



UNIVERSITÀ
DI PAVIA

Dipartimento di Biologia e Biotechnologie “L. Spallanzani”

Laurea Magistrale in Biotechnologie Avanzate

Estrazione di parametri morfometrici da ricostruzioni nano-
tomografiche tridimensionali di ovario di topo: sviluppo di
modelli di classificazione automatica dei follicoli

Relatore:

Prof. Maurizio Zuccotti

Correlatore:

Dott. Andrea Fantinato

Tesi Sperimentale di

Davide Lippolis

Anno Accademico 2025/2026

Riassunto

L'ovario è un organo dinamico, sede dei processi di follicologenesi, ovvero il processo di maturazione del follicolo, e steroidogenesi, che consiste nella produzione ormonale, necessaria alla regolazione della follicologenesi. Lo studio dello sviluppo follicolare e, in particolare, la distinzione tra follicoli sani e follicoli in atresia, il processo degenerativo che interessa la quasi totalità dei follicoli, si è tradizionalmente basato sull'analisi istologica. Tale metodica, seppur affidabile, è capace di fornire soltanto una rappresentazione bidimensionale di strutture intrinsecamente tridimensionali. L'avvento della nanotomografia computerizzata (nanoCT) ha permesso di superare in larga parte questo limite, consentendo di analizzare l'architettura ovarica in tre dimensioni con risoluzione sub-micrometrica e di estrarre parametri morfometrici quantitativi, oggettivi e confrontabili tra campioni e stati fisiologici diversi.

Su queste premesse, il presente lavoro di tesi ha avuto come obiettivo principale lo sviluppo di un protocollo di segmentazione manuale, ossia di identificazione e delimitazione delle strutture follicolari in volumi nanoCT di ovario murino e l'estrazione, dalle maschere di segmentazione così ottenute, di parametri morfometrici quantitativi, con il fine di identificare nuovi marcatori utili a discriminare lo stato fisiologico dei follicoli lungo i diversi stadi della follicologenesi. Le maschere di segmentazione sono state impiegate, da un lato, per l'estrazione dei parametri morfometrici (volume, superficie e intensità media dei voxel) con successivo confronto statistico tra follicoli sani e atresici e, dall'altro, come dataset per l'addestramento di un modello di segmentazione automatica. L'analisi morfometrica, svolta sulle maschere dei follicoli di uno degli ovari analizzati (385 maschere, di cui 366 relative a strutture follicolari e 19 ai corpi lutei), ha evidenziato che le alterazioni associate all'atresia non si manifestano in modo uniforme, ma seguono pattern stadio-specifici. Volume e superficie, parametri strettamente correlati che descrivono la geometria del follicolo, discriminano efficacemente i follicoli sani da quelli atresici solo negli stadi preantrale T5 e antrale T6, nei quali le strutture atresiche risultano significativamente più grandi, a indicare che l'atresia inizia a compromettere l'architettura del follicolo solo a partire da questa fase della follicologenesi. L'intensità media del segnale nanoCT, che riflette la densità e la composizione cellulare dei follicoli, si è invece rivelata un parametro complementare, risultando significativamente ridotta nei follicoli atresici degli stadi primario T3 e pre-antrale T5, dove l'apoptosi delle cellule della granulosa e la degenerazione dell'oocita abbassano l'attenuazione del segnale.

Questi risultati, nel complesso, suggeriscono che le informazioni morfometriche, ricavate dalle maschere di segmentazione, possono supportare la classificazione e la distinzione dei follicoli sani dai follicoli atresici, generalmente effettuata con le sole caratteristiche morfologiche.

Richiedendo il riconoscimento e la segmentazione manuale dei follicoli molto tempo, è emersa la necessità di sviluppare un modello di *deep learning* volto ad automatizzare il processo di segmentazione. Il modello selezionato (UNETR, UNet Transformer), addestrato sulle segmentazioni manuali di 5 ovari, ha raggiunto un'accuratezza di validazione di 0,86 sul volume prepuberale e 0,71 su quello adulto nella segmentazione semantica delle strutture follicolari e dei corpi lutei, riportando risultati promettenti verso l'automazione del processo. Sono tuttavia emersi alcuni limiti, tra cui la difficoltà nel separare istanze follicolari adiacenti e la variabilità delle prestazioni in funzione dell'età dell'organo analizzato, legata alla differente risoluzione dei volumi e allo sbilanciamento dei dati di allenamento verso l'età prepuberale.

Nel complesso, il lavoro fornisce un protocollo di segmentazione manuale affidabile e una caratterizzazione morfometrica dei follicoli in volumi nanoCT, individuando parametri quantitativi associati allo stato di atresia in modo stadio-dipendente. A partire da questo studio, è previsto l'ampliamento del numero di campioni segmentati, in particolare di ovari adulti, così da irrobustire l'analisi dei parametri morfometrici, migliorare la segmentazione semantica automatica e traslare verso la segmentazione per istanza, in cui il modello sarà capace di individuare e classificare le singole strutture follicolari e di attribuirne la tipologia follicolare e lo stato fisiologico.

Indice

INTRODUZIONE.....	1
1. Ovario di mammifero	1
1.1 Anatomia e istologia.....	1
1.2 Origine e sviluppo dell'ovario.....	3
1.2.1 Formazioni delle gonadi e determinazione del sesso.....	3
1.2.2 Dalle PGCs ai follicoli primordiali	4
2. La fisiologia dell'ovario.....	5
2.1 Oogenesi.....	5
2.2 Folliculogenesi.....	6
2.2.1 Classificazione dei follicoli	8
2.3 Regolazione della maturazione follicolare.....	10
2.4 Il ciclo ovarico e il ciclo uterino	12
2.4 Atresia follicolare.....	14
2.5 Invecchiamento dell'ovario e declino della fertilità	16
3. Ricostruzione tridimensionale dell'ovario	18
3.1 La nanotomografia computerizzata	20
3.2 Segmentazione	22
3.3 Rendering 3D	25
SCOPO DEL LAVORO	27
MATERIALI E METODI	28
1. Animali e reagenti	28
2. Preparazione del campione per tomografia.....	28
2.1. Isolamento dell'ovario	28
2.2. Fissazione	28
2.3. Trattamento con mezzo di contrasto.....	28
2.4. Inclusione in paraffina	29
3. NanoCT.....	29
4. Classificazione e annotazione dei follicoli.....	29
4.1. Segmentazione manuale delle strutture ovariche	30
5. Analisi morfometrica.....	31
5.1 Analisi statistica.....	31
6. Sviluppo di un modello di segmentazione	32
6.1. Allenamento modello	33
6.1.1. Preprocessing delle immagini	34
6.1.2. Data augmentation e train/validation splitting.....	34
6.1.3. Integrazione delle segmentazioni con il volume nanoCT	34
RISULTATI	35
1. La segmentazione manuale dei follicoli e dei corpi lutei nel volume 3D dell'ovario	35
1.1 La segmentazione manuale dei follicoli pre-antrali	35
1.1 La segmentazione manuale dei follicoli antrali.....	38
1.3 La segmentazione manuale dei corpi lutei.....	39
2. Analisi morfometrica delle maschere segmentate manualmente.....	41
2.1 Analisi morfometrica dei follicoli pre-antrali	41
2.2 Analisi morfometrica dei follicoli antrali	43
3. La segmentazione automatica dei follicoli e corpi lutei in un volume 3D dell'ovario	45

DISCUSSIONE DEI RISULTATI	47
1. Analisi morfometrica dei follicoli	48
1.1 Volume e Superficie: due morfometriche strettamente correlate	48
1.2 L'intensità media del segnale nanoCT come indicatore della composizione cellulare	50
2. La segmentazione automatica	52
2.1 Le performance del modello UNETR	52
CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE	54
BIBLIOGRAFIA	55

INTRODUZIONE

1. Ovario di mammifero

L'ovario è un organo pari, parenchimatoso, di forma ovale e di piccole dimensioni. Con l'avanzare dell'età tende progressivamente a ridursi di volume, fino a raggiungere circa un quarto delle dimensioni tipiche del periodo fertile. Esso svolge due funzioni strettamente correlate: la gametogenesi, ovvero la produzione e maturazione della cellula uovo, e la steroidogenesi, responsabile della sintesi degli ormoni steroidei estrogeni e progestinici (Ross et al., 2010).

1.1 Anatomia e istologia

Gli organi genitali interni femminili nel topo comprendono le ovaie, l'ovidotto (tuba uterina), l'utero bicorni, la cervice e la vagina (**Figura 1**) (Winkler et al., 2024).

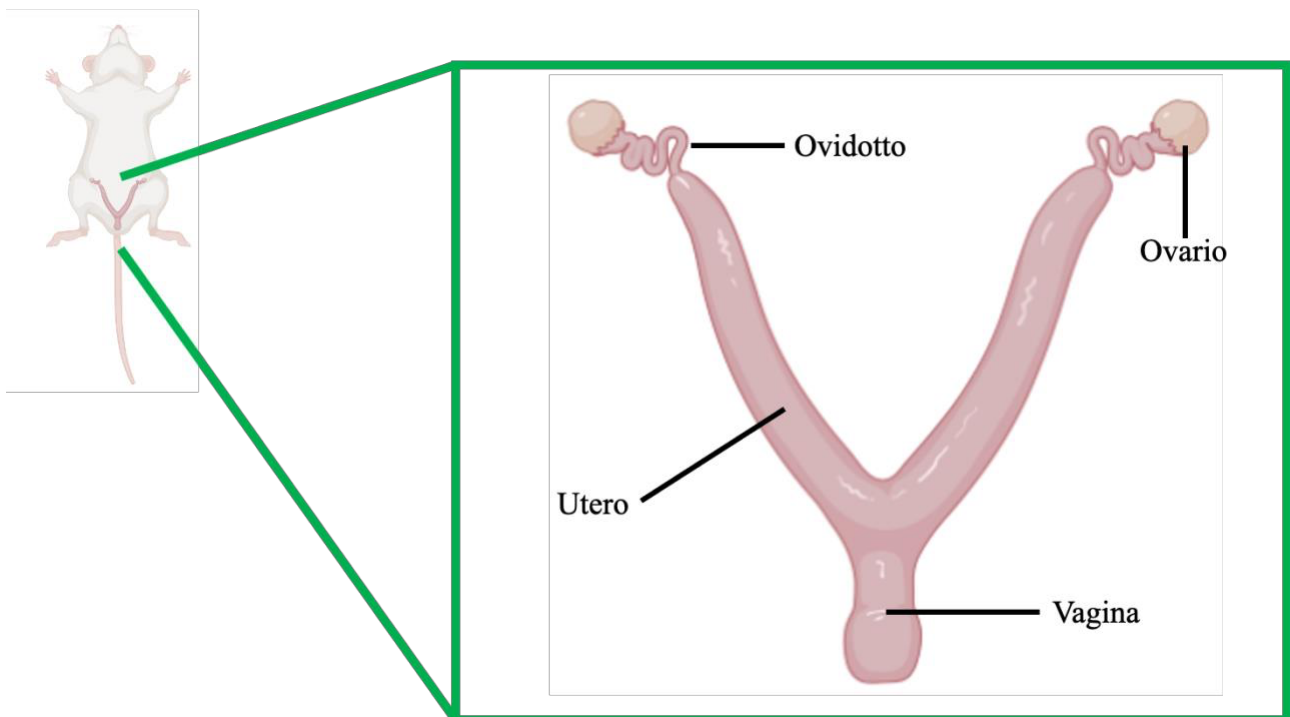


Figura 1. Le principali componenti dell'apparato riproduttivo femminile di topo. L'immagine mostra le componenti principali dell'apparato femminile di topo, quali l'ovidotto, la cavità uterina, l'ovario e il canale vaginale (creato con Biorender.com).

La superficie ovarica è rivestita da un epitelio cubico semplice, denominato epitelio germinativo, che prima della pubertà appare liscio, mentre durante la vita riproduttiva diventa progressivamente irregolare a causa delle cicatrici lasciate dai ripetuti eventi ovulatori.

Immediatamente al di sotto dell'epitelio si trova la tonaca albuginea, una capsula fibrosa connettivale che delimita la regione corticale dell'organo (**Figura 2**). Quest'ultima rappresenta la porzione più esterna ed è costituita da stroma connettivale, all'interno del quale sono presenti i follicoli ovarici nei diversi stadi di maturazione.

La parte più interna dell'ovario è la regione midollare o medulla, formata da tessuto connettivo lasso ricco di vasi sanguigni, vasi linfatici e terminazioni nervose, che penetrano nell'organo attraverso l'ilo (**Figura 2**) (Ross et al., 2010). L'irrorazione è garantita dall'arteria ovarica, che si ramifica progressivamente fino a formare una rete capillare localizzata in prossimità dei follicoli. Da questi capillari durante ogni ciclo ovarico si verifica un processo di neoangiogenesi, essenziale per sostenere la crescita follicolare. Da un singolo vaso preesistente, infatti, si sviluppa una rete capillare articolata che avvolge il singolo follicolo e lo supporta durante la maturazione (Fiorentino et al., 2023; Plendl, 2000).

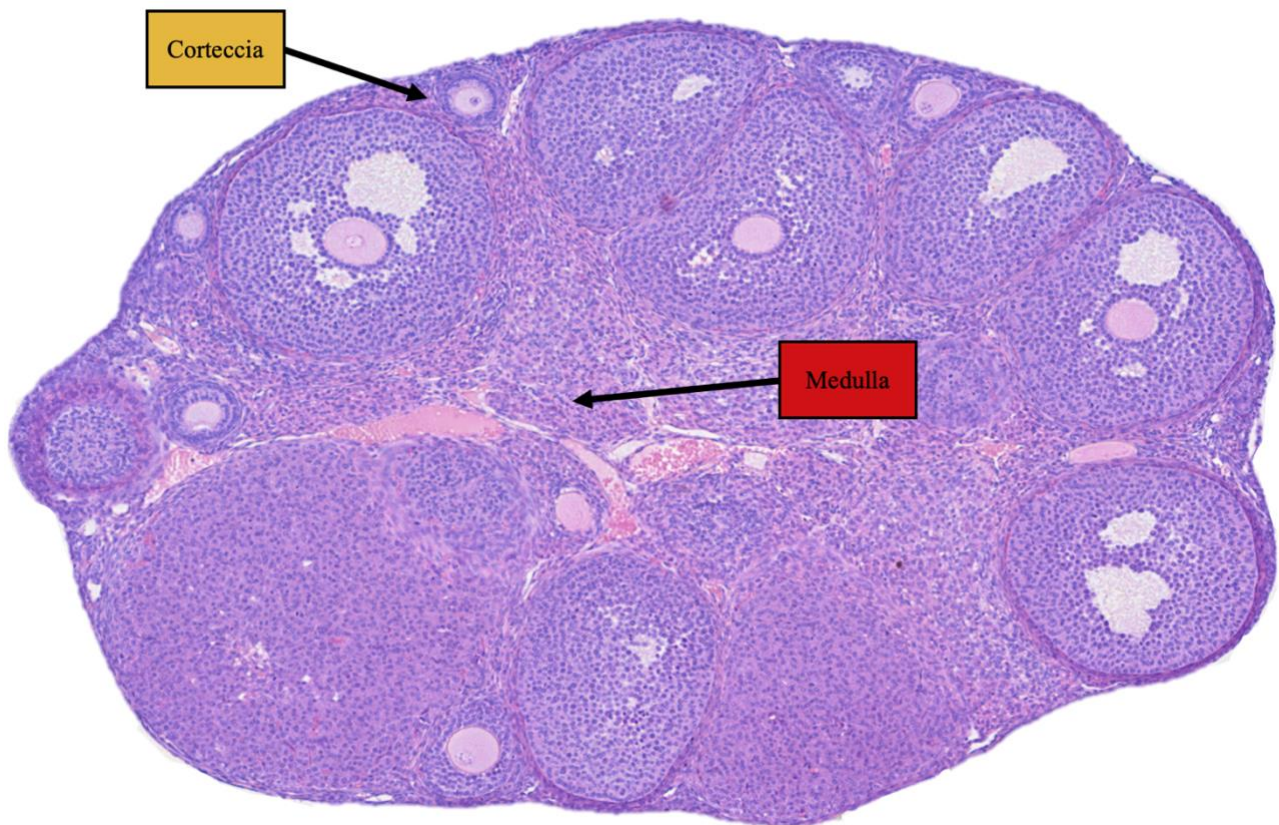


Figura 2. La regione midollare e corticale dell'ovario. L'immagine evidenzia la compartimentalizzazione tra la regione corticale (Corteccia), densamente popolata dai follicoli in vari stadi di maturazione, e la regione midollare (Medulla), ricca di vasi sanguigni, vasi linfatici e fibre nervose. (sezione istologica ottenuta presso il Laboratorio di Biologie e Biotecnologie della Riproduzione).

1.2 Origine e sviluppo dell'ovario

Le gonadi femminili si differenziano durante lo sviluppo embrionale a partire dalle creste genitali, la componente somatica delle gonadi. Queste verranno gradualmente colonizzate dalle cellule germinali primordiali (PGCs), che si differenzieranno prima in oogoni e successivamente in ovociti primari.

1.2.1 Formazioni delle gonadi e determinazione del sesso

Nei mammiferi, l'ovario si sviluppa a partire dalle PGCs, le quali si originano dall'epiblasto embrionale in seguito alla gastrulazione. Queste cellule proliferano, migrano dalla regione extraembrionale della gemma dell'allantoide verso le creste genitali e subiscono una riprogrammazione epigenetica completa, necessaria per azzerare l'imprinting parentale e la divergenza dalla linea somatica (Irie et al., 2014; Lee and Surani, 2024).

Il processo di differenziazione delle PGCs è attivato da una segnalazione induttiva in cui i principali fattori coinvolti sono alcune proteine della famiglia BMP e WNT3, espressi dalle cellule dell'ectoderma extraembrionale ed endoderma viscerale. In aggiunta, le cellule anteriori di quest'ultima regione producono degli antagonisti (Cer1 e Dkk1) che circoscrivono il differenziamento delle PGCs nella regione posteriore dell'epiblasto embrionale (Irie et al., 2014; Magnúsdóttir and Surani, 2014). Una volta raggiunto le creste genitali, le PGCs colonizzano questa regione attraverso un'intensa proliferazione producendo le gonadi bipotenti, il cui destino differenziativo dipende dal contesto genotipico e fenotipico dell'individuo.

In questa fase iniziale, il percorso di differenziamento prestabilito è di tipo femminile e consiste in Rspo1 che attiva Wnt4, il quale a sua volta stabilizza la produzione di β -catenina e sopprime Sox9, fattore necessario per il differenziamento maschile. La prevalsa di Wnt4 e β -catenina favorisce l'espressione del gene *FST*, elemento chiave per lo sviluppo dell'ovario; è presente un'ulteriore pathway, controllato da FoxL2, coinvolto nel mantenimento dell'espressione di follistatina nelle fasi successive dello sviluppo (**Figura 3**).

L'equilibrio della regolazione genica descritta è alterato dal master gene *SRY*, la cui attività, associata alla presenza del cromosoma Y, determina la differenziazione delle gonadi in testicoli. Questo perché il suo prodotto genico, il *testis determining factor* (TDF), induce l'espressione di SOX9, che attiva i geni *FGF9* e *PGD2*, entrambi essenziali per il differenziamento maschile; Fgf9 è anche responsabile dell'inibizione del gene *WNT4* e del suo pathway associato (Gilbert et al., 2018; She and Yang, 2014).

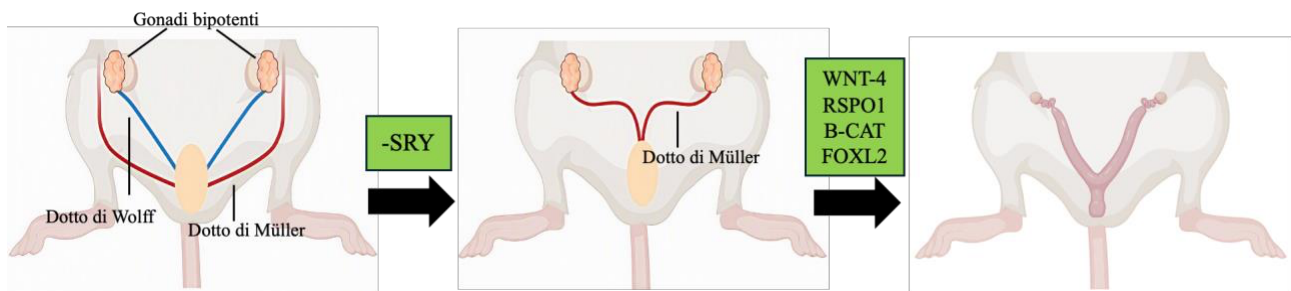


Figura 3. Determinazione del sesso e differenziazione della gonade bipotente. In assenza del gene SRY, il dotto di Wolff regredisce spontaneamente, lasciando intatto il dotto di Müller, dal quale si sviluppa l'apparato genitale femminile (creato con Biorender.com).

Associate alle gonadi indifferenziate sono presenti due strutture embrionali, il dotto di Müller e il dotto di Wolff, i quali consentono rispettivamente lo sviluppo dell'apparato femminile e maschile; i destini delle due strutture sono divergenti e determinati dalla presenza del TDF. In particolare, in assenza del cromosoma Y, prevale il pathway *Rspo1*-*Wnt4*- β -catenina, che permette contestualmente lo sfaldamento del dotto mesonefrico e lo sviluppo del dotto paramesofrenico, dal quale si origineranno le tube uterine, l'utero e la parte superiore della vagina (**Figura 3**) (Gilbert et al., 2018; She and Yang, 2014).

1.2.2 Dalle PGCs ai follicoli primordiali

Le PGCs presenti nelle creste genitali vanno incontro ad un'intensa divisione mitotica con citocinesi incompleta, generando una popolazione clonale di oogoni organizzati in cisti o nidi, strutture caratterizzate da cellule unite da ponti citoplasmatici.

In seguito, avviene la proliferazione e differenziazione delle cellule somatiche in cellule della pregranulosa, le quali sono coinvolte nella rottura delle cisti. In particolare, questo evento avviene durante la fase fetale nell'uomo mentre nel topo subito dopo la nascita (Sánchez and Smits, 2012). Le strutture risultanti, definite follicoli primordiali, sono formate da un singolo oocita circondato da un esiguo strato di cellule somatiche appiattite (Gartner and Hiatt, 2008)

2. La fisiologia dell'ovario

Durante la vita dell'individuo, l'ovario va incontro a profondi cambiamenti strutturali e funzionali. Questi processi comprendono la formazione e l'organizzazione dei follicoli ovarici, la loro maturazione, l'ovulazione o la perdita mediante il processo di atresia.

Con l'avanzare dell'età, la riserva follicolare si riduce progressivamente, determinando una graduale diminuzione della funzione ovarica fino al raggiungimento della menopausa, quando l'attività ovarica cessa definitivamente.

2.1 Oogenesi

L'oogenesi è un insieme di eventi citoplasmatici e nucleari attraverso i quali si formano e maturano gli oociti, cellule di grandi dimensioni dalle quali, in seguito alla fecondazione, può originarsi un nuovo individuo. È un processo che inizia durante la vita fetale, si arresta alla nascita e successivamente riprendere ciclicamente durante la vita riproduttiva dell'individuo.

L'oogenesi si articola in due fasi principali: una fase proliferativa e una fase meiotica (**Figura 4**). La prima è la formazione dei nidi di oogoni, i quali successivamente entrano in meiosi, processo che prevede due divisioni cellulari asimmetriche consecutive che riducono il contenuto di DNA (c) e genomico (n) da diploide ad aploide (Garagna et al., 2010; Gilbert et al., 2018).

L'elemento determinante dell'ingresso in meiosi è il fattore di trascrizione Str8, il quale promuove un nuovo ciclo di sintesi del DNA favorendo per cui l'inizio della meiosi. Durante lo sviluppo, nella gonade femminile, si instaura una regolazione positiva di Str8 operata dal fattore intrinseco Wnt4 e dal fattore estrinseco, prodotto dal mesonefro, acido retinoico (RA) (**Figura 4**) (Bowles et al., 2006; Gilbert et al., 2018).

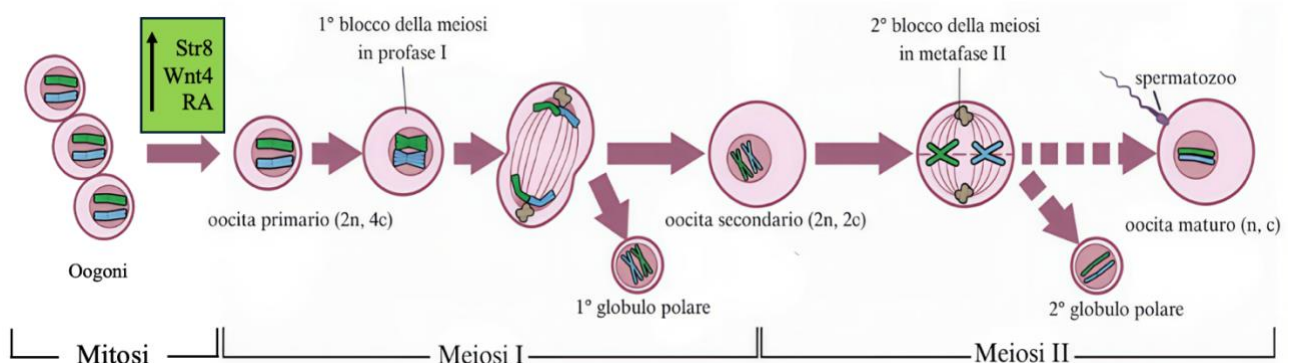


Figura 4. La maturazione dell'oocita, da cellule diploide ad aploide. A partire dalla proliferazione mitotica degli oogoni, il processo prosegue con la Meiosi I. A partire dall'oocita primario (2n, 4c), durante la prima divisione meiotica asimmetrica, sono generati l'oocita secondario (2n, 2c) e il primo globulo polare. Infine, attraverso la Meiosi II è completata la maturazione dell'oocita (n,c) (modificata da Desai et al., 2013).

Entrato nella fase meiotica, l'oogonio ($2n, 4c$) è definito oocita primario; il primo step effettuato è la profase I, la quale è composta da cinque sottofasi: leptotene, zigotene, pachitene, diplotene e diacinesi. È una fase importante perché avvengono eventi cruciali come il crossing over (pachitene) e, successivamente, il blocco della meiosi allo stadio di diplotene, determinando una fase di riposo prolungata, detta dittato (Garagna et al., 2010; Sánchez and Smitz, 2012). Dalla pubertà in poi, solo gli oociti ovulati al termine di ogni ciclo di follicologenesi riprendono la meiosi, producendo un oocita secondario ($2n, 2c$) ed un globulo polare, il quale è eliminato poco prima o subito dopo la fecondazione (**Figura 4**).

L'oocita risultante effettua la seconda meiosi, la quale è bloccata nuovamente, nella maggior parte dei mammiferi, allo stadio di metafase II. Il completamento del processo meiotico, il quale avviene solo se la cellula uovo è fecondata, comporta l'espulsione di un secondo globulo polare e di un pronucleo aploide (n, c) (**Figura 4**) (Garagna et al., 2010; Gilbert et al., 2018).

2.2 Follicologenesi

La follicologenesi è il processo attraverso il quale i follicoli ovarici si formano, crescono e maturano all'interno dell'ovaio. Nei mammiferi, a seconda della specie può iniziare nel periodo fetale, come nell'uomo, oppure dopo la nascita, come nel topo.

Questo processo ha origine con la formazione dei follicoli primordiali, i quali sono in uno stato di quiescenza fino alla pubertà, momento in cui una parte di questi follicoli viene gradualmente attivata per intraprendere il percorso di crescita e maturazione (**Figura 5**) (Garagna et al., 2010; Mumusoglu et al., 2025).

Nei follicoli attivati, l'oocita inizia un processo di accrescimento mentre le cellule follicolari proliferano, formando un singolo strato, e subiscono una transizione morfologica da cellule appiattite a cuboidali. Nella struttura risultante, definita follicolo primario, l'oocita continua ad aumentare di dimensioni contemporaneamente alla proliferazione delle cellule della granulosa, le quali formano l'epitelio pluristratificato della granulosa (**Figura 5**). In questa fase si forma anche la zona pellucida (ZP), una struttura fondamentale non solo nel processo di oogenesi, ma anche nella fecondazione, dove promuove il legame con lo spermatozoo, e sviluppo embrionale, dove protegge l'embrione fino all'impianto nell'utero. Questo strato è formato da glicoproteine assemblate in fibrille e secrete dalle cellule della granulosa e dall'oocita stesso. In particolare, nel topo, sono coinvolte tre proteine ZP1, ZP2, ZP3, mentre nell'uomo è presente una quarta glicoproteina ZP4 (Gupta et al., 2009; Ross et al., 2010).

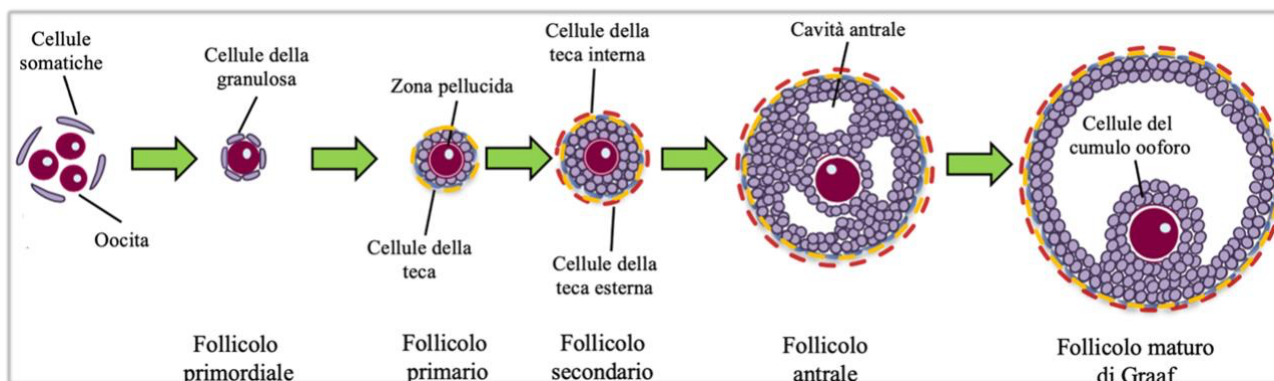


Figura 5. Il follicolo: dallo stadio primordiale alla maturità pre-ovulatoria. L'immagine evidenzia la progressiva organizzazione cellulare che circonda l'oocita: l'avvolgimento da parte delle cellule follicolari e il loro differenziamento, la comparsa della ZP, la stratificazione della granulosa, la formazione della cavità antrale e la differenziazione delle cellule del cumulo ooforo (modificata da Sánchez and Smitz, 2012).

Terminata la sintesi delle ZP, la struttura ovarica derivante è il follicolo secondario, nel quale si osserva lo sviluppo di nuova struttura cellulare esterna, lo strato della teca, il quale è formato dalle cellule della teca, derivanti dallo stroma circostante. In particolare, si distingue uno strato interno con funzione steroidogenica ed uno esterno con funzione strutturale. Contestualmente prosegue la proliferazione delle cellule della granulosa, le quali una volta raggiunto uno spessore tra 6-12 strati, secernano il *liquor follicoli*, un liquido ricco di acido ialuronico; questo, accumulandosi, porterà alla formazione di cavità, dette antri, lungo lo strato della granulosa (**Figura 5**). A questo stadio di maturazione, nel follicolo antrale è terminato l'accrescimento dell'oocita mentre la struttura follicolare continua la sua maturazione. In particolare, nel follicolo maturo o di Graaf i diversi antri si sono fusi in un'unica grande cavità e una parte della cellula della granulosa si è differenziata nelle cellule del cumulo ooforo, adiacenti all'oocita, per formare la corona radiata (**Figura 5**) (Ross et al., 2010).

Nelle strutture ovariche che hanno raggiunto lo stadio finale della maturazione, ovvero nel follicolo maturo o di Graaf, l'oocita è espulso attraverso un processo di ovulazione (**Figura 6**). In particolare, l'oocita è ovulato circondato dalla corona radiata, sotto forma del complesso oocita-cumulo ooforo (COC). A seguito di questo evento, le cellule della granulosa subiscono un processo di luteinizzazione, il quale prevede l'aumento di dimensioni e l'accumulo di un pigmento giallo, detto luteina. Le cellule luteinizzanti si uniscono alle cellule della teca interna, formando rispettivamente le grandi e piccole cellule teca-luteiniche (LLC & SLC), e determinando la formazione del corpo luteo (CL), il quale è responsabile della produzione di estrogeni e progesterone (Abedel-Majed et al., 2019; Reed and Carr, 2000).

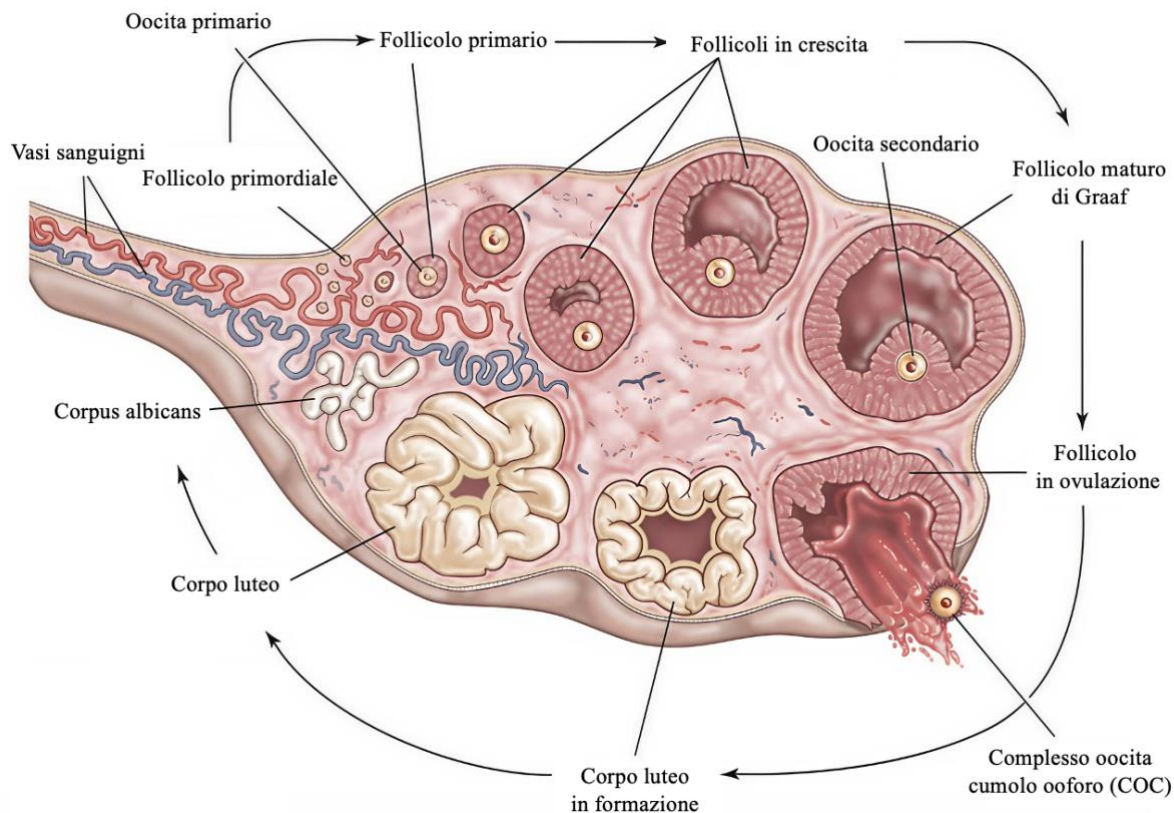


Figura 6. La follicologenesi all'interno di un ovario di mammifero. L'immagine illustra lo sviluppo dal follicolo primordiale al follicolo maturo di Graaf. Sono inoltre evidenziati il momento dell'ovulazione con l'espulsione del COC e la successiva formazione del corpo luteo (modificata dall'Enciclopedia Britannica, 2025).

La struttura e l'attività del corpo luteo sono mantenute se avviene la fecondazione e, nel caso in cui questa è avvenuta, finché la placenta non è in grado di sostenere autonomamente la produzione ormonale necessaria al sostenimento della gravidanza.

Quando le funzioni del CL non sono richieste, questo diminuisce gradualmente la sintesi ormonale e, attraverso la luteolisi, va a formare un tessuto cicatriziale visibile sulla superficie dell'ovario per alcuni cicli (**Figura 6**) (Holesh et al., 2023).

2.2.1 Classificazione dei follicoli

Per uniformare gli studi sulla maturazione follicolare è stata proposta una nomenclatura standard. Nel topo, la classificazione di Pedersen e Peters (1968) rappresenta uno dei sistemi più completi. Essa si basa su dimensioni dell'oocita, morfologia follicolare e numero di cellule follicolari, le quali determinano le dimensioni del follicolo.

I follicoli sono suddivisi in otto classi raggruppate in tre categorie principali (**Figura 7**):

- Follicoli piccoli
 - T1: follicolo ($\sim 15 \mu\text{m}$) costituito dal singolo oocita con un diametro inferiore a $20 \mu\text{m}$

- T2: follicolo ($\sim 20 \mu\text{m}$) primordiale in cui l'oocita è circondato da massimo quattro cellule della pregranulosa appiattite.
- Follicoli medi
 - T3: follicolo ($32 \pm 4,3 \mu\text{m}$) primario con oocita in accrescimento (inferiore a $30 \mu\text{m}$) circondato da un singolo strato di massimo 60 cellule della granulosa cuboidali; se il numero di quest'ultime è inferiore di venti, la struttura è ancora considerata un follicolo piccolo.
 - T4: follicolo ($53 \pm 12,7 \mu\text{m}$) secondario in cui l'oocita è circondato da un massimo di 100 cellule, divise in due strati cellulari.
 - T5: follicolo ($89 \pm 11,2 \mu\text{m}$) in cui l'oocita raggiunge delle dimensioni di $70 \mu\text{m}$ ed è circondato da tre strati di cellule follicolari. Se le cellule di questi strati sono più di 200, la struttura è considerata un follicolo grande.
- Follicoli grandi
 - T6: follicolo ($137 \pm 24,9$) in cui avviene la comparsa di piccoli antri pieni di liquido follicolare nello strato follicolare, composta da non più di 600 cellule follicolari.
 - T7: follicolo ($220 \pm 36,9 \mu\text{m}$) in cui le cellule follicolari sono più di 600 e gli antri si sono uniti in una singola cavità antrale. Inoltre, parte delle cellule follicolari iniziano la formazione del cumulo ooforo, strato follicolare che circonda l'oocita.
 - T8: follicolo ($320 \pm 21,3 \mu\text{m}$) pre-ovulatorio in cui l'oocita, con un diametro finale di $80 \mu\text{m}$, ha completato la maturazione mentre si osserva un cumulo ooforo ben definito e distinguibile dal resto delle cellule follicolari.

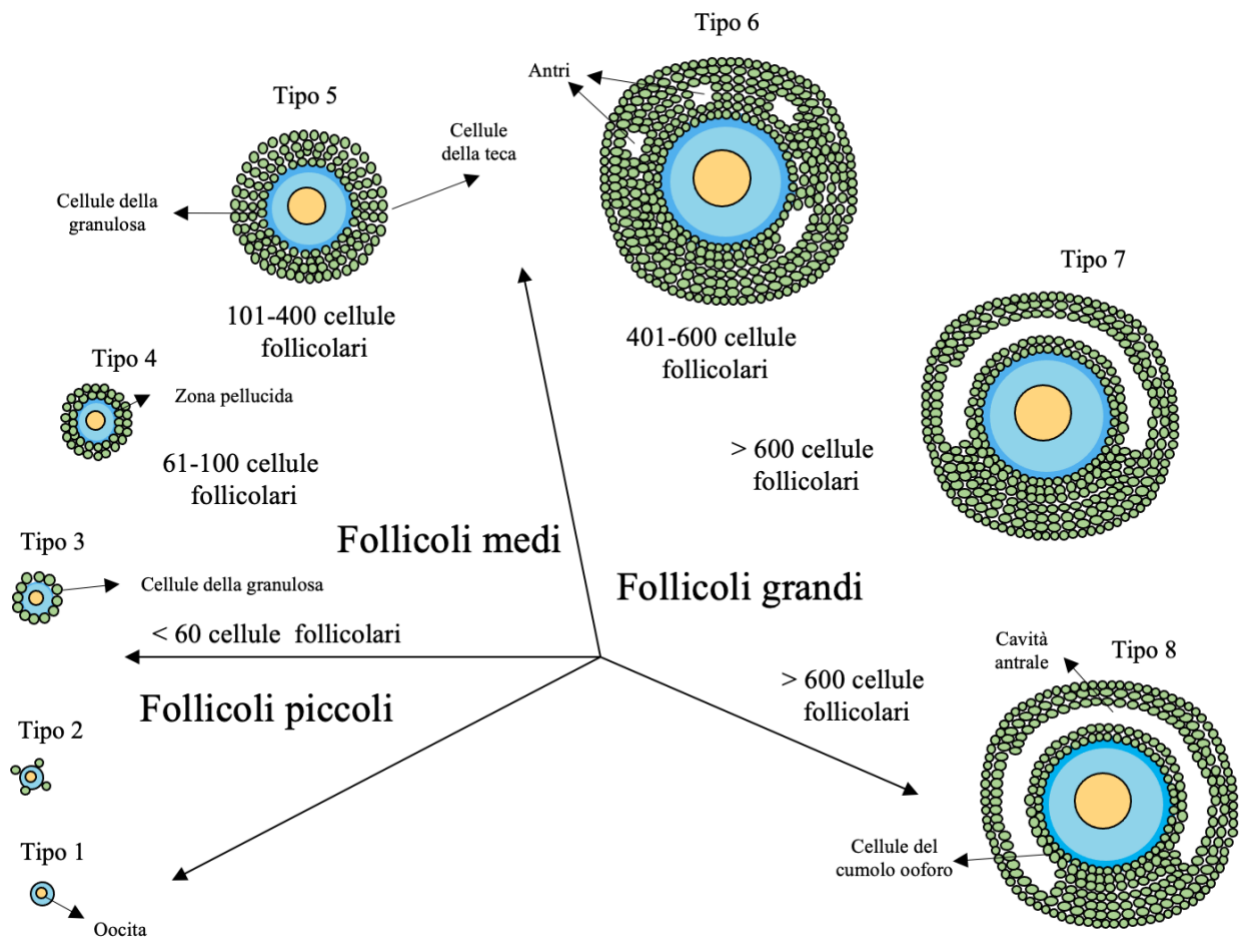


Figura 7. Classificazione dei follicoli in otto classi. Classificazione morfometrica dei follicoli ovarici in otto stadi evolutivi, suddivisi in tre gruppi in base al numero totale di cellule follicolari: Follicoli piccoli (meno di 20 cellule), Follicoli medi (meno di 400 cellule) e Follicoli grandi (modificata da Pedersen and Peters, 1968).

2.3 Regolazione della maturazione follicolare

L'oocita, durante l'oogenesi, va incontro ad una maturazione nucleare, necessaria per l'acquisizione della competenza meiotica, e maturazione citoplasmatica. Queste due processi sono estremamente correlati, in quanto solo se avvengono entrambi correttamente, l'oocita può essere fecondato e, successivamente, sostenere un corretto sviluppo embrionale. Il controllo di questi meccanismi è operato da fattori proteici o ad RNA prodotti dall'oocita stesso o, in alternativa, dalle cellule del cumulo ooforo, indicando quindi un'importante e complessa comunicazione bidirezionale tra gli elementi del COC (Sánchez and Smits, 2012).

La regolazione della folliculogenesi è suddivisa in due fasi, le quali si differenziano per la dipendenza dagli ormoni gonadotropici follicolo stimolante (FSH) e luteinizzante (LH) (**Figura 8**).

La folliculogenesi inizia con la fase gonadotropina-indipendente, la quale è regolata solo da processi biomeccanici mediati da fattori paracrini prodotti dalle cellule somatiche. In particolare, quest'ultima

producono il ligando KIT, un fattore di crescita, che induce nell'oocita l'attivazione del pathway PI3K-AKT-FOXO3. Il primo, PI3K, produce dei fattori lipidici che attivano AKT, il quale fosforila e reprime FOXO3, un fattore di trascrizione che inibisce i geni associata alla crescita follicolare. Tra i geni attivati, i più importanti sono GDF9 e BMP15, fattori di crescita (TGF- β), che stimolano rispettivamente la progressione della maturazione follicolare e la proliferazione delle cellule della granulosa, determinando il reclutamento casuale dei follicoli primordiali alla maturazione (**Figura 8**) (Fiorentino et al., 2023; Mumusoglu et al., 2025).

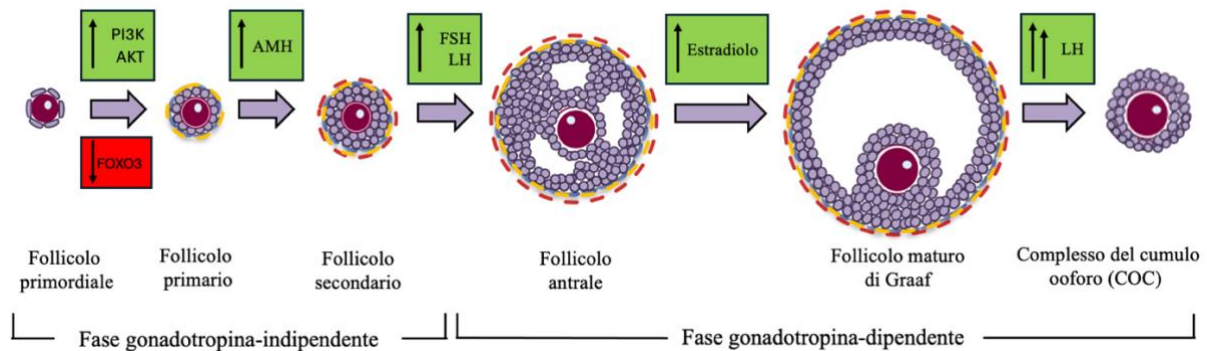


Figura 8. La regolazione della folliculogenesi e i fattori coinvolti. Il processo è suddiviso in una fase gonadotropina-indipendente e una fase gonadotropina-dipendente (modificata da Sánchez and Smitz, 2012).

Parallelamente, per limitare il numero di follicoli primordiali reclutati, le cellule della granulosa dei follicoli in crescita producono l'ormone anti-Mülleriano (AMH), il quale attiva una cascata di segnalazione intracellulare che inibisce l'espressione di geni coinvolti nella crescita follicolare (**Figura 8**) (Sánchez and Smitz, 2012).

La fase gonadotropina-dipendente inizia quando i follicoli in maturazione hanno raggiunto lo stadio secondario pre-antrale. In questo stadio, il fattore principale è la gonadotropina FSH, la quale interagisce con dei recettori transmembrana associati a proteine G espressi dalle cellule della granulosa, promuovendo la sintesi di cAMP e la protein-chinasi A (PKA), e determinando la produzione dell'enzima aromatasi. Quest'ultimo permette alle cellule della granulosa di trasformare gli androgeni, ormoni prodotti dalle cellule della teca a seguito della stimolazione di LH, in estradiolo, ormone fondamentale per il proseguo della maturazione (Bhartiya and Patel, 2021; Holesh et al., 2023; Sánchez and Smitz, 2012).

Durante questa fase avviene un processo di selezione che determina il proseguimento della folliculogenesi, per uno o pochi follicoli dominanti a seconda della specie. Questa scelta dipende dalla sensibilità dei follicoli all'ormone FSH, la quale è direttamente correlata al numero di recettori presenti sulla superficie delle cellule della granulosa. Su quest'ultime, nei follicoli selezionati, l'FSH aumenta l'espressione dei recettori per LH, mentre le restanti strutture follicolari sono degradate attraverso un meccanismo di atresia.

In questo modo, terminata la follicologenesi, i follicoli di Graaf sono sensibili al picco dell'ormone LH, essenziale affinché possa avvenire l'ovulazione (**Figura 8**). In particolare, la gonadotropina induce la produzione di enzimi proteolitici, che indeboliscono la parete follicolare permettendo il rilascio del COC. Inoltre, un altro effetto di questa regolazione è la produzione di una matrice extracellulare, ricca di acido ialuronico, da parte delle cellule del cumulo ooforo, determinando l'espansione della corona radiata, processo fondamentale per il raggiungimento della cellula uovo da parte dello spermatozoo (Bhartiya and Patel, 2021; Sánchez and Smitz, 2012).

I processi di oogenesi e follicologenesi sono strettamente correlati e coordinati tra loro. Infatti, durante l'accrescimento del follicolo, nell'oocita avviene la maturazione citoplasmatica e nucleare, con quest'ultima che culmina con la ripresa meiotica a seguito dell'ovulazione. In particolare, la ripresa del processo meiotico è dovuta al picco di LH, il quale chiude le *gap junction*, canali intercellulari oocita-cumulo ooforo sfruttati per la comunicazione bidirezionale, e attiva la produzione della Fosfodiesterasi 3A, enzima che degrada cAMP. Questo evento riduce il flusso del messaggero secondario verso l'oocita e, con il conseguente calo della concentrazione intracellulare, si ha l'attivazione del complesso *Maturation Promoting Factor* (MPF), elemento chiave per la ripresa della meiosi (Pei et al., 2023; Sánchez and Smitz, 2012).

2.4 Il ciclo ovarico e il ciclo uterino

Nei maggior parte dei mammiferi, durante l'età riproduttiva si ripete, periodicamente, l'estro, processo che nei primati può essere definito anche ciclo mestruale. Quest'ultimo richiede la coordinazione di tre cicli distinti: il ciclo ovarico, caratterizzato dalla maturazione dei follicoli, il ciclo uterino, contraddistinto dallo sviluppo dell'endometrio, e il ciclo cervicale, contrassegnato dalla variazione delle proprietà della mucosa cervicale (**Figura 9**).

L'estro è regolato mediante l'asse ipotalamo-ipofisi-ovario, il quale a seguito di stimoli ambientali, produce a livello dell'ipotalamo la gonadotropina GnRH, che stimola nell'ipofisi anteriore la sintesi degli ormoni FSH e LH. In particolare, l'asse descritto si attiva alla pubertà, rimane attivo per tutto il periodo fertile della femmina per poi arrestarsi alla menopausa (Thiyagarajan et al., 2024).

Il ciclo mestruale è diviso in fase follicolare e fase luteinica. La prima prevede lo sviluppo dei follicoli reclutati alla maturazione a seguito di un aumento della produzione di FSH. Durante la crescita follicolare, le cellule della granulosa secernano l'ormone 17- β estradiolo e inibina B, i quali agiscono negativamente a livello dell'ipotalamo e ipofisi, determinando una diminuzione dell'FSH.

Successivamente, l'incremento delle dimensioni del follicolo, associato all'aumento del numero delle cellule della granulosa, determina una maggiore produzione di 17- β estradiolo. Quando la concentrazione di quest'ultimo supera circa 200 pg/mL per 48-50 ore, il suo effetto su ipotalamo e ipofisi, trasla da negativo a positivo, determinando un rilascio massivo di LH. Il picco dell'ormone luteinizzante attiva i processi finali della follicologenesi, in modo che dopo 10-12 ore avvenga l'ovulazione, evento che stabilisce la fine della fase follicolare e il calo delle concentrazioni ormonali di estrogeni, FSH e LH (**Figura 9**) (Lee, 2023; Reed and Carr, 2000).

Parallelamente a quanto descritto, il 17- β estradiolo, stimola lo sviluppo dell'endometrio, aumentando anche il livello di irrogazione. Infine, l'ormone aumenta anche l'elasticità e il contenuto proteico del muco cervicale, creando canali che facilitano l'ingresso degli spermatozoi nella cavità uterina (Thiyagarajan et al., 2024).

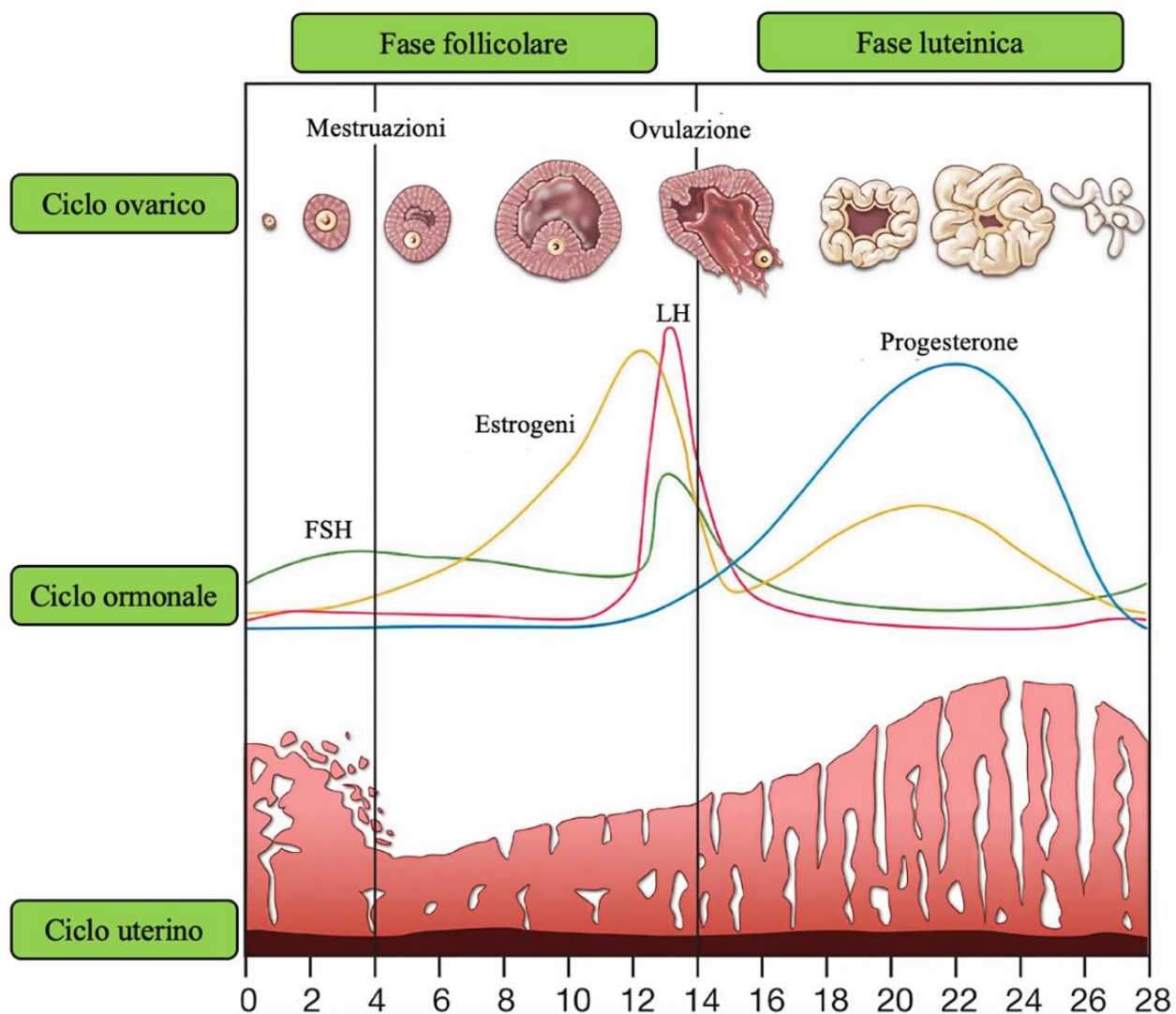


Figura 9. Ciclo mestruale. L'immagine mostra la sinergia tra il ciclo ovarico, il ciclo ormonale e il ciclo uterino (modificata dall'Enciclopedia Britannica, 2025).

Nella fase luteinica, il corpo luteo formatosi stimolato da LH, produce, nuovamente, estrogeni e progesterone, ormone essenziale per rendere l'endometrio adatto all'impianto di un ipotetico embrione e ridurre l'elasticità della mucosa cervicale, in modo da bloccare il passaggio di ulteriori spermatozoi (**Figura 9**). Tra gli ormoni prodotti, l'estrogeno 17- β estradiolo, in questa fase, agisce a livello ipotalamico, riducendo il rilascio di GnRH, in modo da limitare la produzione di FSH e LH, impedendo l'accrescimento di altri follicoli e/o l'ovulazione di ulteriori oociti (Reed and Carr, 2000). Successivamente, se avviene la fecondazione, l'embrione secerne una gonodotropina corionica (hCG), che mantiene attivo il corpo luteo, la cui funzione steroidogenica è essenziale per il sostenimento delle prime fasi dello sviluppo embrionale.

Viceversa, se l'oocita non viene fecondato, il progesterone esercita un feedback negativo sull'ipofisi, riducendo ulteriormente il rilascio di LH. Questa condizione attiva il processo di luteolisi, che determina un rapido e drastico calo di progesterone ed estrogeni. A questo punto l'ipotalamo può riprendere la produzione di GnRH, il quale stimola l'ipofisi a produrre FSH e LH, avviando un nuovo ciclo ovarico (**Figura 9**) (Thiyagarajan et al., 2024).

2.4 Atresia follicolare

L'atresia follicolare è un processo degenerativo, caratterizzato dall'interruzione della crescita e dalla successiva regressione di un follicolo durante il suo sviluppo. Questo meccanismo, che colpisce nei mammiferi circa il 99,9% dei follicoli, garantisce la qualità degli oociti ovulati (Zhang et al., 2025). Oltre ad una carenza della gonadotropina FSH tra i fattori che inducono il processo di atresia follicolare, rivestono un ruolo principale le cellule della granulosa, le quali producono dei fattori di sopravvivenza cellulare, quali i fattori di crescita (IGF, EGF e FGF- β) e interleuchine (IL-1 β e IL-6). Un'eventuale carenza di queste molecole determina una mancata produzione di fattori anti-apoptotici essenziali, come l'estradiolo e il fattore di crescita insulino-simile 1 (IGF-1), che trasforma le cellule follicolari in cellule apoptotiche. In quest'ultime, il pathway PI3K-AKT-FOXO3 non è attivato, per cui FOXO3 defosforilato entra nel nucleo, dove attiva fattori pro-apoptotici come il ligando del recettore FAS (FASLG) e *BCL2 like 11* (BCL2L11) (Inoue et al., 2011; Zhao et al., 2018).

Parallelamente, sono attivate delle caspasi (CASP-3, CASP-8, CASP-9), una classe di proteasi che attraverso la degradazione del DNA nucleare, innescano il processo di apoptosi (Matsuda et al., 2012). Tuttavia, all'atresia follicolare contribuiscono anche processi di auto degradazione cellulare (autofagia), attivi soprattutto in carenze nutrizionali e squilibrio ormonale, e ferroptosi, cioè l'accumulo intracellulare di specie reattive dell'ossigeno (ROS), associata ad una riduzione della

capacità antiossidante cellulare. In particolare, le molecole ROS interagiscono con Fe^{2+} , sviluppando la reazione di Fenton, la quale porta alla morte cellulare (Zhang et al., 2025).

Le anomalie morfologiche principali osservate in strutture atresiche sono degenerazione di oocita e cellule follicolari, con quest'ultime che tendono a formare dei corpi apoptotici, che portano progressivamente alla perdita di identità del follicolo, il quale si confonde con il tessuto interstiziale (**Figura 10**) (Wang et al., 2010).

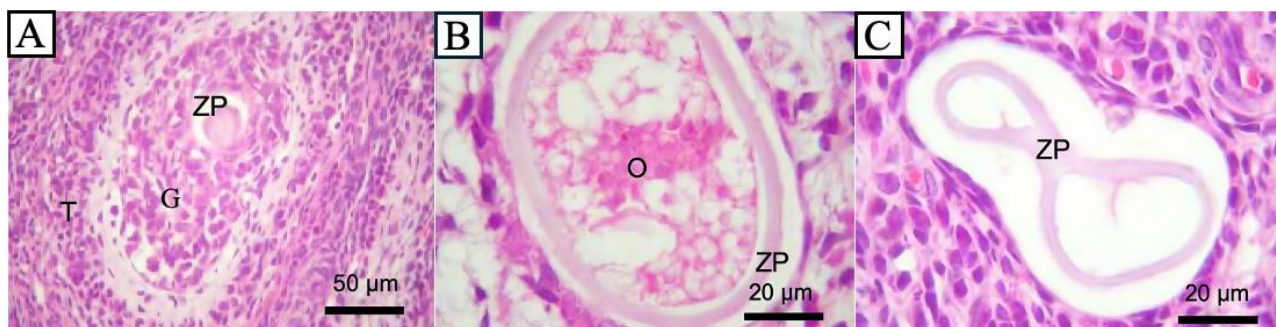


Figura 10. I follicoli atresici. Sezioni di ovario colorate con ematossilina ed eosina. A) follicolo atresico in cui le cellule della granulosa si presentano disorganizzate, B) oocita in uno stadio avanzato di degenerazione, caratterizzato da vacuolizzazioni del citoplasma, C) fase finale del processo degenerativo, con la permanenza del solo residuo della zona pellucida. O=oocita; G=cellule della granulosa; T=cellule della teca; ZP=zona pellucida (modificata da Wang et al., 2010).

L'atresia può verificarsi in qualsiasi stadio di sviluppo follicolare, risultando meno frequente nei follicoli pre-antrali. In questi follicoli, il processo degenerativo interessa contemporaneamente sia l'oocita sia le cellule follicolari circostanti. Nei follicoli antrali, invece, le prime alterazioni degenerative si manifestano principalmente a livello delle cellule della granulosa. Nelle fasi successive, il processo atresico si estende progressivamente alle altre componenti follicolari, fino a coinvolgere anche l'oocita (Inoue et al., 2011; Meng et al., 2018). A prescindere dalla tipologia di follicoli, il risultato della degenerazione sono dei residui di zona pellucida (zona pellucida remnants, ZPR) mentre lo spazio precedentemente occupato dalle cellule follicolari assorbite è colonizzato dalle cellule stromali circostanti (**Figura 10**) (Ross et al., 2010; Uslu et al., 2017). In particolare, le ZPR possono persistere nello stroma ovarico, prima di essere eliminate, per periodi prolungati, anche superiori a dieci settimane. Inoltre, il grado di longevità di queste strutture è correlato alla loro localizzazione all'interno dell'ovaio; infatti, le ZPR situate nella regione midollare tendono ad essere più obsolete rispetto a quelle localizzate nella corticale (Uslu et al., 2017).

2.5 Invecchiamento dell'ovario e declino della fertilità

La fertilità è una condizione limitata al periodo riproduttivo. Infatti, nonostante lo sviluppo dei gameti inizi durante la fase fetale, essa subisce un'interruzione alla nascita, per poi riprendere con l'inizio della pubertà e concludersi definitivamente con la menopausa. Nel periodo fertile, soltanto un numero limitato di oociti viene ovulato, pari a poche centinaia, valore significativamente inferiore rispetto al numero massimo di cellule germinali raggiunto prima dell'avvio della meiosi (**Figura 11**) (Gilbert et al., 2018; Sánchez and Smitz, 2012).

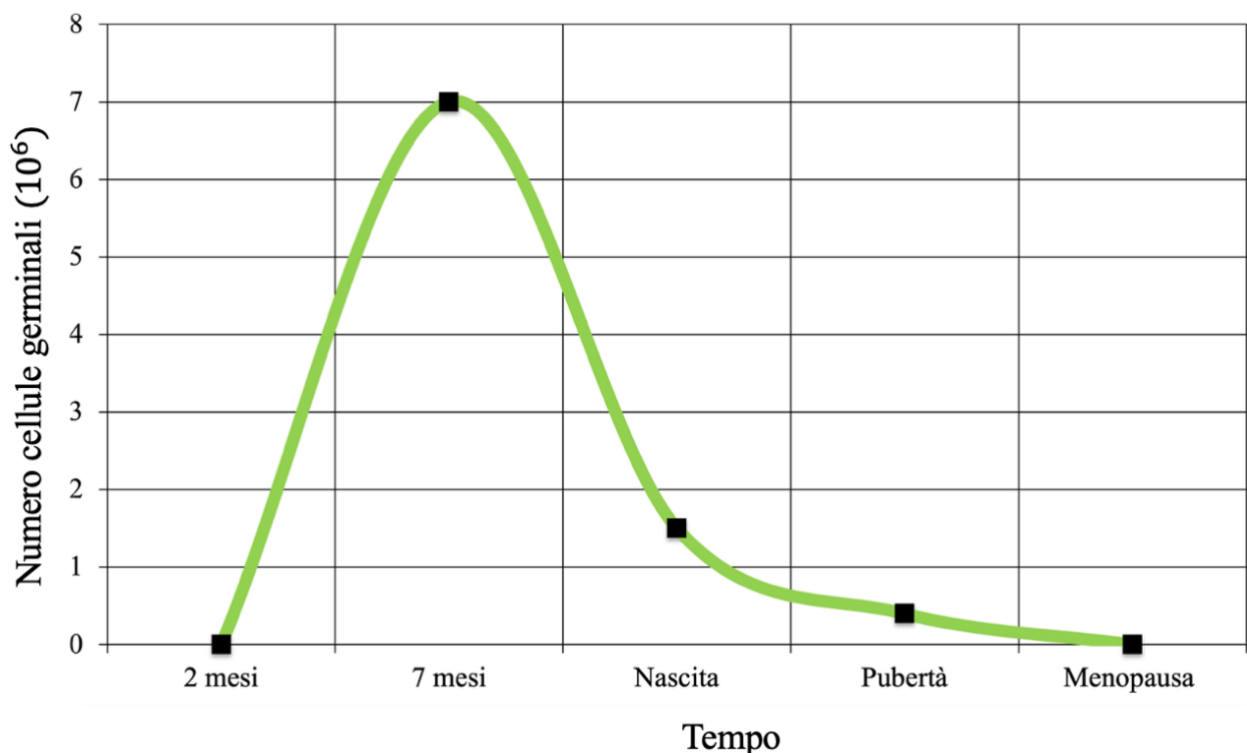


Figura 11. Il declino nel tempo del pool ovarico. Il grafico evidenzia il picco massimo di oociti (circa 7 milioni) raggiunto intorno al settimo mese di vita fetale, seguito da un drastico e costante declino che riduce il patrimonio a circa 1,5 milioni alla nascita, meno di 500.000 alla pubertà, fino al completo esaurimento in coincidenza con la menopausa (basata sui dati Liu et al., 2025).

Il potenziale riproduttivo femminile è determinato dalla quantità e dalla qualità degli ovociti, entrambe soggette a un significativo declino associato all'età (Liu et al., 2025). La diminuzione della riserva ovarica inizia nel periodo fetale, quando gli oogoni entrano in meiosi. La causa di questa prima perdita non è completamente caratterizzata, ma l'opzione più probabile è una combinazione di tre eventi: una quantità limitata di fattori trofici, un meccanismo di selezione per rimuovere le cellule germinali con errori genetici o di appaiamento meiotico e il sacrificio di un oocita morente per fornire nutrimento ed energia alle cellule sopravvissute. La perdita successiva avviene, ancora in fase fetale, durante la formazione dei follicoli primordiali, dove gli oociti, in assenza di fattori trofici e molecole segnale, sono persi per processi apoptotici e di autofagia (**Figura 11**) (Sun et al., 2017).

Il calo del numero di gameti si verifica anche durante l'apparente stato di quiescenza tra la nascita e la pubertà. In particolare, la deprivazione della riserva ovarica avviene attraverso un processo, innescato dalle gonadotropine, che richiede la proteina pro-apoptotica BMF (**Figura 11**) (Liew et al., 2017). Infine, un'ulteriore perdita è osservata ciclicamente, dalla pubertà in poi, durante la follicologenesi (Bhartiya and Patel, 2021). La perdita di qualità degli oociti, invece, è correlata all'avanzare dell'età e determina un aumento dell'instabilità genomica durante l'oogenesi. Quando si presenta questa situazione, gli oociti mostrano spesso un assetto cromosomico aneuploide, con conseguente aumento di problemi durante l'impianto dell'embrione (Liu et al., 2025).

Durante l'invecchiamento dell'ovario, parallelamente a quanto descritto, avvengono delle modificazioni nel microambiente tissutale che contribuiscono al declino funzionale dell'organo (**Figura 12**). Tra queste, la fibrosi ovarica causa un irrigidimento dello stroma, associato ai livelli del collagene e dell'acido ialuronico della matrice extra-cellulare che tendono rispettivamente ad aumentare e diminuire (Amargant et al., 2020; Liu et al., 2025). A questo, si affianca un progressivo calo dell'efficienza del meccanismo di neoangiogenesi e un processo di *inflammaging*, il quale consiste in un aumento dello stato infiammatorio dell'organo, associato ad un incremento della popolazione di macrofagi derivanti da monociti. Infine, i fattori ambientali ed esterni, come la dieta, possono influenzare i processi intrinseci associati all'invecchiamento (Liu et al., 2025; Zhang et al., 2020).

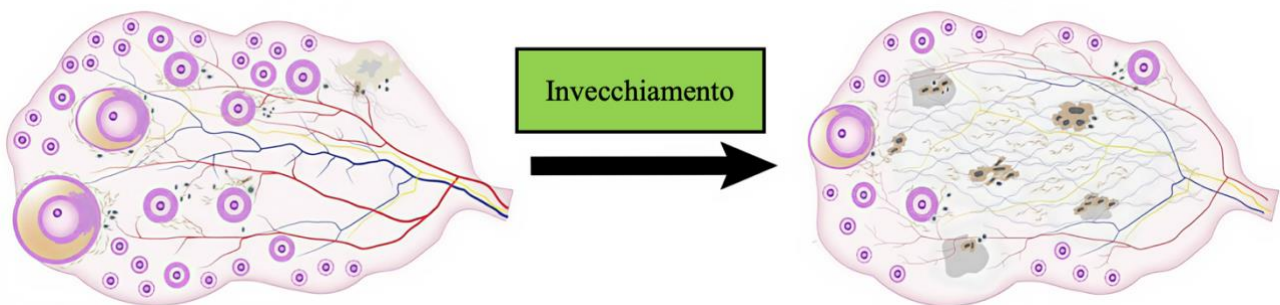


Figura 12. I cambiamenti del microambiente ovarico durante l'invecchiamento. Il declino dell'ovario evidenzia una drastica riduzione della riserva ovarica, un aumento del tessuto fibrotico stromale, una progressiva riduzione della vascolarizzazione stromale e incremento dello stato infiammatorio dell'organo (modificata da Shen et al., 2023).

3. Ricostruzione tridimensionale dell'ovario

Recentemente, un interesse crescente della comunità scientifica mira a comprendere i processi di sviluppo e funzionamento di organi, tessuti o di interi organismi, integrando informazioni molecolari, biochimiche, cellulari e fisiologiche con dati sperimentali sul contesto anatomico tridimensionale da cui derivano. Il risultato di questi approcci è la produzione di atlanti o *digitali twin*, ovvero modelli tridimensionali di tessuti, organi o organismi, utili sia per fini diagnostici che di ricerca (Fiorentino et al., 2021; Ghose et al., 2022). Nel contesto ovarico, questa procedura pone come obiettivo la comprensione della dinamicità dell'organo, dovuta ai processi di follicologenesi, atresia follicolare, neoangiogenesi e ovulazione. Infatti, ad oggi la maggior parte delle informazioni ottenute deriva da studi basati su dati bidimensionali ottenuti tramite sezionamento dell'organo o da studi in vitro di singole componenti follicolari disgregate (Fiorentino et al., 2020, 2021).

La ricostruzione tridimensionale di un organo si basa sull'estrazione della geometria 3D tramite un workflow articolato in quattro fasi fondamentali: acquisizione di immagini seriali, registrazione delle immagini, segmentazione e rendering tridimensionale (**Figura 13**).

L'acquisizione seriale delle immagini prevede, sfruttando diversi possibili approcci (**Figura 13**), la formazione di un dataset, ovvero un insieme di immagini 2D rappresentanti l'intero volume dell'organo. Queste sezioni, nella fase successiva di registrazione, sono allineate tramite dei punti comuni in immagini successive, determinando la formazione di uno stack coordinato e coerente. La segmentazione, invece, permette di identificare all'interno delle diverse sezioni bidimensionali delle regioni d'interesse (ROI) con un significato biologico. Infine, il rendering 3D permette di visualizzare l'organo ricostruito, sfruttando le immagini bidimensionali, lungo i tre assi x, y e z (Fiorentino et al., 2021).

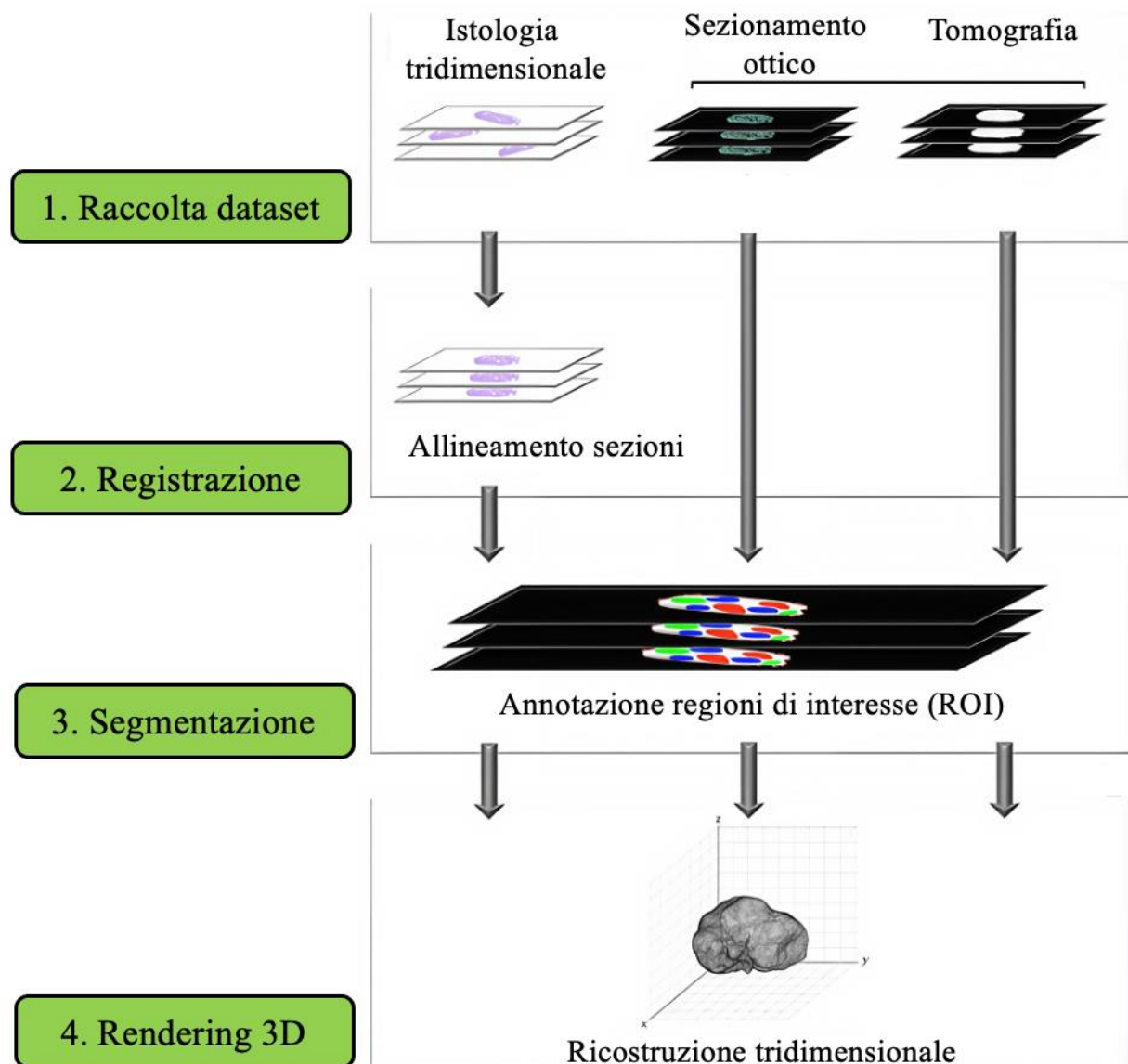


Figura 13. I principali step per la ricostruzione tridimensionale *in silico*. 1. Raccolta dataset: acquisizione di sezioni bidimensionali; 2. Registrazione: allineamento geometrico digitale delle sezioni; 3. Segmentazione: identificazione e tracciamento delle regioni di interesse (ROI); 4. Rendering 3D: generazione del modello volumetrico tridimensionale (modificata da Fiorentino et al., 2021).

3.1 La nanotomografia computerizzata

Ad oggi, sono molteplici gli approcci di *imaging* con i quali si è riusciti a sviluppare modelli tridimensionali di tessuti o organi (**Figura 13**) (Feng et al., 2017; Fiorentino et al., 2020; Kim et al., 2012; Nakata et al., 2017). Tra questi, la tomografia computerizzata (CT), una tecnica *ex vivo*, rappresenta un'ottima alternativa. In particolare, sfruttando la capacità dei raggi X di attraversare i tessuti biologici, permette di ricostruire veri modelli 3D del campione attraverso voxel cubici isotropi (Fiorentino et al., 2021; Rawson et al., 2020). Quest'ultimi sono l'equivalente tridimensionale dei pixel e formano una griglia regolare di cubi, ciascuno dei quali può memorizzare informazioni come colore, densità e proprietà materiali, garantendo una rappresentazione dettagliata dell'oggetto (Bortner and Cidlowski, 2004)

Inoltre, l'utilizzo dell'approccio CT permette di bypassare lo step di registrazione a seguito dell'acquisizione delle immagini (**Figura 13**). Questo è possibile poiché nella tomografia computerizzata i dati acquisiti sono intrinsecamente allineati e immediatamente utilizzabili per la segmentazione e la visualizzazione tridimensionale successiva (Fiorentino et al., 2021).

Il progressivo avanzamento tecnologico ha consentito un significativo incremento della risoluzione isotropica, la quale è passata da una scala micrometrica (microCT) ad una nanometrica (nanoCT). In dettaglio, nella nanotomografia computerizzata i raggi X sono generati da un tubo radiogeno dotato di bersaglio a trasmissione con fascio nanofocalizzato, il quale consente di ridurre significativamente la dimensione del punto focale. Questa configurazione permette inoltre di limitare gli effetti di ombreggiatura periferica, consentendo di ottenere una risoluzione superiore rispetto a quella tipicamente raggiungibile con la microCT (Du Plessis and Broeckhoven, 2019; Khoury et al., 2015). Per acquisire le immagini, il campione è posizionato su un supporto rotante ed esposto al fascio di raggi X, in modo che le proiezioni bidimensionali, derivanti dall'attenuazione del campione, siano convertite in fotoni dello spettro della luce visibile mediante uno scintillatore. Successivamente, i fotoni sono ingranditi tramite una lente obiettivo ($\times 4$ o $\times 20$) e captati da un *charge-coupled detector* (CCD) (**Figura 14**) (Salarian and Toyserkani, 2018). Quest'ultimo, in funzione delle informazioni captate, produce una serie di immagini 2D, che a seguito dell'elaborazione tramite specifici algoritmi di ricostruzione, permettono di ottenere un dataset tomografico in 3D dell'oggetto analizzato in scala di grigi (Du Plessis and Broeckhoven, 2019).

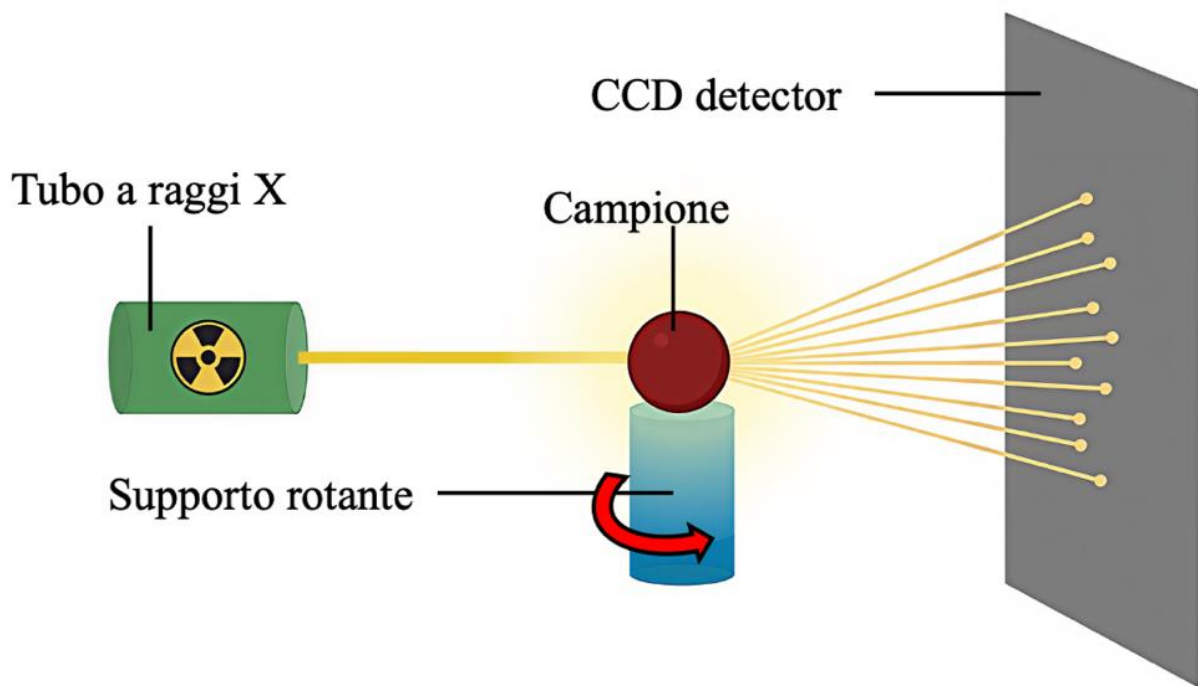


Figura 14. Le componenti principali di un tomografo con risoluzione nanometrica. Il sistema si basa su 4 elementi fondamentali: la sorgente di raggi X, il campione, il supporto rotante e il detector CCD (modificata da Salarian and Toyserkani, 2018).

Tra le miglione presenti nella nanoCT, è molto rilevante il livello di energia usato dai sistemi tomografici. In particolare, i sistemi di microCT operano a energie elevate dei raggi X (90–225 keV), mentre i sistemi di nanoCT funzionano a energie inferiori ai 10 keV. La riduzione energetica rappresenta un vantaggio importante, in quanto consente di ottenere una migliore risoluzione spaziale e un maggiore contrasto nei tessuti molli (Rawson et al., 2020). Quest’ultimi, a differenza dei tessuti duri e radiopachi, sono radiotrasparenti, per cui affinché sia possibile applicare la tecnica descritta è necessario trattare i tessuti molli, tra cui anche l’ovario, con dei mezzi di contrasto. Questi permette di aumentare la radiopacità delle diverse componenti tissutali, rendendole distinguibili tra loro e migliorando la qualità dell’analisi tomografica (Fiorentino et al., 2020). Inoltre, una risoluzione nanometrica permette la visualizzazione e analisi di elementi molto piccoli nel range sub-micrometrico (Kampschulte et al., 2016).

Nonostante i significativi vantaggi portati dalla nanoCT, ad oggi, non è stato pubblicato nessun lavoro riguardo lo sviluppo di un atlante 3D dell’ovario utilizzando la tecnica descritta; infatti, in letteratura sono ritrovabili solo i modelli ottenuti tramite microCT. In particolare, in un primo approccio sono stati ricostruiti diversi ovario 3D di mammiferi (ratto, cane, gatto, maiale, mucca, asino e cavallo), con una risoluzione isotropica di 9 $\mu\text{m}/\text{pixel}$, nel quale è stato possibile osservare la

distribuzione dei vasi sanguigni, distinguere la regione corticale e midollare e identificare i follicoli antrali avanzati e i corpi lutei (Paulini et al., 2017).

In uno studio più recente, dopo aver ottimizzato la procedura di contrasto e le condizioni per l'imaging microCT, si è riusciti a ricostruire un ovario di topo adulto con una risoluzione di 1,5 $\mu\text{m}/\text{pixel}$. Dall'analisi di questo modello tridimensionale, sono stati identificati i principali vasi sanguigni e le rispettive ramificazioni dall'ilo fino alla regione corticale e le strutture follicolari a partire dallo stadio secondario pre-antrale, che corrisponde alla tipologia T4, secondo la classificazione di Pedersen and Peter. Inoltre, è stato possibile distinguere gli elementi costitutivi dei follicoli come le cellule della granulosa e del cumulo, l'antra, lo spazio della zona pellucida, l'oocita e il suo nucleo (**Figura 15**) (Fiorentino et al., 2020).

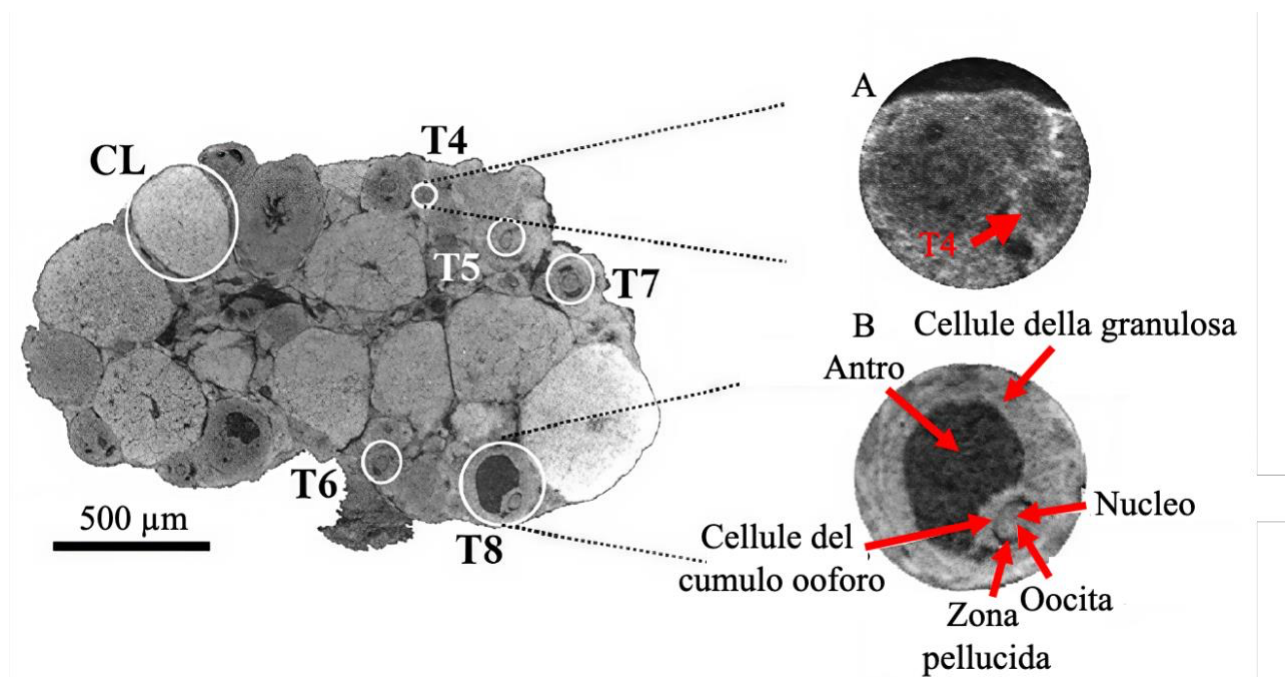


Figura 15. L'identificazione delle tipologie follicolari e delle loro componenti principali nell'ovario di topo adulto. A) Ingrandimento del follicolo T4; B) Ingrandimento del follicolo T8 per osservare le sue principali componenti citologiche (modificata da Fiorentino et al., 2020).

3.2 Segmentazione

La segmentazione è un processo mediante il quale un'immagine bidimensionale viene suddivisa in diverse regioni di interesse (ROI), ciascuna costituita da un insieme di pixel accomunati da uno specifico significato biologico (Fiorentino et al., 2021). In particolare, la segmentazione può essere semantica, in cui si assegna un'etichetta a gruppi di pixel dell'immagine distinguendoli dal *background*, o per istanza, la quale permette di classificare elementi diversi appartenenti alla stessa macrocategoria e precedentemente distinti dal *background* (Sharma et al., 2022; Yu et al., 2018).

A prescindere dalla tipologia, si possono distinguere tre approcci di segmentazione: manuale, semi-automatico o automatico, i quali si differenziano per l'intervento umano richiesto. Il primo, la strategia manuale, è lo standard di riferimento per la segmentazione volumetrica 3D e, infatti, è necessaria per lo sviluppo degli altri due tipi di approcci e per valutare l'accuratezza di quest'ultimi confrontando i loro risultati con quelli manuali dell'operatore.

Tuttavia, è una procedura che presenta diverse criticità, in quanto è completamente effettuata da un operatore, il quale identifica la ROI e traccia dei confini attorno ad essa. Questo determina un'elevata variabilità inter-osservatore e una precaria relazione e continuità tra le sezioni che porta ad una ricostruzione irregolare che influenza inevitabilmente le analisi successive (Gao et al., 2024; Rizwan I Haque and Neubert, 2020).

La segmentazione semi-automatica, invece, sfrutta un algoritmo inizializzato e guidato dall'utente, il quale fornisce un input concreto come il posizionamento di punti con coordinate spaziali (*seed points*) sull'immagine, il disegno di contorni della struttura da segmentare o la marcatura di zone di interesse (*foreground*) e sfondo (*background*). Successivamente l'algoritmo, sfruttando ad esempio *tool* come l'interpolazione, determina le ROI in funzione degli input manuali forniti (Maleike et al., 2009).

Infine, l'approccio automatico è definito tale in quanto non richiede alcuna interazione da parte dell'utente. Tuttavia, la maggior parte delle tecniche automatiche non è autonoma in senso assoluto, ma necessita di dati *ground truth* di addestramento e valutazione, i quali derivano da immagini annotate ottenute con la segmentazione manuale. In dettaglio, il dataset segmentato manualmente dato per l'allenamento permette un apprendimento supervisionato che garantisce all'algoritmo l'acquisizione della capacità desiderata. Viceversa, il dataset di segmentazione manuale dato per la validazione permette di valutare le prestazioni del modello mediante un confronto tra i dati generati manualmente e automaticamente (Qi et al., 2025).

In questo contesto, si sta lavorando per svincolare progressivamente gli algoritmi di segmentazione automatica dal loro addestramento tramite una grande mole di segmentazioni manuali, sviluppando un approccio automatico non supervisionato.

Un approccio che potrebbe favorire il raggiungimento di tale traguardo è il *deep learning* (DL), il quale è in grado di elaborare direttamente le immagini grezze, eliminando così la necessità di fornire caratteristiche definite manualmente. Parallelamente, gli algoritmi alla base del Deep Learning (DL) sono in grado di estrarre automaticamente dai dati molteplici livelli di informazione, inclusi pattern e caratteristiche non direttamente osservabili dall'operatore. Questa capacità consente di ampliare le potenziali applicazioni dell'approccio, favorendone l'impiego in contesti più complessi e diversificati. Tuttavia, affinché si possano ottenere dei risultati soddisfacenti, il DL richiede un vasto set di dati di

imaging, caratteristica che non lo rende ancora indipendente dall'approccio manuale (Rizwan I Haque and Neubert, 2020).

Ad oggi, sfruttando i tre approcci descritti, sono state ottenute ricostruzioni tridimensionali dell'ovario che hanno permesso di studiarne la struttura e quantificarne i follicoli sia in contesti di ricerca che clinici. Ad esempio, a seguito di segmentazione manuale su un ovario murino adulto, è stato possibile identificare i principali vasi sanguigni e le strutture follicoli dallo stadio T4 allo stadio T8, e i corpi lutei. Questa ricostruzione, ha permesso una analisi spaziale dei follicoli, osservando una distribuzione quantitativamente omogenea nell'organo, suddividendone il volume sia lungo l'asse anatomico anteriore-posteriore che e dorsale-ventrale (**Figura 16**) (Fiorentino et al., 2020).

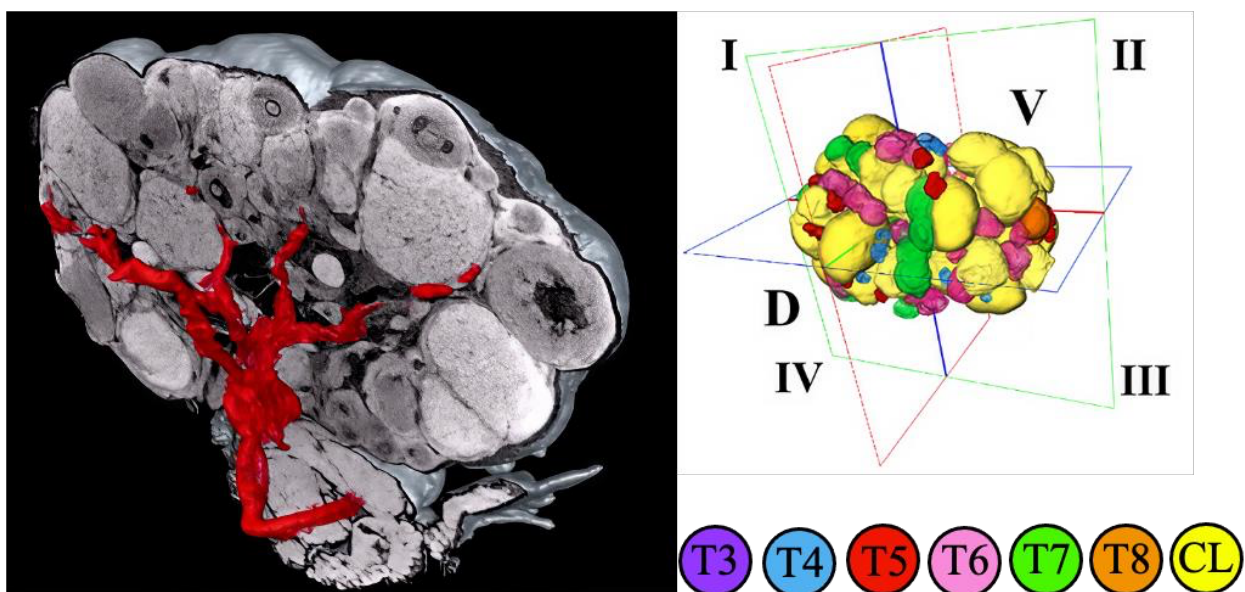


Figura 16. Rendering 3D di un ovario di topo adulto. Ricostruzione tridimensionale *in silico* di follicoli e corpi lutei (distinti per colore) e dei principali vasi sanguigni contenuti in un ovario di topo adulto (modificata da Fiorentino et al., 2020).

In ambito clinico, grazie ad un approccio semi-automatico è stato possibile conteggiare i follicoli in ovari umani per implementare la diagnosi della sindrome dell'ovario policistico, la principale causa dell'infertilità femminile. In particolare, utilizzando il modello SAM2 implementato in 3D slicer è stato possibile ricostruire tridimensionalmente i follicoli a partire da input manuali inseriti nelle sezioni centrali delle ovaie. Successivamente, i dati ottenuti dell'algoritmo sono stati validati dal conteggio follicolare su immagini casuali da parte di operatori specializzati (Zeng et al., 2025). Infine, per quanto riguarda gli algoritmi automatici è stato recentemente sfruttato il modello LCR-UNet per l'analisi dell'ovaio umano, il quale ha acquisito la capacità di identificare i follicolari antrali e, tra questi, il follicolo dominante, a seguito di una procedura di apprendimento supervisionato (Hong et al., 2026).

3.3 Rendering 3D

Il Rendering è un metodo di *Computer Graphics* che, tramite tecniche di illuminazione e ombreggiatura, rappresenta, su un monitor 2D, il volume 3D e la profondità dell'organo analizzato. In seguito a segmentazione, il rendering 3D di un organo può essere realizzato tramite due principali famiglie di algoritmi: *Surface Rendering* (SR) e *Volume Rendering* (VR) (Fiorentino et al., 2021). Il SR sfrutta una struttura geometrica composta da un insieme di punti nello spazio 3D (vertici), segmenti che collegano tali punti (spigoli), e poligoni delimitati dagli spigoli (facce). Il mesh di poligoni derivante approssima un'isosuperficie a partire dal perimetro segmentato dell'organo, producendo un oggetto finale con una superficie opaca e luminosa (El Seoud and Mady, 2019; Shirley et al., 2011). Un'applicazione concreta del SR è la ricostruzione tridimensionale degli ovari a partire da esami ecografici 3D o CT. Il mesh poligonale derivante consente di visualizzare con chiarezza la morfologia esterna dell'organo ed eventuali cisti o corpi solidi irregolari associati (**Figura 17.A**). Questo, supporta la diagnosi e la pianificazione dell'intervento da parte del ginecologo (Pashaj and Merz, 2013).

Il VR, a differenza del precedente, mostra non solo la superficie dell'organo ma anche le sue caratteristiche interne. Questo è possibile sfruttando tutti gli elementi che compongono il volume 3D, ovvero i voxel, equivalenti 3D dei pixel 2D. Grazie a funzioni di ombreggiatura, opacità e colore, codificate attraverso valori RGBA, quali rosso, verde, blu e alpha, con quest'ultimo indicante l'opacità, il VR permette l'osservazione tridimensionale anche di ciò che è contenuto all'interno della superficie 3D dell'organo (El Seoud and Mady, 2019)

Gli ambiti applicativi dell'approccio di VR possono essere più semplici come il conteggio follicolare (**Figura 15-16**) o più complessi come l'identificazione di masse tumorali, a seguito di acquisizione di immagini mediante CT, di pazienti affetti da problematiche oncologiche (**Figura 17.B**) (Fiorentino et al., 2020; Jin et al., 2018).

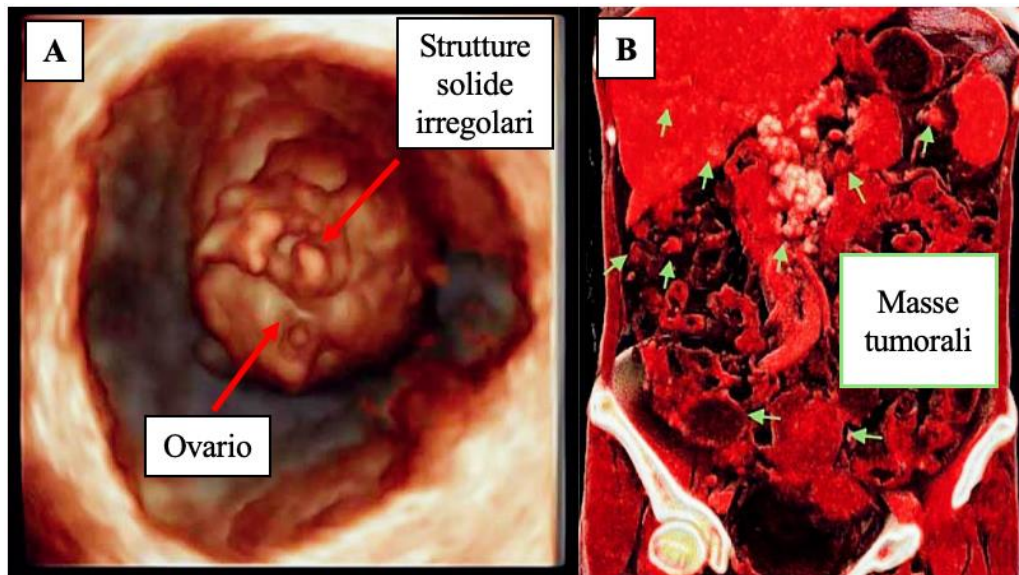


Figura 17. Applicazioni del rendering 3D. A) *Surface rendering* di un ovario umano (modificata da Pashaj and Merz, 2013). B) *Volume rendering* di un busto umano (modificata da Jin et al., 2018).

Recentemente, lo stato dell'arte è progredito sviluppando i modelli *Neural radiance fields* (NeRF) e, successivamente, lo *splatting gaussiano 3D*. Il sistema NeRF sfrutta il campo di radianza, approssimato da una rete neurale, che descrive il colore e la densità volumetrica per ogni punto e per ogni direzione di visione. Al contrario, lo *splatting gaussiano 3D* utilizza un insieme di gaussiane 3D anisotrope, ciascuna delle quali codifica posizione, scala, orientamento, opacità e colore, consentendo il rendering dell'oggetto. I metodi di *splatting gaussiano* sono in genere molto più veloci e producono immagini di qualità migliore, ma richiedono più memoria e spazio di archiviazione (Gao et al., 2025).

SCOPO DEL LAVORO

L'ovario è un organo altamente dinamico per struttura e organizzazione, in quanto nel corso della vita dell'individuo subisce ripetuti modellamenti associati ai processi ciclici di crescita o atresia follicolare, ovulazione e neoangiogenesi.

Lo studio delle dinamiche di sviluppo follicolare si è tradizionalmente basato sull'analisi istologica che, pur rappresentando una metodica affidabile, presenta limiti rilevanti come l'analisi bidimensionale di strutture intrinsecamente tridimensionali (Fiorentino et al., 2021, 2020). Pertanto, un modello tridimensionale dell'ovario permetterebbe una migliore comprensione dell'architettura delle sue unità funzionali, i follicoli, in relazione alle caratteristiche istologiche, citologiche e molecolari che ne determinano le funzioni biologiche.

In questo contesto, l'ambizione a lungo termine del Laboratorio di Biologia e Biotecnologie della Riproduzione dell'Università di Pavia è quella di creare un atlante digitale 4D (3D nel tempo) morfo-funzionale dell'ovario di topo. A tal fine, è stato messo a punto un protocollo di ricostruzione tridimensionale *ex vivo* dell'ovario basato sulla nanotomografia computerizzata (nanoCT). L'utilizzo di questo approccio ha permesso di superare in larga parte i limiti dell'istologia classica, consentendo di analizzare l'architettura ovarica in tre dimensioni con una risoluzione sub-micrometrica e di estrarre parametri morfometrici quantitativi, oggettivi e confrontabili tra campioni e stati fisiologici diversi.

Su queste premesse, il presente lavoro di tesi si pone come primo obiettivo l'ottenimento di segmentazioni manuali dei follicoli da volumi 3D di ovario di topo acquisiti mediante nanoCT, per estrarre informazioni morfometriche quantitative relative alle diverse tipologie follicolari, distinguendo follicoli sani e atresici.

Le stesse segmentazioni verranno poi utilizzate per l'addestramento di un modello automatico di segmentazione dei follicoli basato sul *deep learning* che, integrato con i dati morfometrici estratti, mira a diventare uno strumento in grado di identificare e classificare tutti i follicoli presenti nel volume, distinguendo la tipologia follicolare e lo stato fisiologico sano o atresico.

MATERIALI E METODI

1. Animali e reagenti

Nello studio sono stati utilizzati topi femmina di ceppo CD1, forniti dai laboratori Charles River (Como, Italia). Gli animali sono stati stabulati in condizioni ambientali standardizzate: temperatura costante di 21°C, umidità relativa del 60% e ciclo luce-buio di 12 ore. Tutte le procedure sperimentali sono state condotte nel rispetto della normativa vigente in materia di benessere animale, in conformità con la Direttiva europea 2010/63/UE e il Decreto Legislativo n. 26/2014, relativi alla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici. I reagenti impiegati nel corso del protocollo sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich (Merck, Germania), salvo ove diversamente specificato.

2. Preparazione del campione per tomografia

2.1. Isolamento dell'ovario

Topi di 16, 19, 22, 25 giorni e 2 e 4 mesi di età sono stati sacrificati mediante la procedura regolarizzata. Successivamente, è stata eseguita la dissezione degli annessi extra-ovarici, mediante uno stereomicroscopio, conservando una porzione residua di tessuto adiposo e di ovidotto al fine di preservare l'orientamento dell'asse dorso-ventrale dell'organo. Questo è possibile perché il tessuto adiposo è prevalentemente distribuito nella regione dorsale, mentre l'ovidotto è anatomicamente localizzato nella regione ventrale.

2.2. Fissazione

Gli ovari sinistri, destinati all'analisi nanoCT, sono stati fissati in paraformaldeide al 4% (4g di paraformaldeide in 100 mL di PBS 1X) per 24 ore a 4°C in camera fredda, in agitazione continua. Al termine della fissazione, i campioni sono stati lavati, per circa 48 ore, in acqua distillata (dH₂O), in modo da rimuovere il fissativo in eccesso.

2.3. Trattamento con mezzo di contrasto

Ciascun ovario destro è stato immerso in una soluzione di Lugol al 25% (10 g di ioduro di potassio, 5 g di iodio in 100 mL di dH₂O) per 3 ore in agitazione a temperatura ambiente. Successivamente, l'eccesso del mezzo di contrasto è stato rimosso mediante lavaggio in dH₂O per 24 ore.

2.4. Inclusione in paraffina

Il processo di disidratazione è stato eseguito con passaggi successivi, ciascuno ripetuto due volte, in concentrazioni crescenti di etanolo: 50% per 30 minuti, 70% per 30 minuti, 90% per 30 minuti e 100% per 20 minuti. I campioni, successivamente, sono stati immersi due volte in acetone per 15 minuti ciascuno. Completata la disidratazione, i tessuti sono stati trasferiti inizialmente in paraffina I per 30 minuti a 60°C e in seguito in paraffina II overnight alla medesima temperatura. Il giorno successivo i campioni sono stati inclusi in blocchetti di paraffina e, una volta solidificati, soggetti all'analisi tomografica.

3. NanoCT

I campioni inclusi sono stati scansionati mediante un sistema nanotomografico EasyTom XL (RX Solutions), operante a un voltaggio di 45 kV e una corrente di 130 μ A. I parametri di acquisizione utilizzati hanno consentito di ottenere immagini con una risoluzione spaziale isotropa di 0,85 μ m/pixel lungo i tre assi (x, y e z). La ricostruzione delle sezioni virtuali del volume dell'organo è stata effettuata tramite il software XAct software (RXsolution) unireconstruction (versione 1.1) con esportazione in formato TIFF a 16 bit. Infine, la visualizzazione e l'analisi delle immagini sono state effettuate con il software Fiji ImageJ (NIH).

4. Classificazione e annotazione dei follicoli

Le sezioni ottenute mediante nanoCT sono state analizzate al fine di identificare e classificare le strutture follicolari ovariche. L'analisi ha consentito di distinguere diverse tipologie follicolari, in particolare T3, T4, T5, T6, T7, T8 e i corpi lutei (CL). La classificazione è stata condotta sulla base di criteri dimensionali e morfologici, come la presenza o assenza della zona pellucida (ZP), le dimensioni della cavità antrale e lo spessore dello strato di cellule follicolari (Pedersen and Peters, 1968). Il parametro dimensionale utilizzato, invece, è stato il diametro di ciascun follicolo, calcolato moltiplicando il numero di sezioni consecutive in cui la struttura risultava visibile per la risoluzione isotropica di acquisizione (0,85 μ m/pixel lungo i tre assi).

Sulla base dei parametri descritti, i criteri di classificazione adottati sono stati i seguenti:

- T3: diametro di $32 \pm 4,3$ μ m, singolo strato di cellule follicolari, assenza di cavità antrale e di ZP
- T4: diametro di $53 \pm 12,7$ μ m, ZP ben definita, assenza di anatro
- T5: diametro di $89 \pm 11,2$ μ m, ZP ben definita, assenza di anatro
- T6: diametro di $137 \pm 24,9$ μ m, presenza di antri di piccole o medie dimensioni

- T7: diametro di $220 \pm 36,9 \mu\text{m}$, cavità antrali estese
- T8: diametro di $320 \pm 21,3 \mu\text{m}$, singolo antro esteso, oocita circondato dalle cellule del cumulo ooforo;
- CL: diametro di $490 \pm 12,7 \mu\text{m}$, prive di oocita.

Inoltre, sono stati identificati specifici marcatori morfologici di atresia follicolare, tra cui il grado di degenerazione dell'oocita e la formazione di aggregati apoptotici di cellule della granulosa all'interno delle cavità antrali, fino ad arrivare all'ultima struttura rimanente in seguito ad atresia, le ZPR (Wang et al., 2010).

Infine, tutte le strutture identificate sono state annotate mediante il software Fiji ImageJ (NIH), utilizzando lo strumento ROI Manager, con l'apposizione di un'etichetta circolare colorata in base alla tipologia follicolare: viola per T3, azzurro per T4, rosso per T5, rosa per T6, verde per T7, arancione per T8 e giallo per i CL. Ciascun follicolo è stato tracciato manualmente attraverso le sezioni nanoCT consecutive, così da garantirne l'identificazione e il conteggio accurati. I follicoli atresici sono stati ulteriormente contrassegnati aggiungendo un punto nero al centro dell'etichetta colorata.

4.1. Segmentazione manuale delle strutture ovariche

Nei volumi annotati per classificare le diverse tipologie follicolari, utilizzando il software open source 3D Slicer (versione 5.8.2), sono stati segmentati manualmente tutti i follicoli e corpi lutei presenti. Le ricostruzioni 3D degli ovari, in formato TIFF 8 bit, sono state importate nel modulo di segmentazione e le strutture follicolari sono state segmentate manualmente creando delle ROI. In particolare, sfruttando la funzione *Paint*, sono stati delineati manualmente i voxel di ogni follicolo, dalla sezione di apertura fino a quella di chiusura della struttura, ogni circa 5/15 sezioni a seconda della tipologia e dimensione della struttura follicolare. Successivamente, tramite lo strumento di interpolazione, è stato ricostruito il volume tridimensionale di ciascun follicolo.

Infine, le maschere ottenute sono state associate alla rispettiva classe follicolare utilizzando gli operatori logici disponibili in 3D Slicer. In particolare, mediante il *logical operator (Add)*, i follicoli appartenenti alla stessa tipologia sono stati raggruppati all'interno di un unico segmento, ottenendo una segmentazione distinta per ciascuna classe follicolare. La segmentazione manuale è stata resa riproducibile seguendo criteri anatomici predefiniti e, quando necessario, rifinita su piani ortogonali per garantire la coerenza spaziale e la completa separazione delle maschere realizzate sfruttando la funzione di erosione.

Le maschere ottenute sono state poi utilizzate per estrarre le informazioni morfometriche come descritto nel Capitolo 5 e per addestrare un modello automatico di segmentazione dei follicoli come descritto nel Capitolo 6. Per questa ultima task, una volta generate le maschere di tutti i follicoli, come

step intermedio sono state importate in formato NifTI in Fiji ImageJ, dove sono state rese maschere binarie dove 0 (nero) corrisponde al background e 1 (bianco) ai follicoli, sfruttando lo strumento *make binary* del software. Questo ha consentito di addestrare il modello per la segmentazione semantica.

5. Analisi morfometrica

Terminata la segmentazione manuale, per ogni classe follicolare, esclusi i CL, è stata effettuata un'analisi morfometrica. In dettaglio, sfruttando il software Fiji ImageJ, ogni classe di segmentazione, è stata resa binaria come descritto nel paragrafo 5.1 di Materiali e Metodi. Successivamente, le maschere bianche tramite la funzione *Image Calculator (AND)*, sono state associate al volume intero dell'ovario corrispondente, in modo da isolare dal volume solo i singoli follicoli selezionati dalla segmentazione. In seguito, mediante il tool *properties*, ad ogni voxel è stato associata una risoluzione isotropica di $1,7 \mu\text{m}$ e, infine, sono state estratte le informazioni morfometriche utilizzando la funzione *3D objects counter*. Sebbene il dataset completo di parametri estratti includa un'ampia gamma di variabili, l'analisi si è focalizzata specificamente su tre parametri che risultano biologicamente e statisticamente più rilevanti per la discriminazione tra lo stato sano e atresico nei diversi stadi follicolari:

- Volume (μm^3): misura il volume totale del follicolo in unità cubiche micrometriche. Questo dato rappresenta il volume occupato dal follicolo all'interno dell'organo.
- Superficie (μm^2): misura l'area della superficie esterna del follicolo, calcolata contando i voxel che si trovano al confine tra l'interno e l'esterno della struttura.
- Intensità Media dei Voxel: rappresenta il valore medio del segnale nanoCT all'interno del volume follicolare. Tale parametro riflette la densità media della struttura e la sua composizione cellulare. Infatti, delle variazioni in questa metrica possono indicare modificazioni strutturali associate a fenomeni biologici come l'apoptosi, la fibrosi o l'accumulo di liquido.

5.1 Analisi statistica

In questo studio sono state valutate le differenze nelle caratteristiche morfologiche di volume, superficie e intensità media dei voxel di ciascuna classe follicolare, suddivisa in follicoli sani e atresici. Non avendo a disposizione dati con distribuzione normale verificata, è stato scelto il test di Wilcoxon rank-sum test (Mann-Whitney U), un test statistico non parametrico. I p-value ottenuti sono stati successivamente corretti per confronti multipli tramite aggiustamento FDR (False Discovery

Rate), al fine di ridurre il rischio di falsi positivi derivanti dalla molteplicità dei test eseguiti. Tutte le elaborazioni statistiche sono state eseguite con il software RStudio e i risultati sono stati considerati statisticamente significativi per $p \leq 0,05$, altamente significativi per $p \leq 0,01$ ed estremamente significativi per $p \leq 0,001$. L'analisi è stata effettuata per ogni stadio follicolare, fatta eccezione per lo stadio T4, in cui la presenza di un solo campione nel gruppo degli atresici ($n=1$) impedisce l'utilizzo di un test statistico.

6. Sviluppo di un modello di segmentazione

Parallelamente, con l'obiettivo di automatizzare e velocizzare il processo di identificazione e classificazione dei follicoli, è stato intrapreso un approccio automatico di segmentazione dei follicoli. Per questa task, è stata scelta UNETR (Unet Transformer) (Hatamizadeh et al., 2022), un'architettura pre-addestrata (**Figura 18**). Quest'ultima, progettata inizialmente per la segmentazione di tumori cerebrali e di organi del torace in scansioni tomografiche, consente l'elaborazione di dati volumetrici 3D, l'identificazione delle relazioni globali tra voxel, e raggiunge elevate prestazioni di segmentazione anche in presenza di una quantità limitata di dati di addestramento.

Il modello selezionato utilizza la tipica struttura ad U delle reti di segmentazione, in cui il tradizionale *encoder* è sostituito con un *Vision Trasformer 3D*, costituito da 12 layer ($L = 12$). L'immagine volumetrica di input viene suddivisa in *patch* non sovrapposte 3D di $16 \times 16 \times 16$ voxel, porzioni cubiche del volume, successivamente convertite in una sequenza di token elaborata dal Transformer. Grazie al meccanismo di *self-attention*, il Transformer è in grado di modellare relazioni a lungo raggio tra regioni anche molto distanti dell'immagine.

Il *decoder* ricostruisce progressivamente la mappa di segmentazione ad alta risoluzione mediante operazioni di *upsampling* per riacquisire la risoluzione spaziale originale in seguito al *downsampling* eseguito dall'*encoder*, combinando le informazioni globali fornite dal Transformer con i dettagli spaziali provenienti dalle *skip-connections* che trasferiscono queste informazioni dall'*encoder* al *decoder*.

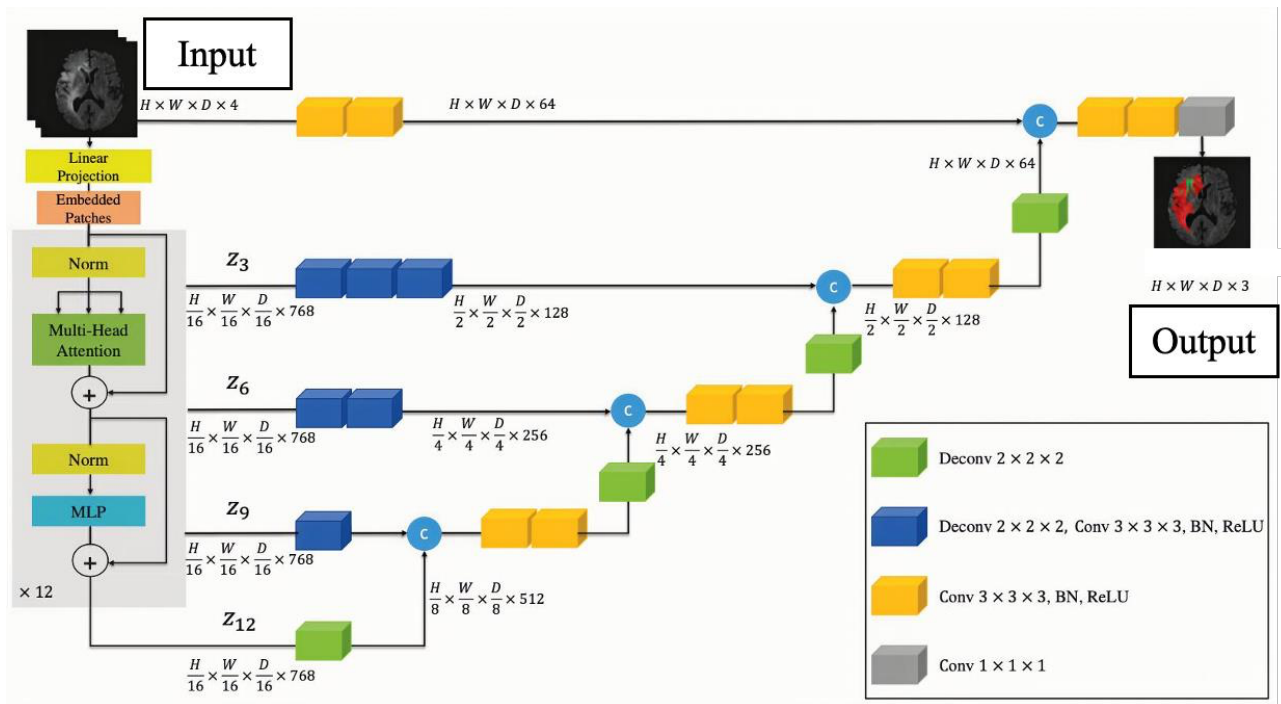


Figura 18. Rappresentazione schematica dell'architettura UNETR (Unet Transformer) per la segmentazione di immagini. Il modello selezionato utilizza la tipica struttura ad U delle reti di segmentazione con un *encoder* (Input) e *decoder* (Output) (modificata da Hatamizadeh et al., 2022).

6.1. Allenamento modello

L'ottimizzazione del modello è stata effettuata in un ambiente Python 3.10. utilizzando la libreria MONAI fornita da NVIDIA, mediante l'algoritmo AdamW con un learning rate pari a 0,0001. Il modello è stato addestrato per 5.000 iterazioni, impostando una funzione di *early stopping* con l'obiettivo di interrompere l'addestramento in caso di mancato miglioramento delle performance di segmentazione, con un tempo complessivo di addestramento di circa 2 giorni.

Durante la fase di inferenza, la segmentazione dei volumi è stata eseguita mediante una strategia di sliding window, utilizzando finestre adiacenti con una sovrapposizione del 50% al fine di ridurre gli artefatti ai bordi delle patch e migliorare la continuità della segmentazione.

L'addestramento del modello si basa su una funzione di perdita composita (*Loss Function*), la quale misura quanto la segmentazione prodotta dall'algoritmo sia diversa da quella manuale (*ground truth*). In particolare, il modello utilizza la Dice Loss, la quale valuta quanto la maschera prodotta si sovrappone a quella manuale. Maggiore è l'errore riscontrato dal modello, più quest'ultimo aggiorna i propri parametri per migliorare la segmentazione.

6.1.1. *Preprocessing delle immagini*

Per poter addestrare il modello i volumi 3D e le relative segmentazioni sono stati sottoposti a una fase di pre-processing per fornire al modello dati di input nel formato richiesto per l'addestramento. In particolare, è stato applicato un *padding* (aggiunta di pixel neri) per ottenere dimensioni quadrate lungo gli assi x e y mediante la funzione *Adjust Canvas Size* di Fiji. Successivamente, i volumi sono stati ridimensionati lungo tutti gli assi fino a raggiungere una dimensione di 512×512 sul piano x-y, senza alterare la risoluzione isotropica, tramite la funzione *Scale*. I volumi sono stati quindi convertiti in formato a 16 bit e i valori di contrasto e luminosità sono stati normalizzati. Infine, i volumi sono stati esportati in formato NIfTI tramite Fiji e compressi in formato .nii.gz.

6.1.2. *Data augmentation e train/validation splitting*

Per aumentare le dimensioni del dataset di addestramento, i volumi nanoCT utilizzati per il training, con le rispettive maschere, sono stati soggetti a rotazioni spaziali 3D lungo i tre assi, sfruttando la loro risoluzione isotropica e preservando la loro coerenza spaziale. Per assicurare la riproducibilità delle rotazioni sono stati usati dei *seeds* fissi per PyTorch e NumPy. In questo modo, è stato possibile ottenere 23 nuovi diversi orientamenti di osservazione dei volumi, aumentando il numero di campioni utilizzati per l'addestramento da 5 a 120. In particolare, per l'addestramento del modello sono stati utilizzati 4 volumi di età prepuberale (16, 19, 22 e 25 giorni di età) e un ovario adulto (2 mesi di età), mentre per la validazione del modello un ovario di 25 giorni di età e un ovario di 4 mesi di età.

6.1.3. *Integrazione delle segmentazioni con il volume nanoCT*

Per valutare visivamente il risultato della segmentazione su degli ovari di test di 25 giorni e 4 mesi di età, le maschere di segmentazione ottenute utilizzando il modello addestrato sono state combinate con il volume dell'ovario ottenuto mediante nanoCT per isolare i follicoli segmentati dallo stroma ovarico circostante. Per fare questo, è stato utilizzato il software Fiji, in particolare la funzione *Process>Image calculator* e l'operatore logico AND per sovrapporre alle maschere binarie il volume di nanoCT.

RISULTATI

1. La segmentazione manuale dei follicoli e dei corpi lutei nel volume 3D dell'ovario

La segmentazione degli stadi follicolari T3-T8 e dei corpi lutei è stata effettuata su volumi nanoCT tridimensionali ad alta risoluzione, ricostruiti con voxel isotropici di $\sim 1,7 \mu\text{m}^3$.

Nei seguenti paragrafi è illustrata in dettaglio la segmentazione manuale di ciascuno stadio (T3-T8 e CL), con riferimenti dettagliati all'ovario di 4 mesi, i cui follicoli sono stati utilizzati per l'estrazione dei parametri morfometrici.

1.1 La segmentazione manuale dei follicoli pre-antrali

Lo stadio T3 rappresenta la prima fase dello sviluppo follicolare osservabile nei modelli nanoCT analizzati. Questi follicoli sono caratterizzati da dimensioni estremamente ridotte e da una struttura ancora priva di cavità antrale (**Figura 19A-C**). Infatti, nel volume nanoCT dell'ovario di 4 mesi, i follicoli T3 appaiono come strutture sferiche di piccole dimensioni (diametro medio $32 \mu\text{m}$), circondate da un singolo strato di cellule della granulosa cubiche. Per questa tipologia follicolare sono state generate 11 maschere di segmentazione manuale, di cui 9 relative a follicoli sani e 3 a follicoli atresici.

Lo stadio T4, invece, è caratterizzato da un incremento progressivo delle dimensioni e dall'inizio della formazione della zona pellucida, la struttura proteica che circonda l'oocita. I follicoli T4 appaiono nel volume nanoCT come strutture ancora relativamente compatte, con un diametro che varia tra 40 e $65 \mu\text{m}$ circa, e presentano una morfologia ancora principalmente sferica con un inizio della stratificazione delle cellule della granulosa (**Figura 19D-F**).

Per questo stadio di maturazione, le maschere di segmentazione manuale generate sono 22, di cui solo una corrisponde a un follicolo atresico.

Infine, lo stadio T5 rappresenta l'ultima fase della maturazione follicolare precedente alla comparsa delle cavità antrali. Nel volume nanoCT, i follicoli T5 appaiono come strutture di dimensioni di circa $90 \mu\text{m}$, con una morfologia ancora prevalentemente sferica ma con inizio evidente della differenziazione della teca esterna (**Figura 20A-C**).

Per questa tipologia follicolare sono state ottenute 54 maschere mediante segmentazione manuale, di cui 33 riferite a follicoli sani e 21 a follicoli atresici.

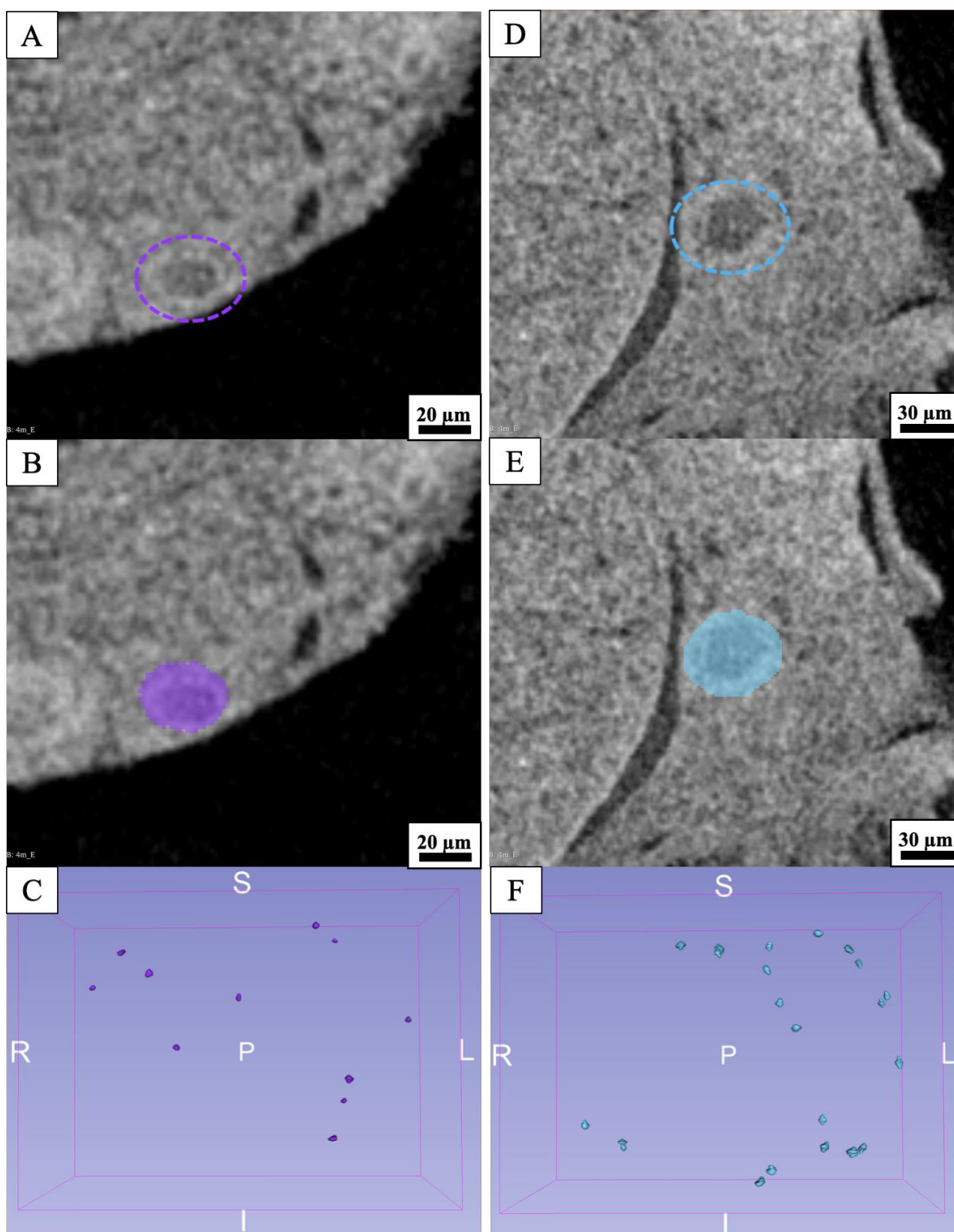


Figura 19. La segmentazione manuale dello stadio di maturazione T3 e T4; A e D) Sezione nanoCT di un ovario murino di 4 mesi di un follicolo T3 (viola) e T4 (azzurro); B e E) Maschera di segmentazione manuale di un follicolo T3 (viola) e T4 (azzurro); C e F) Rendering 3D delle maschere dei follicoli T3 (viola) e T4 (azzurro) generate dall'ovario analizzato.

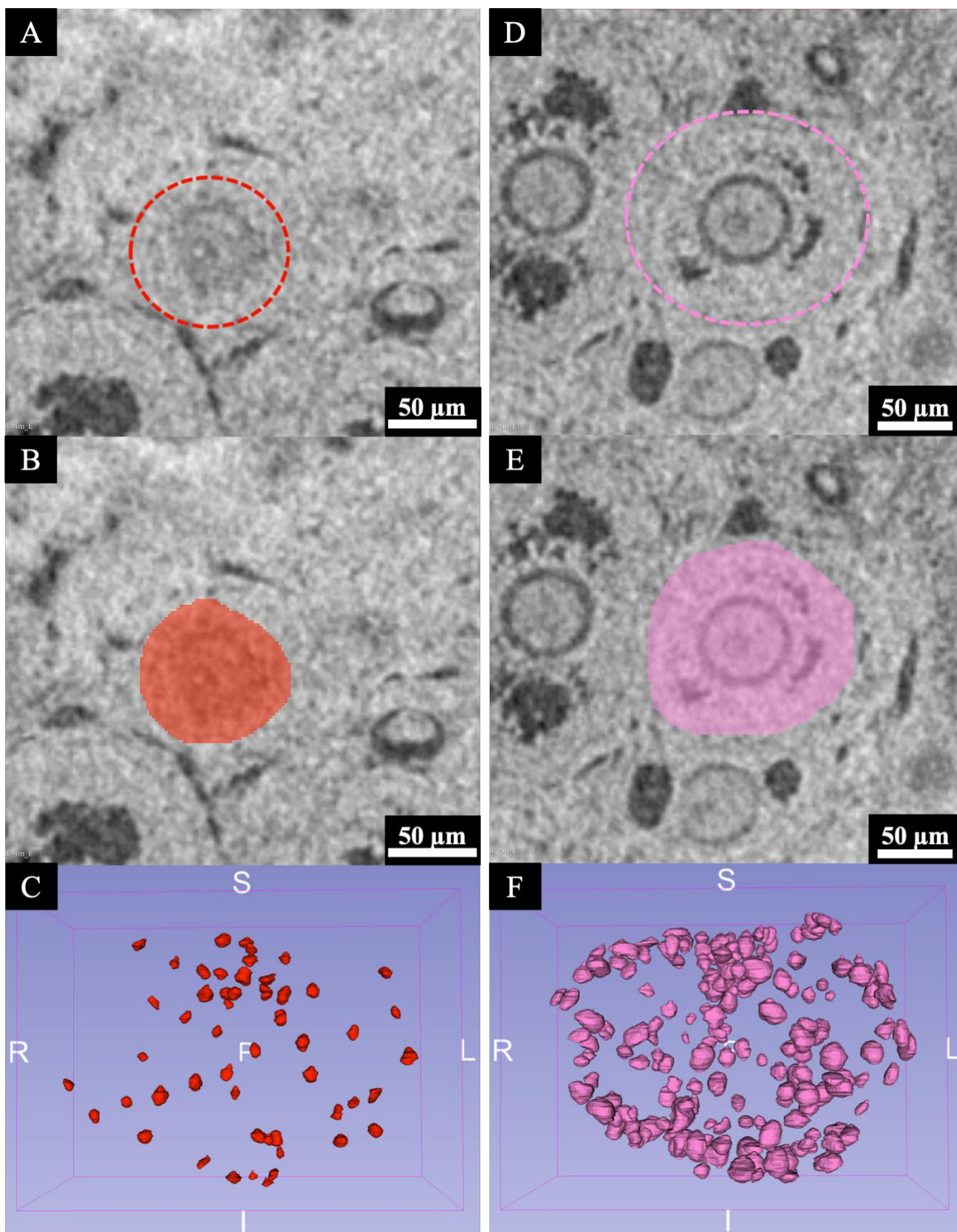


Figura 20. La segmentazione manuale dello stadio di maturazione T5 e T6; A e D) Sezione nanoCT di un ovario murino di 4 mesi di un follicolo T5 (rosso) e T6 (rosa); B e E) Maschera di segmentazione manuale di un follicolo T5 (rosso) e T6 (rosa); C e F) Rendering 3D delle maschere dei follicoli T5 (rosso) e T6 (rosa) generate dall'ovario analizzato.

1.1 La segmentazione manuale dei follicoli antrali

Lo stadio di maturazione T6 nel volume nanoCT è la prima struttura follicolare (diametro medio di 137 μm) in cui si osserva la presenza di antri, un oocita distinguibile e delle dimensioni considerevoli ma limitate rispetto alle altre tipologia di follicoli antrali. Inoltre, è osservabile una chiara distinzione dell'intera struttura follicolare dal tessuto stromale circostante (**Figura 20D-F**).

La procedura di segmentazione manuale ha consentito di generare 197 maschere per questa tipologia follicolare, identificando 155 follicoli sani e 42 follicoli atresici.

Lo stadio T7, invece, è caratterizzato da un'ulteriore espansione delle cavità antrali, le quali tendono a fondersi tra loro e occupare la maggior parte del volume follicolare. Nel volume nanoCT, i follicoli T7 appaiono come strutture di grandi dimensioni, con un diametro di circa 220 μm , con una massiccia cavità antrale e con una parte delle cellule della granulosa che iniziano a differenziarsi nelle cellule del cumulo nella zona circostante all'oocita, il quale è localizzato in posizione eccentrica (**Figura 21A-C**). Per lo stadio T7 sono state generate manualmente 75 maschere di segmentazione, di cui 35 relative a follicoli sani e 40 a follicoli atresici.

Infine, l'ultimo stadio della maturazione follicolare è il T8, il quale rappresenta il follicolo maturo immediatamente precedente l'ovulazione. Nel volume nanoCT, i follicoli T8 appaiono come le strutture follicolari più grandi (diametro di circa 320 μm), con una cavità antrale che occupa la quasi totalità del volume follicolare e circonda lo stato della granulosa in uno strato sottile e concentrico nella zona periferica della struttura. Inoltre, è ben visibile il complesso cumulo-oocita, il quale è ormai spostato marginalmente in vista dell'imminente ovulazione (**Figura 21D-F**). La segmentazione manuale di questa tipologia follicolare ha prodotto 7 maschere di segmentazione, delle quali 5 associate a follicoli sani e 2 a follicoli atresici.

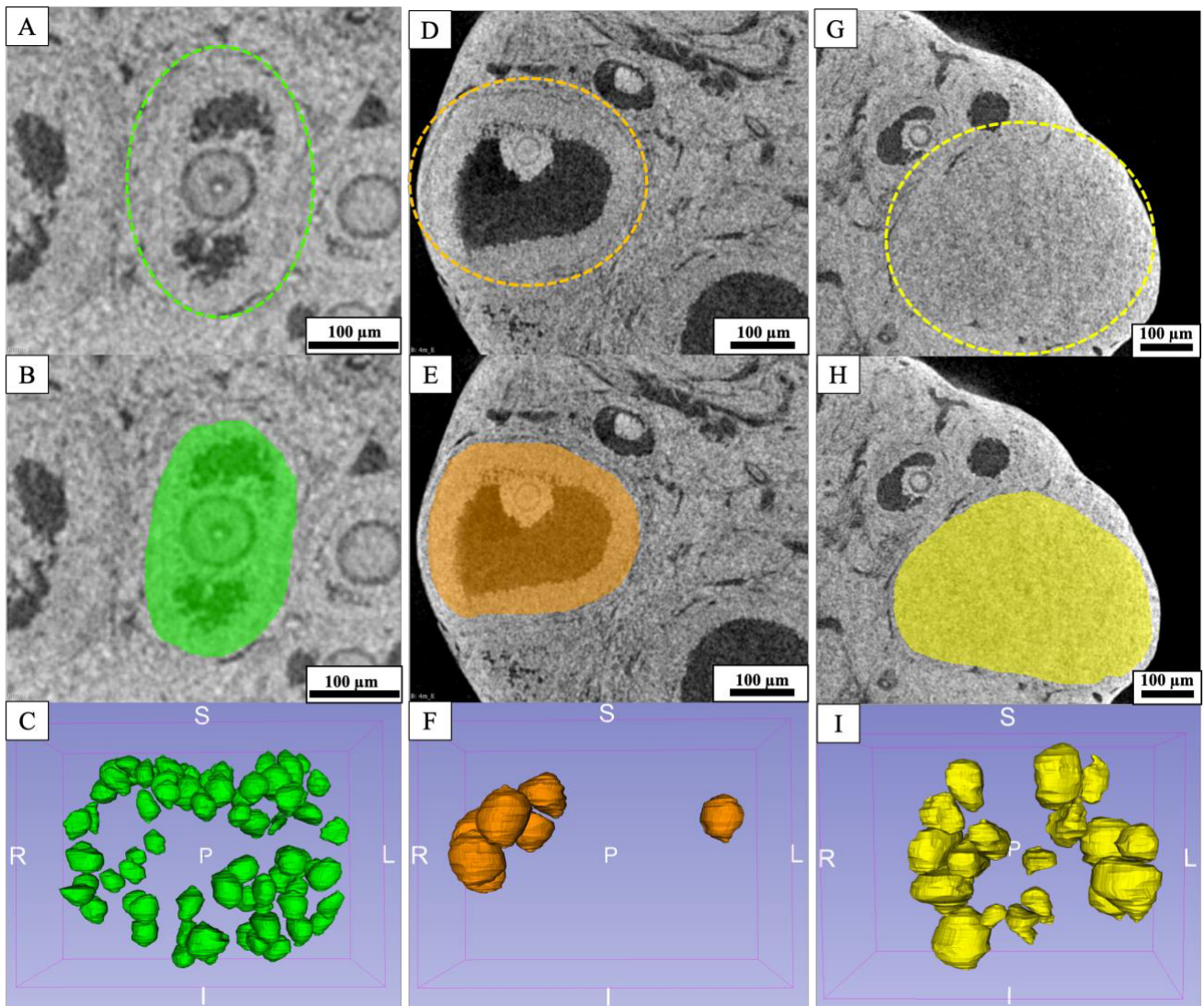


Figura 21. La segmentazione manuale dello stadio di maturazione T7 e T8 e del corpo luteo; A, D e G) Sezione nanoCT di un ovario murino di 4 mesi di un follicolo T7 (verde), T8 (arancione) e CL (giallo); B, E e H) Maschera di segmentazione manuale di un follicolo T7 (verde), T8 (arancione) e CL (giallo); C, F e I) Rendering 3D delle maschere dei follicoli T7 (verde), T8 (arancione) e CL (giallo) generate dall'ovario analizzato.

1.3 La segmentazione manuale dei corpi lutei

Il corpo luteo rappresenta la struttura endocrina che si forma dopo l'ovulazione dalle cellule rimanenti del follicolo ovulato. Nel volume nanoCT, il corpo luteo appare come una struttura compatta di forma irregolare e di diametro di circa 490 µm, formata dalle cellule della granulosa e della teca luteinizzate. Questa eterogeneità cellulare comporta che il corpo luteo, dal punto di vista istologico, a differenza dei follicoli in via di sviluppo, non presenta delle cavità antrali ma una struttura con regioni a diversa densità (**Figura 21G-I**).

La segmentazione manuale di queste strutture ha generato 19 maschere di segmentazione.

Dalla segmentazione manuale di tutti i follicoli contenuti all'interno del volume dell'ovario di 4 mesi, è stato possibile ottenere un rendering 3D il quale permette una rotazione interattiva dell'intero organo, consentendo l'analisi e la localizzazione spaziale delle diverse tipologie follicolari, distinte dal differente codice colore utilizzato (**Figura 22**).

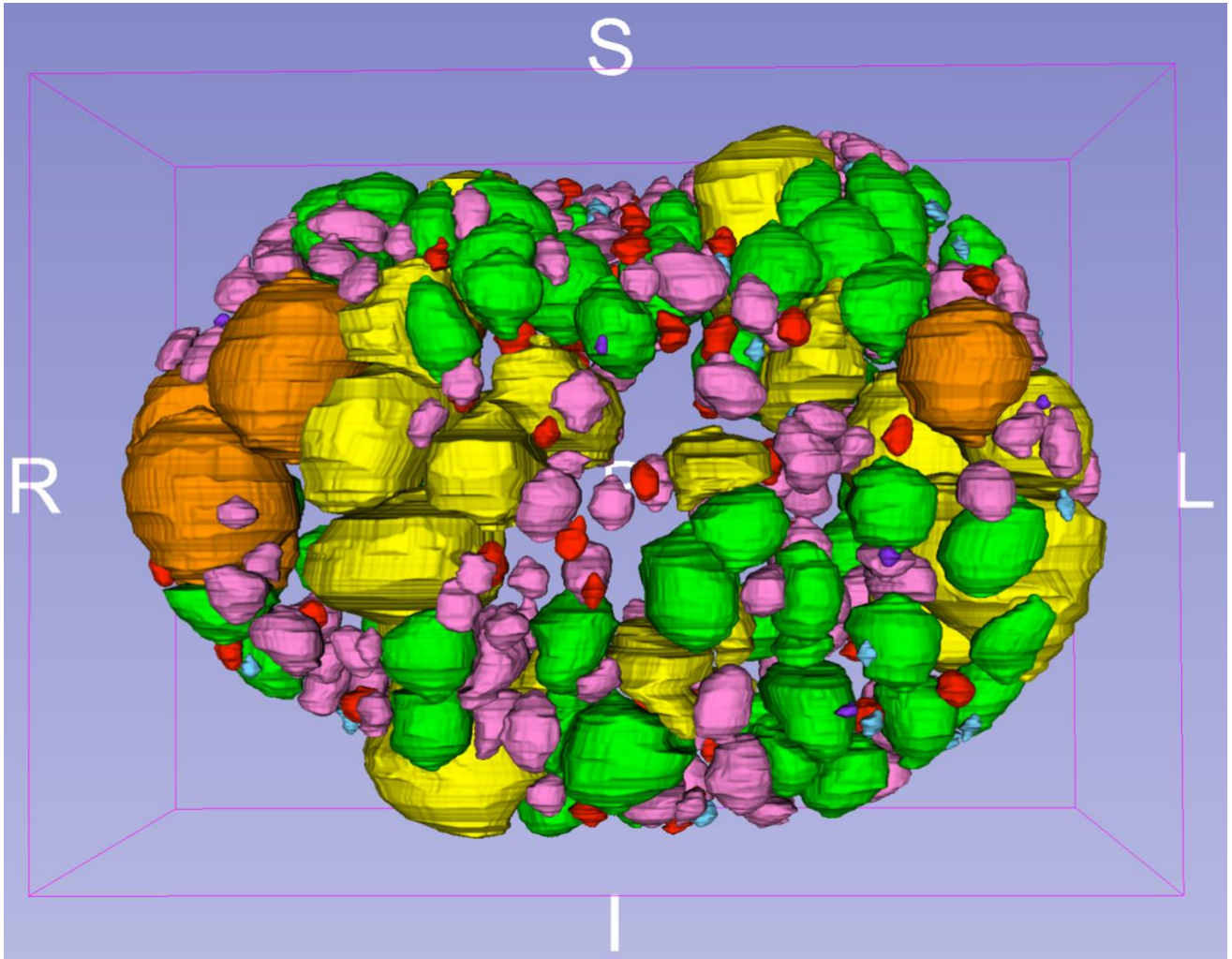


Figura 22. Rendering 3D delle maschere di segmentazione manuale. Visualizzazione tridimensionale, lungo l'asse antero-posteriore di un ovario murino, delle maschere ottenute con segmentazione manuale mediante 3D Slicer; T3= viola, T4=azzurro, T5=rosso, T6=rosa, T7=verde, T8=arancione, CL=giallo.

2. Analisi morfometrica delle maschere segmentate manualmente

In questo capitolo verranno descritte le informazioni morfometriche riguardanti volume, superficie e intensità media dei voxel per ogni tipologia follicolare, confrontando i follicoli sani con i follicoli atresici. In particolare, questi valori, preliminarmente, sono stati estratti dai follicoli appartenenti all'ovario di 4 mesi di età.

2.1 Analisi morfometrica dei follicoli pre-antrali

Lo stadio T3, rappresentato da un ridotto numero di follicoli (n=8 sani, n=3 atresici), non ha mostrato differenze statisticamente significative nel volume tra follicoli sani e atresici (p-value>0,05) (**Figura 23A**), così come l'analisi della superficie follicolare (p-value>0,05) (**Figura 23B**). Questo risultato era atteso in quanto in follicoli di piccole dimensioni e morfologia prevalentemente sferica, la superficie è fortemente correlata al volume.

L'intensità media dei voxel presenti in follicoli T3 sani e atresici, invece, è risultato l'unico parametro statisticamente significativo (p-value=0,045) (**Figura 23C**), dove i follicoli atresici presentano una intensità minore rispetto ai follicoli sani.

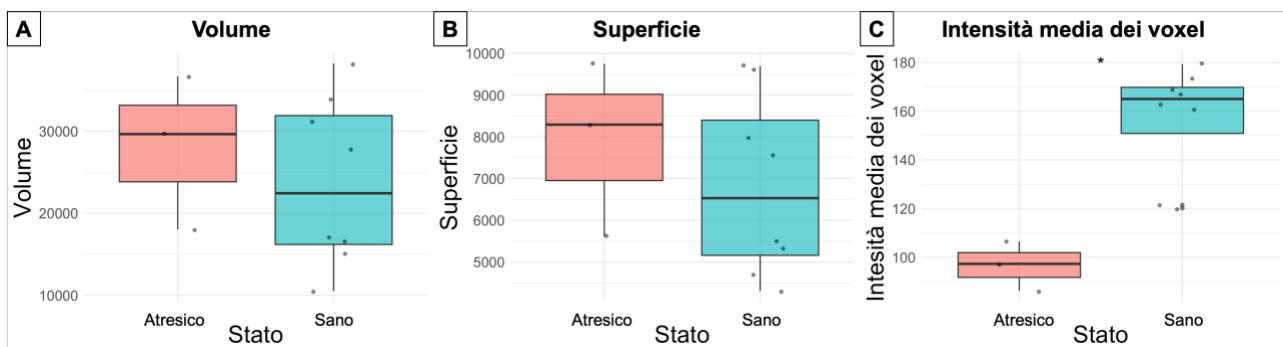


Figura 23. Analisi morfometrica dei follicoli T3. A) Il volume in follicoli sani e atresici allo stadio di maturazione T3; B) La superficie in follicoli sani e atresici allo stadio di maturazione T3; C) L'intensità media dei voxel in follicoli sani e atresici allo stadio di maturazione T3; (plot atresico=rosso; plot sano=azzurro).

Lo stadio T4 (n=21 sani; n=1 atresico) è caratterizzato dalla presenza di un unico follicolo atresico. La numerosità campionaria estremamente ridotta ha impedito l'esecuzione di un confronto statistico tra i due stati fisiologici. Di conseguenza, il p-value non è risultato calcolabile (NA) per nessuna delle tre morfometriche analizzate (**Figura 24A, B e C**). Nonostante ciò, i valori di volume e superficie del singolo follicolo atresico appaiono paragonabili a quelli dei follicoli sani, mentre l'intensità media dei voxel risulta essere inferiore in questo follicolo rispetto ai follicoli sani.

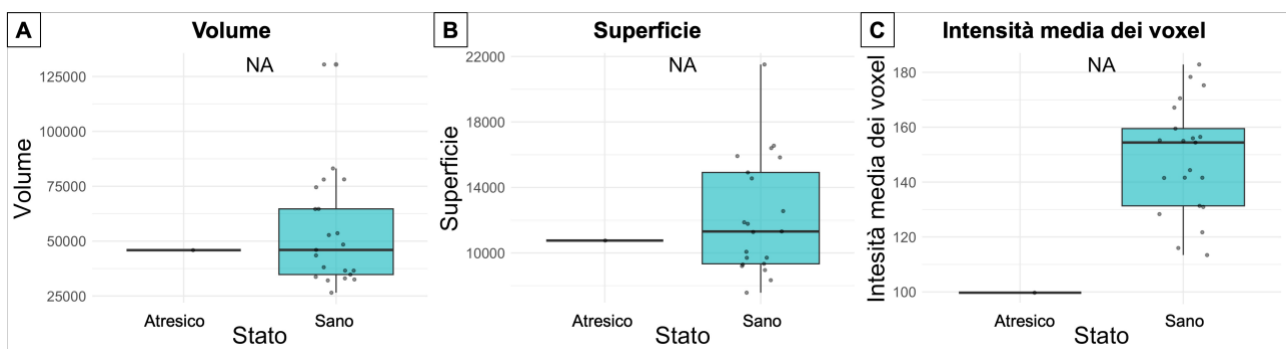


Figura 24. Analisi morfometrica dei follicoli T4. A) Il volume in follicoli sani e atresici allo stadio di maturazione T5; B) La superficie in follicoli sani e atresici allo stadio di maturazione T4; C) L'intensità media dei voxel in follicoli sani e atresici allo stadio di maturazione T4; (plot atresico=rosso; plot sano=azzurro).

Per lo stadio T5 (n=33 sani, n=21 atresici), invece, è stata osservata una differenza altamente significativa nel volume tra follicoli sani e atresici (p-value=0,0000129) (**Figura 25A**). Nel dettaglio, i follicoli atresici di questo stadio di maturazione presentano volumi mediamente più grandi rispetto ai follicoli sani dello stesso stadio. Anche nell'analisi della superficie follicolare dello stadio T5 è stata rilevata una differenza altamente significativa (p-value=0,0000181) (**Figura 25B**), con i follicoli atresici che presentano superfici significativamente maggiori rispetto ai sani. Infine, è stata riscontrata una differenza estremamente significativa (p-value=0,0000468) (**Figura 25C**) anche nell'ultima caratteristica morfologica analizzata, ovvero l'intensità media dei voxel. In dettaglio i follicoli atresici presentano un'intensità media significativamente più bassa rispetto ai follicoli sani.

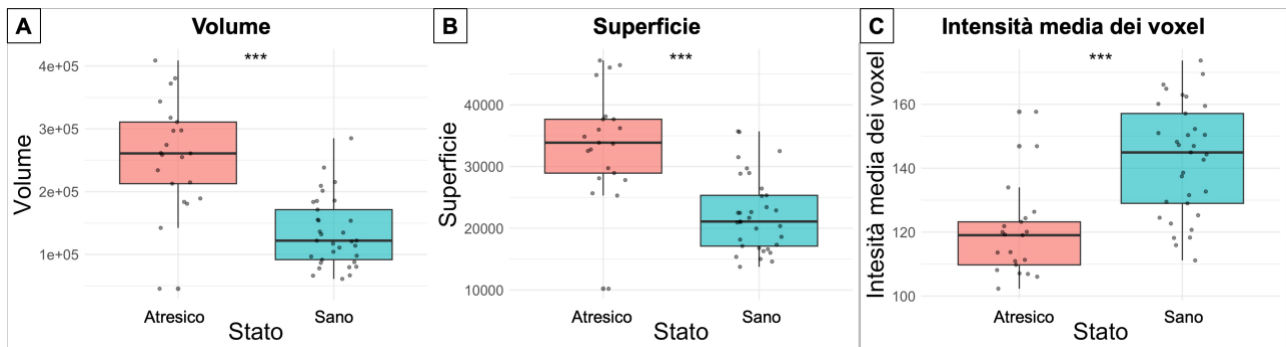


Figura 25. Analisi morfometrica dei follicoli T5. A) Il volume in follicoli sani e atresici allo stadio di maturazione T5; B) La superficie in follicoli sani e atresici allo stadio di maturazione T5; C) L'intensità media dei voxel in follicoli sani e atresici allo stadio di maturazione T5; (plot atresico=rosso; plot sano=azzurro).

2.2 Analisi morfometrica dei follicoli antrali

Le analisi morfometriche effettuate nelle strutture dello stadio T6 (n=155 sani, n=42 atresici) ha confermato la tendenza osservata nei follicoli T5. Le strutture dello stadio di maturazione T6 atresiche presentano volumi significativamente maggiori rispetto ai sani (p-value=0,0000108) (**Figura 26A**), andamento concorde a quanto osservato nei follicoli T5. Anche nei follicoli dello stadio T6 è stato riscontrato un incremento di superficie nei follicoli atresici rispetto a quelli sani. Infatti, è presente una differenza altamente significativa nell'analisi di tale metrica (p-value=0,00000559) (**Figura 26B**). Anche in questo stadio, l'aumento di superficie nei follicoli atresici è coerente essendo la superficie follicolare strettamente correlata al volume della struttura. Infine, non è stata osservata, nei follicoli allo stadio di maturazione T6, nessuna differenza statisticamente significativa nell'intensità media dei voxel tra follicoli sani e atresici (p-value>0,05) (**Figura 26C**).

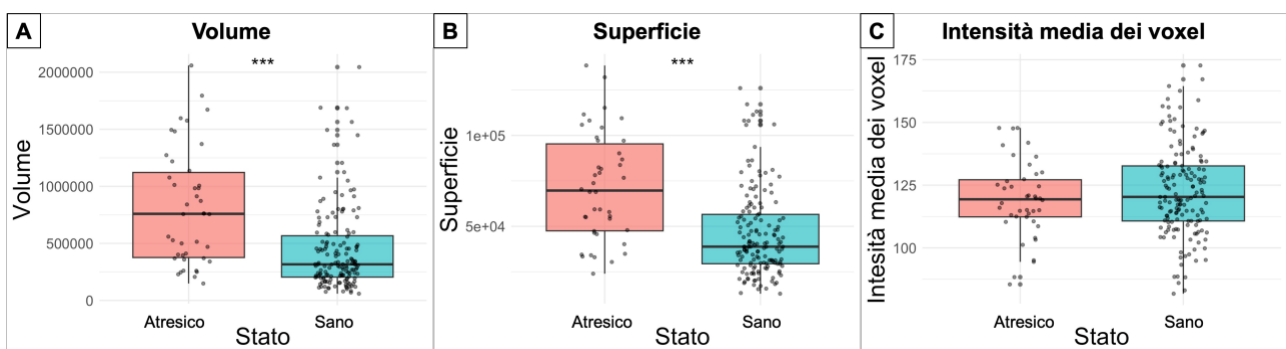


Figura 26. Analisi morfometrica dei follicoli T6. A) Il volume in follicoli sani e atresici allo stadio di maturazione T6; B) La superficie in follicoli sani e atresici allo stadio di maturazione T6; C) L'intensità media dei voxel in follicoli sani e atresici allo stadio di maturazione T6; (plot atresico=rosso; plot sano=azzurro).

L'analisi morfometrica dei follicoli allo stadio di maturazione T7 (n=35 sani, n=40 atresici) non ha mostrato differenze significative nel volume tra follicoli sani e atresici (p-value>0,05) (**Figura 27A**). Questo risultato indica che la variabile volume non discrimina efficacemente lo stato atresico in

questo stadio tardivo dello sviluppo. Analogamente al volume, la superficie dei follicoli T7 non mostra differenze significative tra sani e atresici ($p\text{-value}>0,05$) (**Figura 27B**).

Infine, nell'analisi dell'intensità media dei voxel non è stata riscontrata una differenza statisticamente significativa tra follicoli sani e atresici ($p\text{-value}>0,05$) (**Figura 27C**). Tuttavia, il valore di $p\text{-value}$ pari a 0,088, pur non essendo statisticamente significativo, risulta relativamente vicino alla soglia di significatività.

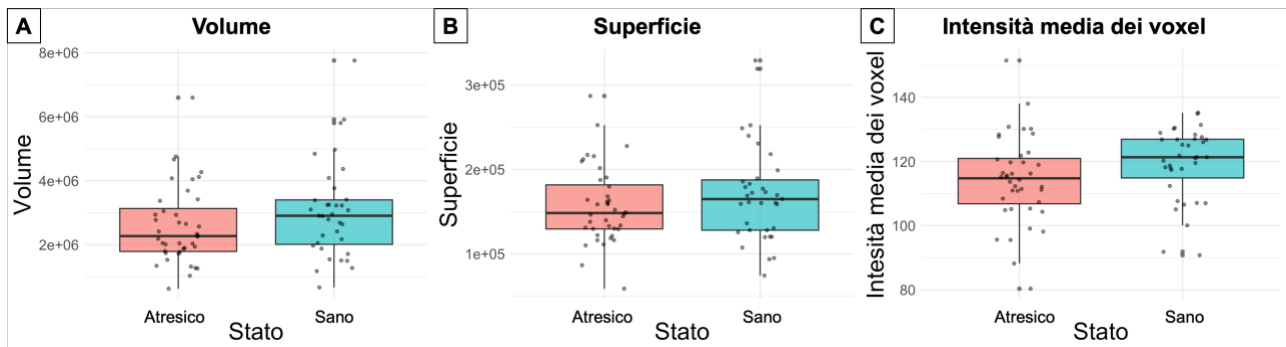


Figura 27. Analisi morfometrica dei follicoli T7. A) Il volume in follicoli sani e atresici allo stadio di maturazione T7; B) La superficie in follicoli sani e atresici allo stadio di maturazione T7; C) L'intensità media dei voxel in follicoli sani e atresici allo stadio di maturazione T7; (plot atresico=rosso; plot sano=azzurro).

Infine, l'ultima fase della maturazione follicolare è lo stadio T8 ($n=5$ sani, $n=2$ atresici). L'analisi morfometrica dei parametri di volume e superficie follicolare è in linea con quanto osservato nello stadio T7. Infatti, in entrambi i casi non sono state riscontrate delle differenze statisticamente significative ($p\text{-value}>0,05$) (**Figura 28A, B**). Anche dall'analisi dell'intensità media dei voxel non è emersa nessuna differenza statisticamente significatività tra i due stati fisiologici dei follicoli T8 ($p\text{-value}>0,05$) (**Figura 28C**). Ciononostante, i valori di questi parametri risultano inferiori nei follicoli atresici rispetto ai follicoli sani.

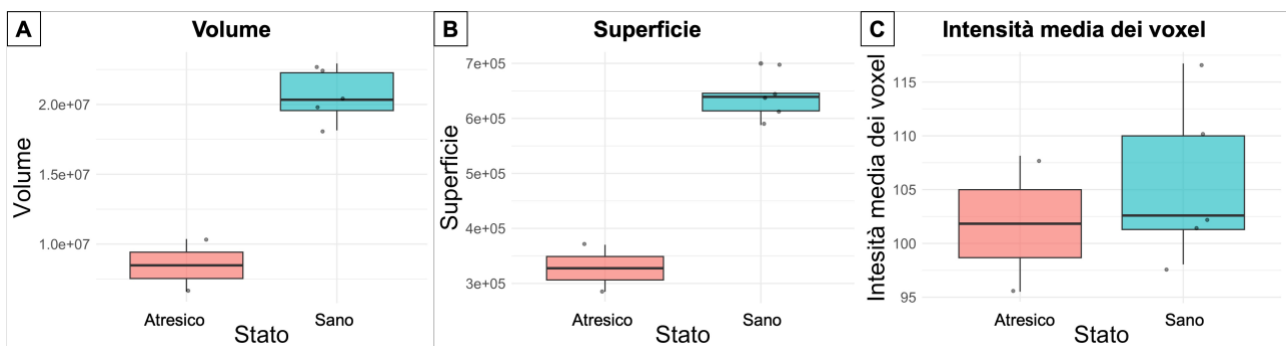


Figura 28. Analisi morfometrica dei follicoli T3. A) Il volume in follicoli sani e atresici allo stadio di maturazione T8; B) La superficie in follicoli sani e atresici allo stadio di maturazione T8; C) L'intensità media dei voxel in follicoli sani e atresici allo stadio di maturazione T8; (plot atresico=rosso; plot sano=azzurro).

3. La segmentazione automatica dei follicoli e corpi lutei in un volume 3D dell'ovario

Dopo aver creato manualmente le maschere e pre-elaborato le immagini come descritto nel paragrafo 6.1.1 di Materiali e metodi, i dataset, ottenuti da ovari di 16, 19, 22, 25 giorni e 2 e 4 mesi, sono stati utilizzati per l'addestramento e la valutazione del modello UNETR. La scelta di questa architettura è stata preceduta da un'ampia revisione della letteratura sui principali modelli disponibili per la segmentazione di immagini CT, con l'obiettivo di identificare un'architettura pre-addestrata adatta al transfer learning sul dataset in esame.

A seguito dell'addestramento il modello è stato in grado di segmentare i follicoli presenti nei volumi nanoCT, identificando correttamente i follicoli appartenenti agli stadi di sviluppo compresi tra T3 e T8, con un'accuratezza di validazione pari a 0,86 in un ovario di età prepuberale (25 giorni di età) e a 0,71 in un ovario di età adulta (4 mesi di età).

Il modello addestrato è poi stato utilizzato per la segmentazione dei follicoli su un dataset di test, composto da ovari di 25 giorni (**Figura 29A, B**) e 4 mesi di età (**Figura 29C, D**), in modo da valutare visivamente il risultato di segmentazione ottenuto osservando i follicoli segmentati nel volume di nanoCT.

Come è possibile osservare, nell'ovario di 25 giorni il modello è in grado di segmentare con precisione i diversi follicoli, dai piccoli primari T3 ai più grandi preovulatori T8, generando però sporadicamente dei punti di contatto tra i singoli follicoli. Al contrario, nell'ovario di 4 mesi di età, sono principalmente visibili i corpi lutei tra lo stroma dell'ovario, che è in queste figure lasciato in nero. Il modello riconosce i corpi lutei, distinguendo le grandi strutture prive di antro e con un contrasto più acceso, e con più difficoltà i diversi follicoli, erodendo gran parte dello strato di cellule della granulosa più esterno, non riconoscendo porzioni di follicoli e lasciando vistosi punti di contatto tra le diverse strutture.

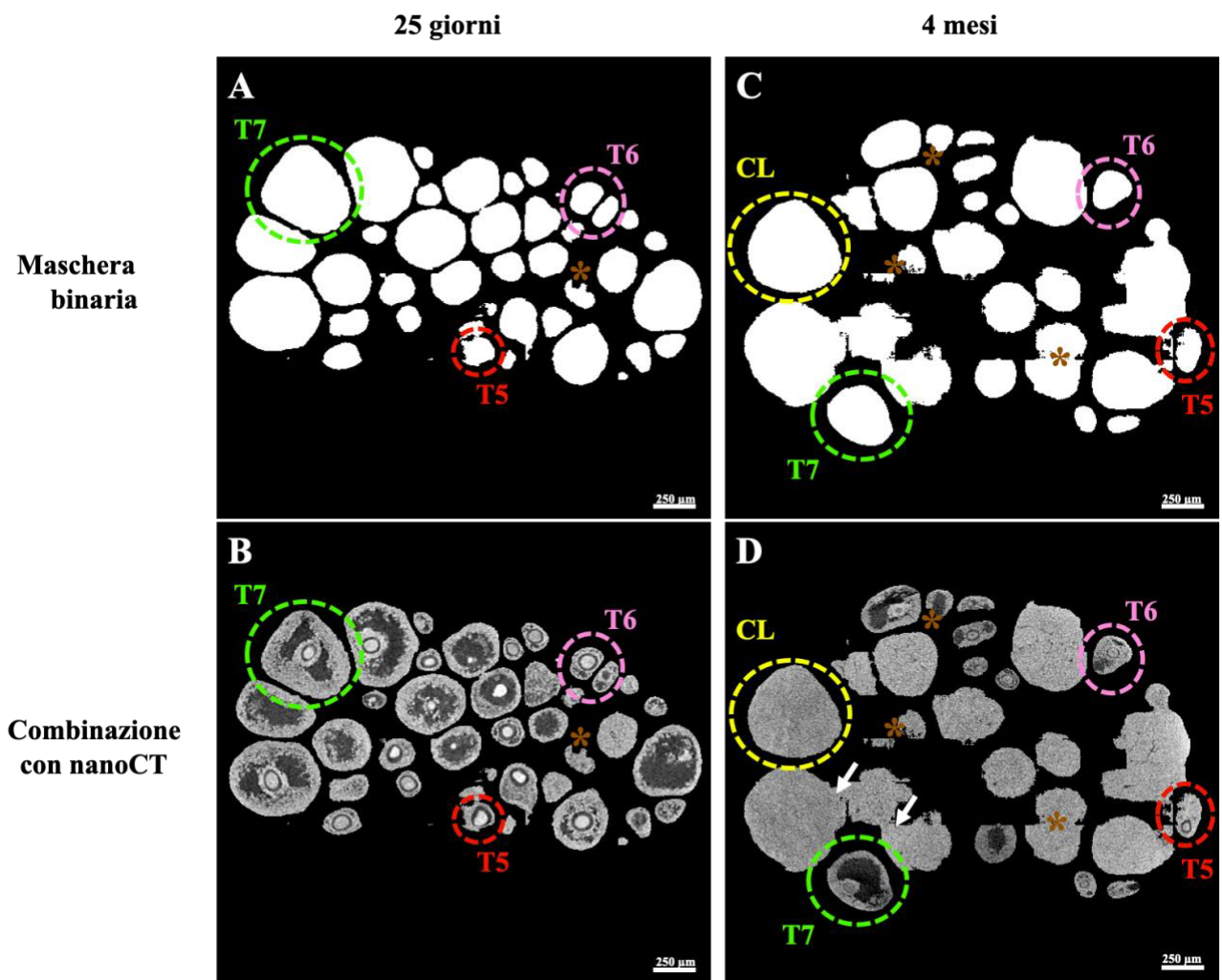


Figura 29. La segmentazione automatica del modello UNETR. A) Segmentazione automatica su un ovario di 25 giorni; B) Maschera di segmentazione automatica combinata alla nanoCT; C) Segmentazione automatica su un ovario di 25 giorni; D) Maschera di segmentazione automatica combinata alla nanoCT. Giallo=Corpo luteo; Verde=follicolo T7; Rosa=follicolo T6; Rosso=follicolo T5; asterisco marrone= maschere di segmentazione automatiche con parziale erosione; freccia bianca=punti di contatto tra maschere di segmentazione automatiche.

DISCUSSIONE DEI RISULTATI

La crescita follicolare rappresenta uno dei processi biologici più complessi nei mammiferi, caratterizzato da molteplici fasi di proliferazione, differenziazione e, in molti casi, atresia e morte cellulare programmata (Mumusoglu et al., 2025; Wang et al., 2010). Tradizionalmente, la classificazione dei follicoli nei diversi stadi maturativi e la valutazione del loro stato fisiologico sono state condotte mediante analisi istologica bidimensionale, metodica affidabile, che tuttavia risulta distruttiva, soggettiva e fornisce solo una rappresentazione bidimensionale di strutture intrinsecamente tridimensionali (Fiorentino et al., 2021, 2020).

L'emergere di tecnologie di imaging tridimensionale ad alta risoluzione, in particolare la nanoCT, ha rivoluzionato la possibilità di analizzare l'architettura tridimensionale dei tessuti ovarici con un'elevata risoluzione spaziale, che in dettaglio nel nostro studio ha raggiunto un valore di $\sim 1,7 \mu\text{m}$ lungo i tre assi. Questa tecnica ha permesso di identificare e classificare tutti i follicoli presenti nel volume dell'ovario dal primario T3 al preovulatorio T8 e di distinguere i follicoli sani da quelli atresici mediante delle caratteristiche morfologiche. Nonostante ciò, questa classificazione manuale è un task che richiede molto tempo da parte di un operatore e per questo motivo è emersa la necessità di utilizzare approcci automatizzati di identificazione e classificazione dei follicoli.

In questa tesi ho messo a punto una procedura di segmentazione manuale, con il fine di estrarre informazioni morfometriche relative alle maschere generate in modo da identificare nuovi marcatori utili a migliorare la comprensione della folliculogenesi e determinare lo stato fisiologico in cui si trova ciascun follicolo. Le segmentazioni ottenute sono state poi utilizzate per l'addestramento di un modello automatico di segmentazione dei follicoli.

1. Analisi morfometrica dei follicoli

La procedura di segmentazione manuale sviluppata in questo studio ha permesso di generare segmentazioni di tutti i follicoli presenti in ovari di 16, 19, 22, 25, 2 e 4 mesi di età. In particolare, per l'analisi morfometrica, è stato utilizzato solo l'ovario di 4 mesi di età, sfruttando le sue 385 maschere di segmentazione, di cui 366 corrispondono a strutture follicolari. Quest'ultime sono state utilizzate per l'estrazione dei parametri morfometrici (volume, superficie e intensità media dei voxel). L'analisi morfometrica rappresenta un punto fondamentale per la caratterizzazione dei follicoli ovarici. A differenza delle osservazioni tradizionali, basate su descrizioni istologiche 2D, l'estrazione di parametri morfometrici da immagini tomografiche 3D consente una valutazione realmente rappresentativa dell'organizzazione tridimensionale dell'ovario, fornendo metriche quantitative direttamente misurabili e confrontabili tra diversi campioni e stati fisiologici. Infatti, l'estrazione delle informazioni morfometriche potrebbe aggiungere, alle già note differenze morfologiche tra follicoli sani e atresici, altre caratteristiche utili per distinguere lo stato fisiologico di queste strutture follicolari.

L'indagine morfometrica ha messo in luce differenze stadio-specifiche derivanti da misurazioni quantitative, ma che racchiudono una rilevanza biologica, in cui le alterazioni geometriche e densitometriche associate al processo atresico non si manifestano in modo uniforme, bensì emergono con pattern distintivi lungo il corso della folliculogenesi.

1.1 Volume e Superficie: due morfometriche strettamente correlate

Per lo stadio di maturazione T3, nell'analisi di queste morfometriche non è stata riscontrata una differenza significativa tra follicoli sani e atresici. Questi risultati riflettono le dimensioni ridotte e la morfologia strettamente sferica, le quali limitano la variabilità geometrica, rendendo il volume e la superficie delle caratteristiche non utilizzabili per la distinzione dello stato fisiologico in queste strutture. Inoltre, è da considerare che questi parametri sono estratti dalle maschere di segmentazioni manuali, le quali potrebbero portare ad una sovrastima o sottostima delle caratteristiche morfologiche analizzate.

Dall'analisi dello stadio T4 è emersa la presenza di un solo follicolo atresico, circostanza che ha impedito qualsiasi confronto statistico. Tale limitata numerosità, tuttavia, non rappresenta un evento casuale, ma riflette le caratteristiche dell'atresia follicolare, che negli stadi pre-antrali si manifesta con

una frequenza inferiore rispetto agli stadi antrali. Per quanto riguarda le morfometriche di volume e superficie follicolare, l'unico follicolo atresico analizzato non presenta valori che si discostano da quelli osservati nei follicoli sani, risultato che suggerisce che l'architettura del follicolo, durante l'atresia in queste fasi della folliculogenesi, rimane conservata, nonostante l'avvio dei processi degenerativi a livello cellulare.

L'analisi statistica condotta, invece, per i follicoli T5 e T6 rappresenta uno dei risultati più robusti dello studio. In dettaglio è stato riscontrato un aumento significativo di volume e superficie nei follicoli atresici degli stadi considerati.

L'atresia è caratterizzata da apoptosi massiccia delle cellule della granulosa, innescata da deficienze di segnalazione ormonale o da stress metabolico (Inoue et al., 2011; Matsuda et al., 2012; Zhang et al., 2025; Zhao et al., 2018). Tuttavia, in letteratura è stato osservato che l'effetto universale dell'apoptosi è la riduzione delle dimensioni follicolari a causa dell'rimpicciolimento cellulare guidato dall'efflusso di K^+ e Cl^- (Bortner and Cidlowski, 2004; Model, 2014). L'aumento di dimensioni dei follicoli atresici può essere dunque associato ad un fenomeno di necrosi secondaria in cui le cellule apoptotiche non rimosse tempestivamente progrediscono verso la permeabilizzazione di membrana e rigonfiamento (Silva et al., 2008). In alternativa, l'incremento di volume potrebbe riflettere un accumulo o una ritenzione di liquido all'interno del follicolo. Infatti, un follicolo che non procede verso l'ovulazione può mantenere o dilatare l'antra ripieno di fluido, espandendo così il volume follicolare complessivo (Balazi et al., 2014).

Per gli stadi antrali tardivi (follicoli T7-T8) dall'analisi statistica non è emersa nessuna differenza statisticamente significativa tra follicoli sani e atresici. Questo risultato è attribuibile alla dimensioni già molto elevate dei follicoli, nei quali avviene prevalentemente l'espansione della cavità antrale (Ross et al., 2010). Ciononostante, è possibile osservare come i follicoli atresici appartenenti a queste tipologie follicolari mostrino dimensioni ridotte rispetto ai follicoli sani, soprattutto nei follicoli T8, sottolineando come la degenerazione del follicolo porti ad un suo collassamento, fino alla completa degenerazione. L'infiltrazione della cavità antrale da parte di cellule fibroblastoidi differenziate dalla teca, infatti, porta progressivamente alla digestione di strutture apoptotiche all'interno del follicolo e alla perdita del fluido follicolare la cui pressione provoca una espansione del follicolo (Wang et al., 2010).

A differenza dello stadio T7, caratterizzato da una numerosità campionaria adeguata, lo stadio T8 presenta un numero di campioni significativamente inferiore. Di conseguenza, la limitata numerosità campionaria potrebbe aver ridotto la potenza statistica dell'analisi, impedendo l'identificazione di

eventuali differenze tra follicoli sani e atresici. Sarà pertanto necessario ampliare il campione di follicoli T8 per verificare se la tendenza osservata possa essere confermata e raggiungere la significatività statistica.

Nel complesso, i risultati ottenuti nelle diverse fasi della folliculogenesi indicano che le alterazioni dell'architettura follicolare associate all'atresia non si manifestano in modo uniforme lungo tutti gli stadi di maturazione, ma risultano circoscritte a specifiche finestre di sviluppo, in particolare agli stadi T5 e T6. Ciò suggerisce che l'impatto dell'atresia sulla geometria del follicolo sia strettamente dipendente dallo stadio maturativo, e che volume e superficie acquisiscano valore discriminante tra follicoli sani e atresici soltanto in corrispondenza di tali stadi.

In conclusione, questi risultati suggeriscono come l'estrazione di informazioni riguardo le dimensioni tridimensionali delle diverse tipologie follicolari, possa supportare la classificazione e la distinzione dei follicoli sani dai follicoli atresici non solo basandosi su caratteristiche morfologiche.

1.2 L'intensità media del segnale nanoCT come indicatore della composizione cellulare

L'analisi dell'intensità media dei voxel del segnale nanoCT ha rivelato un pattern diverso rispetto a volume e superficie. Questo risultato suggerisce che questa caratteristica morfologica è complementare alle dimensioni 3D precedentemente analizzate, riflettendo la composizione cellulare intrinseca. Nelle immagini nanoCT, l'intensità dipende dal coefficiente di attenuazione del campione, che a sua volta dipende dalla densità del tessuto e dalla sua composizione cellulare, per cui variazioni nelle caratteristiche cellulari possono determinare una capacità di assorbimento differente (Rawson et al., 2020).

Da questa analisi è stata riscontrata una differenza significativa solo negli stadi T3 e T5, dove i follicoli atresici presentano un'intensità media minore. In questi follicoli pre-antrali, l'apoptosi massiccia delle cellule della granulosa determina diversi cambiamenti macroscopici, come la vacuolizzazione dell'oocita, e microscopici, quali la condensazione e frammentazione del nucleo, la formazione dei corpi apoptotici e la degenerazione mitocondriale, che potenzialmente riducono l'intensità media del segnale nanoCT (Meng et al., 2018; Wang et al., 2010).

Nello stadio di maturazione T4, invece, la metrica dell'intensità media dei voxel evidenzia un comportamento peculiare in cui il valore misurato nel follicolo atresico risulta inferiore al valore minimo rilevato nell'intera distribuzione dei follicoli sani. Sebbene tale osservazione non possa essere sottoposta a verifica statistica a causa dell'esiguità del campione, essa suggerisce che questa informazione morfometrica possa rappresentare un potenziale indicatore distintivo tra follicoli sani e atresici nello stadio di maturazione T4.

Il processo atresico, che nei follicoli pre-antrali coinvolge simultaneamente l'oocita e le cellule follicolari, determina la comparsa di strutture a bassa radiopacità, quali corpi apoptotici e vacuolizzazioni citoplasmatiche, che riducono l'attenuazione complessiva del tessuto. La diminuzione dell'intensità media osservata nel follicolo atresico T4 potrebbe quindi rappresentare l'espressione quantitativa di questa iniziale perdita di densità e della progressiva disorganizzazione dell'architettura cellulare. Tale interpretazione è coerente con la tendenza osservata nello stadio di maturazione T3, nel quale le prime modificazioni indotte dall'atresia sembrano determinare una lieve riduzione del valore medio di intensità dell'intera struttura follicolare.

Al contrario, l'assenza di una significatività statistica negli altri stadi può essere associata alle dinamiche evolutive della folliculogenesi. Per lo stadio T6, T7 e T8, vi è la comparsa delle cavità antrali piene di liquido follicolare, le quali progressivamente aumentano le loro dimensioni. Poiché l'intensità media viene calcolata sull'intero volume della maschera, la presenza di questo fluido, il quale è caratterizzato da una bassa radiodensità, tende a mascherare le differenze di densità cellulare che si verificano selettivamente nello strato della granulosa.

Nonostante il potenziale effetto mascherante esercitato dal liquido follicolare, nello stadio di maturazione T7 ci si avvicina ad una significatività, suggerendo che l'intensità media dei voxel possa comunque rappresentare un parametro informativo per la discriminazione tra follicoli sani e atresici. Saranno, tuttavia, necessari ulteriori studi condotti su campioni più numerosi per verificare se tale tendenza sia confermata e possa tradursi in una differenza statisticamente significativa.

2. La segmentazione automatica

Nell'ambito della analisi biomediche, la segmentazione manuale o semi-automatica delle strutture biologiche di interesse è ad oggi il task che richiede più tempo da parte di ricercatori e clinici esperti, i quali devono accuratamente delineare i contorni degli elementi di interesse. Così come nei casi clinici di segmentazione di porzioni di tessuto tumorali o patologiche (Pagano et al., 2023), o di follicoli ovarici antrali per una loro quantificazione e valutazione qualitativa nei centri di riproduzione assistita (Singh et al., 2022), la segmentazione eseguita in questa tesi ha richiesto un prolungato training e una elevata precisione per l'identificazione dei follicoli. Per questo motivo, è emersa la necessità di addestrare un modello di segmentazione automatica dei follicoli ovarici, in ottica di integrare questa segmentazione con le informazioni morfometriche ricavate dalle maschere per la costruzione di un modello di classificazione automatica delle diverse tipologie follicolari, capace di distinguere i follicoli sani dai follicoli atresici.

2.1 Le performance del modello UNETR

Addestrato utilizzando 4 ovari di età prepuberale (16, 19, 22, e 25 giorni di età) e 1 di età adulta (2 mesi di età), e validato su un ovario di età prepuberale (25 giorni di età) e uno di età adulta (4 mesi di età), il modello UNETR ha raggiunto un'accuratezza di validazione di 0,86 sulla segmentazione semantica dei follicoli T3-T8 all'interno del volume nanoCT prepuberale e di 0,71 sul volume di ovario adulto. Questi valori sono comparabili a quanto riportato in letteratura per la segmentazione di strutture biologiche in imaging volumetrico ovarico, dove modelli basati su deep learning hanno raggiunto performance analoghe a quelle ottenute nel presente studio (Mathur et al., 2020). I risultati ottenuti riflettono la numerosità dei campioni di addestramento del modello, rappresentati per la maggior parte da volumi di età prepuberale e quindi aventi una voxel size equiparabile ($\sim 1,7\mu\text{m}$), informazione che ha permesso al modello di riconoscere con più facilità le strutture follicolari all'interno del volume di validazione. Al contrario, il volume di ovario adulto ha una voxel size maggiore ($\sim 3,3\mu\text{m}$), quindi una risoluzione minore, rendendo più difficoltoso al modello il riconoscimento dei follicoli.

Inoltre, la metrica di validazione utilizzata è un parametro globale che attribuisce a tutti i voxel lo stesso peso, indipendentemente dalla tipologia follicolare. Poiché i voxel appartenenti a follicoli T6-T8 costituiscono una proporzione molto maggiore del volume totale, l'accuratezza misurata potrebbe essere non proporzionalmente dominata dalle prestazioni su questi stadi. Per una caratterizzazione più granulare, sarebbero necessarie metriche per-class come il Dice score (Maier-Hein et al., 2024; Taha and Hanbury, 2015).

Un problema critico identificato durante l'analisi è che il modello UNETR, sebbene sia capace di riconoscere la presenza di follicoli all'interno del volume, non sempre è in grado di distinguere istanze follicolari separate nel caso di follicoli adiacenti. Questo rappresenta un limite fondamentale per il passaggio da segmentazione semantica, in cui si assegna un'etichetta ad ogni voxel, a segmentazione per istanza, in cui le porzioni etichettate sono identificate e classificate (Sharma et al., 2022; Yu et al., 2018). La causa principale di questo problema è identificabile nella sovrapposizione o ristretta vicinanza delle maschere di *ground truth* manuali; infatti quando le maschere di due follicoli sono in contatto o sono separate da un bordo sottile, la definizione di confine tra essi è ambigua, e il modello, durante il training, apprende a produrre una singola maschera che ingloba entrambe le strutture piuttosto che due maschere separate (Ronneberger et al., 2015; Weigert et al., 2020).

CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

Il lavoro svolto in questa tesi si inserisce nel più ampio progetto di ottenimento di un atlante 4D (3D nel tempo) morfo-funzionale dell'ovario di topo su cui il Laboratorio di Biologia e Biotecnologie della Riproduzione sta concentrando i suoi più recenti studi, con l'obiettivo di comprendere i cambiamenti che avvengono nella regolazione del processo di maturazione dei follicoli e dei gameti nell'ovario durante la vita riproduttiva di un individuo. In particolare, i risultati ottenuti dalla segmentazione manuale dei follicoli da volumi di ovario analizzati con nanoCT pongono le basi per la messa a punto di un modello di classificazione automatica dei follicoli, con l'obiettivo di velocizzare questo processo fino ad oggi eseguito manualmente.

I risultati preliminari ottenuti dall'addestramento del modello di segmentazione automatica dei follicoli, così come le informazioni morfometriche estratte dalle maschere 3D delle diverse tipologie follicolari sono molto promettenti. Infatti, anche se queste ultime non mostrano in ogni confronto analizzato delle significatività, suggeriscono la presenza di tendenze dimensionali e di intensità dei voxel in grado di discriminare i follicoli sani dai follicoli che hanno iniziato il processo atresico.

Partendo da questi risultati preliminari, il lavoro futuro di questo studio si concentrerà sull'ampliamento del numero di campioni segmentati, particolarmente di ovari di età adulta, in modo da ottenere più dati per l'addestramento del modello automatico per il miglioramento delle performance di segmentazione su ovari adulti. L'ottenimento di queste ulteriori maschere consentirà inoltre di espandere i follicoli presi in analisi per l'estrazione e la comparazione dei parametri morfometrici, in modo da consolidare statisticamente le tendenze osservate in questo studio e di individuare ulteriori marcatori stato-specifico nelle diverse fasi di maturazione follicolare.

Infine, sarà cruciale l'integrazione di questi risultati, segmentazione e dati quantitativi che descrivono le diverse tipologie follicolari, per ottenere un modello di segmentazione in grado di identificare, segmentare e classificare automaticamente ogni singolo follicolo, attribuendone la tipologia follicolare e lo stato fisiologico sano o atresico.

BIBLIOGRAFIA

- Abedel-Majed, M.A., Romereim, S.M., Davis, J.S., Cupp, A.S., 2019. Perturbations in Lineage Specification of Granulosa and Theca Cells May Alter Corpus Luteum Formation and Function. *Front. Endocrinol.* 10, 832. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00832>
- Amargant, F., Manuel, S.L., Tu, Q., Parkes, W.S., Rivas, F., Zhou, L.T., Rowley, J.E., Villanueva, C.E., Hornick, J.E., Shekhawat, G.S., Wei, J., Pavone, M.E., Hall, A.R., Pritchard, M.T., Duncan, F.E., 2020. Ovarian stiffness increases with age in the mammalian ovary and depends on collagen and hyaluronan matrices. *Aging Cell* 19, e13259. <https://doi.org/10.1111/accel.13259>
- Balazi, A., Sirotkin, A.V., Pivko, J., Chrenek, P., 2014. Effect of Oxytocin, IBMX and dbc AMP on Rabbit Ovarian Follicles. *Anat. Histol. Embryol.* 43, 379–385. <https://doi.org/10.1111/ahe.12088>
- Bhartiya, D., Patel, H., 2021. An overview of FSH-FSHR biology and explaining the existing conundrums. *J. Ovarian Res.* 14, 144. <https://doi.org/10.1186/s13048-021-00880-3>
- Bortner, C.D., Cidlowski, J.A., 2004. The role of apoptotic volume decrease and ionic homeostasis in the activation and repression of apoptosis. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* 448, 313–318. <https://doi.org/10.1007/s00424-004-1266-5>
- Bowles, J., Knight, D., Smith, C., Wilhelm, D., Richman, J., Mamiya, S., Yashiro, K., Chawengsaksophak, K., Wilson, M.J., Rossant, J., Hamada, H., Koopman, P., 2006. Retinoid Signaling Determines Germ Cell Fate in Mice. *Science* 312, 596–600. <https://doi.org/10.1126/science.1125691>
- Desai, N., Ludgin, J., Sharma, R., Anirudh, R.K., Agarwal, A., 2013. Female and Male Gametogenesis, in: Falcone, T., Hurd, W.W. (Eds.), *Clinical Reproductive Medicine and Surgery*. Springer New York, New York, NY, pp. 43–62. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6837-0_3
- du Plessis, A., Broeckhoven, C., 2019. Looking deep into nature: A review of micro-computed tomography in biomimicry. *Acta Biomater.* 85, 27–40. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.12.014>
- El Seoud, M.S.A., Mady, A.S., 2019. A Comprehensive Review on Volume Rendering Techniques. *Proc. 2019 8th Int. Conf. Softw. Inf. Eng.* <https://doi.org/10.1145/3328833.3328878>
- Encyclopedia Britannica | Britannica [WWW Document], n.d. URL <https://www.britannica.com/> (accessed 7.1.26).
- Feng, Y., Cui, P., Lu, X., Hsueh, B., Möller Billig, F., Zarnescu Yanez, L., Tomer, R., Boerboom, D., Carmeliet, P., Deisseroth, K., Hsueh, A.J.W., 2017. CLARITY reveals dynamics of

ovarian follicular architecture and vasculature in three-dimensions. *Sci. Rep.* 7, 44810.
<https://doi.org/10.1038/srep44810>

- Fiorentino, G., Cimadomo, D., Innocenti, F., Soscia, D., Vaiarelli, A., Ubaldi, F.M., Gennarelli, G., Garagna, S., Rienzi, L., Zuccotti, M., 2023. Biomechanical forces and signals operating in the ovary during folliculogenesis and their dysregulation: implications for fertility. *Hum. Reprod. Update* 29, 1–23. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmac031>
- Fiorentino, G., Parrilli, A., Garagna, S., Zuccotti, M., 2021. Three-dimensional imaging and reconstruction of the whole ovary and testis: a new frontier for the reproductive scientist. *Mol. Hum. Reprod.* 27, gaab007. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaab007>
- Fiorentino, G., Parrilli, A., Garagna, S., Zuccotti, M., 2020. Three-Dimensional Micro-Computed Tomography of the Adult Mouse Ovary. *Front. Cell Dev. Biol.* 8, 566152. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.566152>
- Gao, K., Gao, Y., He, H., Lu, D., Xu, L., Li, J., 2025. NeRF: Neural Radiance Field in 3D Vision: A Comprehensive Review (Updated Post-Gaussian Splatting). <https://doi.org/10.48550/arXiv.2210.00379>
- Gao, Y., Chen, X., Yang, Q., Lasso, A., Kolesov, I., Pieper, S., Kikinis, R., Tannenbaum, A., Zhu, L., 2024. An effective and open source interactive 3D medical image segmentation solution. *Sci. Rep.* 14, 29878. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-80206-7>
- Garagna, S., Redi, C.A., Zuccotti, M., 2010. Gametogenesis. In: *Biologia dello Sviluppo* (Giudice G., Tocco GA., Campanella C.). Piccin, Padova.
- Gartner, L.P., Hiatt, J.L., 2008. *Istologia*, Terza edizione. ed. Edises.
- Ghose, S., Ju, Y., McDonough, E., Ho, J., Karunamurthy, A., Chadwick, C., Cho, S., Rose, R., Corwin, A., Surette, C., Martinez, J., Williams, E., Sood, A., Al-Kofahi, Y., Falo, L.D., Börner, K., Ginty, F., 2022. Human Digital Twin: Automated Cell Type Distance Computation and 3D Atlas Construction in Multiplexed Skin Biopsies. <https://doi.org/10.1101/2022.03.30.486438>
- Gilbert, S.F., Barresi, M.J.F., Cecconi, F., 2018. Determinazione sessuale e gametogenesis. In: *Biologia dello Sviluppo*, 5. ed italiana condotta sull'11. edizione americana. ed. Zanichelli, Bologna.
- Gupta, S.K., Bansal, P., Ganguly, A., Bhandari, B., Chakrabarti, K., 2009. Human zona pellucida glycoproteins: functional relevance during fertilization. *J. Reprod. Immunol.* 83, 50–55. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2009.07.008>
- Hatamizadeh, A., Tang, Y., Nath, V., Yang, D., Myronenko, A., Landman, B., Roth, H.R., Xu, D., 2022. UNETR: Transformers for 3D Medical Image Segmentation, in: 2022 IEEE/CVF Winter Conference on Applications of Computer Vision (WACV). Presented at the 2022

IEEE/CVF Winter Conference on Applications of Computer Vision (WACV), pp. 1748–1758. <https://doi.org/10.1109/WACV51458.2022.00181>

Hollesh, J.E., Bass, A.N., Lord, M., 2023. Physiology, Ovulation, in: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).

Hong, J., Chen, C., Li, M., Qiu, J., Dong, B., Lin, Y., 2026. A deep learning-based computer-aided determination method for dominant follicle identification and antral follicle count in pelvic MRI images. *Biomed. Eng. OnLine* 25, 37. <https://doi.org/10.1186/s12938-026-01518-5>

Inoue, N., Matsuda, F., Goto, Y., Manabe, N., 2011. Role of Cell-Death Ligand-Receptor System of Granulosa Cells in Selective Follicular Atresia in Porcine Ovary. *J. Reprod. Dev.* 57, 169–175. <https://doi.org/10.1262/jrd.10-198E>

Irie, N., Tang, W.W.C., Azim Surani, M., 2014. Germ cell specification and pluripotency in mammals: a perspective from early embryogenesis. *Reprod. Med. Biol.* 13, 203–215. <https://doi.org/10.1007/s12522-014-0184-2>

Jin, Y., Yang, X., Li, Q., Yan, Z., Yang, H., Liao, C., 2018. CT of ovarian cancer: 3D cinematic rendering for preoperative evaluation. *J. Ovarian Res.* 11, 86. <https://doi.org/10.1186/s13048-018-0461-5>

Kampschulte, M., Langheinrich, A.C., Sender, J., Litzlbauer, H.D., Althöhn, U., Schwab, J.D., Alexandre-Lafont, E., Martels, G., Krombach, G.A., 2016. Nano-Computed Tomography: Technique and Applications. *RöFo - Fortschritte Auf Dem Geb. Röntgenstrahlen Bildgeb. Verfahr.* 188, 146–154. <https://doi.org/10.1055/s-0041-106541>

Khoury, B.M., Bigelow, E.M.R., Smith, L.M., Schlecht, S.H., Scheller, E.L., Andarawis-Puri, N., Jepsen, K.J., 2015. The use of nano-computed tomography to enhance musculoskeletal research. *Connect. Tissue Res.* 56, 106–119. <https://doi.org/10.3109/03008207.2015.1005211>

Kim, J., Choi, Y.H., Chang, S., Kim, K.-T., Je, J.H., 2012. Defective folliculogenesis in female mice lacking Vaccinia-related kinase 1. *Sci. Rep.* 2, 468. <https://doi.org/10.1038/srep00468>

Lee, S., 2023. The Functions of Reproductive Hormones and Luteal Cell Types of Ovarian Corpus Luteum in Cows. <https://doi.org/10.20944/preprints202304.0559.v1>

Lee, S.-M., Surani, M.A., 2024. Epigenetic reprogramming in mouse and human primordial germ cells. *Exp. Mol. Med.* 56, 2578–2587. <https://doi.org/10.1038/s12276-024-01359-z>

Liew, S.H., Nguyen, Q.-N., Strasser, A., Findlay, J.K., Hutt, K.J., 2017. The ovarian reserve is depleted during puberty in a hormonally driven process dependent on the pro-apoptotic protein BMF. *Cell Death Dis.* 8, e2971–e2971. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.361>

- Liu, X., Zhao, Y., Feng, Y., Wang, S., Zhang, J., 2025. Ovarian Aging: Mechanisms, Age-Related Disorders, and Therapeutic Interventions. *MedComm* 6, e70481.
<https://doi.org/10.1002/mco2.70481>
- Magnúsdóttir, E., Surani, M.A., 2014. How to make a primordial germ cell. *Development* 141, 245–252. <https://doi.org/10.1242/dev.098269>
- Maier-Hein, L., Reinke, A., Godau, P., Tizabi, M.D., Buettner, F., Christodoulou, E., Glocker, B., Isensee, F., Kleesiek, J., Kozubek, M., Reyes, M., Riegler, M.A., Wiesenfarth, M., Kavur, A.E., Sudre, C.H., Baumgartner, M., Eisenmann, M., Heckmann-Nötzl, D., Radsch, T., Acion, L., Antonelli, M., Arbel, T., Bakas, S., Benis, A., Blaschko, M.B., Cardoso, M.J., Cheplygina, V., Cimini, B.A., Collins, G.S., Farahani, K., Ferrer, L., Galdran, A., Van Ginneken, B., Haase, R., Hashimoto, D.A., Hoffman, M.M., Huisman, M., Jannin, P., Kahn, C.E., Kainmueller, D., Kainz, B., Karagyris, A., Karthikesalingam, A., Kofler, F., Kopp-Schneider, A., Kreshuk, A., Kurc, T., Landman, B.A., Litjens, G., Madani, A., Maier-Hein, K., Martel, A.L., Mattson, P., Meijering, E., Menze, B., Moons, K.G.M., Müller, H., Nichyporuk, B., Nickel, F., Petersen, J., Rajpoot, N., Rieke, N., Saez-Rodriguez, J., Sánchez, C.I., Shetty, S., Van Smeden, M., Summers, R.M., Taha, A.A., Tiulpin, A., Tsaftaris, S.A., Van Calster, B., Varoquaux, G., Jäger, P.F., 2024. Metrics reloaded: recommendations for image analysis validation. *Nat. Methods* 21, 195–212.
<https://doi.org/10.1038/s41592-023-02151-z>
- Maleike, D., Nolden, M., Meinzer, H.-P., Wolf, I., 2009. Interactive segmentation framework of the Medical Imaging Interaction Toolkit. *Comput. Methods Programs Biomed.* 96, 72–83.
<https://doi.org/10.1016/j.cmpb.2009.04.004>
- Mathur, P., Kakwani, K., Diplav, Kudavelly, S., GA, R., 2020. Deep Learning based Quantification of Ovary and Follicles using 3D Transvaginal Ultrasound in Assisted Reproduction, in: 2020 42nd Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine & Biology Society (EMBC). Presented at the 2020 42nd Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine & Biology Society (EMBC), pp. 2109–2112.
<https://doi.org/10.1109/EMBC44109.2020.9176703>
- Matsuda, F., Inoue, N., Manabe, N., Ohkura, S., 2012. Follicular Growth and Atresia in Mammalian Ovaries: Regulation by Survival and Death of Granulosa Cells. *J. Reprod. Dev.* 58, 44–50.
<https://doi.org/10.1262/jrd.2011-012>
- Meng, L., Jan, S.Z., Hamer, G., van Pelt, A.M., van der Stelt, I., Keijer, J., Teerds, K.J., 2018. Preantral follicular atresia occurs mainly through autophagy, while antral follicles degenerate mostly through apoptosis. *Biol. Reprod.* 99, 853–863.
<https://doi.org/10.1093/biolre/iory116>
- Model, M.A., 2014. Possible causes of apoptotic volume decrease: an attempt at quantitative review. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* 306, C417–C424.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00328.2013>

- Mumusoglu, S., Yang, Q., Kawamura, K., Chang M, C., Liu, K., Hsueh, A.J., 2025. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles: a quarter-century update. *Reprod. Biomed. Online* 51, 105108. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2025.105108>
- Nakata, H., Sonomura, T., Iseki, S., 2017. Three-dimensional analysis of seminiferous tubules and spermatogenic waves in mice. *Reproduction* 154, 569–579. <https://doi.org/10.1530/REP-17-0391>
- Pagano, L., Thibault, G., Bousselham, W., Riesterer, J.L., Song, X., Gray, J.W., 2023. Efficient semi-supervised semantic segmentation of electron microscopy cancer images with sparse annotations. *Front. Bioinforma.* 3. <https://doi.org/10.3389/fbinf.2023.1308707>
- Pashaj, S., Merz, E., 2013. Current Role of 3D/4D Sonography in Obstetrics and Gynecology. *Donald Sch. J. Ultrasound Obstet. Gynecol.* 7, 400–408. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10009-1310>
- Paulini, F., Chaves, S.B., Rôlo, J.L.J.P., Azevedo, R.B.D., Lucci, C.M., 2017. Evaluation of ovarian structures using computerized microtomography. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 89, 2131–2139. <https://doi.org/https://doi.org/10.1590/0001-3765201720150864>
- Pedersen, T., Peters, H., 1968. Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. *J. Reprod. Fertil.* 17, 555–557. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0170555>
- Pei, Z., Deng, K., Xu, C., Zhang, S., 2023. The molecular regulatory mechanisms of meiotic arrest and resumption in Oocyte development and maturation. *Reprod. Biol. Endocrinol. RBE* 21, 90. <https://doi.org/10.1186/s12958-023-01143-0>
- Plendl, J., 2000. Angiogenesis and vascular regression in the ovary. *Anat. Histol. Embryol.* 29, 257–266. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0264.2000.00265.x>
- Qi, G., Zhu, Z., Li, K., Xiao, H., Qi, G., Zhu, Z., Li, K., Xiao, H., 2025. Advancements and Challenges in Medical Image Segmentation: A Comprehensive Survey. *Sens. AI* 1, 3–29. <https://doi.org/10.53941/sai.2025.100002>
- Rawson, S.D., Maksimcuka, J., Withers, P.J., Cartmell, S.H., 2020. X-ray computed tomography in life sciences. *BMC Biol.* 18, 21. <https://doi.org/10.1186/s12915-020-0753-2>
- Reed, B.G., Carr, B.R., 2000. The Normal Menstrual Cycle and the Control of Ovulation, in: Feingold, K.R., Adler, R.A., Ahmed, S.F., Anawalt, B., Blackman, M.R., Chrousos, G., Corpas, E., de Herder, W.W., Dhatriya, K., Dungan, K., Hamilton, E., Hofland, J., Jan de Beur, S., Kalra, S., Kaltsas, G., Kapoor, N., Kim, M., Koch, C., Kopp, P., Korbonits, M., Kovacs, C.S., Kuohung, W., Laferrère, B., Levy, M., McGee, E.A., McLachlan, R., Muzumdar, R., Purnell, J., Rey, R., Sahay, R., Shah, A.S., Sperling, M.A., Stratakis, C.A., Trence, D.L., Wilson, D.P. (Eds.), *Endotext*. MDTText.com, Inc., South Dartmouth (MA).

- Rizwan I Haque, I., Neubert, J., 2020. Deep learning approaches to biomedical image segmentation. *Inform. Med. Unlocked* 18, 100297. <https://doi.org/10.1016/j.imu.2020.100297>
- Ronneberger, O., Fischer, P., Brox, T., 2015. U-Net: Convolutional Networks for Biomedical Image Segmentation, in: Navab, N., Hornegger, J., Wells, W.M., Frangi, A.F. (Eds.), *Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention – MICCAI 2015*, Lecture Notes in Computer Science. Springer International Publishing, Cham, pp. 234–241. https://doi.org/10.1007/978-3-319-24574-4_28
- Ross, M.H., Pawlina, W., Sica, G., 2010. *Istologia: testo e atlante: con elementi di biologia cellulare e molecolare*. CEA, Milano.
- Salarian, M., Toyserkani, E., 2018. The use of nano-computed tomography (nano-CT) in non-destructive testing of metallic parts made by laser powder-bed fusion additive manufacturing. *Int. J. Adv. Manuf. Technol.* 98, 3147–3153. <https://doi.org/10.1007/s00170-018-2421-z>
- Sánchez, F., Smits, J., 2012. Molecular control of oogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1822, 1896–1912. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.05.013>
- Sharma, R., Saqib, M., Lin, C.T., Blumenstein, M., 2022. A Survey on Object Instance Segmentation. *SN Comput. Sci.* 3, 499. <https://doi.org/10.1007/s42979-022-01407-3>
- She, Z.-Y., Yang, W.-X., 2014. Molecular mechanisms involved in mammalian primary sex determination. *J. Mol. Endocrinol.* 53, R21–R37. <https://doi.org/10.1530/JME-14-0018>
- Shen, L., Liu, J., Luo, A., Wang, S., 2023. The stromal microenvironment and ovarian aging: mechanisms and therapeutic opportunities. *J. Ovarian Res.* 16, 237. <https://doi.org/10.1186/s13048-023-01300-4>
- Shirley, P., Marschner, S., Ashikhmin, M., Gleicher, M., Hoffman, N., Johnson, G., Munzner, T., Reinhard, E., Sung, K., B.Thompson, W., Willemsen, P., Wyvill, B., 2011. *Fundamentals of Computer Graphics*, terza. ed. CRC press.
- Silva, M.T., Do Vale, A., Dos Santos, N.M.N., 2008. Secondary necrosis in multicellular animals: an outcome of apoptosis with pathogenic implications. *Apoptosis* 13, 463–482. <https://doi.org/10.1007/s10495-008-0187-8>
- Singh, V.K., Yousef Kalafi, E., Cheah, E., Wang, S., Wang, J., Ozturk, A., Li, Q., Eldar, Y.C., Samir, A.E., Kumar, V., 2022. HaTU-Net: Harmonic Attention Network for Automated Ovarian Ultrasound Quantification in Assisted Pregnancy. *Diagnostics* 12, 3213. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12123213>
- Sun, Y.-C., Sun, X.-F., Dyce, P.W., Shen, W., Chen, H., 2017. The role of germ cell loss during primordial follicle assembly: a review of current advances. *Int. J. Biol. Sci.* 13, 449–457. <https://doi.org/10.7150/ijbs.18836>

- Taha, A.A., Hanbury, A., 2015. Metrics for evaluating 3D medical image segmentation: analysis, selection, and tool. *BMC Med. Imaging* 15, 29. <https://doi.org/10.1186/s12880-015-0068-x>
- Thiyagarajan, D.K., Basit, H., Jeanmonod, R., 2024. Physiology, Menstrual Cycle, in: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Uslu, B., Dioguardi, C.C., Haynes, M., Miao, D.-Q., Kurus, M., Hoffman, G., Johnson, J., 2017. Quantifying growing versus non-growing ovarian follicles in the mouse. *J. Ovarian Res.* 10, 3. <https://doi.org/10.1186/s13048-016-0296-x>
- Wang, W., Liu, H., Tian, W., Zhang, F., Gong, Y., Chen, J., Mao, D., Shi, F., 2010. Morphologic observation and classification criteria of atretic follicles in guinea pigs. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 11, 307–314. <https://doi.org/10.1631/jzus.B0900391>
- Weigert, M., Schmidt, U., Haase, R., Sugawara, K., Myers, G., 2020. Star-convex Polyhedra for 3D Object Detection and Segmentation in Microscopy, in: 2020 IEEE Winter Conference on Applications of Computer Vision (WACV). Presented at the 2020 IEEE Winter Conference on Applications of Computer Vision (WACV), IEEE, Snowmass Village, CO, USA, pp. 3655–3662. <https://doi.org/10.1109/WACV45572.2020.9093435>
- Winkler, I., Tolkachov, A., Lammers, F., Lacour, P., Daugelaite, K., Schneider, N., Koch, M.-L., Panten, J., Grünschlager, F., Poth, T., Ávila, B.M. de, Schneider, A., Haas, S., Odom, D.T., Gonçalves, Â., 2024. The cycling and aging mouse female reproductive tract at single-cell resolution. *Cell* 187, 981-998.e25. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2024.01.021>
- Yu, H., Yang, Z., Tan, L., Wang, Y., Sun, W., Sun, M., Tang, Y., 2018. Methods and datasets on semantic segmentation: A review. *Neurocomputing* 304, 82–103. <https://doi.org/10.1016/j.neucom.2018.03.037>
- Zeng, A., Lu, J., Li, Y., 2025. Three-dimensional MRI follicle segmentation and counting using SegmentWithSAM in the diagnosis of polycystic ovary syndrome. *Abdom. Radiol.* 50, 3847–3855. <https://doi.org/10.1007/s00261-025-04818-x>
- Zhang, T., Lin, M., Wang, C., Zhou, J., 2025. Mechanisms of follicular atresia: focus on apoptosis, autophagy, and ferroptosis. *Front. Endocrinol.* 16. <https://doi.org/10.3389/fendo.2025.1603467>
- Zhang, Z., Schlamp, F., Huang, L., Clark, H., Brayboy, L., 2020. Inflammaging is associated with shifted macrophage ontogeny and polarization in the aging mouse ovary. *Reproduction* 159, 325–337. <https://doi.org/10.1530/REP-19-0330>
- Zhao, Y., Zhang, Y., Li, J., Zheng, N., Xu, X., Yang, J., Xia, G., Zhang, M., 2018. MAPK3/1 participates in the activation of primordial follicles through mTORC1-KITL signaling. *J. Cell. Physiol.* 233, 226–237. <https://doi.org/10.1002/jcp.25868>