&download=true](https://cdn.who.int/media/docs/default-source/biologicals/vaccine-standardization/trs_987_annex2.pdf?sfvrsn=ea91caca_3&download=true) (consultato il 3 marzo 2024).
30. Agenzia Europea per i Medicinali (EMA). Linea guida ICH S5 (R3) sulla Tossicologia Riproduttiva: Rilevamento della Tossicità per la Riproduzione nei Prodotti Farmaceutici per Uso Umano. 2020. Disponibile online: [https://www.ema.europa.eu/it/documents/scientific-guideline/ichguideline-s5-r3-detection-toxicity-reproduction-human-pharmaceuticals-step-5\\_it.pdf](https://www.ema.europa.eu/it/documents/scientific-guideline/ichguideline-s5-r3-detection-toxicity-reproduction-human-pharmaceuticals-step-5_it.pdf) (consultato il 3 marzo 2024).
31. Karaman, E.; Onder, GO; Goktepe, O.; Karakas, E.; Mat, OC; Bolat, D.; Koseoglu, E.; Tur, K.; Baran, M.; Ermis, M.; et al. Effetti protettivi dell'acido borico assunto in diversi modi sull'ischemia e la riperfusione ovarica sperimentale. *Biol. Trace Elem. Res.* **2024**, *202*, 2730–2743. [PubMed]
32. Myers, M.; Britt, KL; Wreford, NGM; Ebling, FJ; Kerr, JB Metodi per quantificare il numero di follicoli all'interno dell'ovaio del topo. *Riproduzione* **2004**, *127*, 569–580. [PubMed]
33. Karaman, E.; Yavuz, A.; Ayan, D.; Bayram, E.; Sı, F.; Sakalli, E.; Temur, I.; Abbassamento, I.; Sıim, Y.; Ayag, İo; et al. Effetti ormonali e istologici del vaccino inattivato SARS-CoV-2 (TURKOVAC™) sulla riserva ovarica. *Flora* **2024**, *29*, 516–525.
34. Pangas, SA; Matzuk, MM Modelli genetici per la segnalazione della superfamiglia del fattore di crescita trasformante β nello sviluppo del follicolo ovarico. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2004**, *225*, 83–91.
35. Harlow, CR; Davidson, L.; Burns, KH; Yan, C.; Matzuk, MM; Hillier, SG I membri della superfamiglia FSH e TGF-β regolano l'espressione genica del fattore di crescita del tessuto connettivo delle cellule della granulosa in vitro e in vivo. *Endocrinologia* **2002**, *143*, 3316–3325.
36. Wang, EY; Chen, H.; Sun, BQ; Wang, H.; Qu, HQ; Liu, Y.; Sun, XZ; Qu, J.; Fang, ZF; Tian, L.; et al. I livelli sierici del fattore di commutazione dell'isotipo IgA TGF-β1 sono elevati nei pazienti con COVID-19. *FEBS Lett.* **2021**, *595*, 1819–1824.
37. El-Derany, MO; Said, RS; El-Demerdash, E. Le cellule staminali mesenchimali derivate dal midollo osseo invertono l'insufficienza ovarica prematura indotta dalla radioterapia: enfasi sull'integrazione del segnale dei percorsi TGF-β, Wnt/β-catenina e ippopotamo. *Rev. Rappresentante delle cellule staminali* **2021**, *17*, 1429–1445.
38. Nakayama, T. Una risposta infiammatoria è essenziale per lo sviluppo dell'immunità adattativa: immunogenicità e immunotossicità. *Vaccino* **2016**, *34*, 5815–5818. [PubMed]
39. Cossigny, DAF Il ruolo dei membri della superfamiglia TGF-β: TGF-β1 e activina A nella follicologenesi precoce. Tesi di dottorato, Monash University, Melbourne, Australia, 2017. Riferimento incrociato]
40. Guzmán, A.; Hernández-Coronado, CG; Gutiérrez, CG; Rosales-Torres, AM Il sistema del fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF) come regolatore chiave dell'angiogenesi e della crescita del follicolo ovarico. *Sviluppo Mol. Riprod.* **2023**, *90*, 201–217.
41. Irusta, G.; Abramovich, D.; Parborell, F.; Tesone, M. Ruolo di sopravvivenza diretta del fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF) sulle cellule follicolari ovariche di ratto. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2010**, *325*, 93–100.

42. Abramovich, D.; Celin, AR; Hernandez, F.; Tesone, M.; Parborell, F. Analisi spaziotemporale dell'espressione proteica dei fattori angiogenici e dei relativi recettori durante la follicologenesi nei ratti con e senza trattamento ormonale. *Riproduzione* **2009**, *137*, 309–320.
43. Zhang, X.; Niu, Y.; Huang, Y. La melatonina inibisce la proliferazione cellulare in un modello di ratto con iperplasia mammaria mediando il percorso PTEN/AKT. *Rappresentante Oncologo* **2021**, *45*, 66. [PubMed]
44. Al-Shahat, A.; Hulail, MAE; Soliman, NMM; Khamis, T.; Fericean, LM; Arisha, AH; Moawad, RS La melatonina attenua la disfunzione ovarica indotta dal cisplatino alterando la steroidogenesi, l'infiammazione, l'apoptosi, lo stress ossidativo e il percorso di segnalazione PTEN/PI3K/Akt/mTOR/AMPK nei ratti femmina. *Farmaceutica* **2022**, *14*, 2769. [Riferimento incrociato]
45. Caglayan, C.; Kandemir, FM; Yıldırım, S.; Kucukler, S.; Kilinc, MA; Saglam, YS Lo zingerone migliora la tossicità ovarica e uterina indotta dal cisplatino tramite la soppressione degli squilibri ormonali sessuali, dello stress ossidativo, dell'infiammazione e dell'apoptosi nei ratti Wistar femmina. *Biomed. Farmacoaltro.* **2018**, *102*, 517–530.
46. Penzias, A.; Azziz, R.; Bendikson, K.; Falcone, T.; Hansen, K.; Hill, M.; Hurd, W.; Jindal, S.; Kalra, S.; Mersereau, J.; et al. Test e interpretazione delle misure di riserva ovarica: un parere del comitato. *Fertile. Sterile.* **2020**, *114*, 1151–1157.
47. Visser, JA; Themmen, AP Ormone antimulleriano e follicologenesi. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2005**, *234*, 81–86.
48. Gruijters, MJ; Visser, JA; Durlinger, AL; Themmen, AP Ormone antimulleriano e il suo ruolo nella funzione ovarica. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2003**, *211*, 85–90. [PubMed]
49. Kuyucu, Y.; Tap, Ö. Gli effetti dell'ormone antimulleriano sulla follicologenesi nei ratti: valutazione al microscopio ottico ed elettronico. *Ultrastruttura. Patologia.* **2021**, *45*, 59–70.
50. Durlinger, A.; Visser, J.; Themmen, A. Regolazione della funzione ovarica: il ruolo dell'ormone antimulleriano. *Riproduzione* **2002**, *124*, 601–609.
51. Durlinger, AL; Kramer, P.; Karels, B.; de Jong, FH; Uilenbroek, JT; Grootegoed, JA; Themmen, AP Controllo del reclutamento del follicolo primordiale mediante ormone antimulleriano nell'ovaio del topo. *Endocrinologia* **1999**, *140*, 5789–5796. [PubMed]
52. Visser, JA; Durlinger, AL; Peters, IJ; van den Heuvel, ER; Rose, UM; Kramer, P.; de Jong, FH; Themmen, AP Aumento della degenerazione degli ovociti e dell'atresia follicolare durante il ciclo estrale nei topi privi di ormone anti-mülleriano. *Endocrinologia* **2007**, *148*, 2301–2308. [PubMed]
53. Orvieto, R.; Noach-Hirsh, M.; Segev-Zahav, A.; Haas, J.; Nahum, R.; Aizer, A. Il vaccino mRNA contro il SARS-CoV-2 influenza le prestazioni dei pazienti durante il ciclo di fecondazione in vitro? *Riprod. Biol. Endocrinol.* **2021**, *19*, 69.
54. Aharon, D.; Lederman, M.; Ghofranian, A.; Hernandez-Nieto, C.; Canon, C.; Hanley, W.; Gounko, D.; Lee, JA; Stein, D.; Buyuk, E.; et al. Fecondazione in vitro ed esiti precoci della gravidanza dopo la vaccinazione contro la malattia da coronavirus 2019 (COVID-19). *Ostetricia e Ginecologia* **2022**, *139*, 490–497.
55. Huang, J.; Xia, L.; Lin, J.; Liu, B.; Zhao, Y.; Xin, C.; Ai, X.; Cao, W.; Zhang, X.; Tian, L.; et al. Nessun effetto del vaccino inattivato contro SARS-CoV-2 sugli esiti della fecondazione in vitro: uno studio con punteggio di propensione abbinato. *J. Inflamm. Res.* **2022**, *15*, 839–849.
56. Avraham, S.; Kedem, A.; Zur, H.; Youngster, M.; Yaakov, O.; Yerushalmi, GM; Gat, I.; Gidoni, Y.; Hochberg, A.; Baum, M.; et al. Vaccinazione contro la malattia da coronavirus 2019 e risultati del trattamento dell'infertilità. *Fertile. Sterile.* **2022**, *117*, 1291–1299.
57. Huang, J.; Xia, L.; Tian, L.; Fan, H.; Xu, D.; Ai, X.; Wu, X.; Chen, J.; Xing, G.; Huang, L.; et al. Impatto del vaccino inattivato contro SARS-CoV-2 sulla ploidia embrionale: uno studio di coorte retrospettivo di 133 cicli di PGT-A in Cina. *Ricerca biologica* **2022**, *55*, 26.
58. Karavani, G.; Chill, HH; Dick, A.; Meirman, C.; Gutman-Ido, E.; Herzberg, S.; Ben-Meir, A.; Imbar, T. La vaccinazione Pfizer SARS-CoV-2 BNT162b2 mRNA (BNT162b2) non ha effetti avversi sui risultati della crioconservazione elettiva degli ovociti. *Riproduzione, Biomedicina, Online* **2022**, *45*, 987–994. [Riferimento incrociato] [PubMed]
59. Ghaemi, M.; Hantoushzadeh, S.; Shafiee, A.; Gargari, va bene; Fathi, H.; Eshraghi, N.; Razavi, J.; Habibi, GR; Jafarabady, K. L'effetto della vaccinazione COVID-19 e COVID-19 sull'ormone anti-Mülleriano nel siero: una revisione sistematica e una meta-analisi. *Immun. Infiammazione. Dis.* **2024**, *12*, e1136. [Riferimento incrociato] [PubMed]
60. Bahl, K.; Senn, JJ; Yuzhakov, O.; Bulychev, A.; Brito, LA; Hassett, KJ; Laska, ME; Smith, M.; Almarsson, Ö.; Thompson, J.; et al. Dimostrazione preclinica e clinica dell'immunogenicità dei vaccini a mRNA contro i virus influenzali H10N8 e H7N9. *Mol. Ther.* **2017**, *25*, 1316–1327. [Riferimento incrociato]
61. Vogel, AB; Kanevsky, I.; Che, Y.; Swanson, KA; Muik, A.; Vormehr, M.; Kranz, LM; Walzer, KC; Hein, S.; Güler, A.; et al. I vaccini BNT162b proteggono i macachi rhesus dal SARS-CoV-2. *Natura* **2021**, *592*, 283–289. [Riferimento incrociato]
62. Laczko, D.; Hogan, MJ; Toulmino, SA; Hicks, P.; Lederer, K.; Gaudette, Texas; Castano, D.; Amanat, F.; Muramatsu, H.; Oguin, TH, 3rd; et al. Una singola immunizzazione con vaccini a mRNA modificato con nucleosidi provoca forti risposte immunitarie cellulari e umorali contro SARS-CoV-2 nei topi. *Immunità* **2020**, *53*, 724–732.e7. [Riferimento incrociato]
63. Wang, H.; Zhang, Y.; Huang, B.; Deng, W.; Quan, Y.; Wang, W.; Xu, W.; Zhao, Y.; Li, N.; Zhang, J.; et al. Sviluppo di un candidato vaccino inattivato, BBIBP-CorV, con potente protezione contro SARS-CoV-2. *Cella* **2020**, *182*, 713–721.e9. [Riferimento incrociato]
64. Polacco, FP; Tommaso, SJ; Kitchin, N.; Absalon, J.; Gurtman, A.; Lockhart, S.; Perez, JL; Perez Marc, G.; Moreira, DE; Zerbini, C.; et al. Sicurezza ed efficacia del vaccino BNT162b2 mRNA COVID-19. *Laurea in ingegneria meccanica* **2020**, *383*, 2603–2615. [PubMed]

65. Cagigi, A.; Loré, K. Risposte immunitarie indotte dalla vaccinazione a mRNA nei topi, nelle scimmie e negli esseri umani. *Vaccin***2021**, *9*, 61. [Riferimento incrociato]
66. Gao, Q.; Bao, L.; Mao, H.; Wang, L.; Xu, K.; Yang, M.; Li, Y.; Zhu, L.; Wang, N.; Lv, Z.; et al. Sviluppo di un candidato vaccino inattivato per SARS-CoV-2. *Scienza***2020**, *369*, 77–81. [Riferimento incrociato]
67. Nair, AB; Jacob, S. Una semplice guida pratica per la conversione della dose tra animali ed esseri umani. *J. Clinica di base. Farmaceutica***2016**, *7*, 27–31. [Riferimento incrociato]
68. Cain, L.; Chatterjee, S.; Collins, TJ Follicologenesi in vitro dei follicoli preantrali del ratto. *Endocrinologia***1995**, *136*, 3369–3377. [PubMed](#)
69. Kuo, SW; Ke, FC; Chang, GD; Lee, MT; Hwang, JJ Potenziale ruolo dell'ormone follicolo-stimolante (FSH) e del fattore di crescita trasformante (TGF- $\beta$ 1) nella regolazione dell'angiogenesi ovarica. *J. Fisiologia cellulare***2011**, *226*, 1608–1619. [PubMed](#)

**Disclaimer/Nota dell'editore:** Le dichiarazioni, le opinioni e i dati contenuti in tutte le pubblicazioni sono esclusivamente quelli dei singoli autori e collaboratori e non di MDPI e/o del/dei curatore/i. MDPI e/o il/i curatore/i declinano ogni responsabilità per eventuali danni a persone o proprietà derivanti da idee, metodi, istruzioni o prodotti a cui si fa riferimento nel contenuto.