

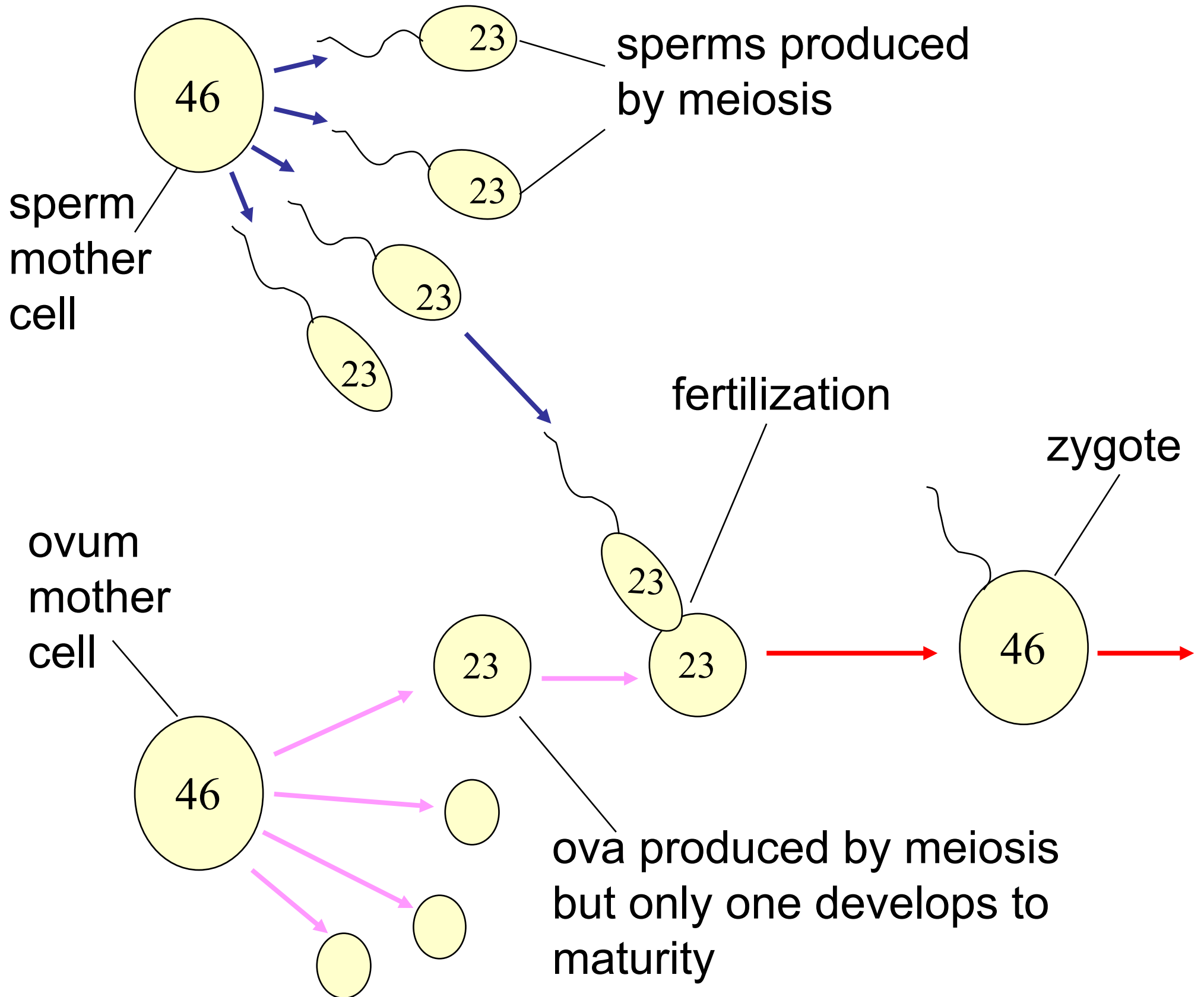
Fecondazione



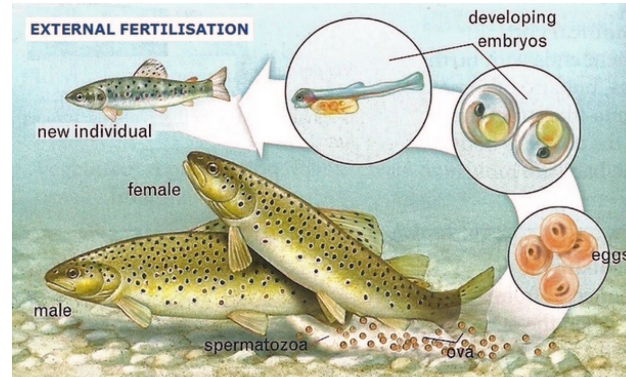
La fecondazione è quel processo per cui si attuano insieme la *sessualità* (l'unione dei geni dei genitori) e la *riproduzione* (l'origine di un nuovo individuo). Cellule aploidi specializzate, i *gameti*, si devono incontrare, fondere ed infine unire i loro genomi per dar luogo allo zigote o uovo fecondato, ristabilendo così il corredo diploide tipico della specie:

FUSIONE DEI NUCLEI DELLO SPERMATOZOO E DELLA CELLULA UOVO CON LA FORMAZIONE DELLO ZIGOTE

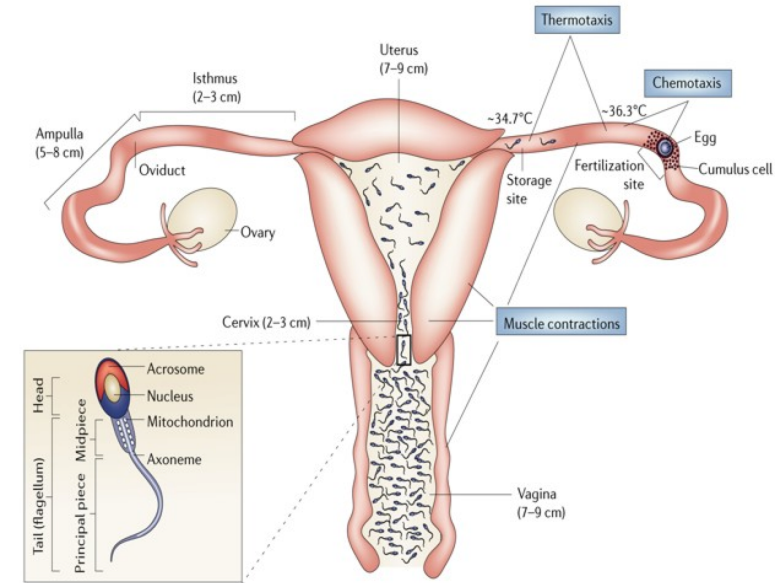
Fecondazione



Fecondazione



First, the female releases the unfertilised eggs (ova) into water and then the male releases sperm (full of spermatozoa) over them.



Esterna, coi gameti rilasciati in ambiente acquatico: senza copulazione, prevede la produzione di un gran numero di gameti; generalmente non vi sono cure parentali; tipica di molti invertebrati, pesci e anfibi.

Interna, nelle vie genitali femminili: prevede la copula e la produzione di un numero ridotto di gameti (soprattutto uova); generalmente sono presenti cure parentali; tipica di condroitti (squali e razze), rettili, uccelli e mammiferi, con alcune eccezioni tra gli invertebrati e gli anfibi.

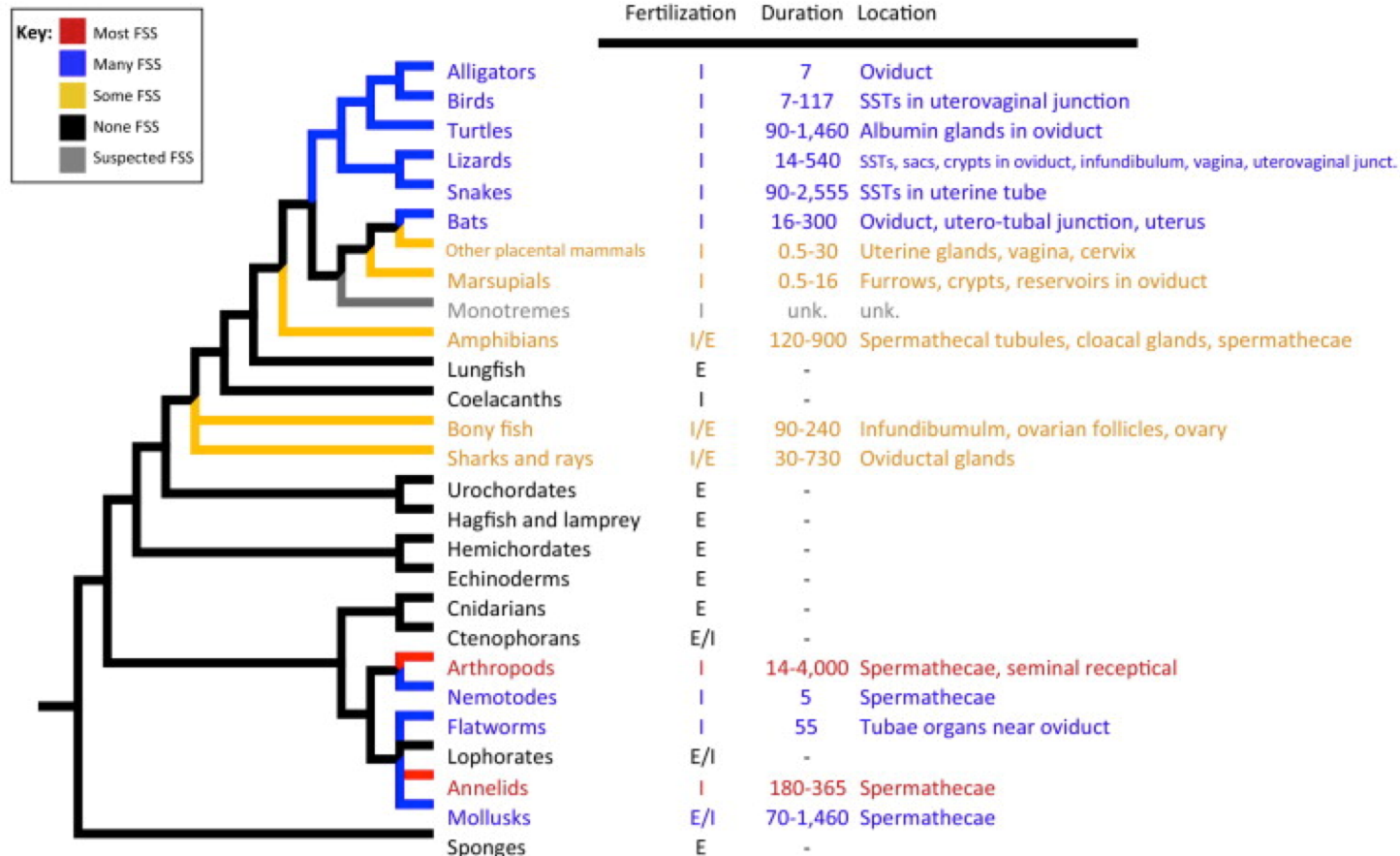
Fecondazione

Strategie riproduttive: sincronizzazione dei cicli riproduttivi, per cui i gameti maschili e femminili maturano in sincronia e gli zigoti hanno maggiori probabilità di svilupparsi.

Vi sono delle eccezioni:

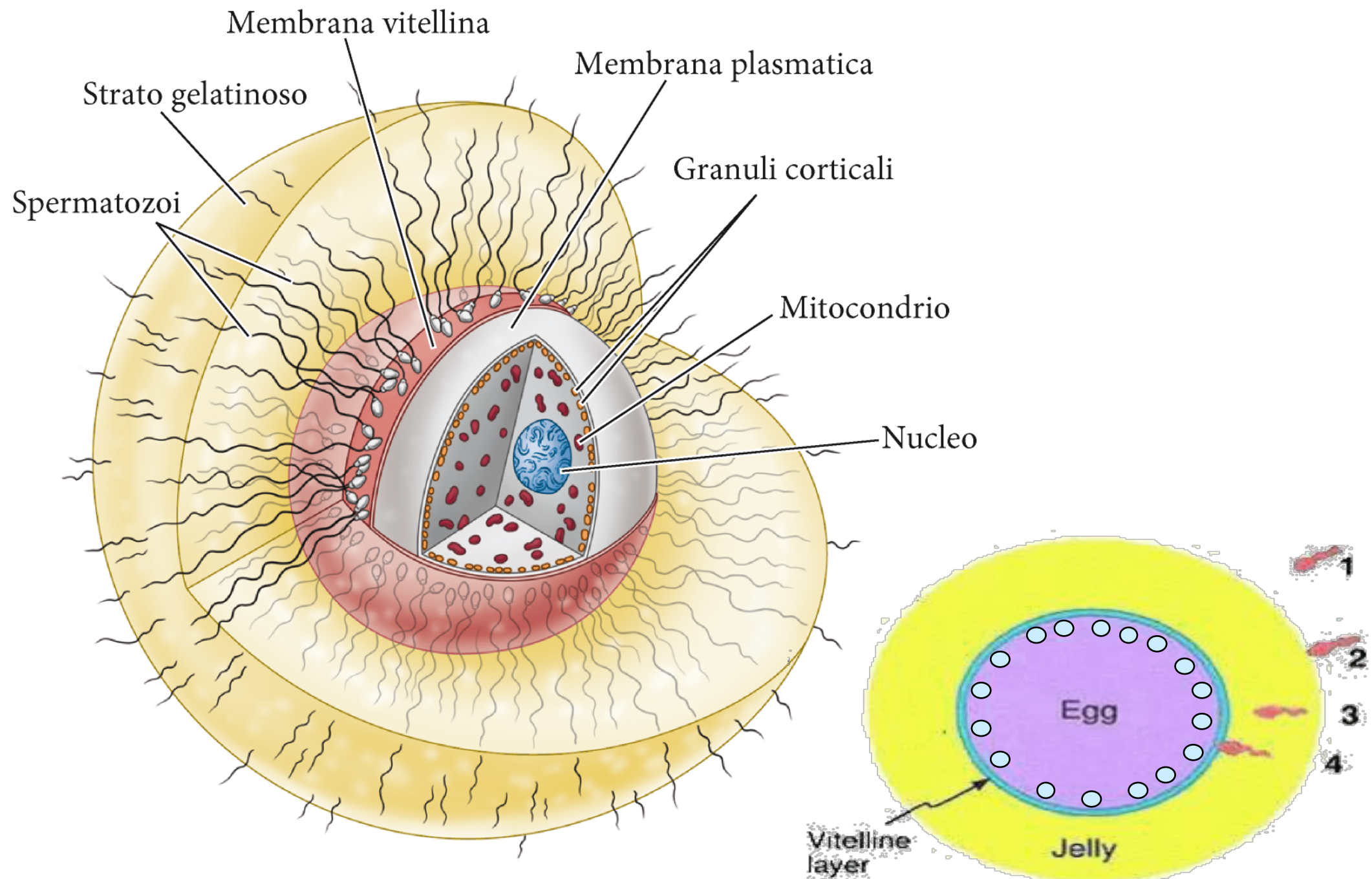
Pipistrello: gli spermatozoi sono conservati nell'utero per mesi

Ape: conserva gli spermatozoi per tutta la vita



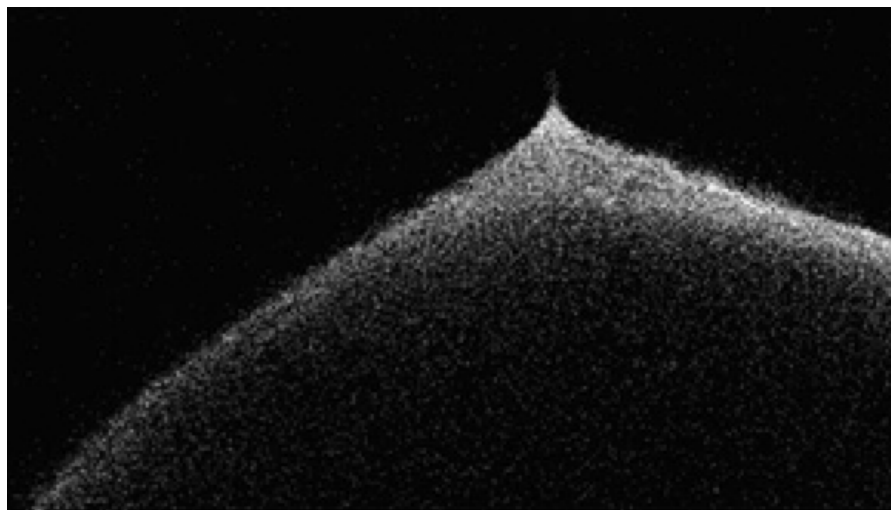
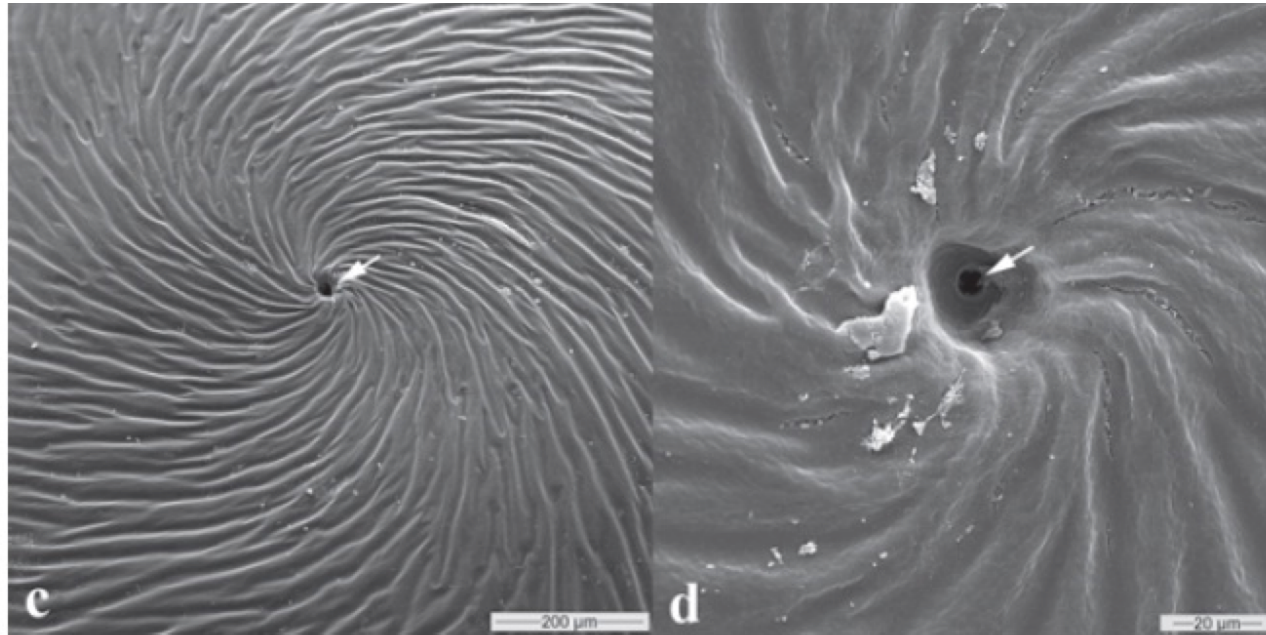
Fecondazione

L'ovocita è circondato da vari strati di materiale, che lo spermatozoo deve attraversare per poter arrivare alla membrana plasmatica.



Fecondazione

Strategie riproduttive: meccanismi chemiotattici che attraggono in maniera specie-specifica gli spermatozoi, guidandoli verso l'uovo. Vengono rilasciati dagli involucri ovulari sostanze chemioattrattanti per gli spermatozoi (la *fertilizina* nel riccio di mare studiata dal Lillie, 1912). L'esistenza di tali sostanze è stata ad es. ipotizzata per spiegare l'aggregazione degli spermatozoi vicino al micropilo del corion dei pesci.



Fecondazione

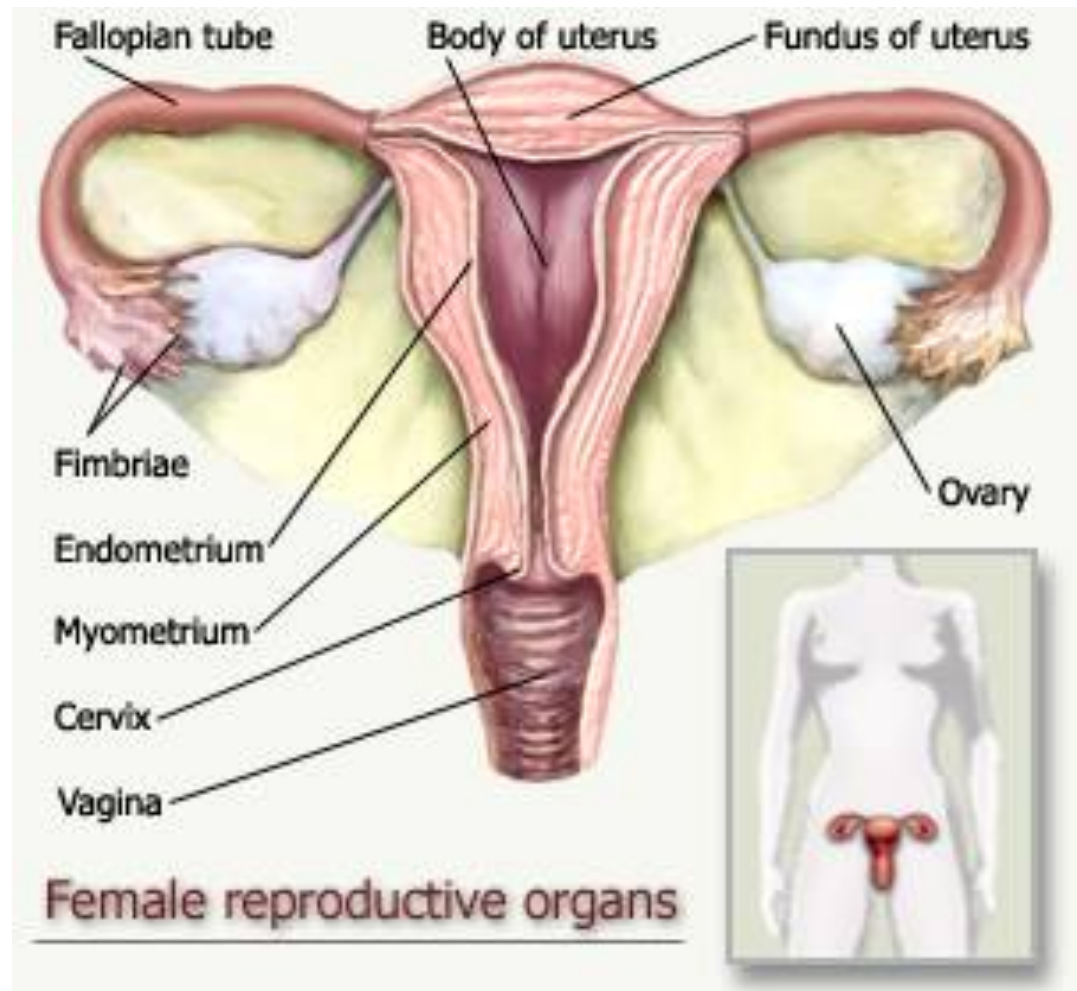
La fecondazione mette in atto tutte le strategie che permettono l'incontro di *gameti della stessa specie e non di specie diverse*. Gli ibridi interspecifici sono sterili.

Pur con differenze fra le varie specie, perché si attui con successo la fecondazione, devono avvenire diverse interazioni fra i gameti:

- 1) Avvicinamento dello spermatozoo all'uovo**
- 2) Attivazione e penetrazione dello spermatozoo attraverso gli involucri ovulari**
- 3) Contatto e fusione della membrana plasmatica dei due gameti**
- 4) Attivazione dell'uovo**

Fecondazione nella specie umana

- fertilization in mammals occurs in the oviduct
- The ova is viable for approximately 24 hours after ovulation



Fecondazione

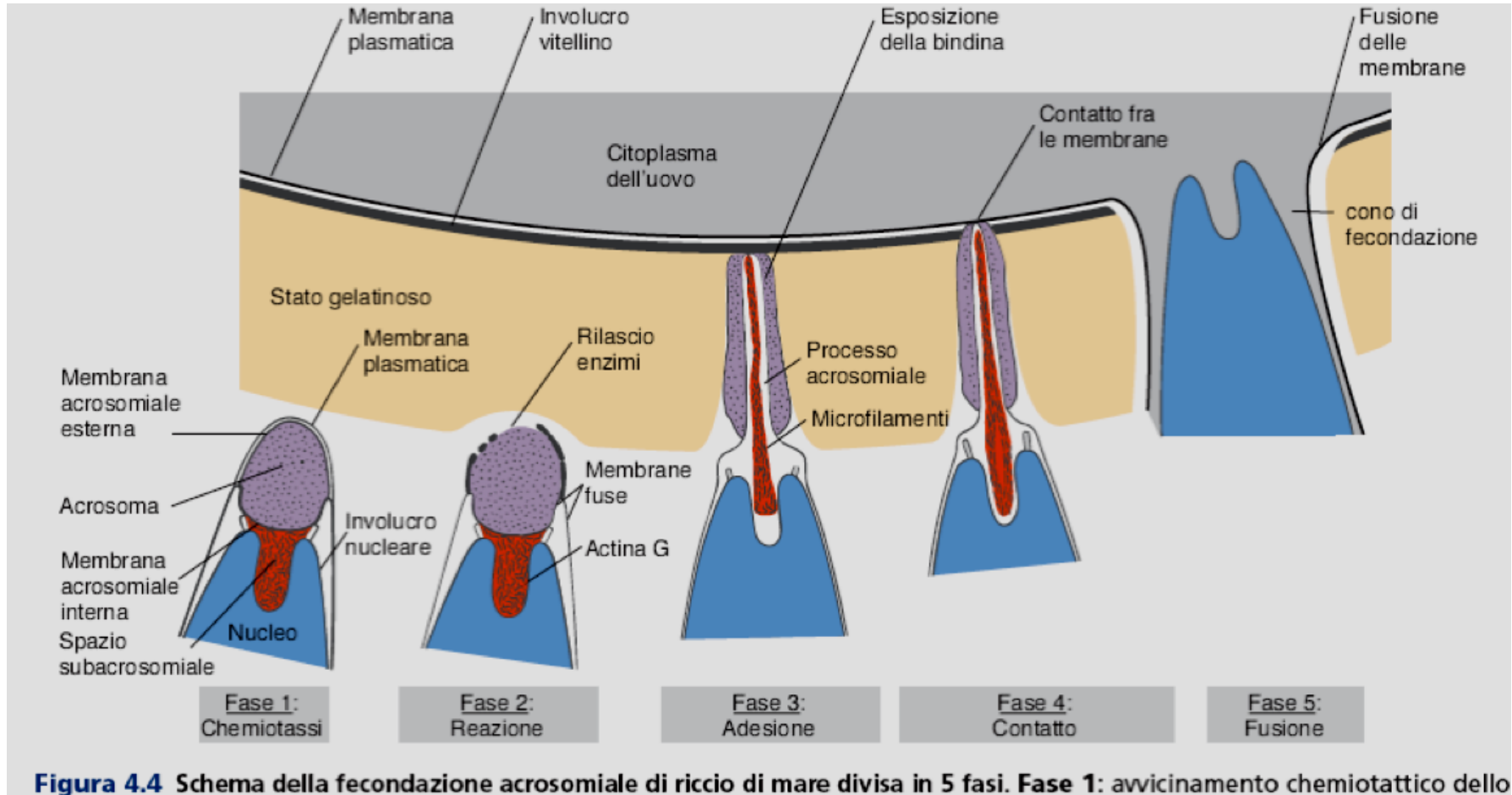
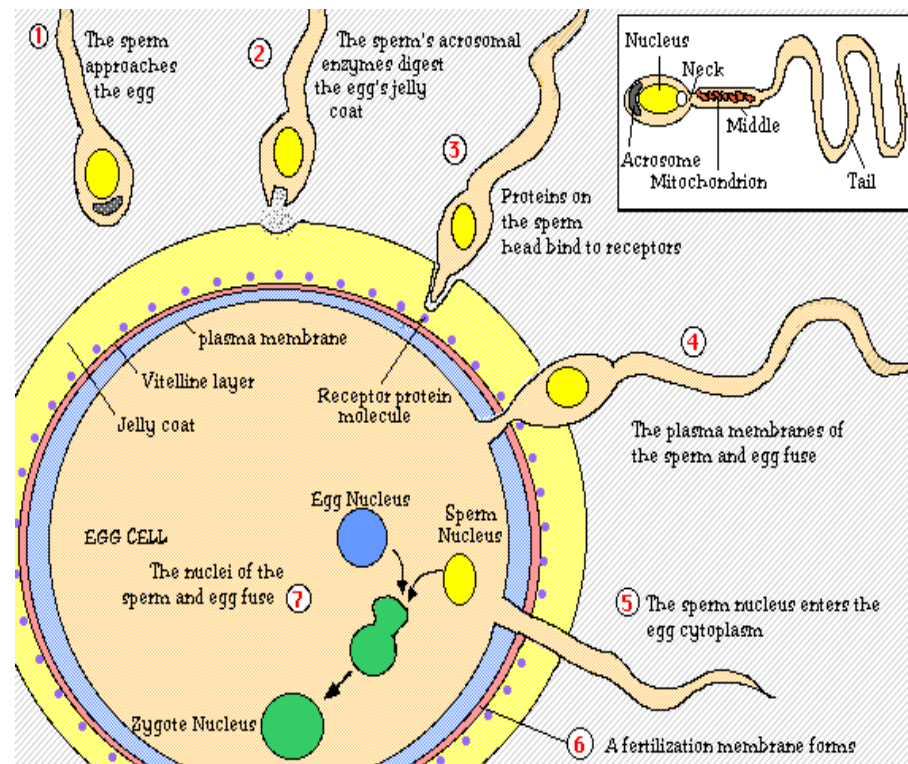
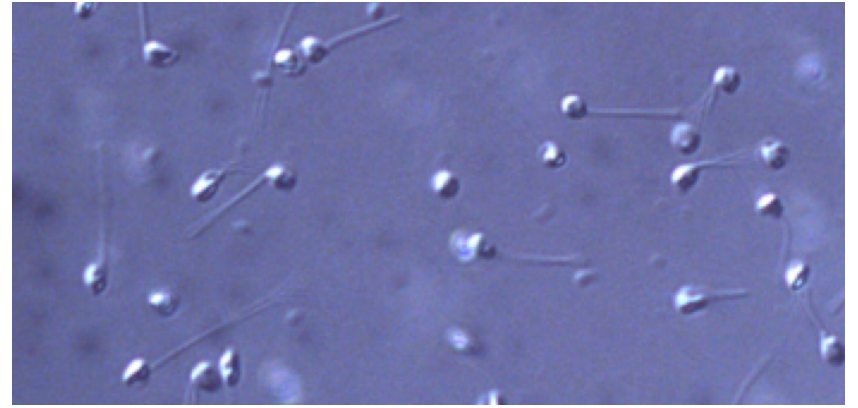


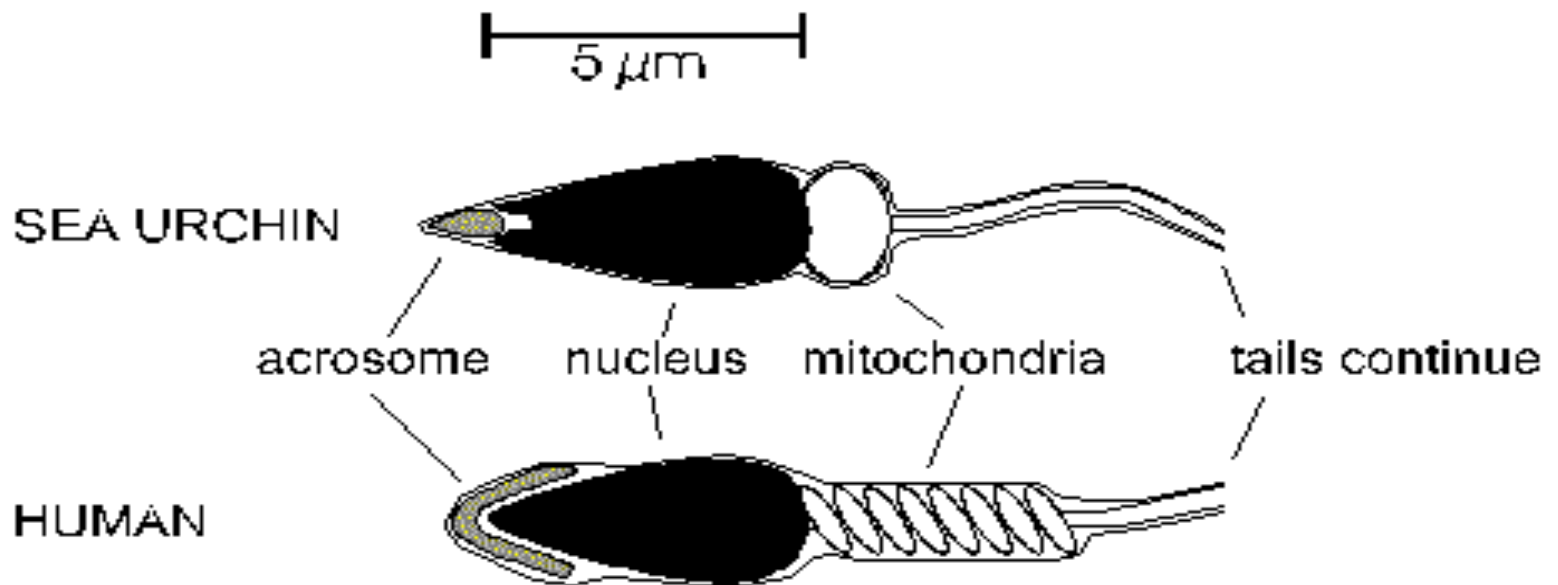
Figura 4.4 Schema della fecondazione acrosomiale di riccio di mare divisa in 5 fasi. Fase 1: avvicinamento chemiotattico dello



Fecondazione nel riccio di mare

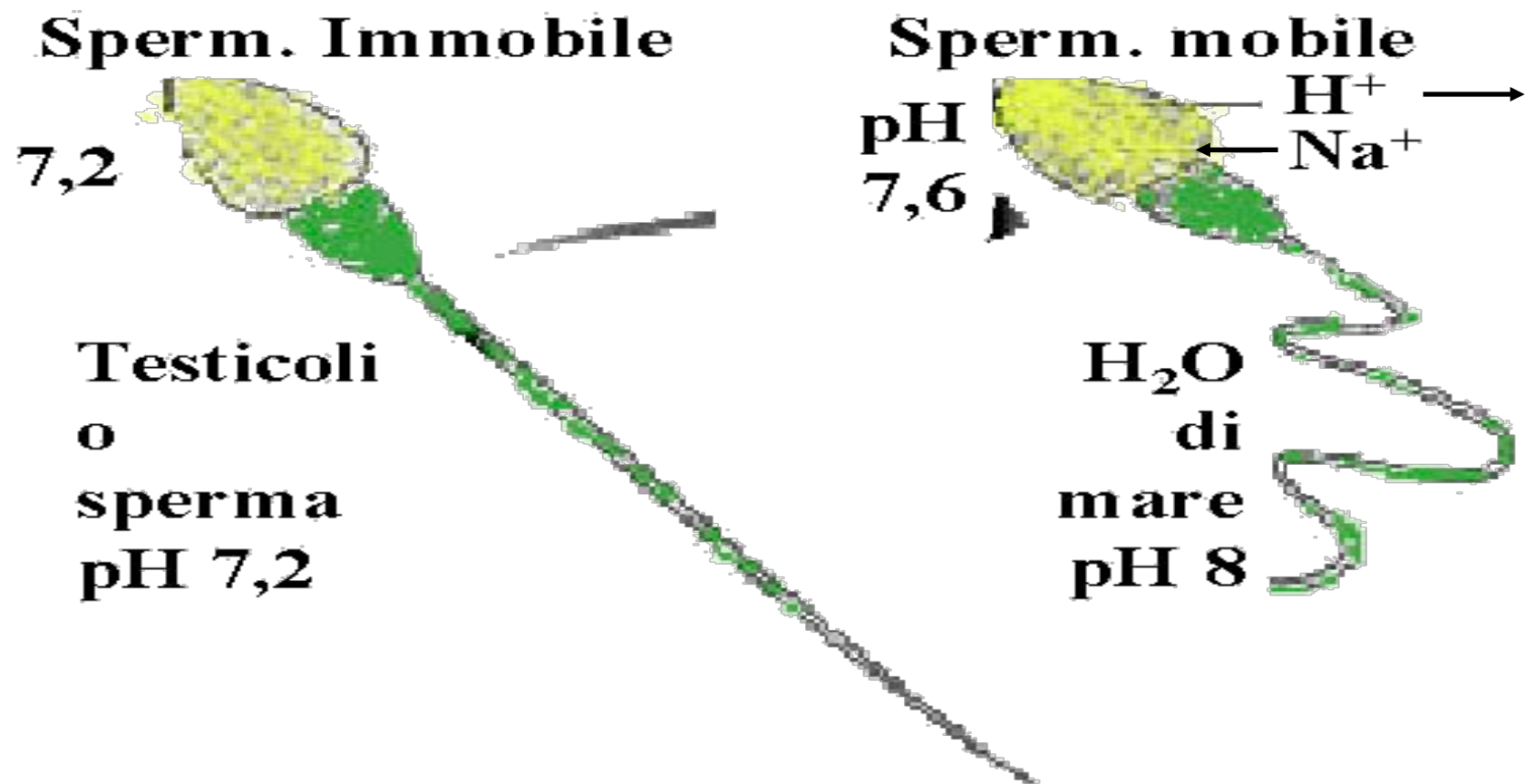


Lo spermatozoo



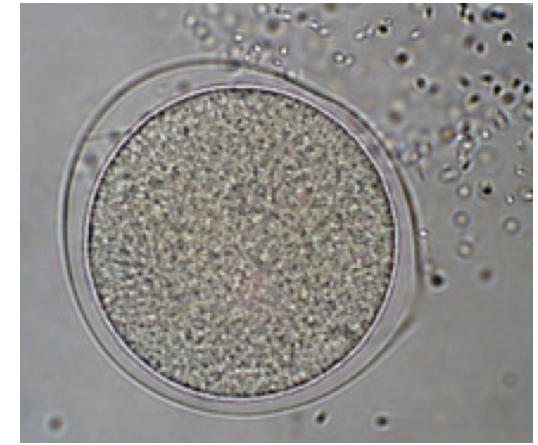
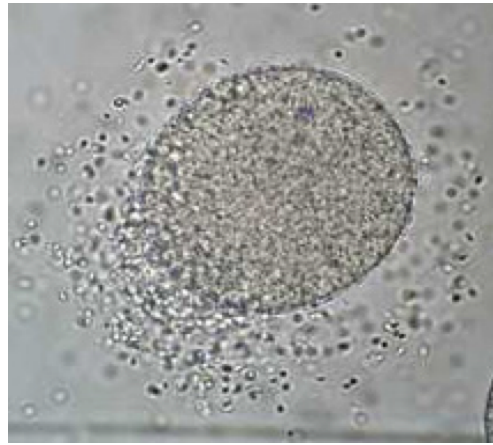
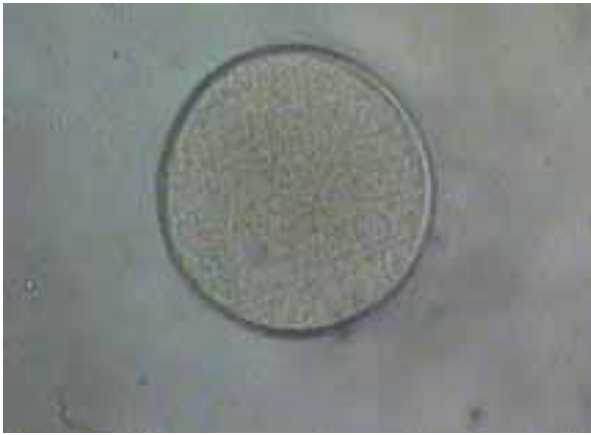
Gli spermatozoi degli invertebrati acquatici sono più semplici di quelli dei vertebrati. Nella testa presentano un piccolo acrosoma e sono forniti di un breve pezzo intermedio con pochi mitocondri sferoidali.

Fecondazione nel riccio di mare

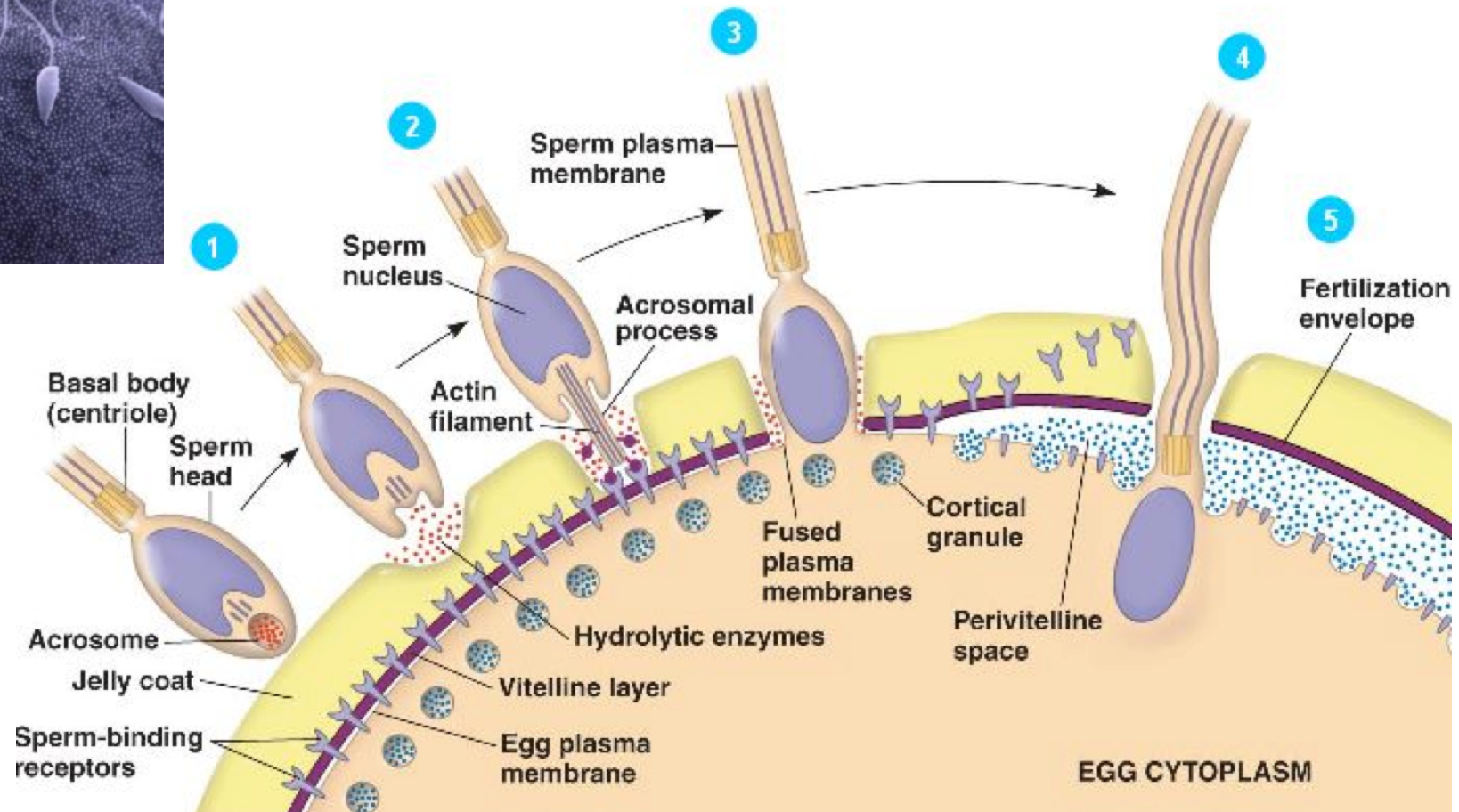


Lo spermatozoo degli echinodermi diventa mobile a contatto con l'acqua di mare per la penetrazione di Na^+ e contemporanea fuoriuscita di H^+ che fa aumentare il pH interno da 7,2 a 7,6, che a sua volta attiva l'attività ATPasica della dineina.

Fecondazione nel riccio di mare



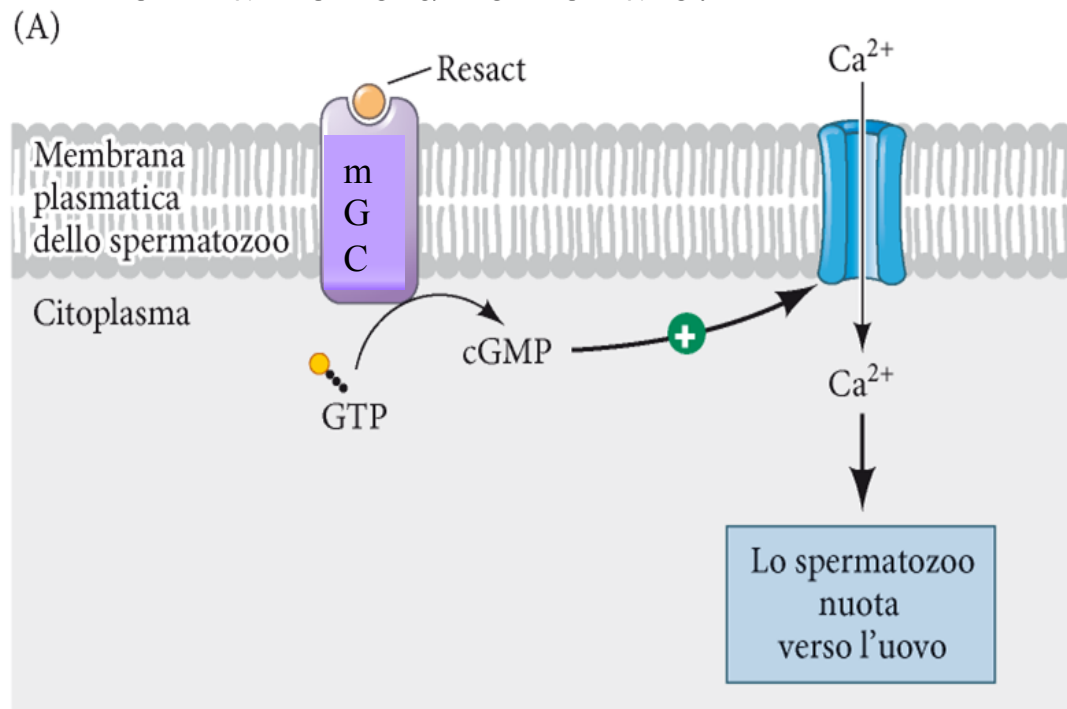
Fertilization in sea urchin.



Fecondazione nel riccio di mare

Attrazione specie-specifica degli spermatozoi

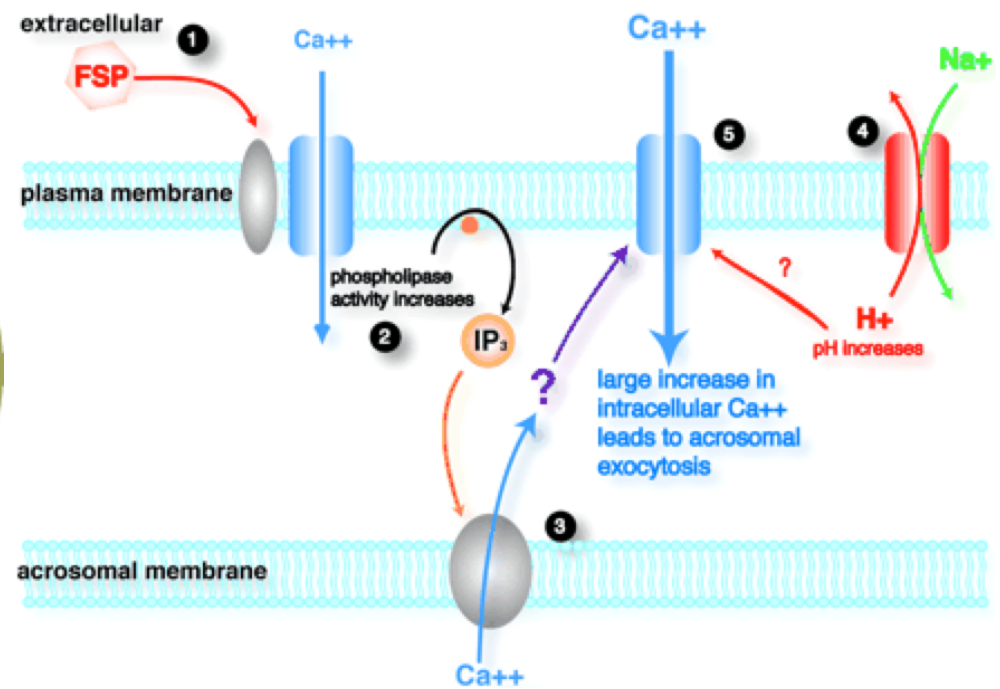
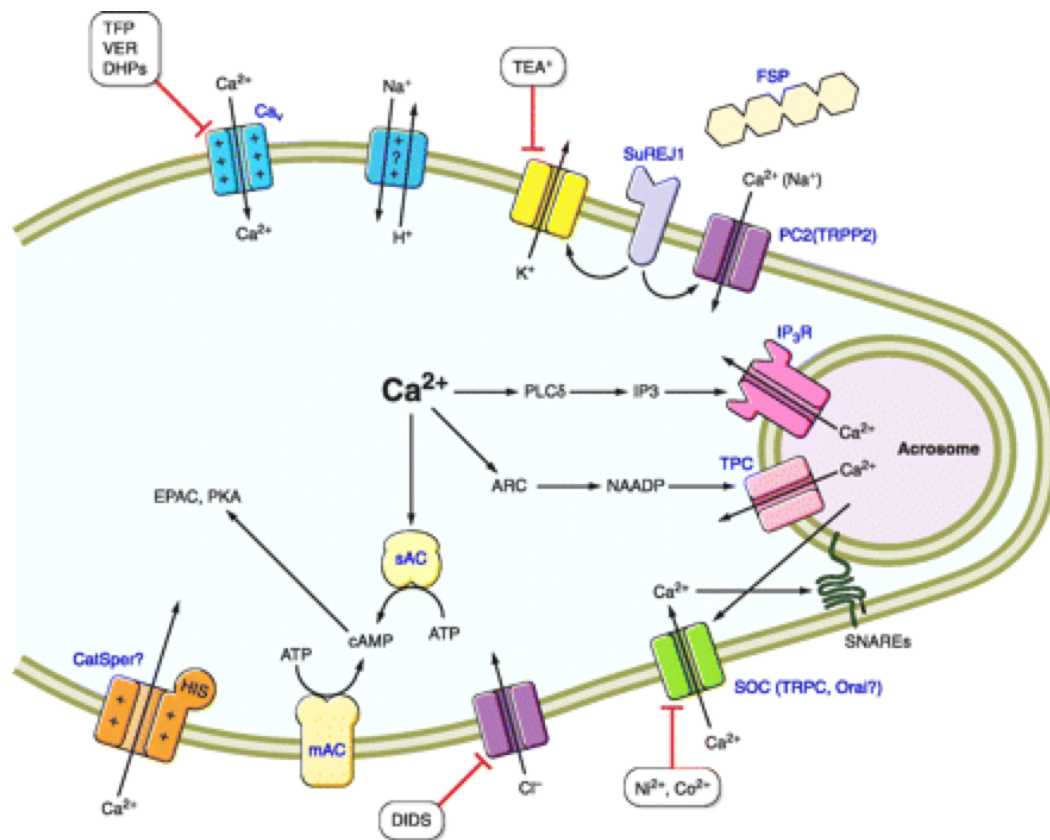
Il *resact*, un piccolo peptide di 14 aa., prodotto dall'involucro gelatinoso dell'uovo, agisce chemiotatticamente anche a concentrazioni bassissime per guidare gli spermatozoi alle uova del riccio di mare seguendo il suo gradiente di concentrazione. Il resact è specie-specifico in quanto attira solo gli spermatozoi di *Arbacia punctulata* e non quelli di altre specie di riccio. Altro piccolo peptide è lo *speract* che, come il resact, attiva gli spermatozoi utilizzando nucleotidi ciclici come II messaggeri. Infatti il recettore dello spermatozoo del riccio di mare presenta attività guanilil-ciclastasi (mGC) e lo speract tramite la mGC innalza i livelli di cGMP, il quale attiva un canale di Ca^{2+} permettendo un afflusso di tale ione dall'acqua di mare fornendo così allo spermatozoo un'informazione direzionale.



Fecondazione nel riccio di mare

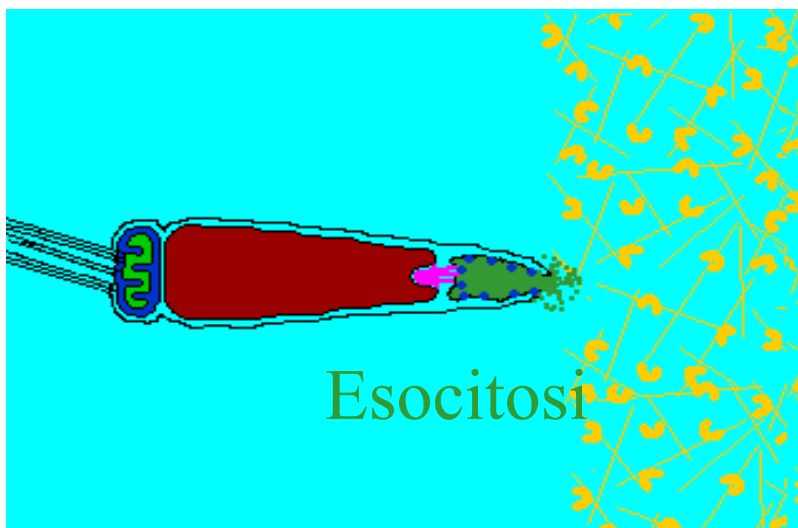
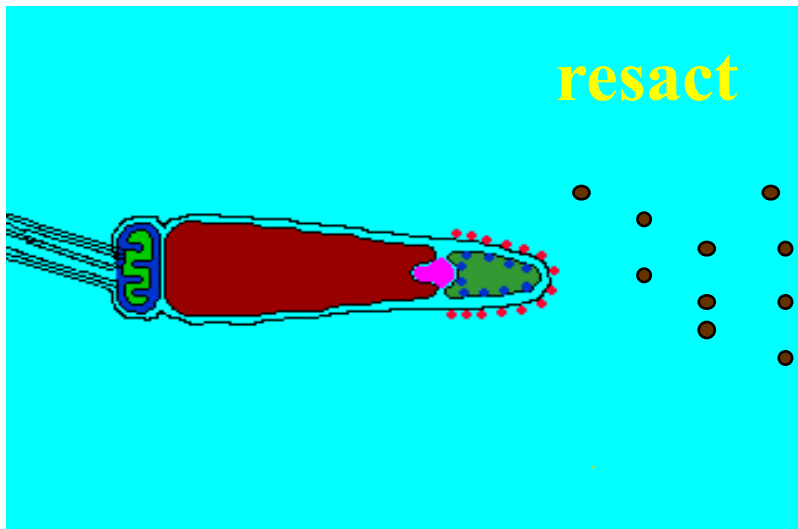
Attivazione degli spermatozoi: Reazione acrosomiale

Nel riccio di mare un polimero solforato del fucosio contenuto nell'involucro gelatinoso dell'uovo innesca la reazione acrosomiale, che consta di due fasi: *1-la fusione della membrana acrosomiale esterna con la conseguente esocitosi degli enzimi acrosomiali e l'esposizione di quella interna, 2-la protrusione del processo acrosomiale.*



Fecondazione nel riccio di mare

Gradiente di chemioattrattante che attira gli spermatozoi verso l'uovo



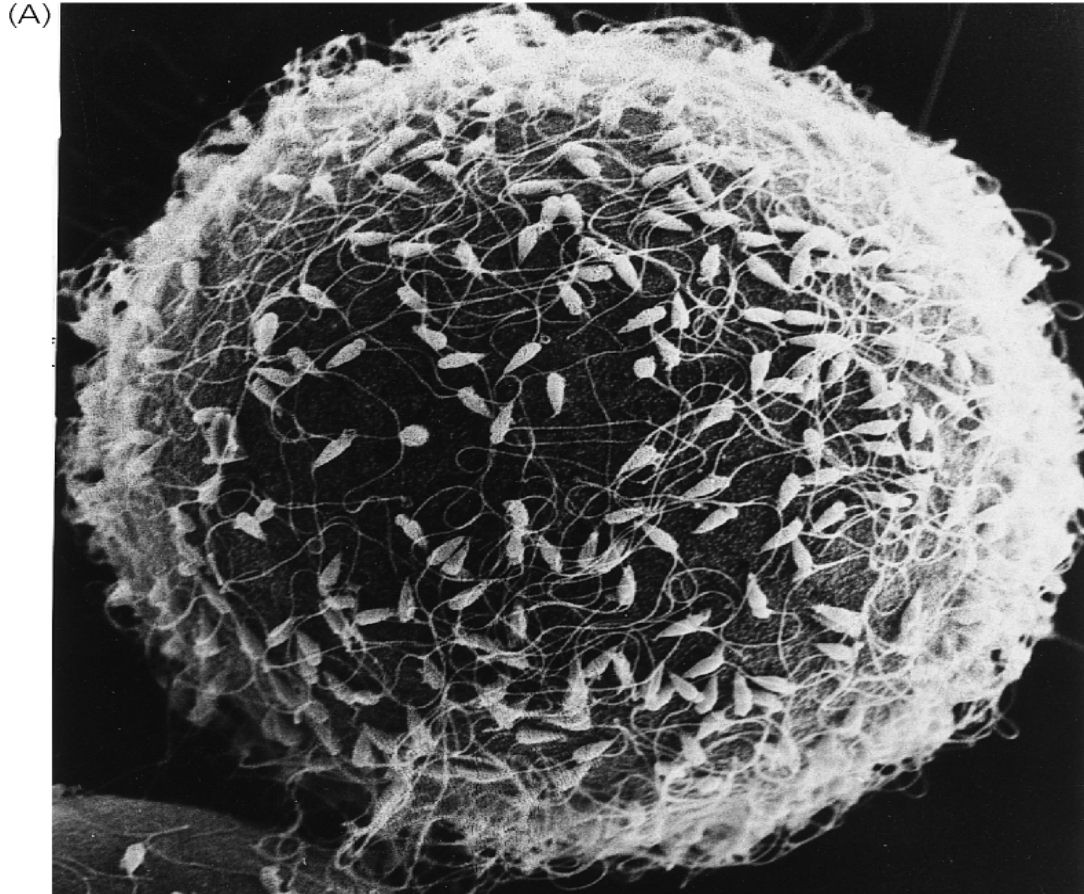
Involucro gelatinoso: nel momento in cui le molecole recettrici della membrana plasmatica dello spermatozoo reagiscono legandosi al polimero del fucosio del jelly coat, attivano:

- 1) un canale di trasporto del Ca^{+2} e si ha uno scambio ionico con entrata di Ca^{+2} e fuoriuscita di 2K^{+}
- 2) uno scambiatore $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$
- 3) l'enzima fosfolipasi che produce IP_3 .

Ciò provoca l'esocitosi del contenuto acrosomico: gli enzimi acrosomiali digerendo il jelly coat permettono il passaggio dello spermatozoo

Fecondazione nel riccio di mare

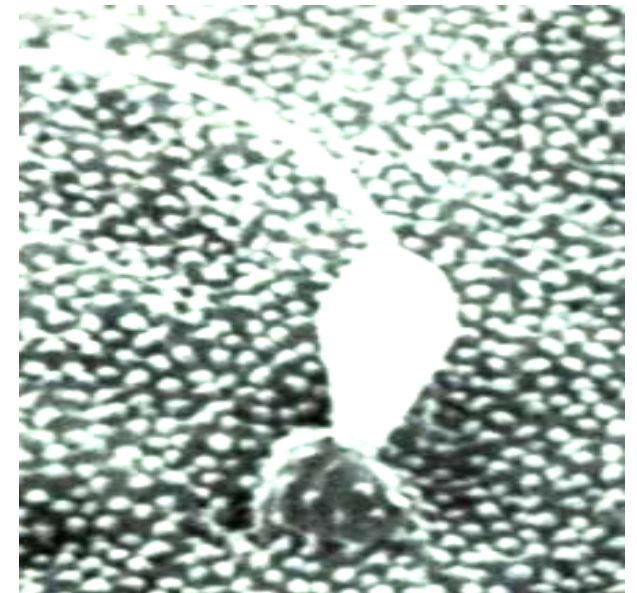
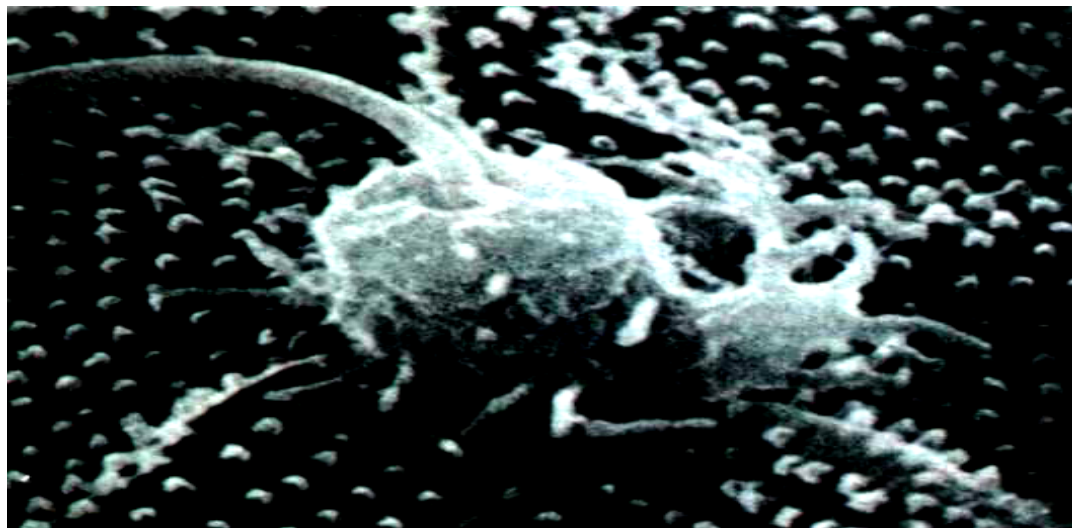
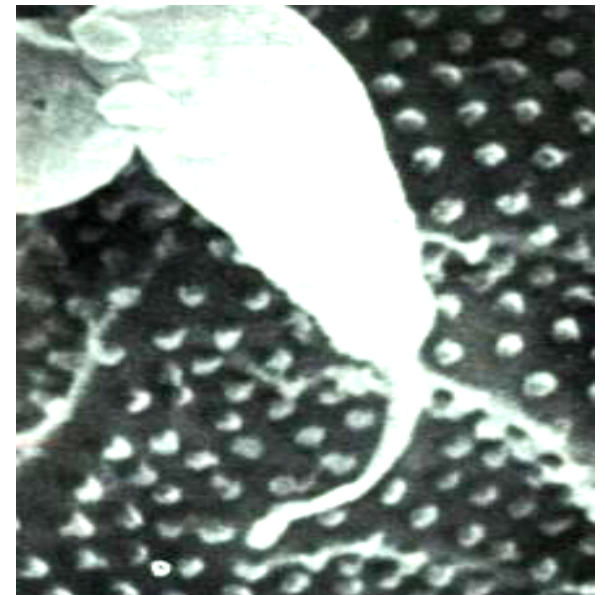
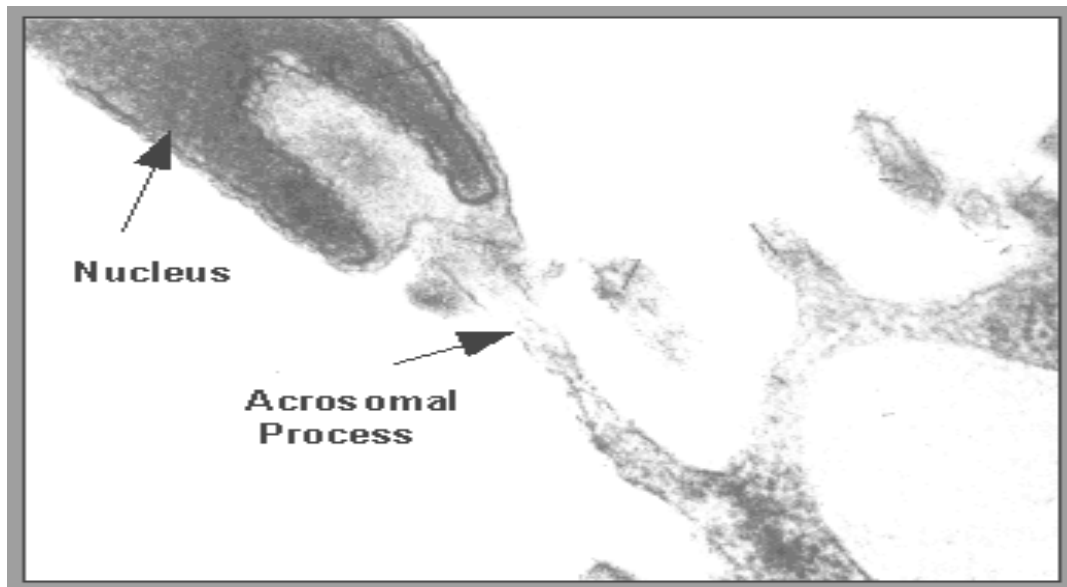
Legame dello spermatozoo all'involucro dell'uovo



Palline di polistirolo rivestite del possibile recettore della bindina a cui si lega lo spermatozoo

Fecondazione nel riccio di mare

Una volta avvenuto il legame specie-specifico comincia la fusione delle membrane dei gameti: la ligandina presenta un gruppo di aa idrofobici responsabili di causare la fusione di vescicole fosfolipidiche tra di loro. Generalmente l'intero spermatozoo entra nel citoplasma ovulare. La sua membrana plasmatica diventa parte della membrana plasmatica ovulare. Dopo che lo spermatozoo si fonde con l'uovo, un'estensione del citoplasma ovulare, il *cono di fecondazione*, avvolge la testa dello spermatozoo



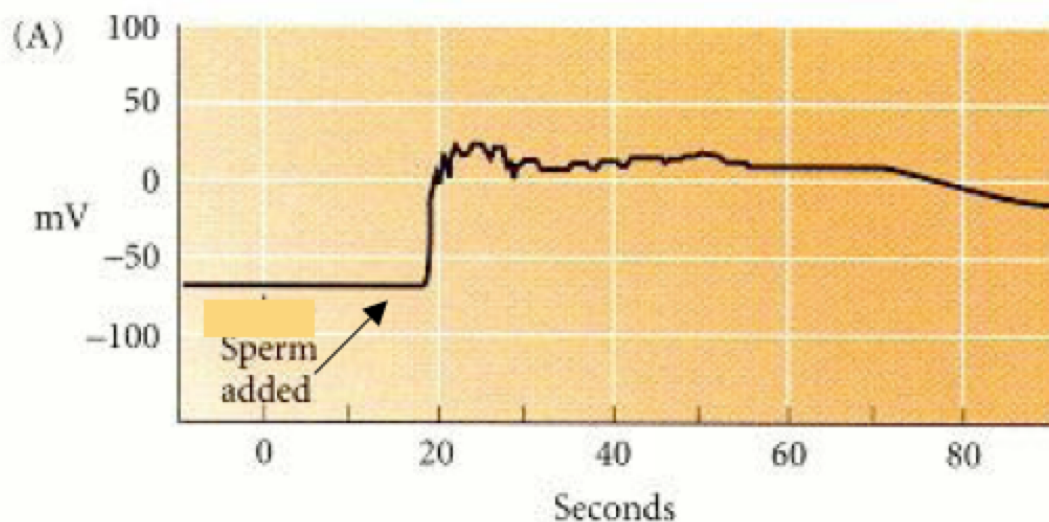
BLOCCO DELLA POLISPERMIA

Vi sono due meccanismi che bloccano la polispermia:

Il **blocco rapido**, dovuto ad un cambiamento del potenziale elettrico della membrana ovulare.

Il **blocco lento**, dovuto all'esocitosi dei granuli corticali e perciò detto *reazione corticale*

Blocco rapido della Polispermia



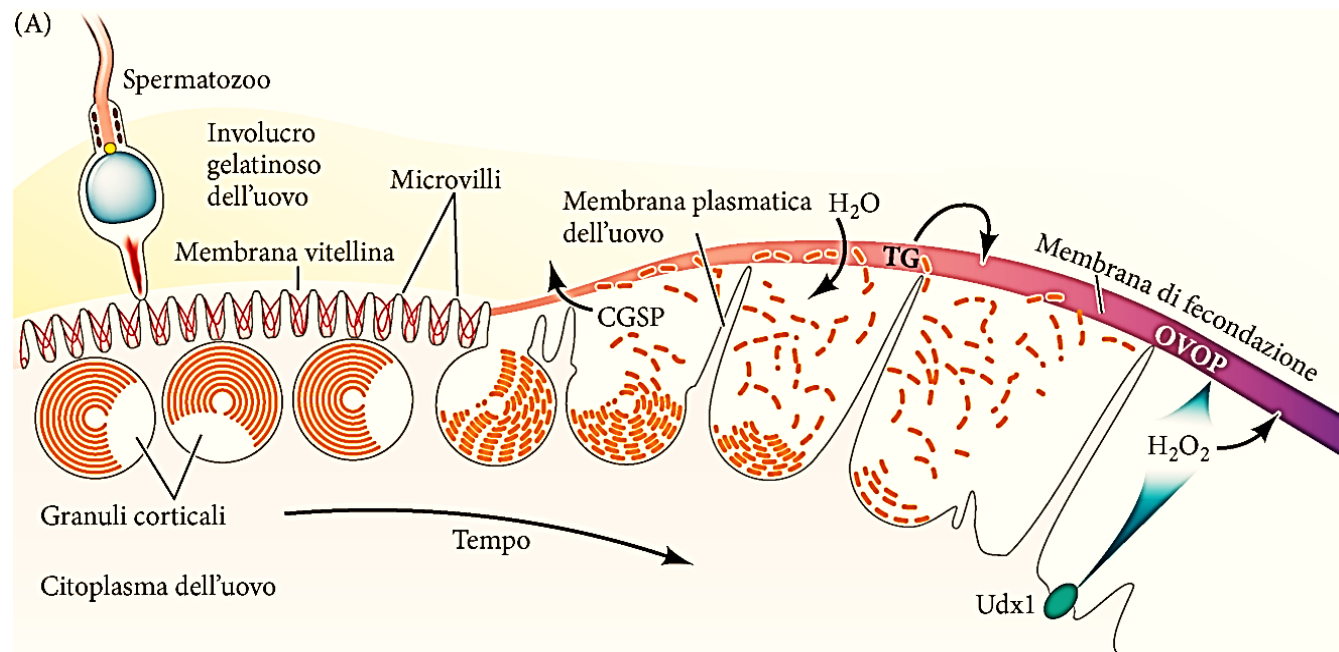
Na ⁺ (mM)	Percentage of polyspermic eggs
490	22
360	26
120	97
50	100

Entro pochi sec. dal 1° contatto dello spermatozoo con la superficie dell'uovo si ha depolarizzazione della membrana plasmatica ovulare per un piccolo afflusso di Na⁺. La membrana diventa positiva e nessuno spermatozoo si può più legare

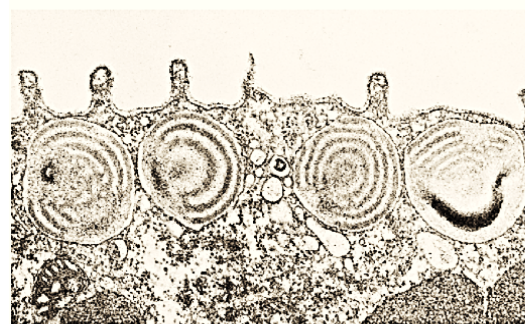
Blocco lento della Polispermia

Il Ca^{+2} rilasciato nel citoplasma ovulare provoca la fusione della membrane dei granuli corticali e di quella plasmatica col rilascio del contenuto dei granuli nello spazio compreso fra membrana vitellina e plasmatica, lo *spazio perivitellino*: qui *proteasi* degradano i recettori per la ligandina ed i pilastri che ancorano la membrana vitellina alla plasmatica. *Mucopolisaccaridi* per osmosi richiamano acqua nello spazio perivitellino e rigonfiandosi, **fanno sollevare la membrana vitellina che diviene membrana di fecondazione**. *Perossidasi* legano residui di tirosine di proteine della membrana di fecondazione indurendola. La *proteina ialina* infine forma un involucro intorno all'uovo.

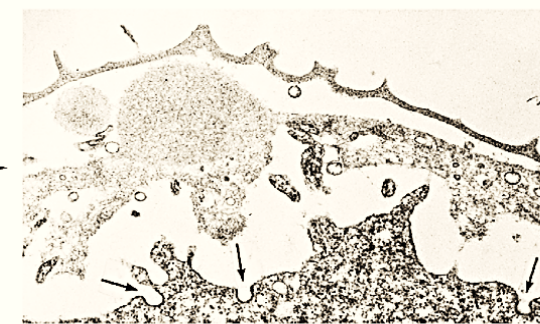
- | | |
|-----------------------|--|
| 1. Proteasi | a. Taglio delle proteine che connettono MV a MP
b. Taglio dei recettori della bindina |
| 2. Mucopolisaccaridi | Gradiente osmotico |
| 3. Enzima perossidasi | Rinforzo della MF mediante legame trasversale sui residui tirosinici |
| 4. Proteina ialina | Rivestimento interno dell'uovo |



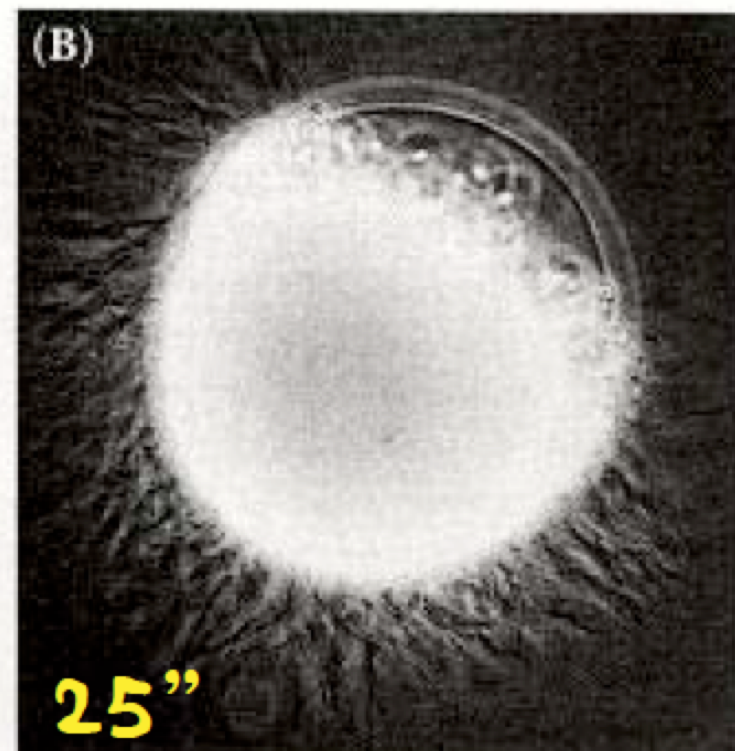
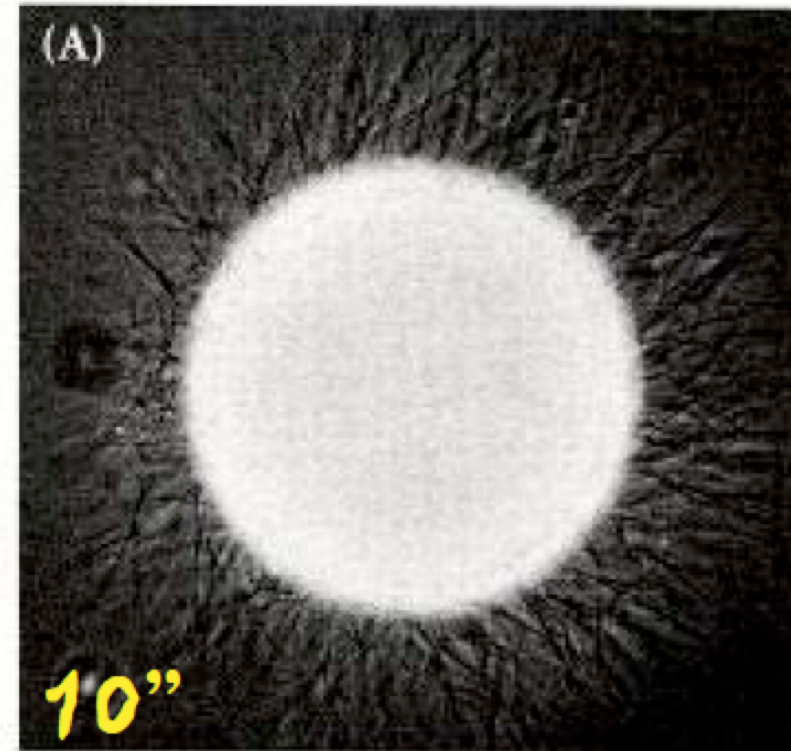
(B)



(C)

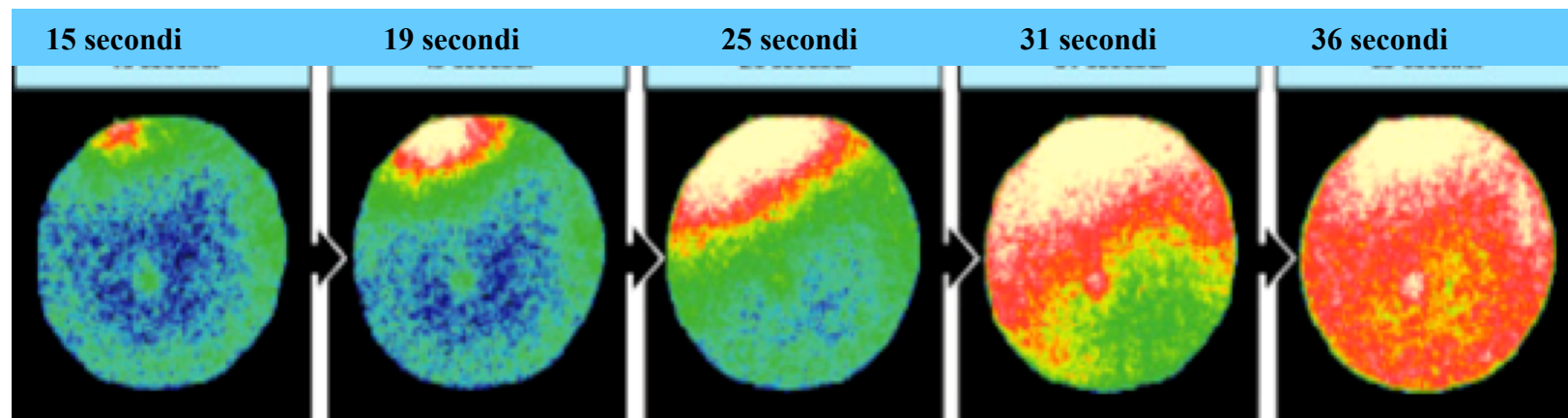


Formazione dell'involucro di fecondazione e rimozione dell'eccesso di sperma

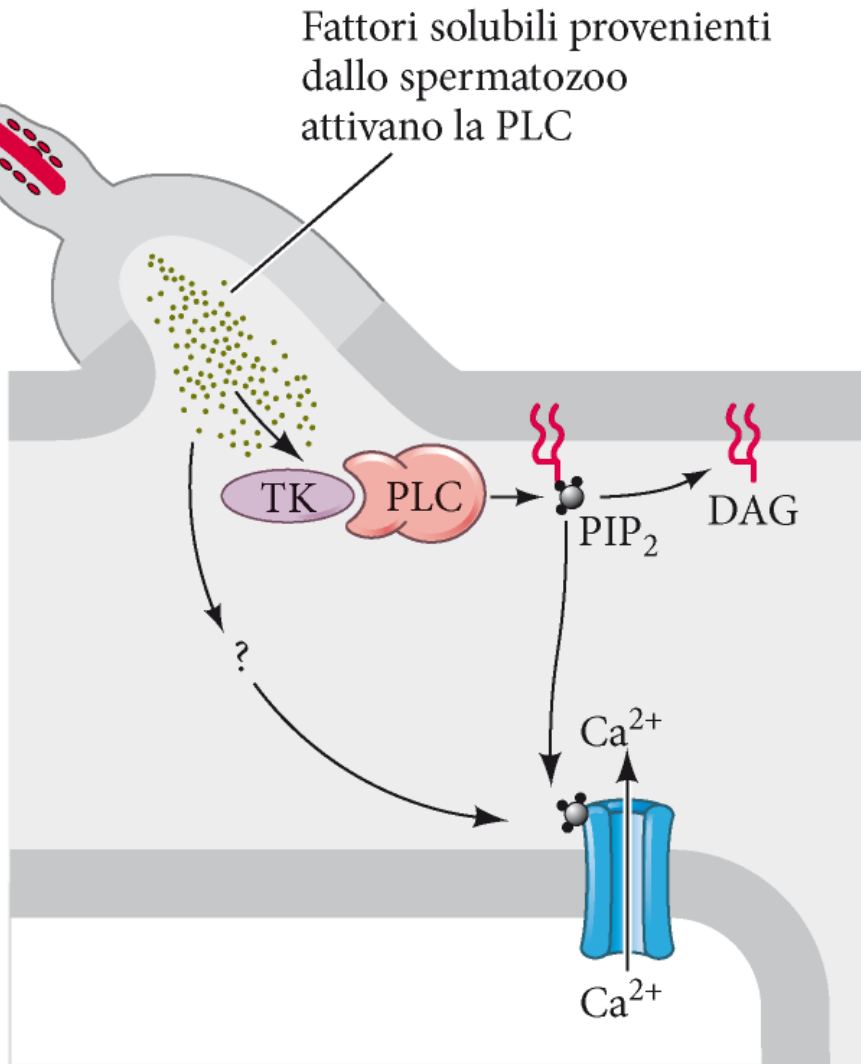


Sollevamento della membrana di fecondazione

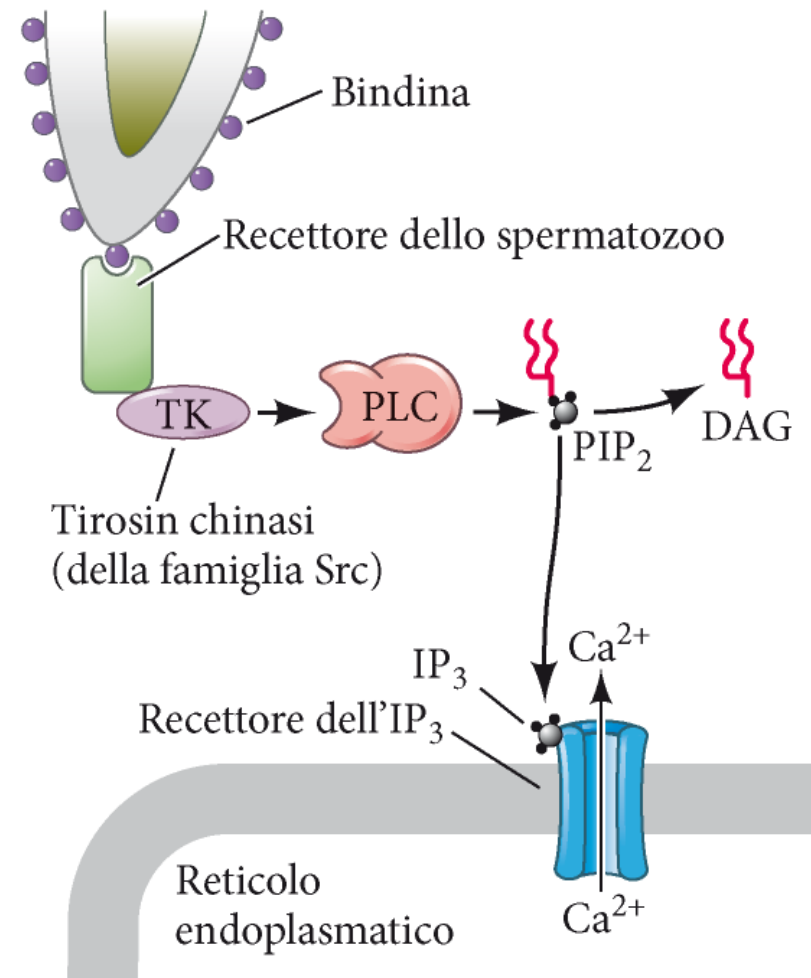
Il calcio libero nel citoplasma scatena l'esocitosi dei granuli corticali, che a loro volta contengono Ca^{+2} , innescando una reazione a cascata. Con l'equorina, un colorante fluorescente estratto dalle meduse, si può seguire l'onda del calcio che attraversa l'ovocita

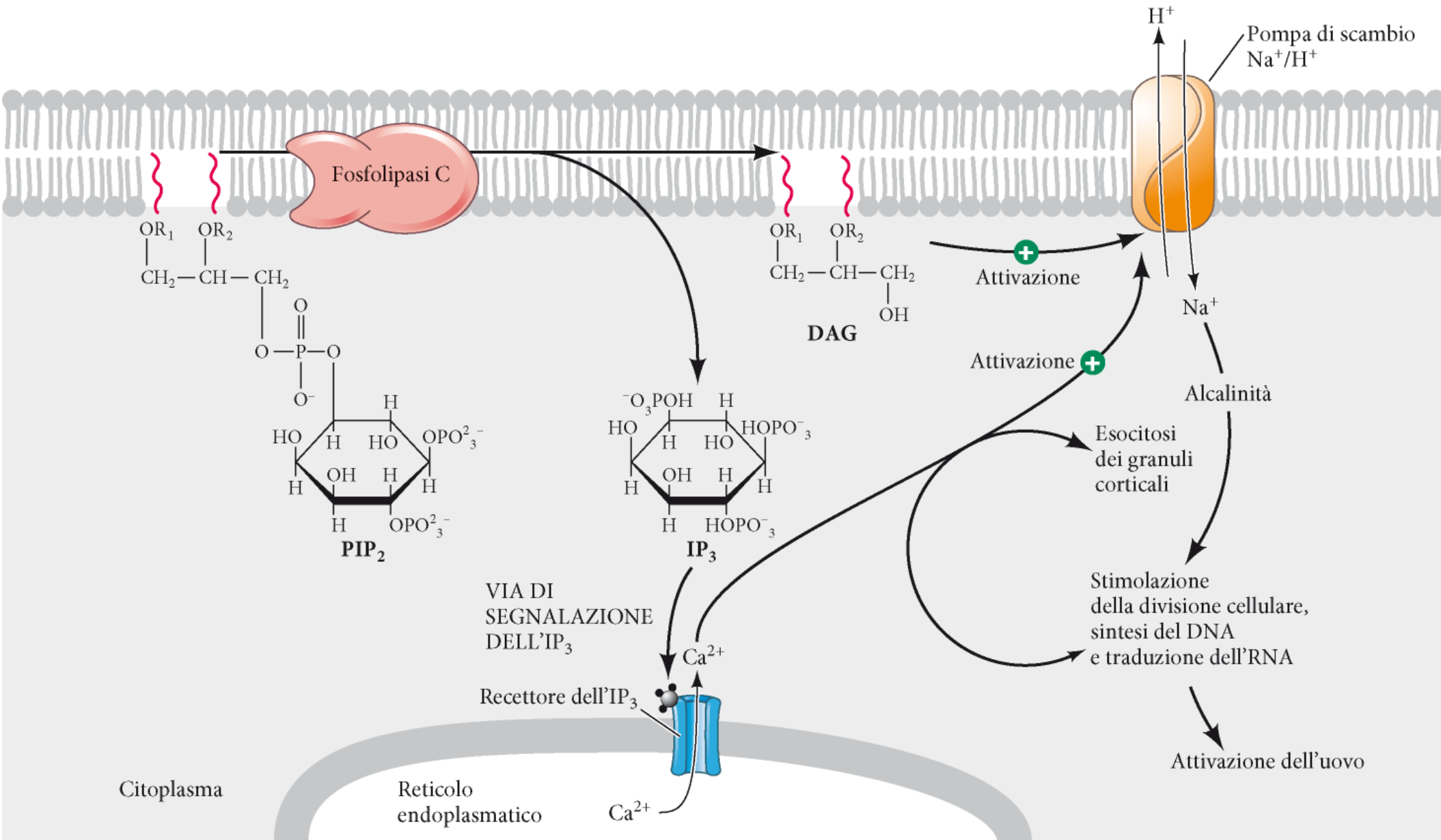


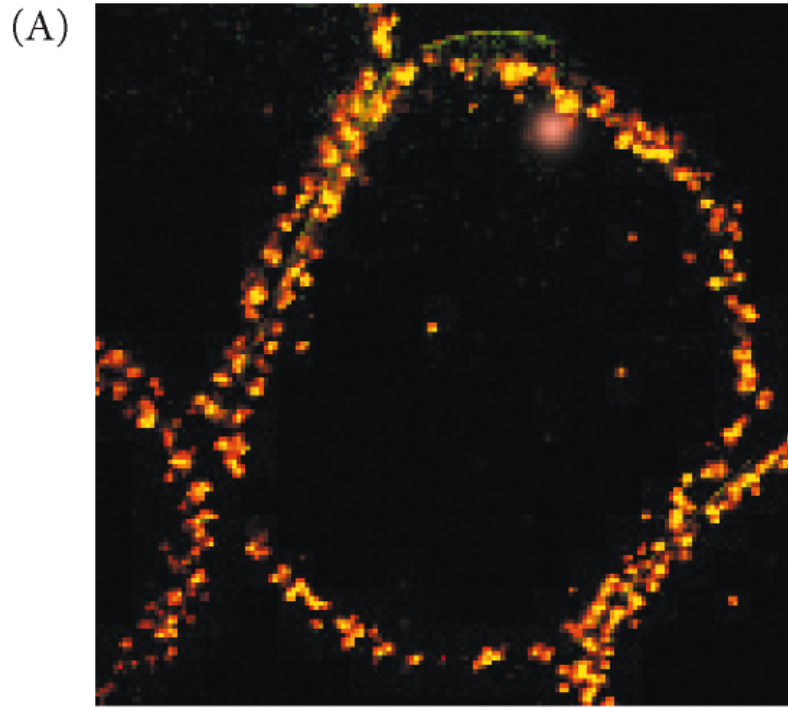
(A) ATTIVAZIONE DELL'UOVO DOPO LA FUSIONE DELLE MEMBRANE DEI GAMETI



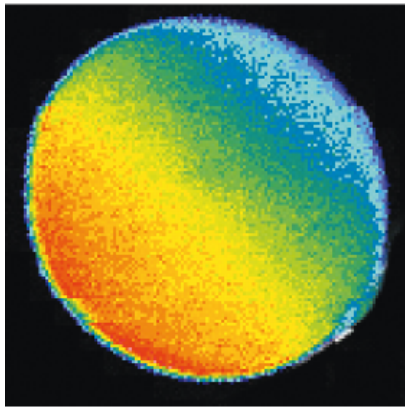
(B) ATTIVAZIONE DELL'UOVO PRIMA DELLA FUSIONE DEI GAMETI



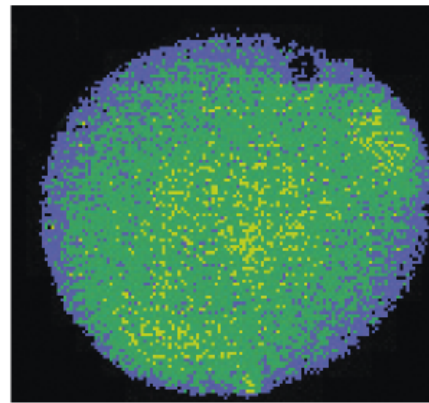




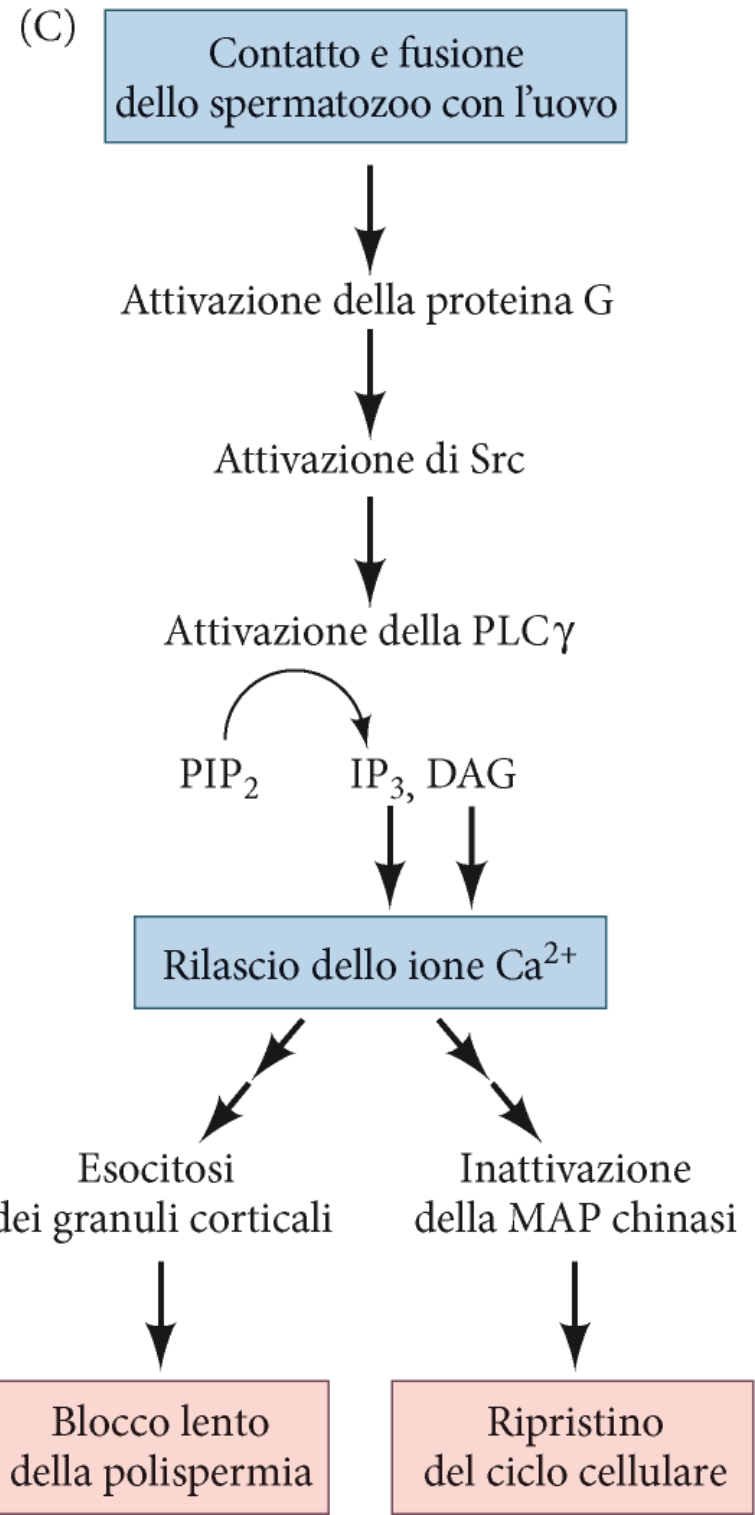
(B)



Controllo



Aggiunta dell'inibitore
di $G\alpha_q$



ATTIVAZIONE DEL METABOLISMO DELL'UOVO

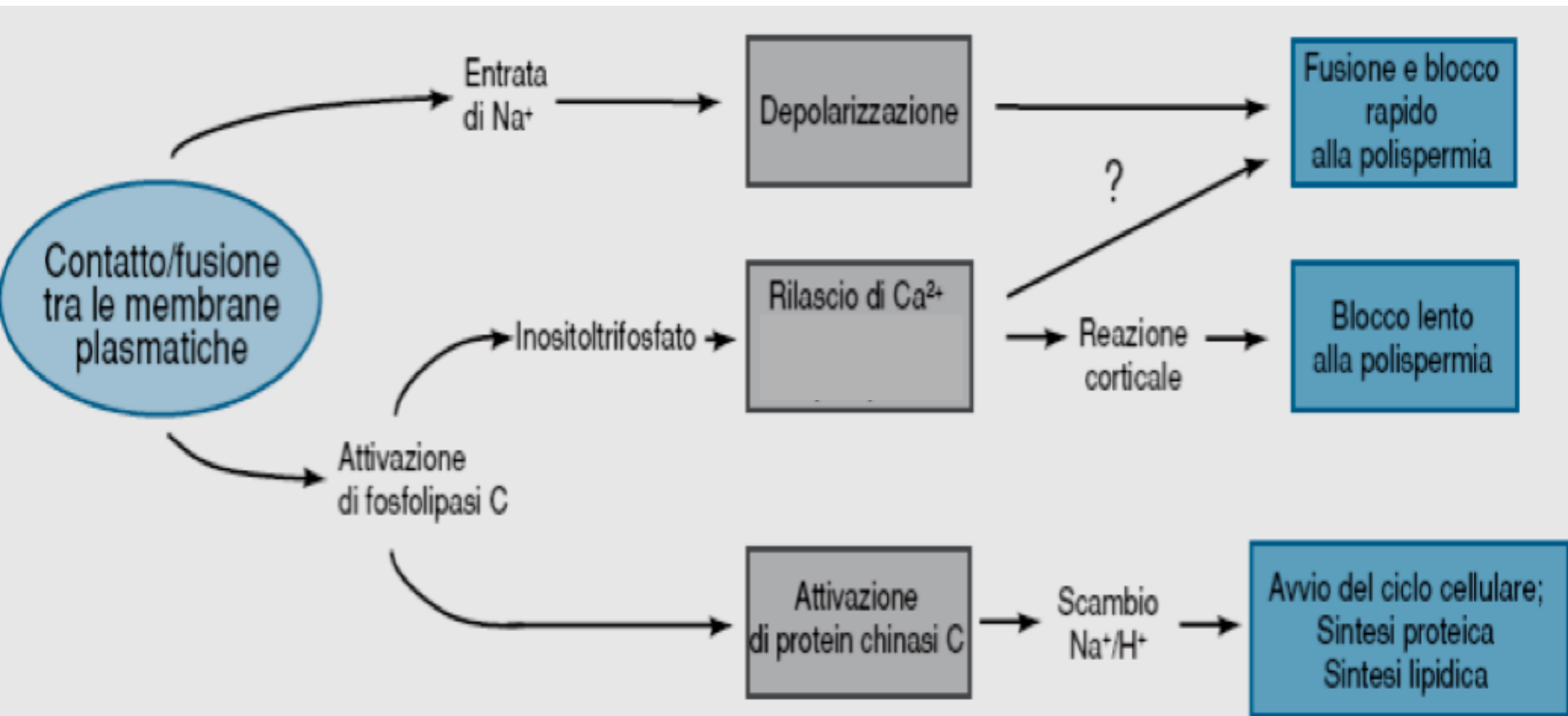
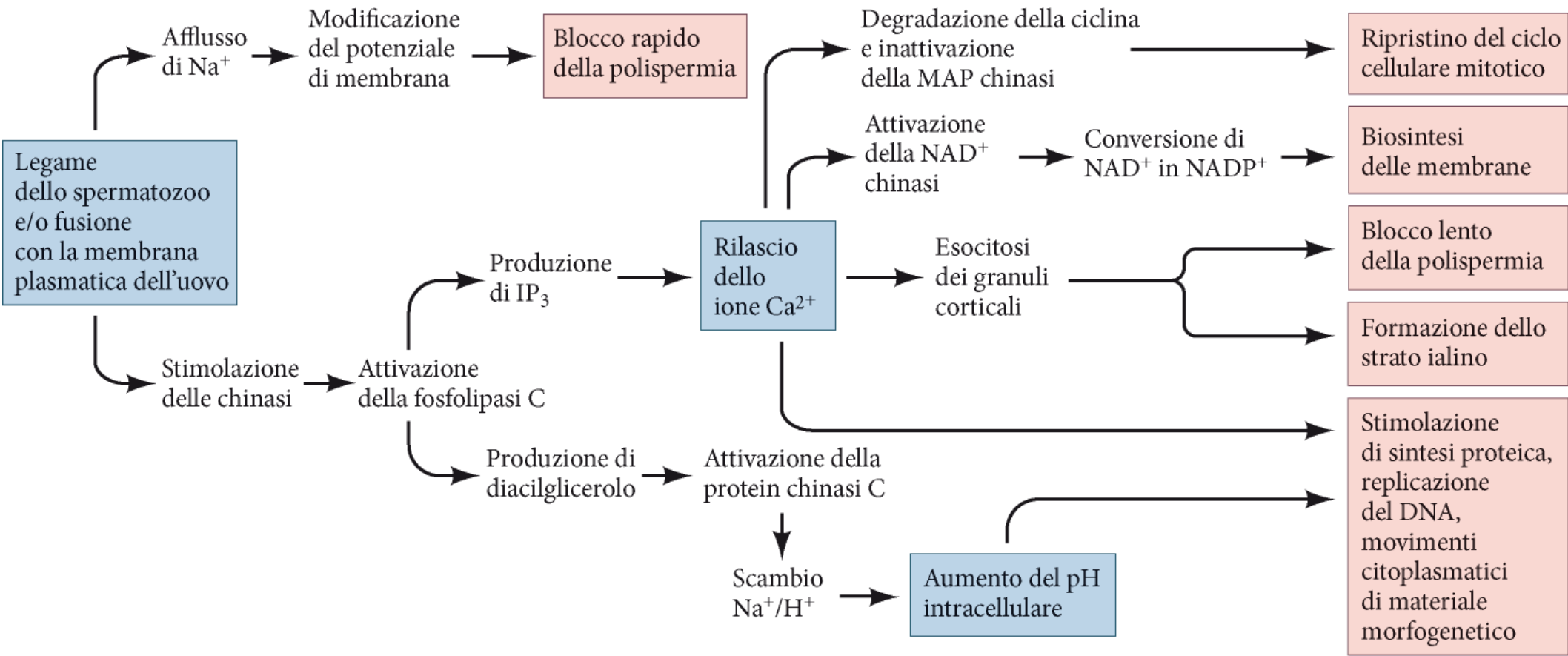
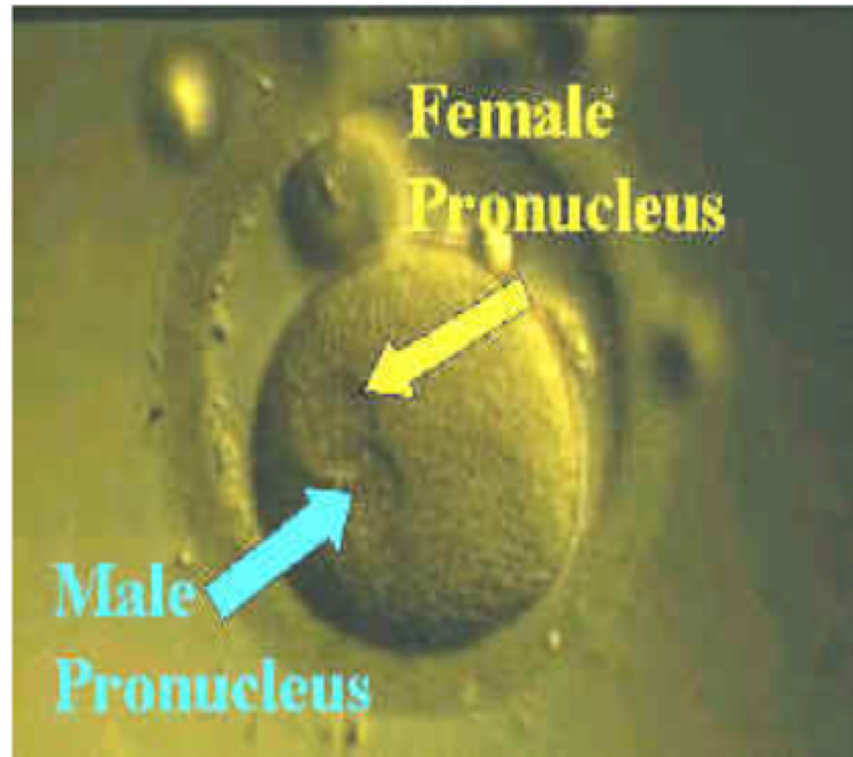
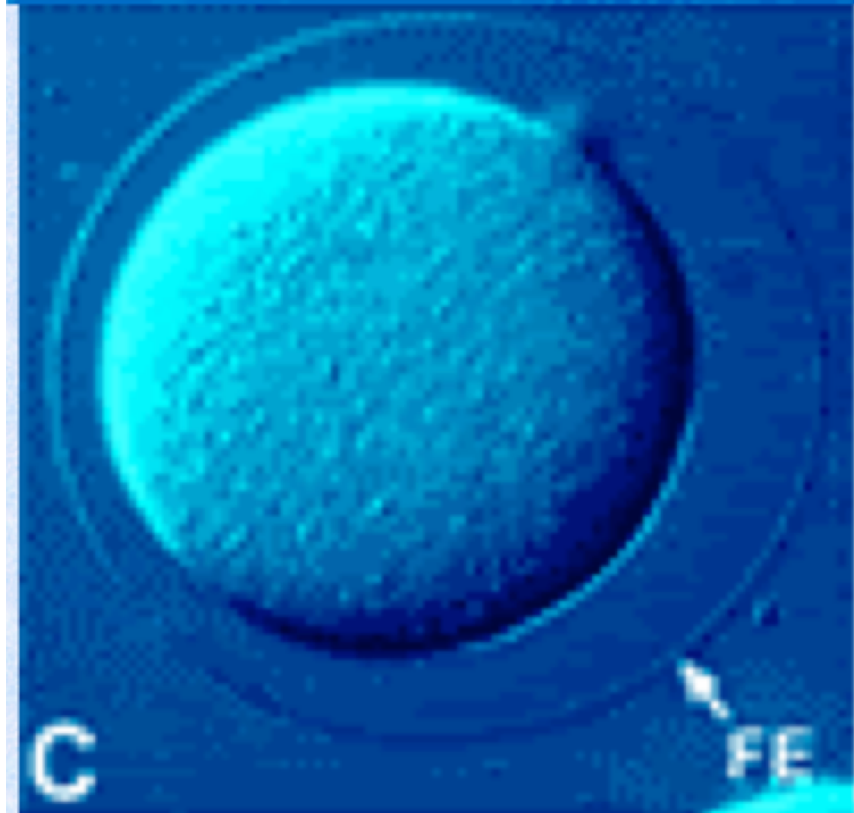
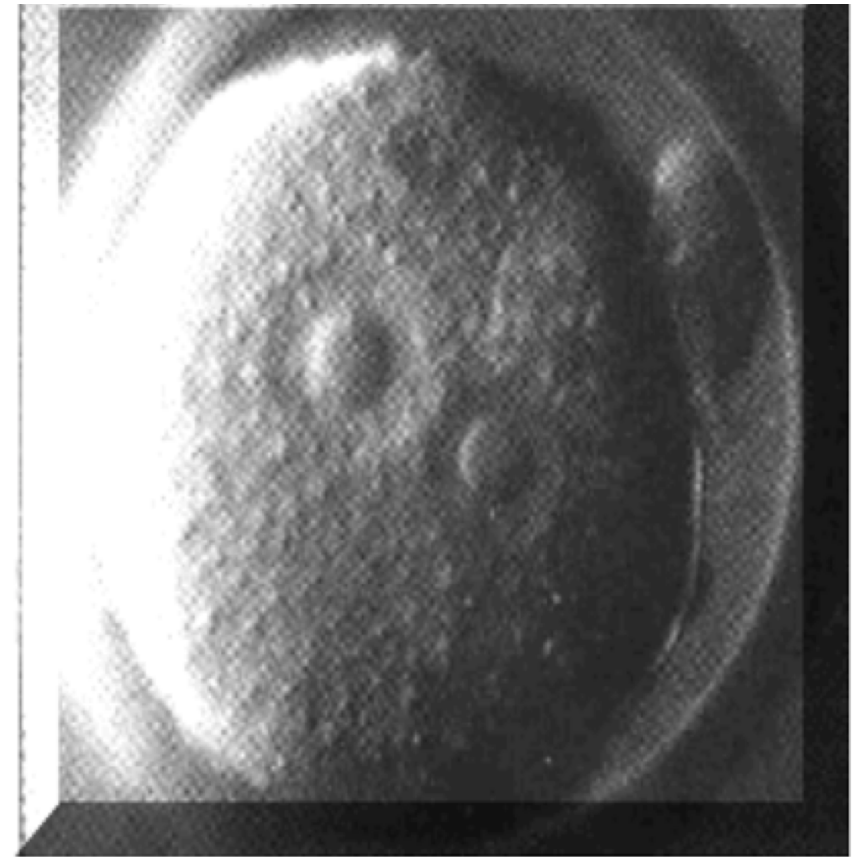
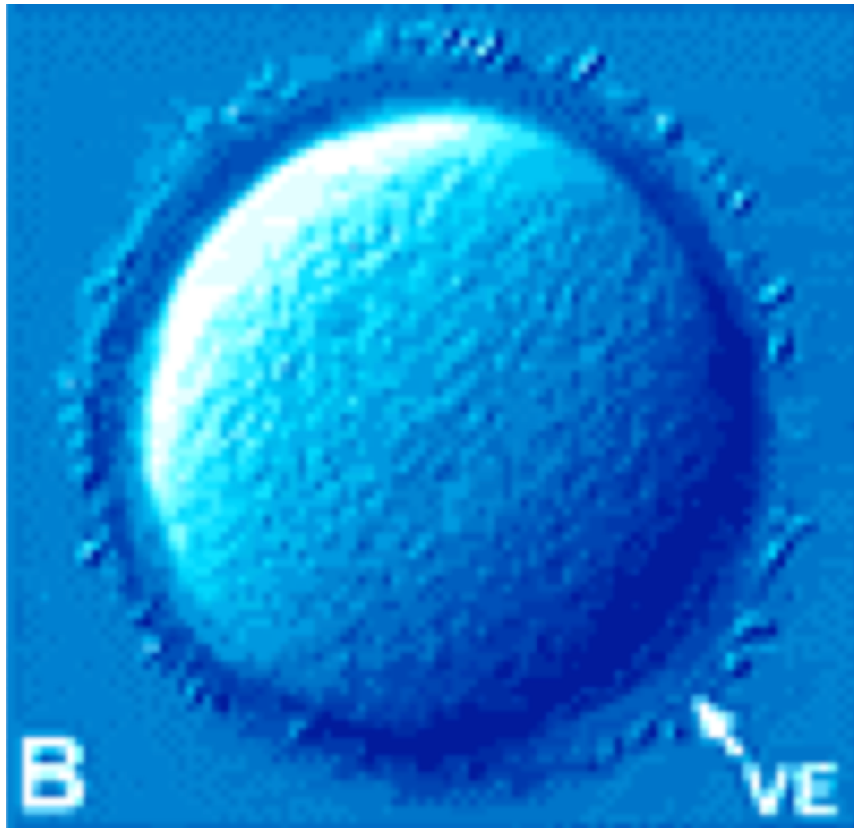


Fig. 4.14 Temporizzazione schematica degli eventi chiave nell'attivazione dell'uovo di riccio di mare (vedi anche Tabella 4.1)

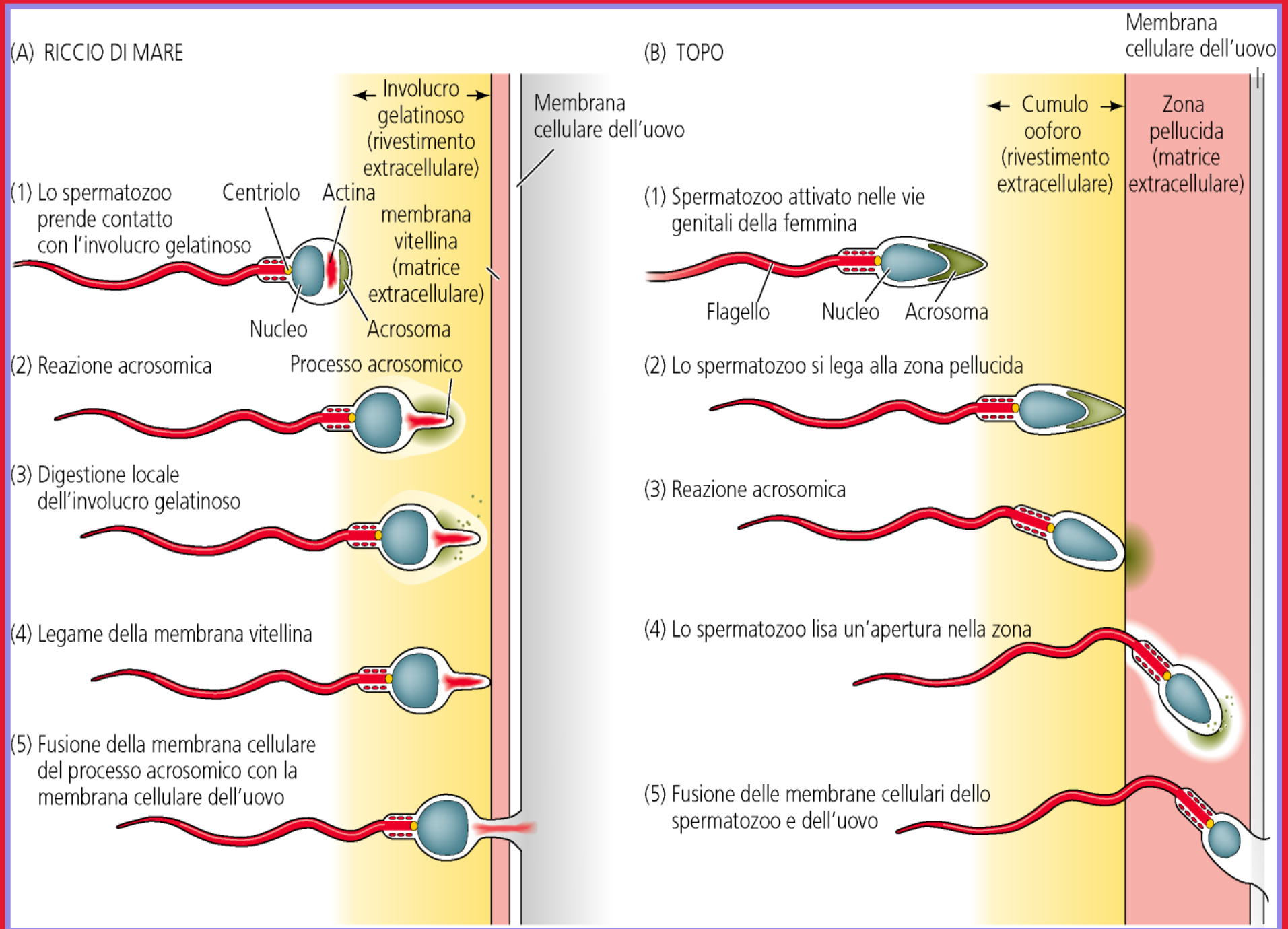
Sintesi di acidi nucleici e proteine a partire dall'mRNA materno



Globulo polare, membrana di fecondazione e pronuclei in riccio di mare



La fecondazione di riccio di mare e di mammifero



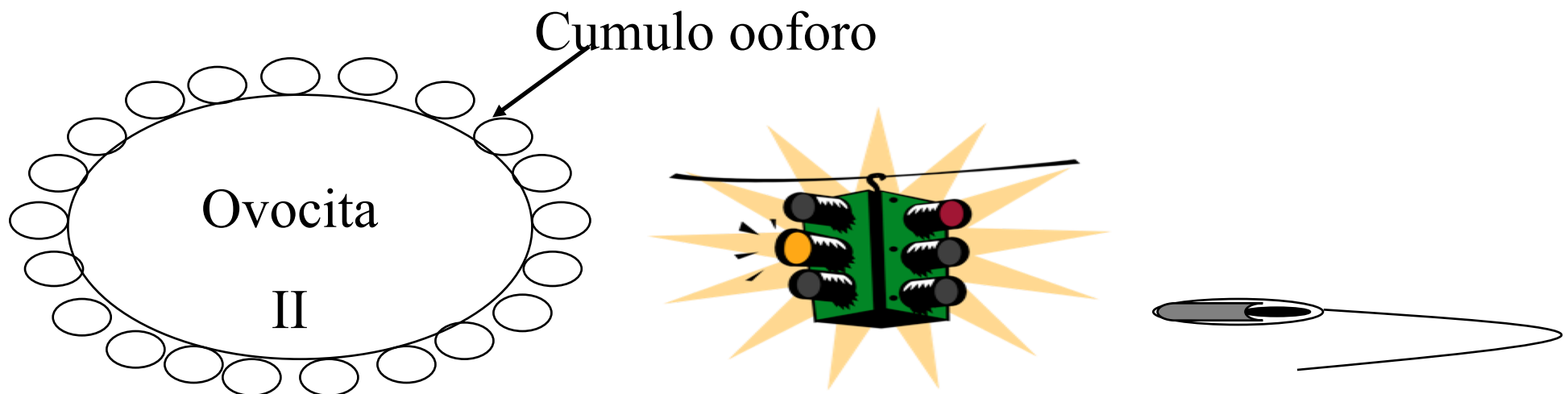
Fecondazione Mammiferi

Fecondazione interna

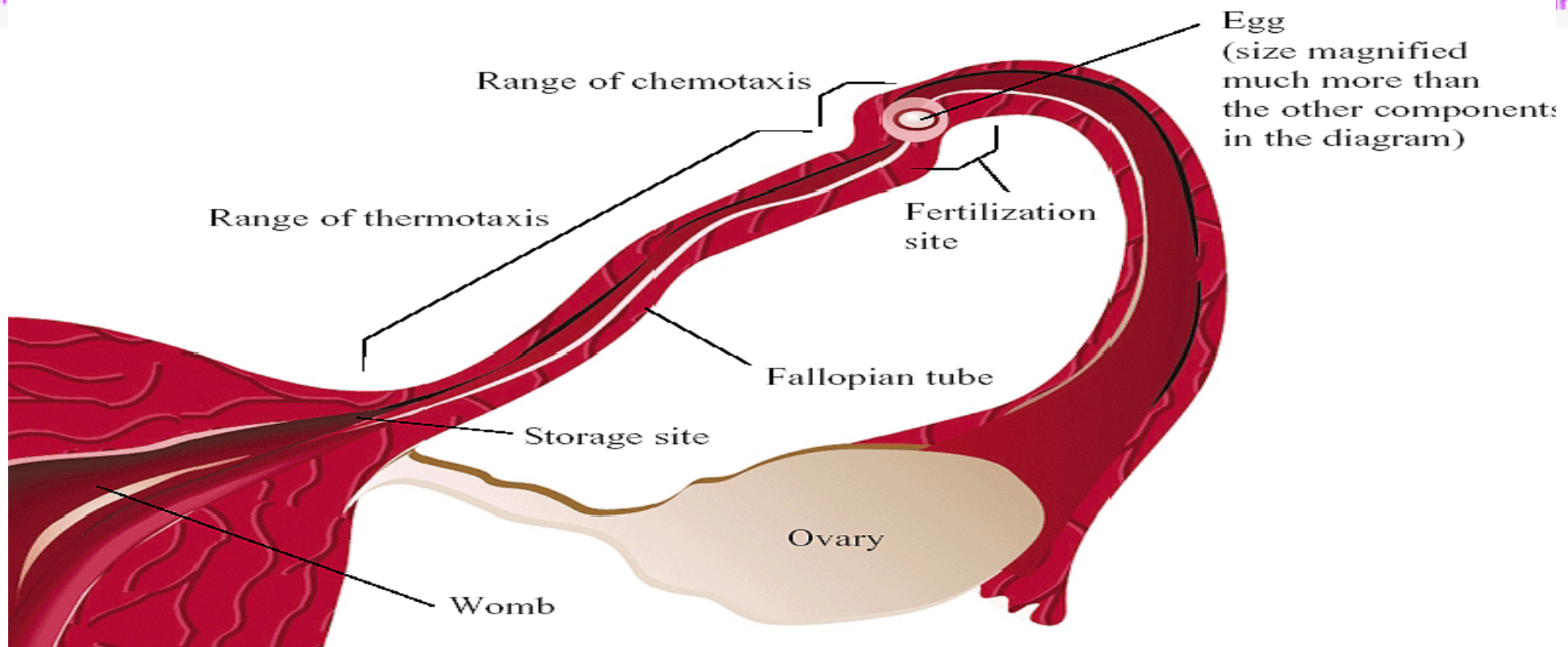
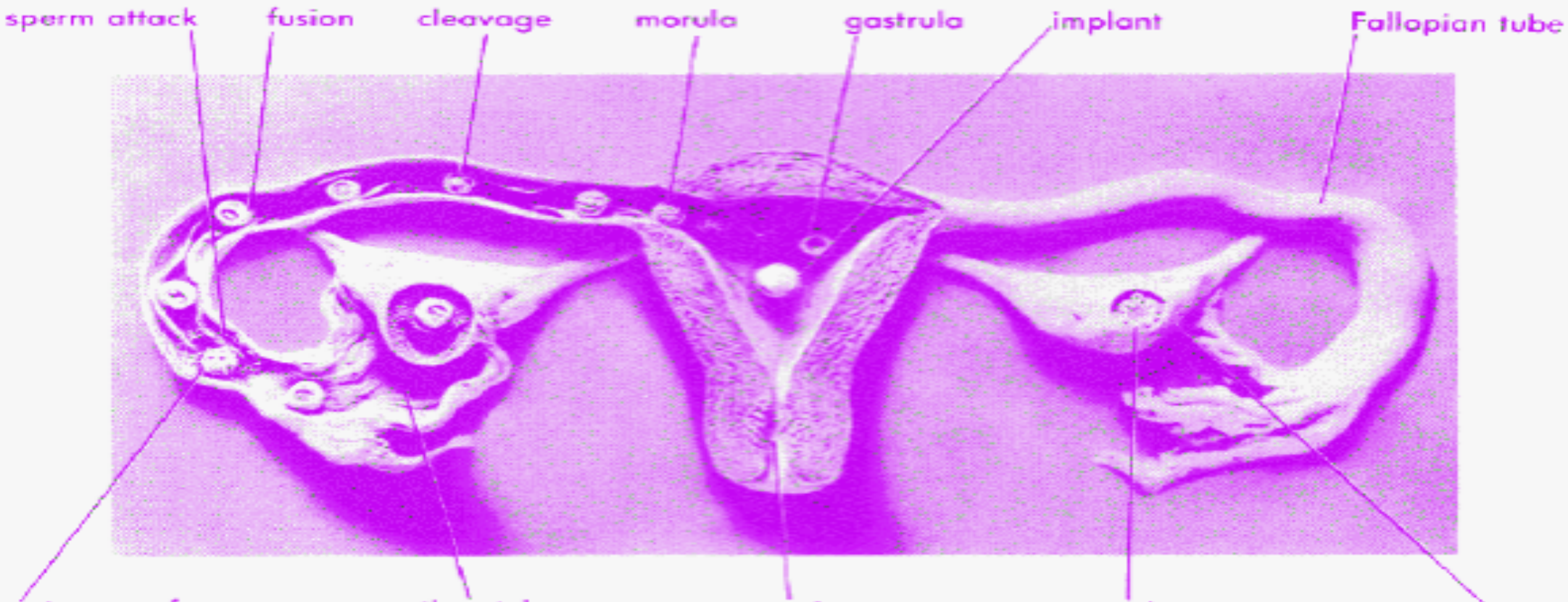
Di norma un campione di seme umano contiene da 200 a 400×10^6 spermatozoi in un volume di 2-4ml. Se gli spermatozoi sono meno di 20 milioni/ml o se gli sp. anomali sono superiori al 25%, l'individuo è in genere sterile.

Gli spermatozoi, usciti dal testicolo, sono incapaci di movimento. Acquistano tale capacità nell'epididimo.

Per poter fecondare l'uovo gli spermatozoi devono essere capacitati, qualità che acquistano nelle vie genitali femminili.

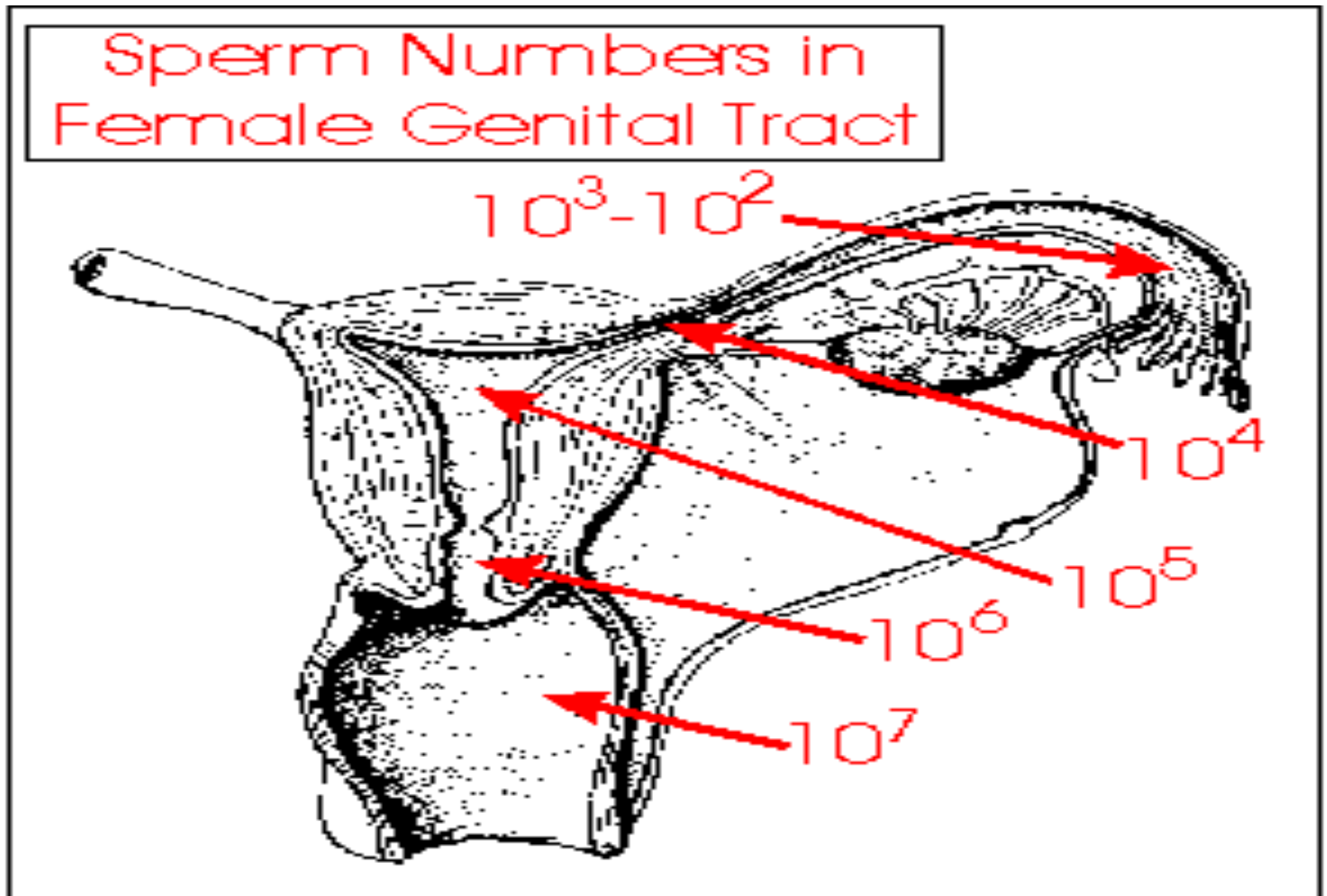


Vie genitali femminili e fecondazione

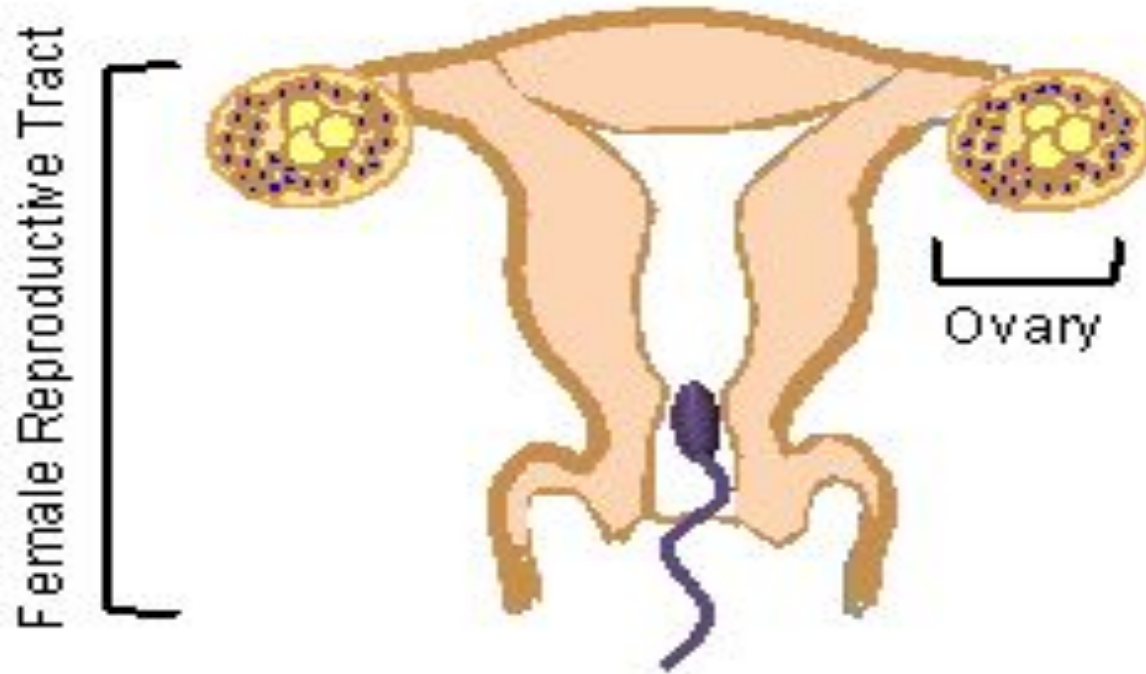


Il numero di spermatozoi che arrivano all'ampolla si riduce progressivamente

Prima dell'ovulazione il pH del collo uterino è alcalino, il che permette la sopravvivenza degli spermatozoi. Il muco cervicale nel periodo in cui l'ovocita è fecondabile facilita il passaggio degli spermatozoi



Spermatozoi e vie genitali femminili



Spermatozoi nelle vie genitali femminili

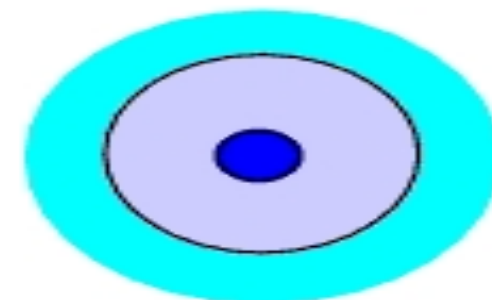
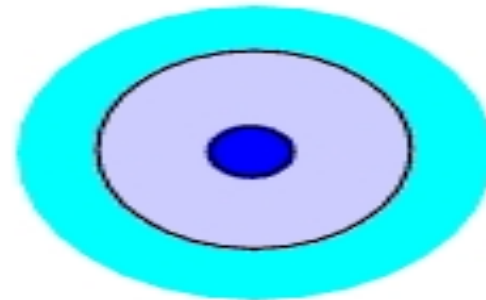
- Perdita di fattori decapacitanti
- Formazione di zattere lipidiche
- Attivazione della via di segnalazione di PKA
- Iperattivazione della motilità spermatica
- Acquisizione della capacità di legarsi a ZP

Gli spermatozoi per essere in grado di fecondare devono essere capacitati

Capacitation of Human Sperm

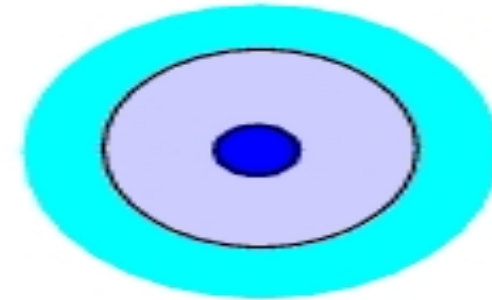
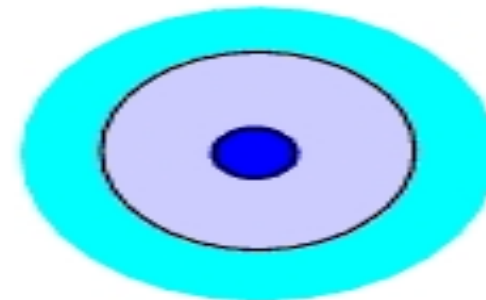
Experiment #1

Sperm from testes



Experiment #2

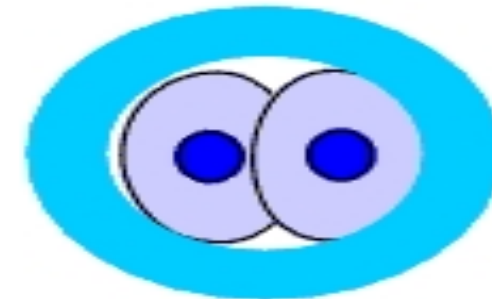
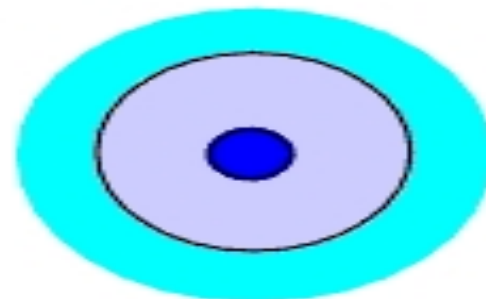
Ejaculated sperm



Experiment #3

"Treated" ejaculated sperm

Mix with uterine washings

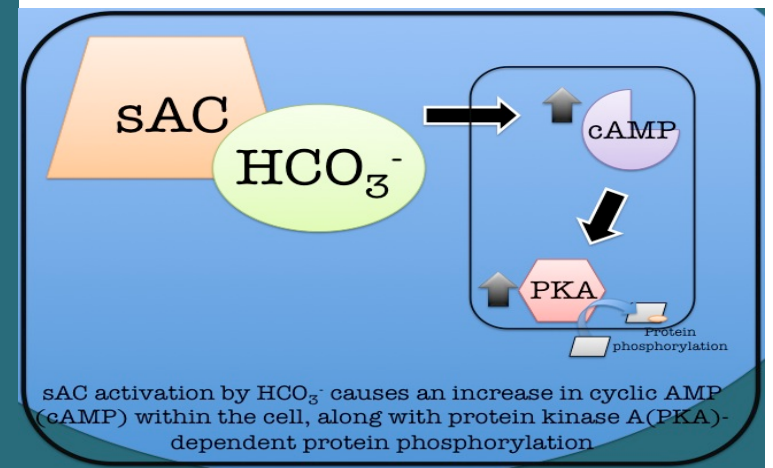
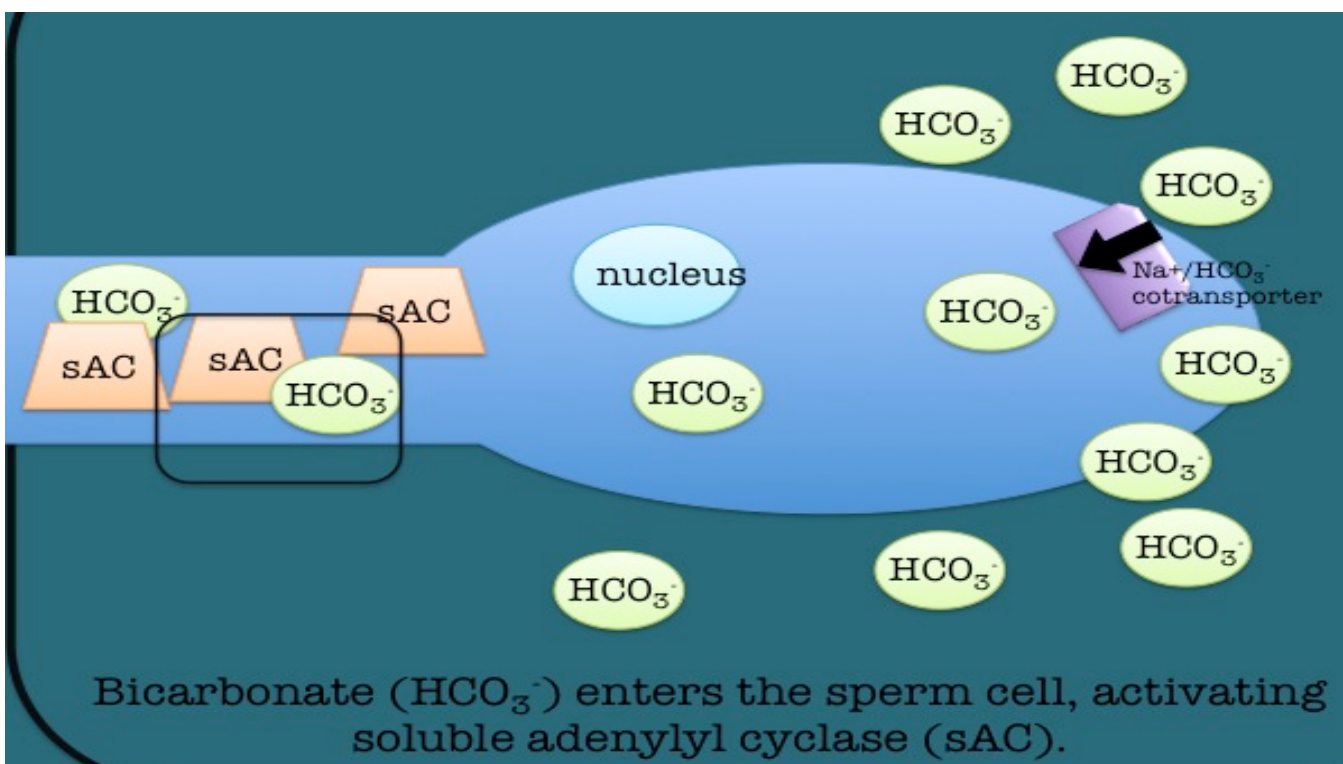
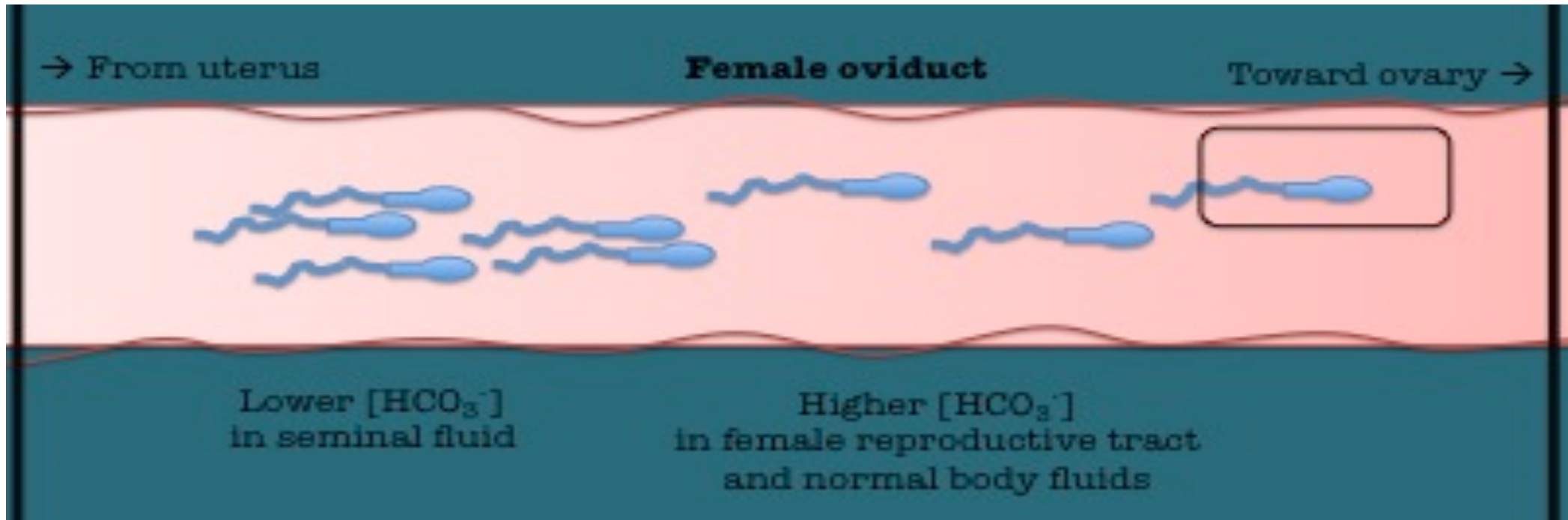


Gli spermatozoi per essere in grado di fecondare devono essere capacitati

La capacitazione avviene durante il transito nelle vie genitali femminili, ambiente in cui è presente progesterone che agisce rendendo la membrana dello spermatozoo instabile. A questo scopo agisce anche l'albumina, che sottrae colesterolo alla membrana plasmatica dello spermatozoo, spostando così le zattere lipidiche che contengono recettori. Le vie genitali femminili secernono ioni bicarbonato che attivano la ciclasi adenilica solubile nello spermatozoo, importante per la fusione delle membrane acrosomiale e plasmatica dell'oocita per provocare la reazione acrosomiale

Uno spermatozoo può impiegare da 1/2h a 6 giorni per arrivare nell'ampolla

Capacitazione



**Fosforilazione di
proteine e**
↓
CAPACITAZIONE

Capacitazione e legame alla zona pellucida

Epididymal

Ejaculated

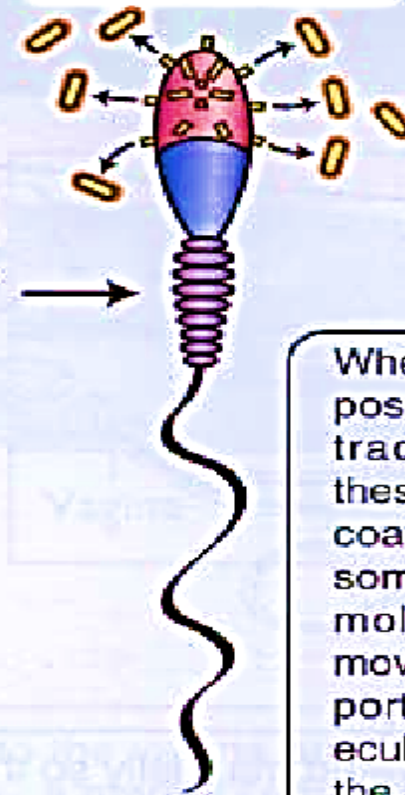
Capacitated



+ Seminal plasma



+ Female tract

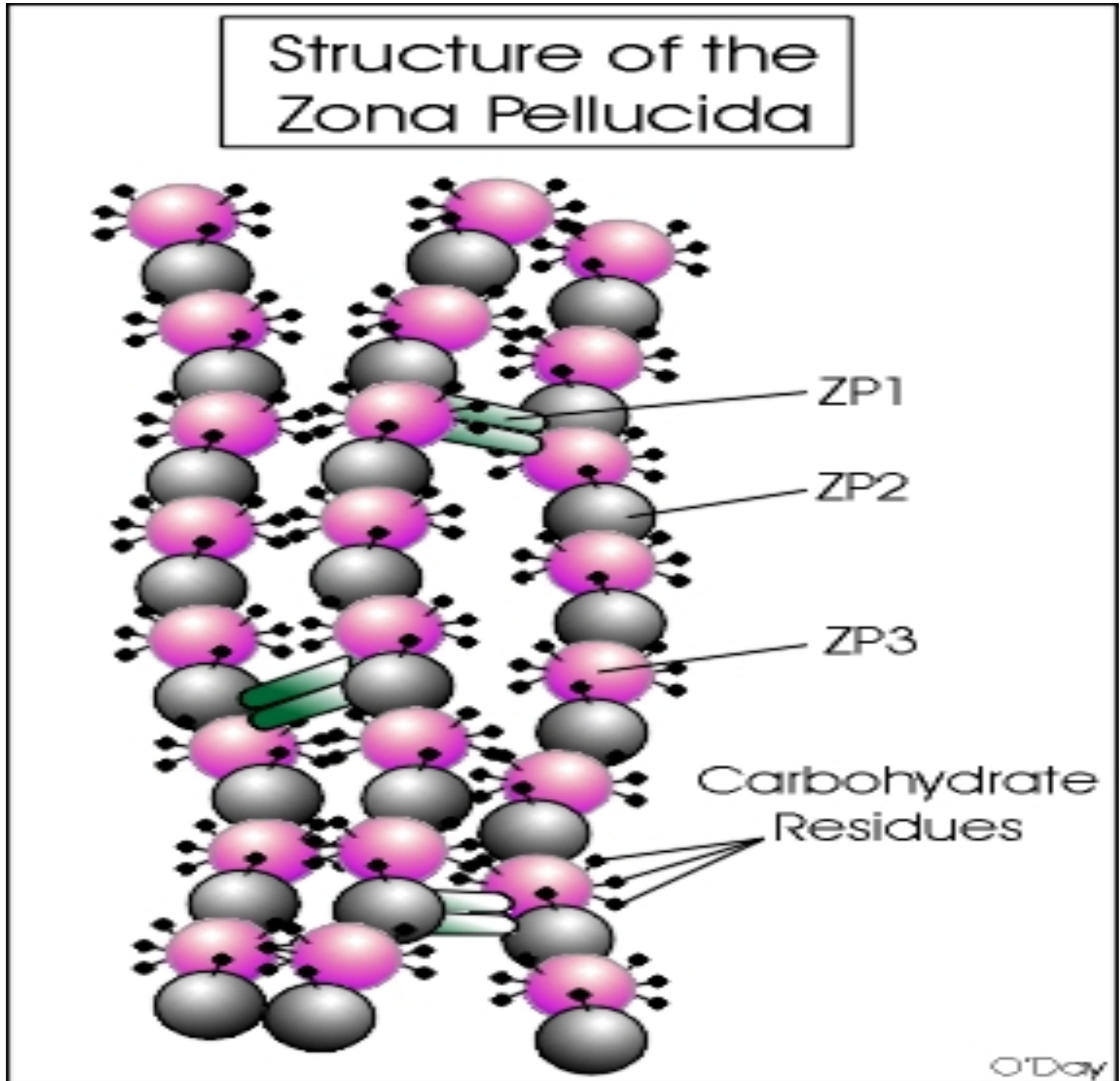


The plasma membrane of epididymal spermatozoa contains a complement of surface molecules (proteins and carbohydrates) illustrated here as yellow T's.

The surface molecules in epididymal sperm become coated with seminal plasma proteins (orange halos) that mask portions of the membrane molecules.

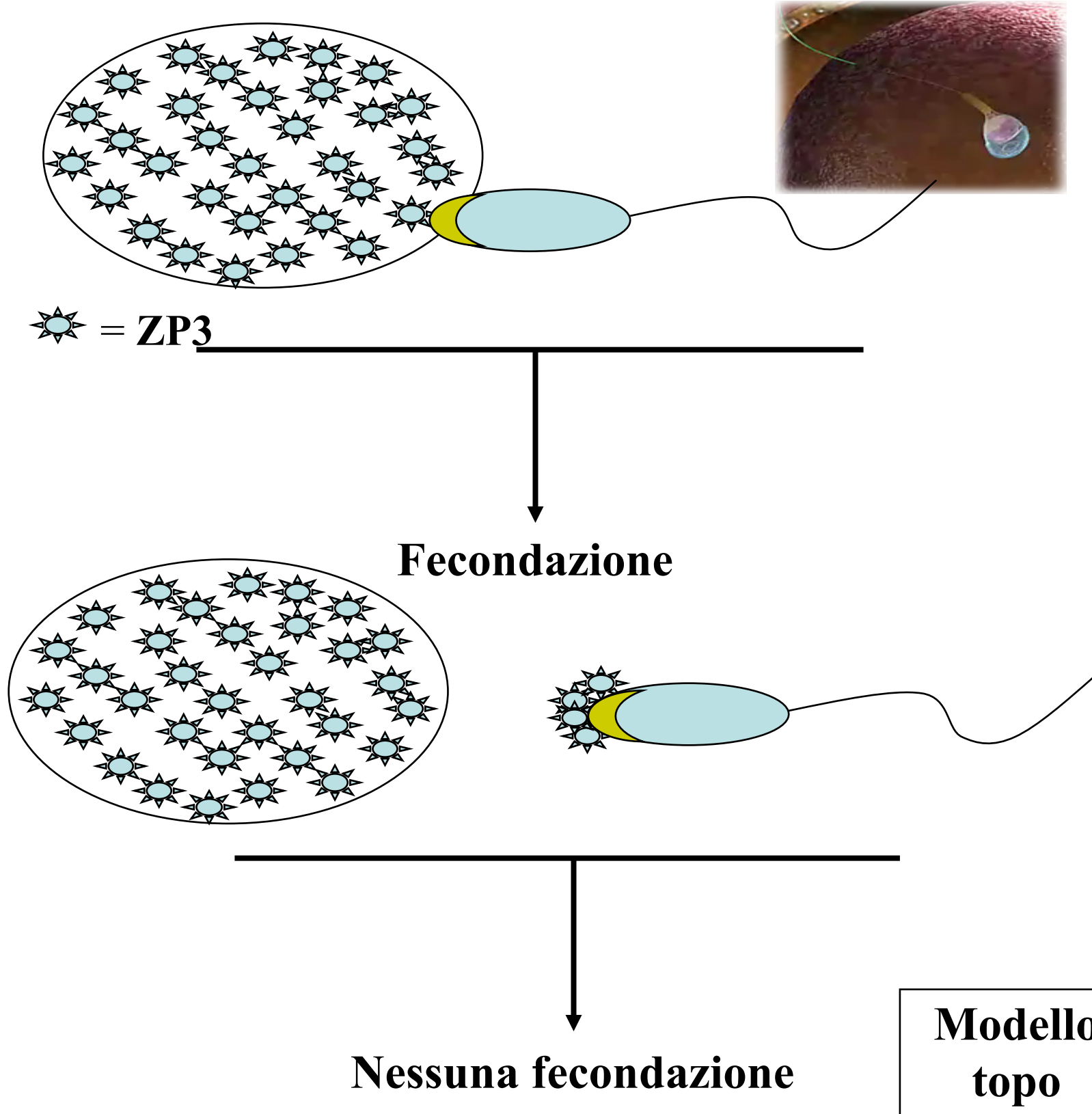
When sperm are exposed to the female tract environment, these seminal plasma coatings, along with some of the surface molecules, are removed, thus exposing portions of the molecules that can bind to the zona pellucida of the oocyte.

Un involucro glicoproteico circonda l'uovo: la zona pellucida



La zona pellucida

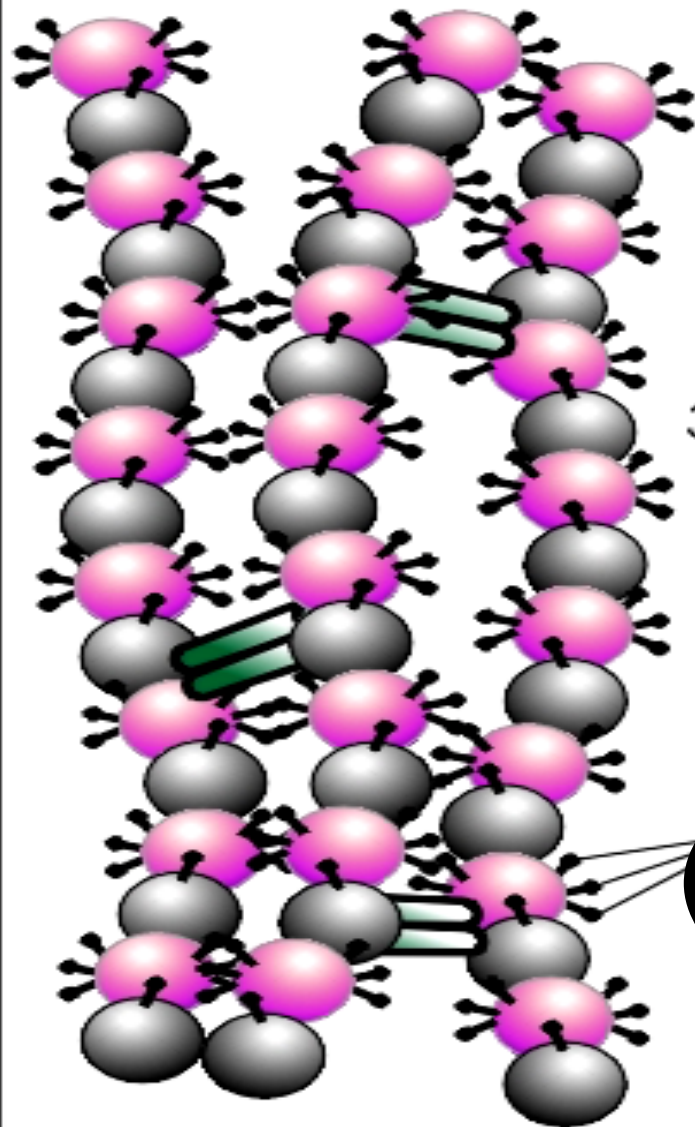
Solo ZP3 (non ZP1 e Zp2) è in grado di legare gli spermatozoi



La ZP3 è il recettore ovulare dello spermatozoo ed è responsabile del *legame primario* dello spermatozoo all'ovocita

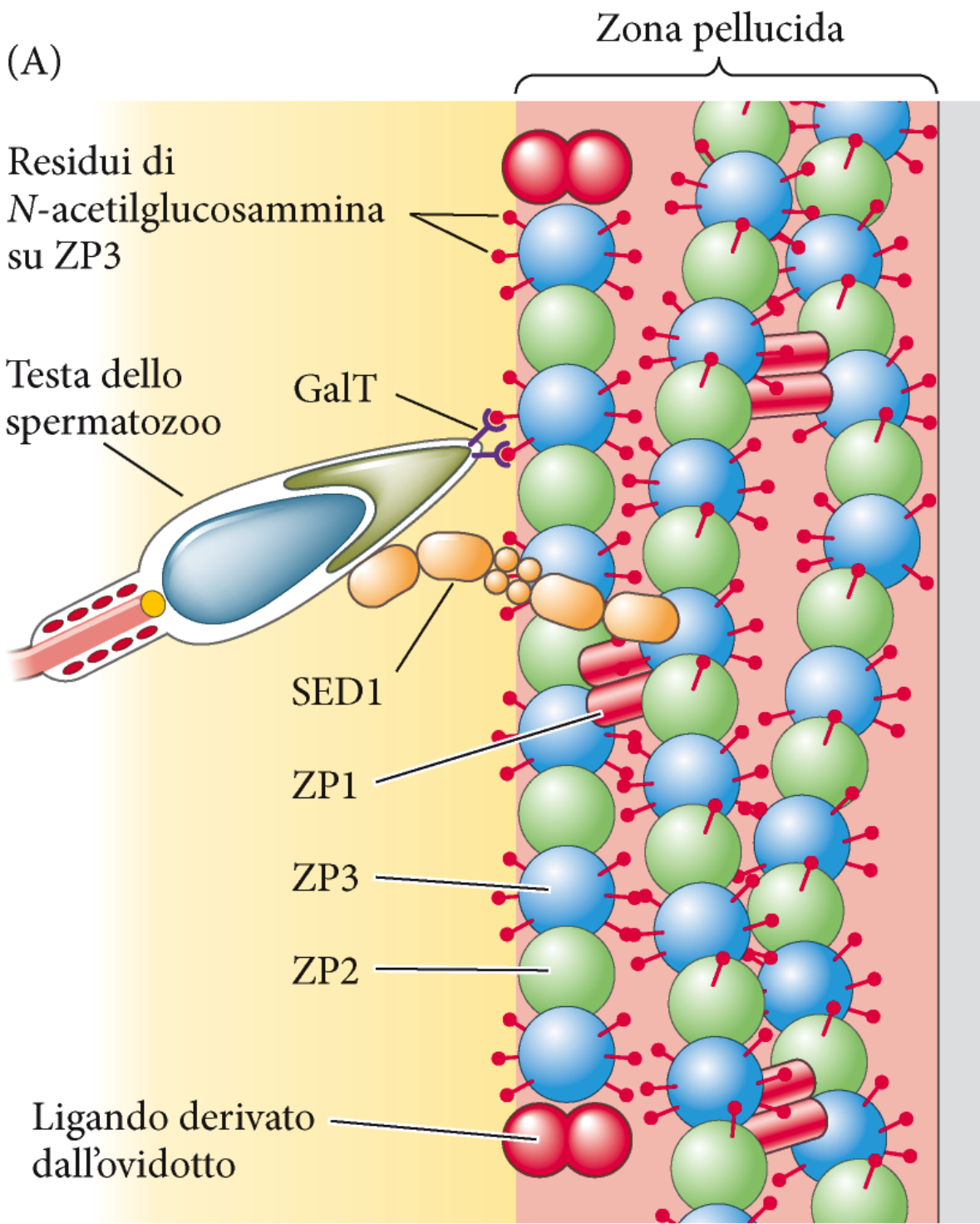
La ZP2 lega lo spermatozoo dopo la reazione acrosomiale e si forma così il *legame secondario*

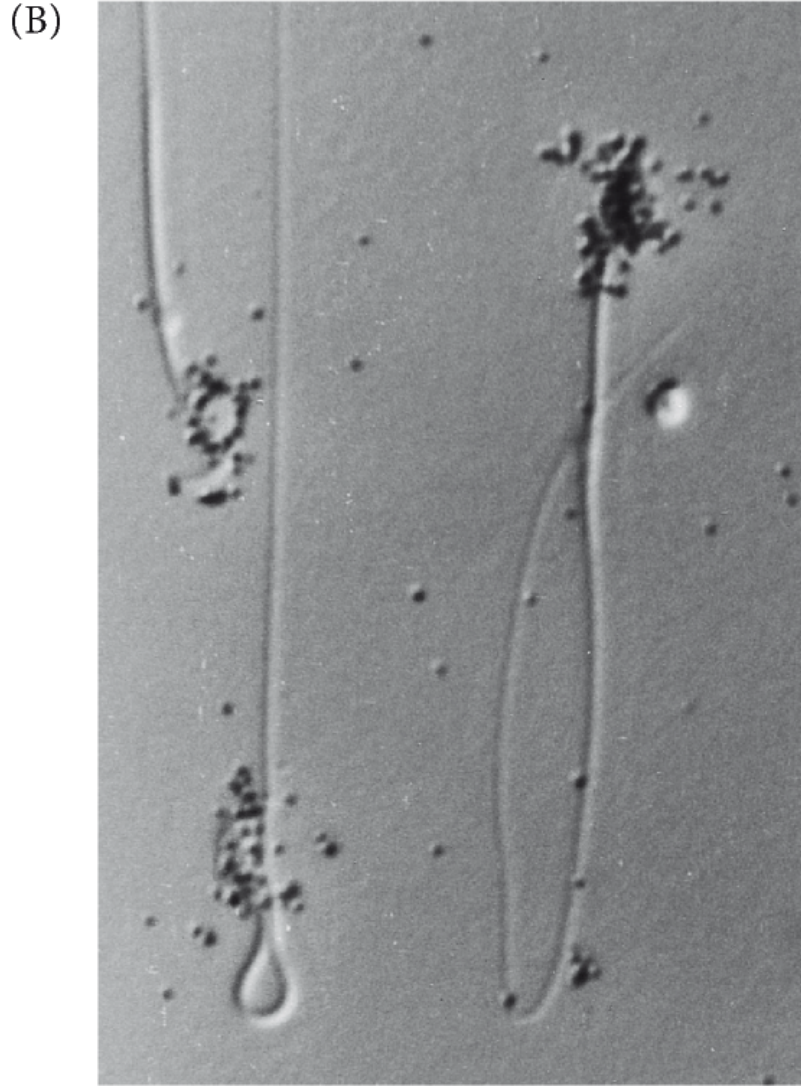
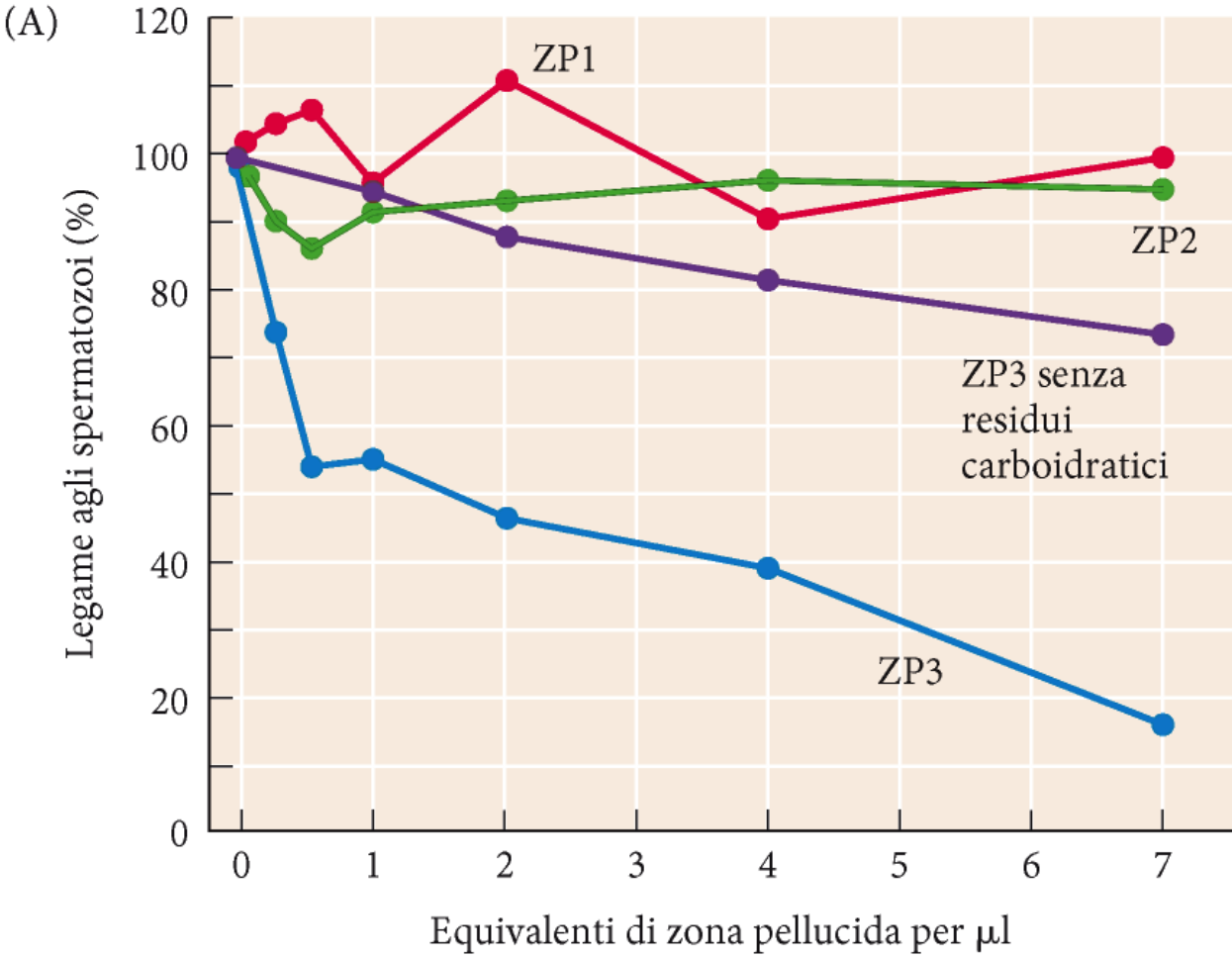
Zona Pellucida Proteins & Fertilization



1. Receptor for ZP3 on sperm head binds to ZP3 in egg zona pellucida
2. ZP3-Receptor binding leads to clustering of receptors to side of sperm head
3. Resulting acrosome reaction releases acrosin which digests hole through zona
4. ZP2 receptor binds to ZP2 keeping sperm attached to zona

Note: Experimental removal of carbohydrate residues from ZP3 prevents sperm-egg binding and fertilization

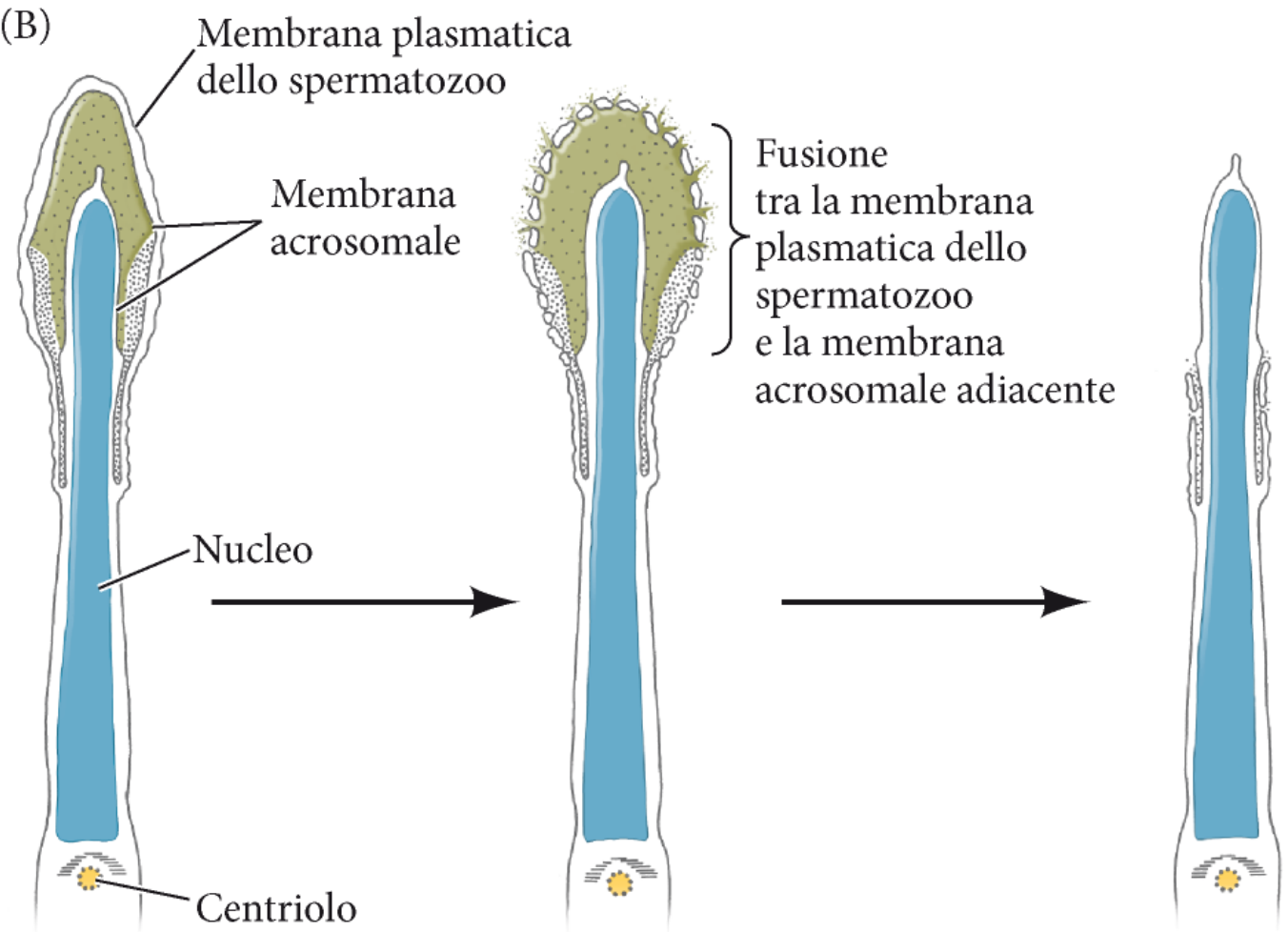




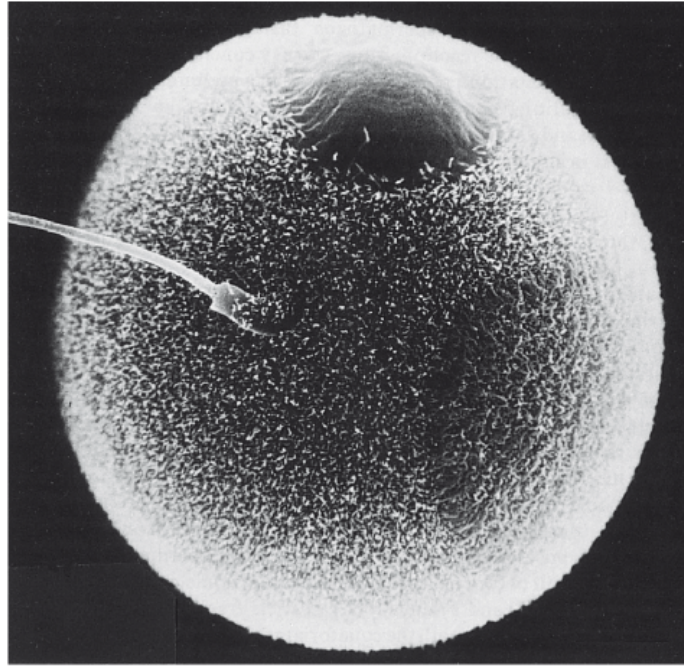
(A)



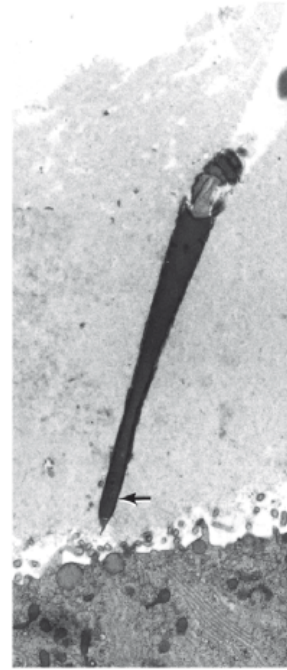
(B)



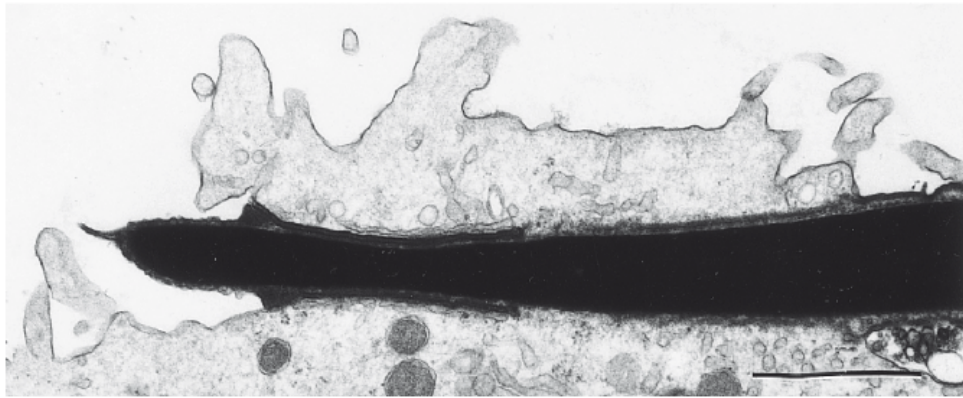
(A)



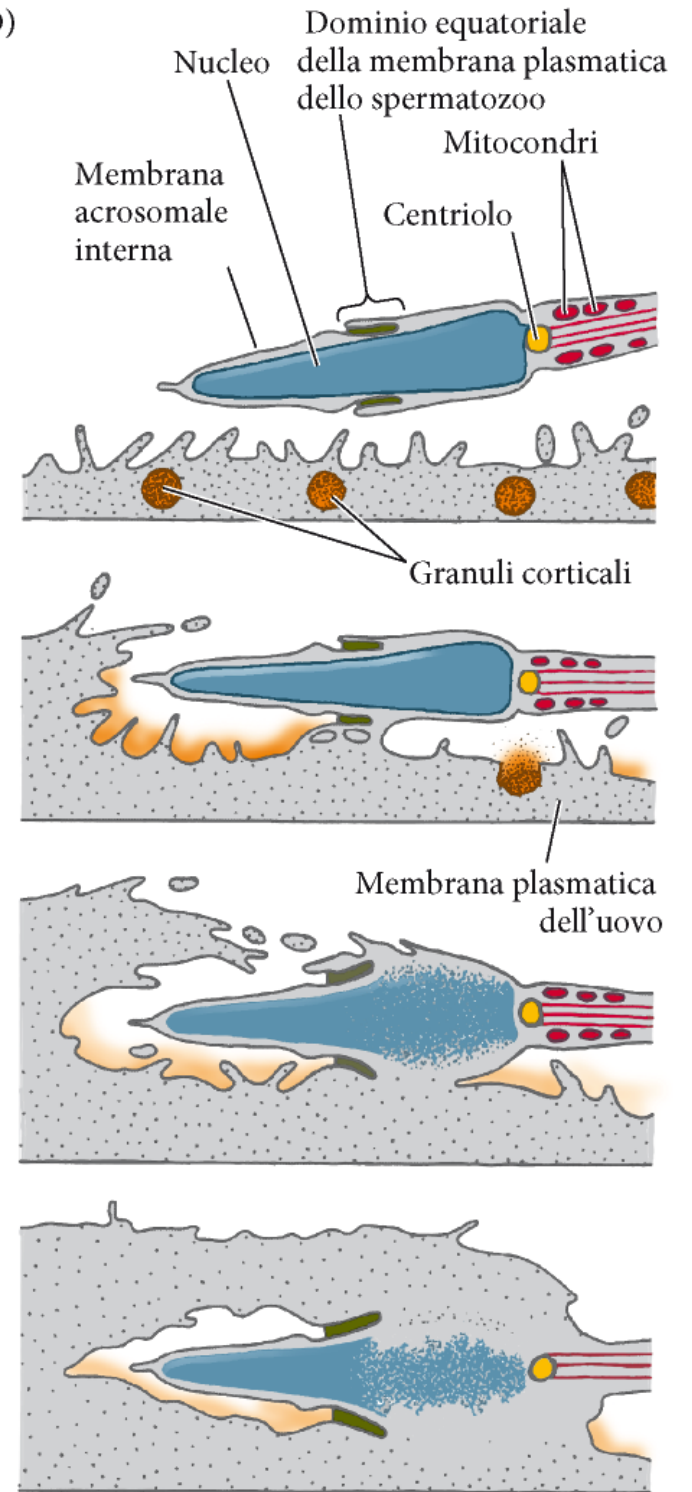
(B)



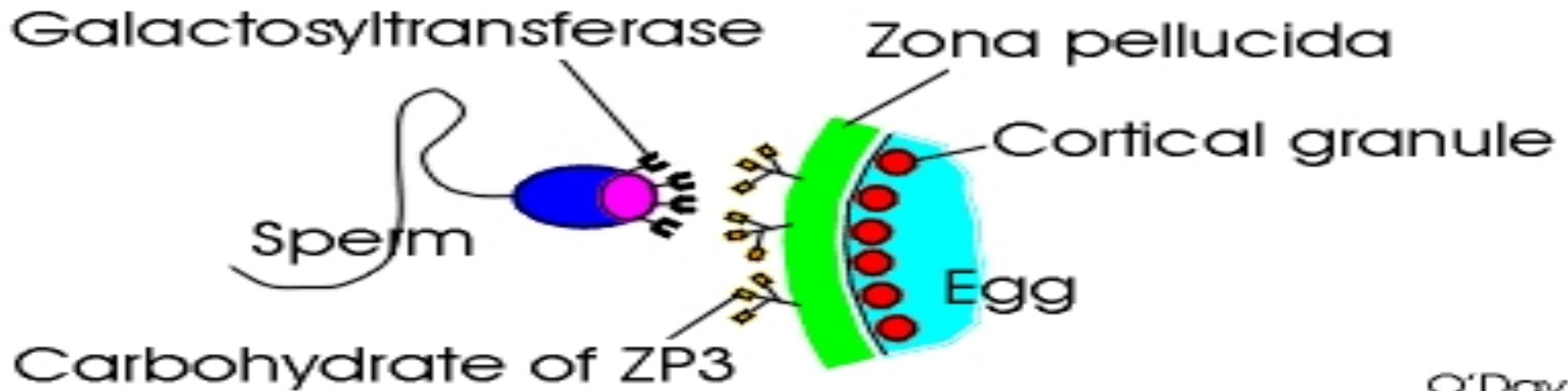
(C)



(D)



ZP3 e reazione acrosomiale



Legame spermatozoo-uovo

Raggruppamento dei recettori

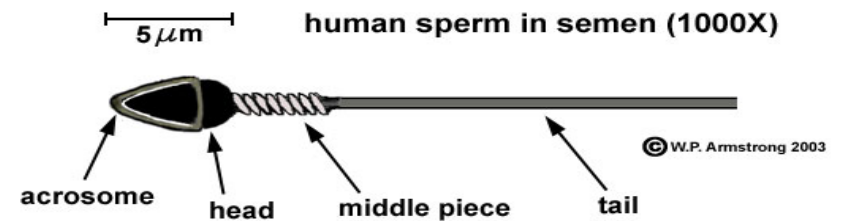
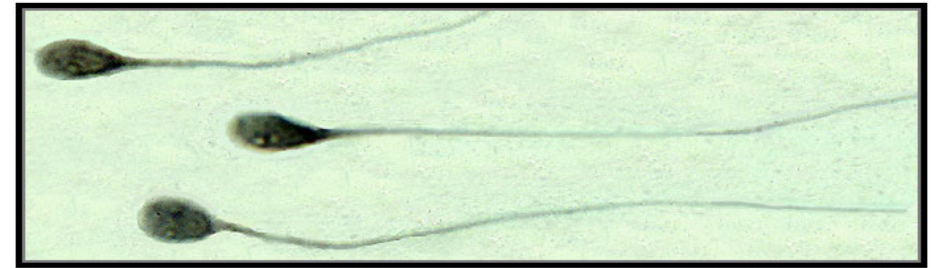
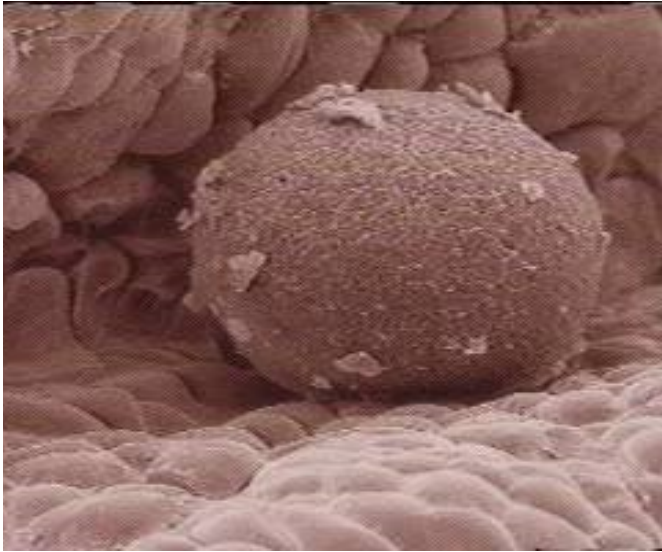


Acrosome Exocytosis

**Rilascio di enzimi litici
come l'acrosina mediante
la quale lo spermatozoo si
scava un passaggio nella
zona**



Interazione uovo-spermatozoo



(B) TOPO



(1) Spermatozoo attivato nelle vie genitali della femmina



(2) Lo spermatozoo si lega alla zona pellucida



(3) Reazione acrosomica



(4) Lo spermatozoo lisa un'apertura nella zona



(5) Fusione delle membrane cellulari dello spermatozoo e dell'uovo

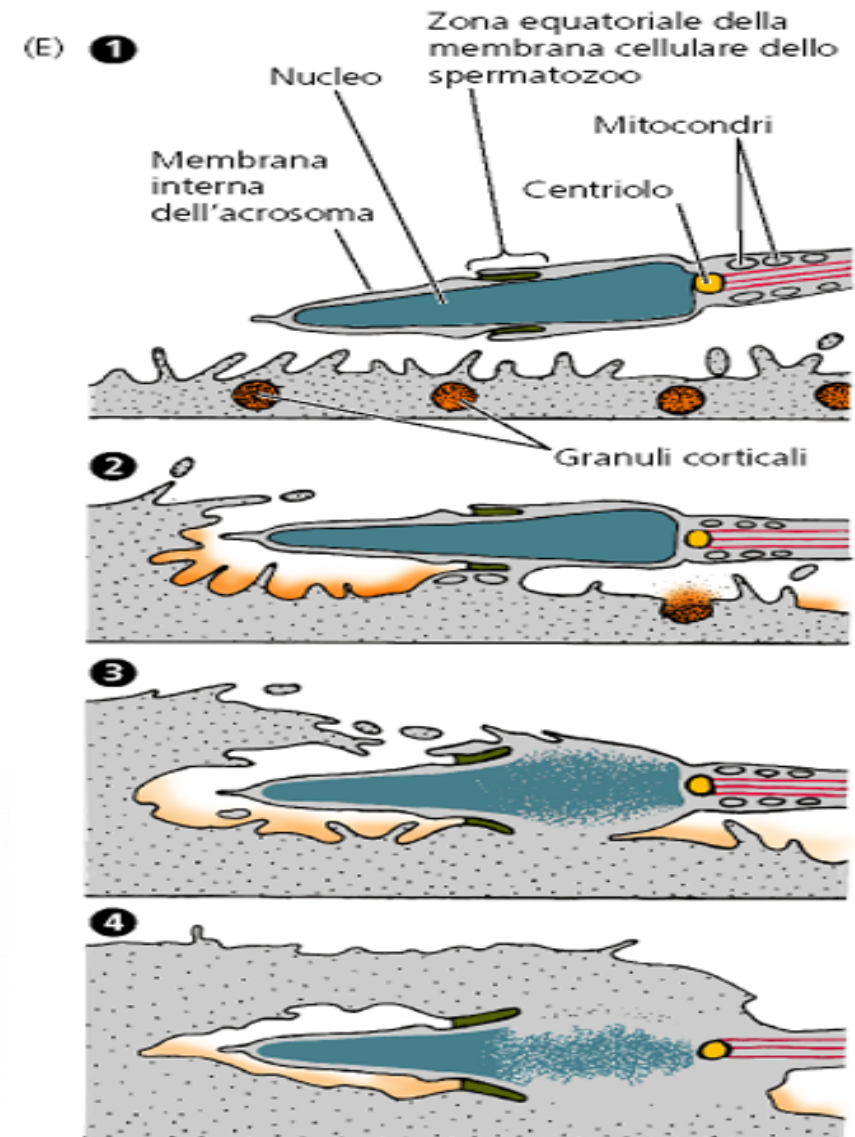
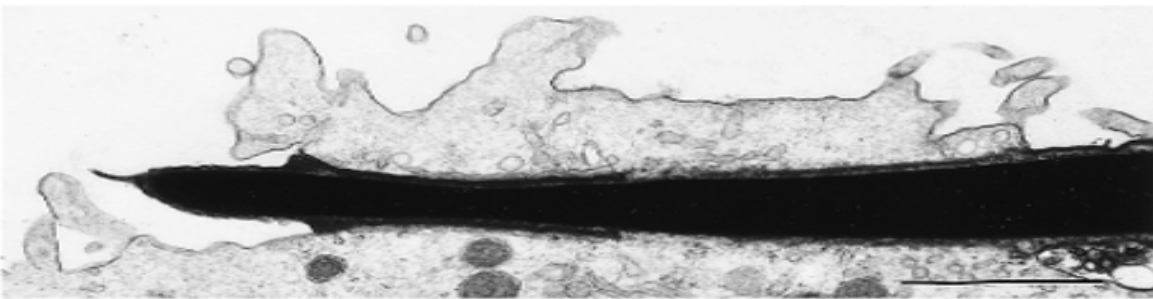
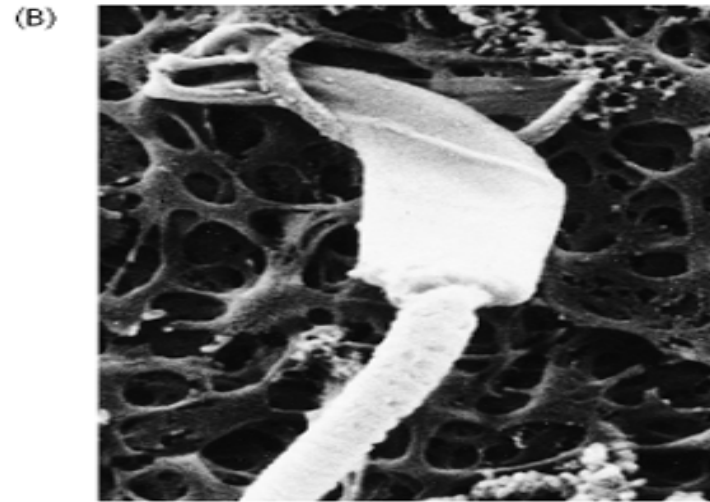
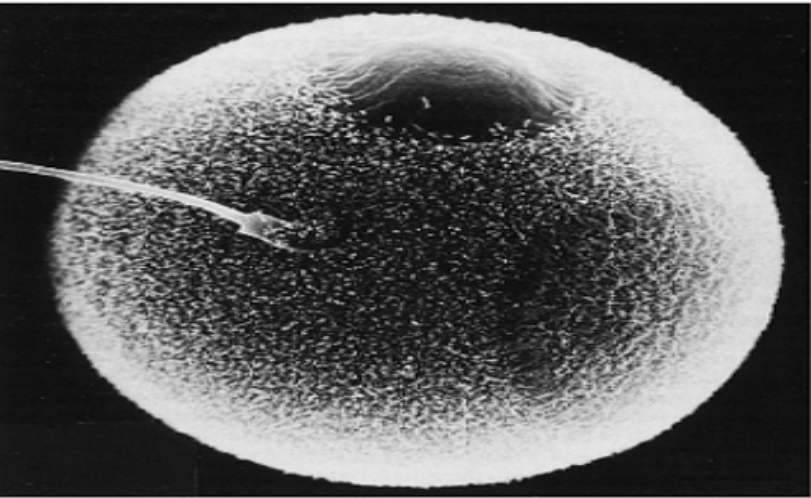


Membrana cellulare dell'uovo

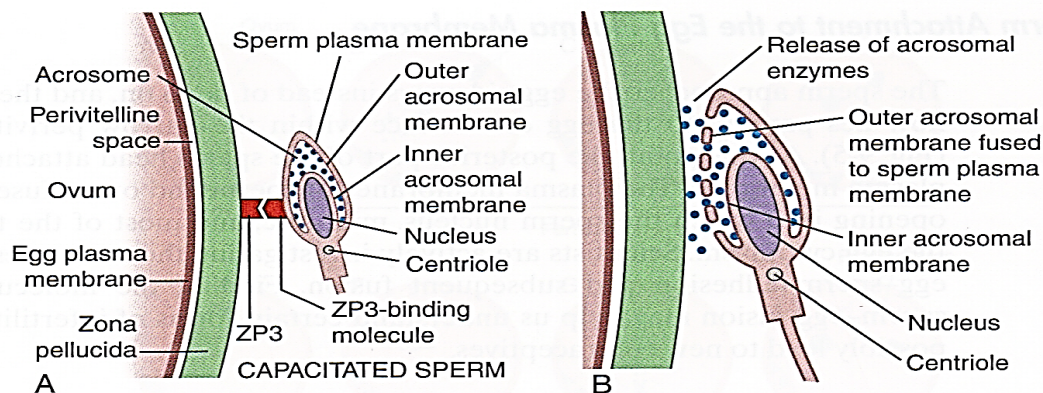
Cumulo ooforo (rivestimento extracellulare)

Zona pellucida (matrice extracellulare)

Interazione uovo-spermatozoo

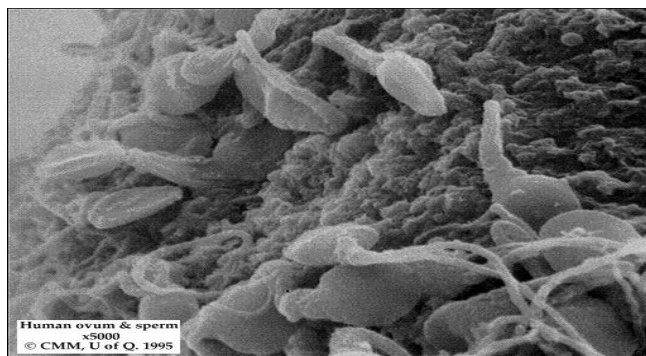


A differenza del riccio di mare, lo spermatozoo dei mammiferi si mette in contatto con l'uovo tangenzialmente





Legami spermatozoo-uovo



Primario: ZP3 e molecole sulla membrana plasmatica dello spermatozoo (galattosil-trasferasi, N-acetilglucosaminidasi). Una volta avvenuto il legame scatta la reazione acrosomiale

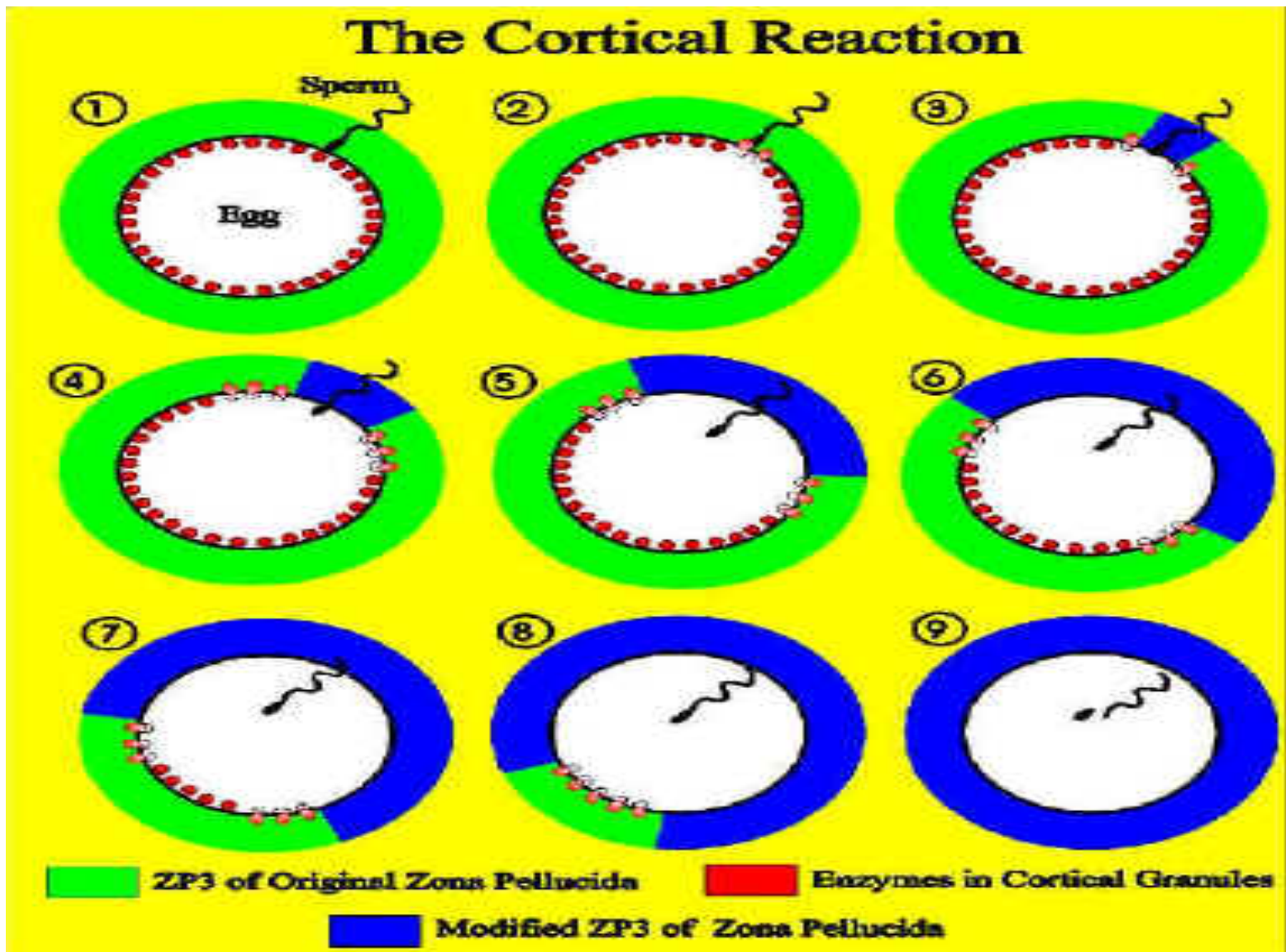
Secondario: lo spermatozoo, una volta avvenuta la reazione, deve passare attraverso la ZP, grazie alla spinta del flagello e al movimento oscillante della testa per legarsi alla membrana dell'uovo. La proteina PH 20 (nella cavia) della membrana acrosomiale interna lega lo spermatozoo alla ZP2. Nell'uomo è invece presente la SPAM-1 (sperm adhesion molecule-1), omologa della PH 20.

Fusione dei gameti: lo spermatozoo si trova ora nello spazio perivitellino e si deve legare alla m dell'uovo. La fertilina o PH 30 dello spermatozoo si lega alle integrine dell'uovo (?)

Reazione corticale e blocco della polispermia

La ZP3 viene modificata e la ZP2 scissa dagli enzimi rilasciati dai granuli corticali:

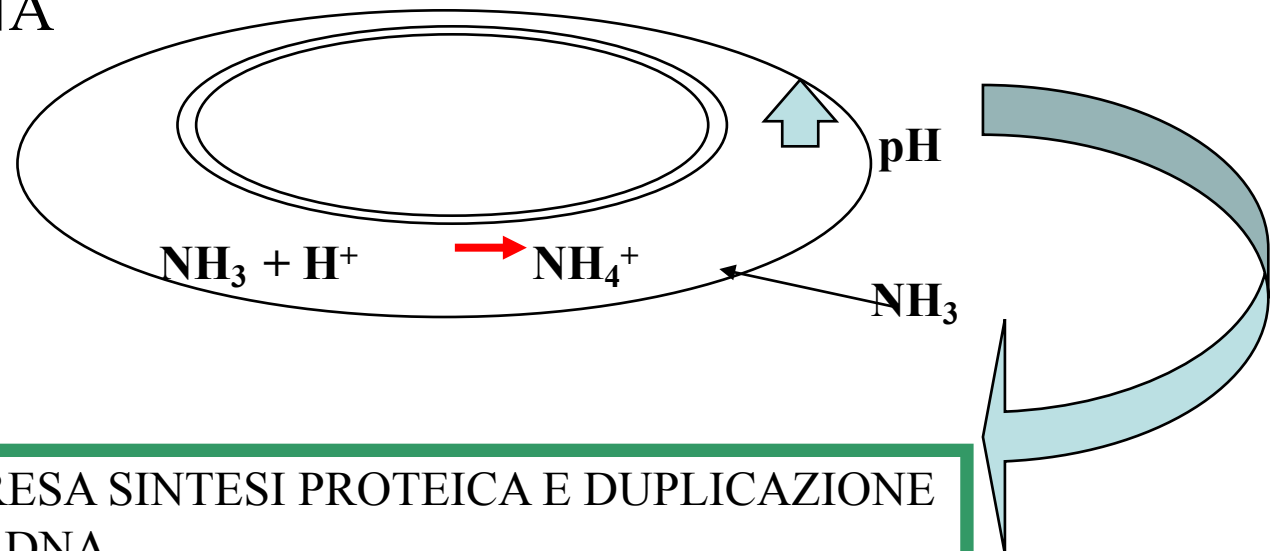
Nessun altro spermatozoo si può legare all'uovo



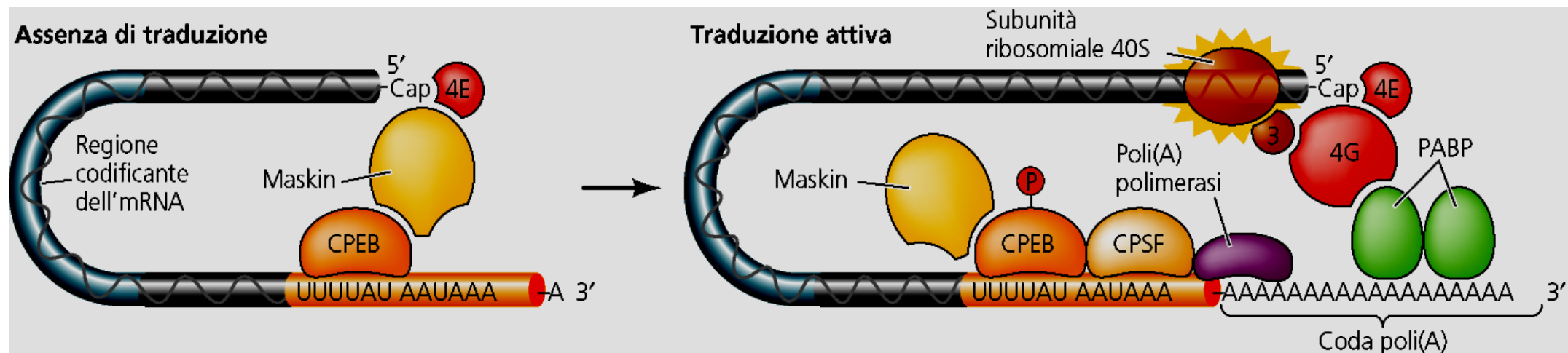
Come nel riccio di mare, l'esocitosi dei granuli corticali è innescata dalla liberazione di Ca^{+2}

Ripresa metabolica

L'innalzamento del pH è responsabile dell'attivazione metabolica dell'uovo. Infatti uova tenute in H₂O priva di Na⁺ si attivano con l'NH₃ che penetra nel citoplasma e preleva H⁺ formando lo ione ammonio NH₄⁺ e facendo innalzare il pH. Le onde di Ca²⁺ dopo lo ingresso dello sp. inattivano le MAP chinasi consentendo la sintesi del DNA



Smascheramento dei messaggeri dopo la fecondazione



Legame dello spermatozoo alla membrana plasmatica dell'uovo

Afflusso di Na^+

Variazione del potenziale di membrana

Blocco veloce della polispermia

Trasduzione del segnale

Attivazione fosfolipasi C (,è presente anche nello sp.)

IP3

Liberazione di Ca^{+2}

Esocitosi granuli corticali

Blocco lento della polispermia

DAG

Attivazione della PKC

Scambio Na^+/H^+

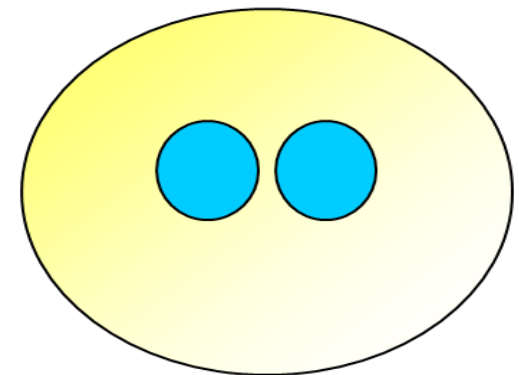
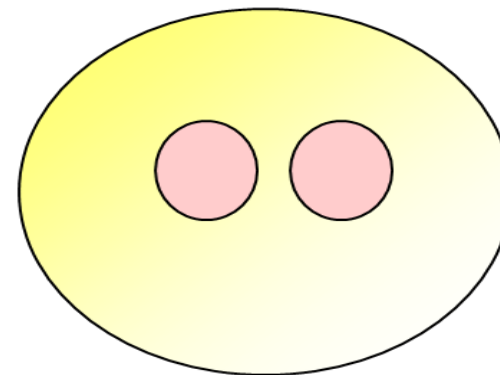
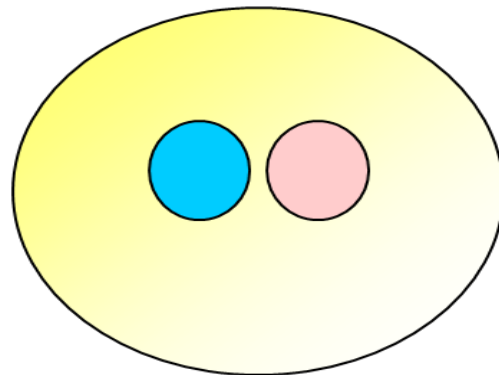
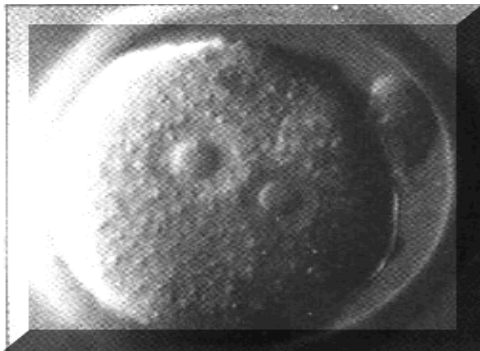
Aumento pH cellulare

Sintesi proteica, del DNA etc.

?

I pronuclei dello spermatozoo e dell'uovo non sono equivalenti

Esempio: Mola idatiforme o gravidanza molare: iperplasia del trofoblasto. E' dovuto all'impianto di un uovo senza nucleo fecondato da uno spermatozoo che duplica i suoi cromosomi. Ci troviamo di fronte quindi ad embrione diploide con materiale genetico solo di origine paterna.



Biparentale

Ginogenetico

Androgenetico



I pronuclei dello spermatozoo e dell'uovo non sono equivalenti



GENI IMPRINTED

Igf-2 codifica per l'IGF-2, fattore di crescita simile all'insulina

H 19 regola l'espressione di *Igf-2*

Igf-2r non codifica per il recettore di IGF-2, ma per una proteina che lo degrada

Fecondazione *in vitro* (IVF)

La prima bambina concepita con l'IVF è nata in Inghilterra nel 1978 e si chiama Louise Brown.

Diagnosi e inizio del trattamento

Questo primo processo dura tra 2 e 3 ore

1 Stimolazione

Si stimolano le ovaie con ormoni affinché producano follicoli.

2 Controllo

Tramite ecografia si controlla che le dimensioni e la quantità dei follicoli siano le adeguate.



Il Suo partner deve lasciare un campione di seme che analizzeremo per vedere se è utilizzabile



FIVET ICSI

Estrazione degli ovuli trasferimento

Questo secondo processo dura tra 3 e 5 giorni

IL TRATTAMENTO È RACCOMANDABILE

- Quando c'è una quantità insufficiente di spermatozoi.
- Quando c'è ostruzione nelle tube di Falloppio.
- Dopo aver realizzato vari tentativi di inseminazione artificiale senza successo.

3 Estrazione

L'estrazione degli ovuli si realizza mediante aspirazione.

4 Fecondazione

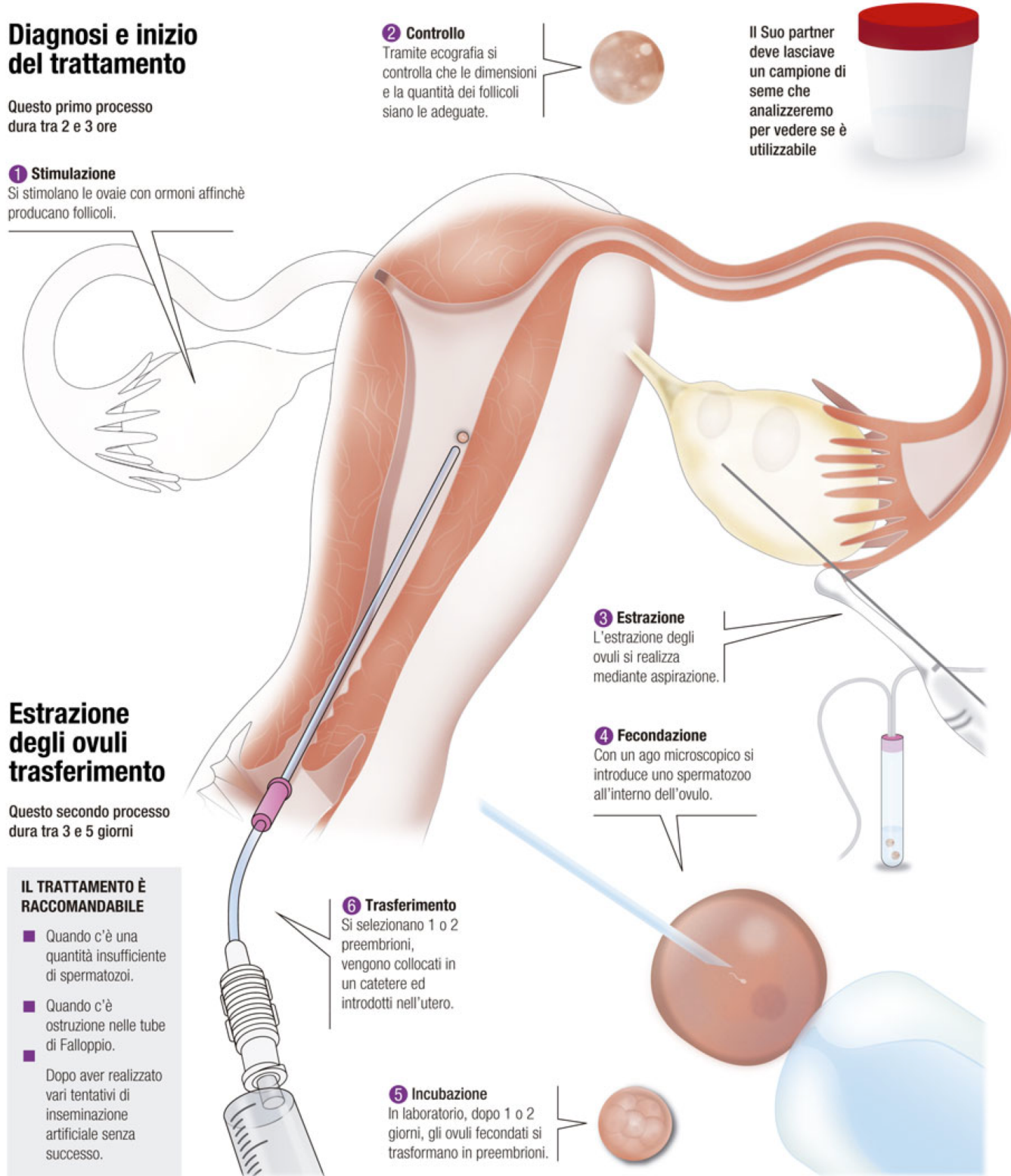
Con un ago microscopico si introduce uno spermatozoo all'interno dell'ovulo.

6 Trasferimento

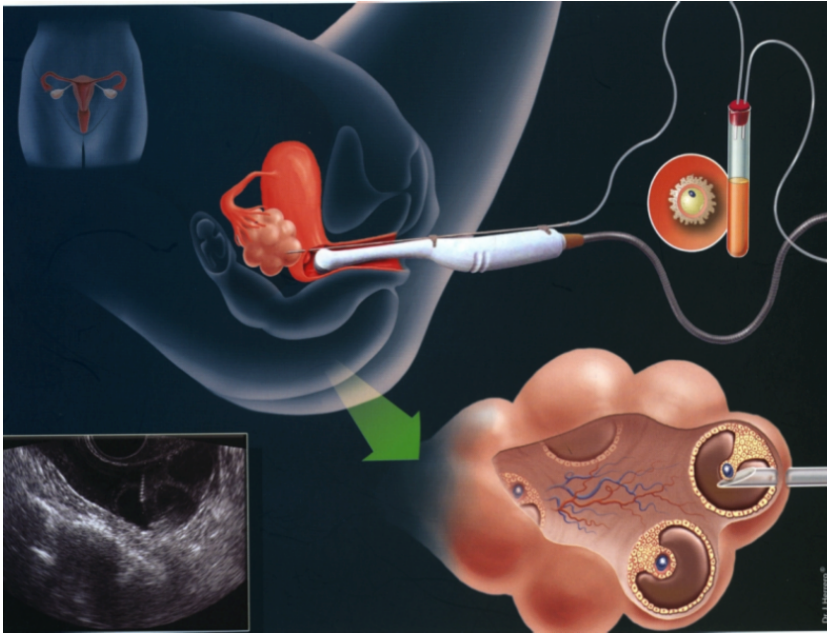
Si selezionano 1 o 2 preembrioni, vengono collocati in un catetere ed introdotti nell'utero.

5 Incubazione

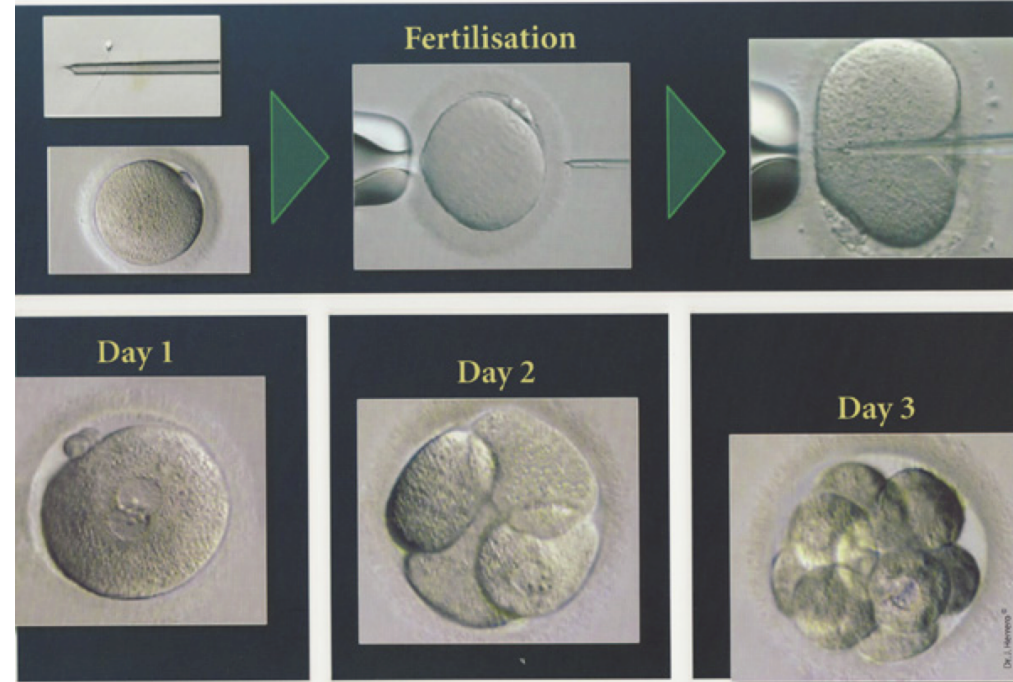
In laboratorio, dopo 1 o 2 giorni, gli ovuli fecondati si trasformano in preembrioni.



Pick-up degli oociti



ICSI and Embryo Development



Iniezione intracitoplasmatica dello spermatozoo



Impianto dell'embrione in utero



PARTENOGENESI

Naturale: -Obbligatoria (mancanza di partner)

-Occasionale o facoltativa (solo in particolari condizioni)

Komodo dragon



Bonnethead shark



Water flea



Bynoe's gecko



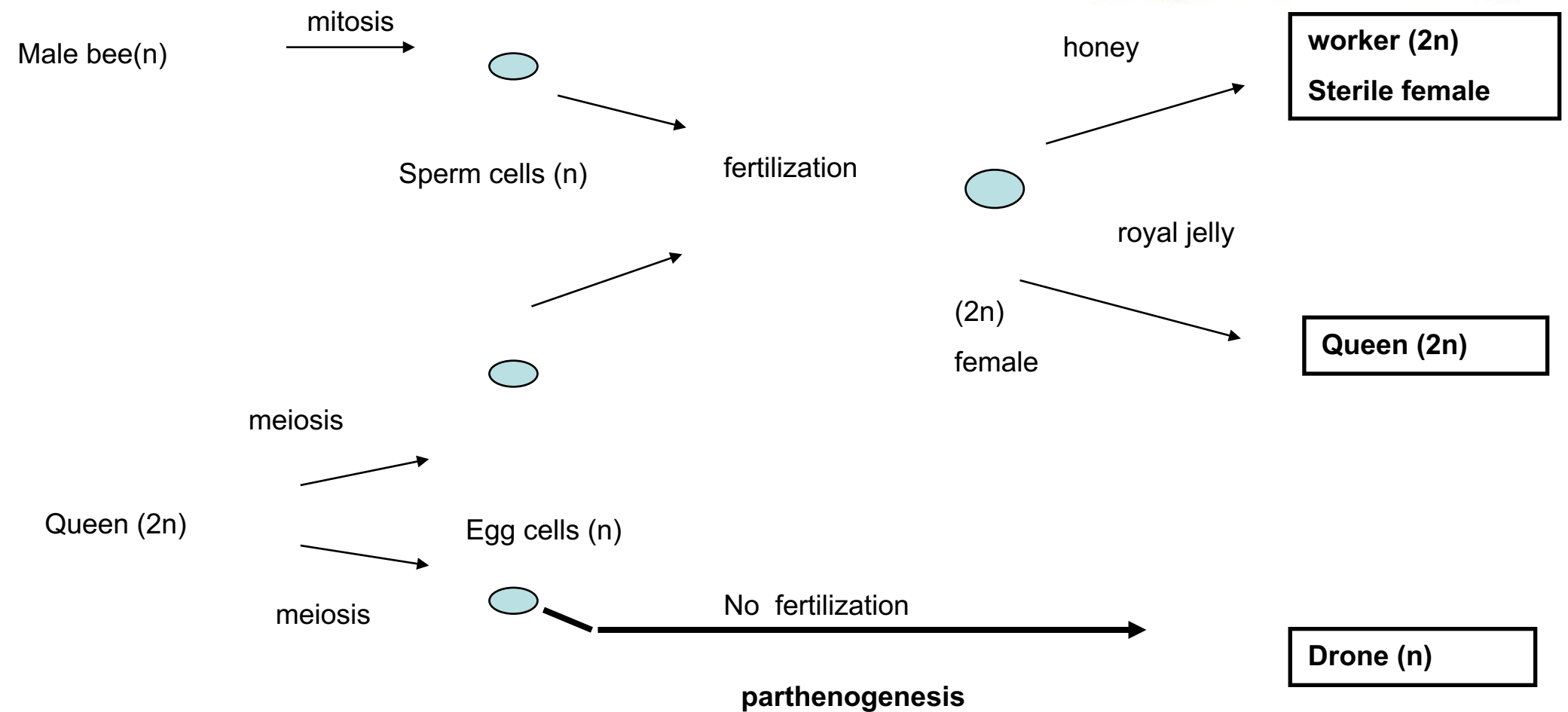
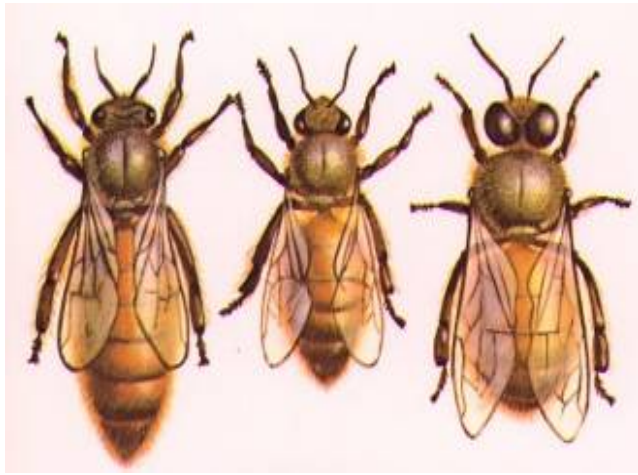
Warramaba virgo grasshopper



Mulga trees

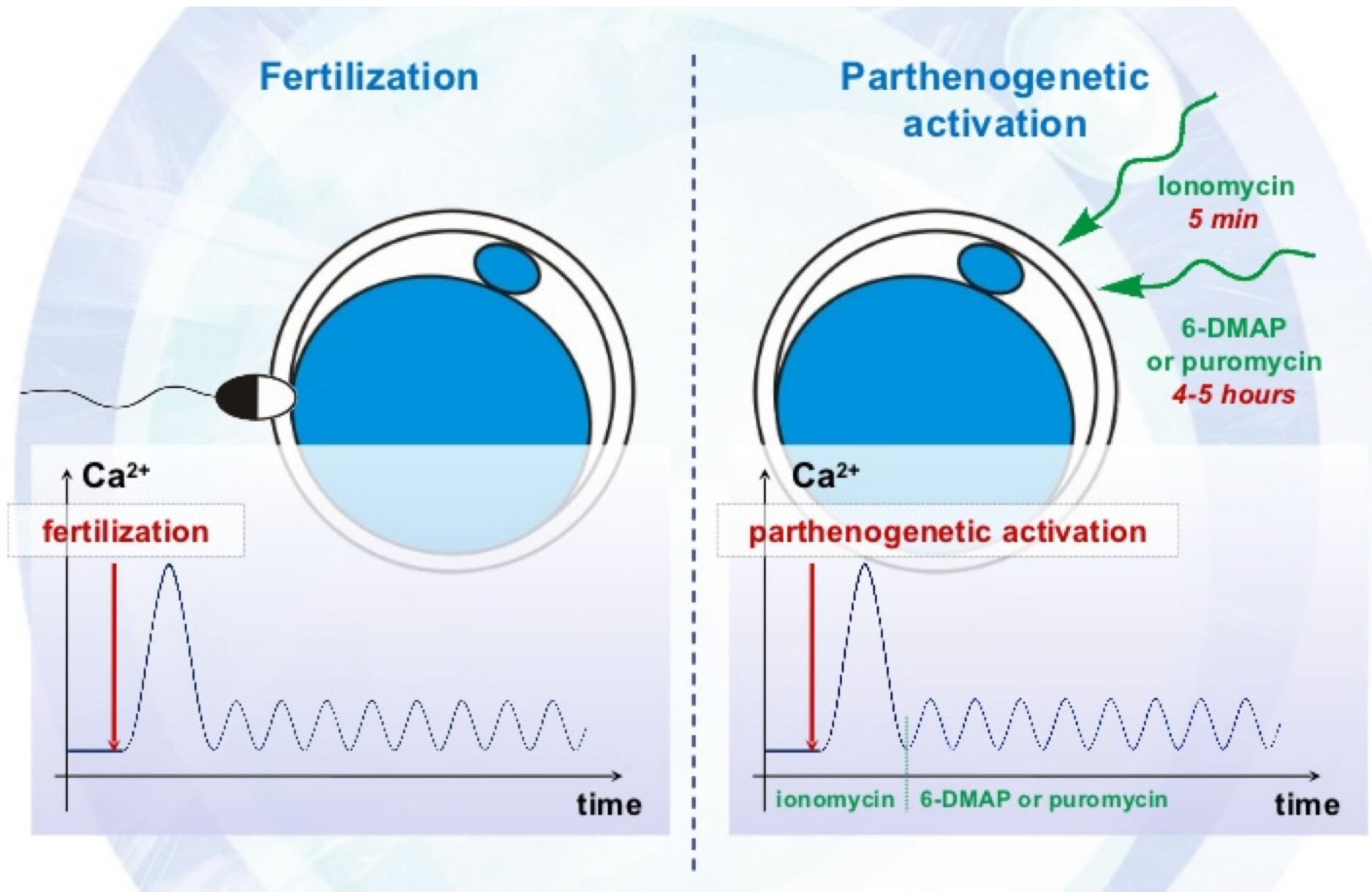


PARTENOGENESIS



PARTENOGENESIS

Sperimentale



PARTENOGENESIS

PARTHENOGENESIS

Unfertilised eggs have two complete sets of chromosomes



One set is expelled during fertilisation, but an electric or chemical shock can make the egg develop as if fertilised and retain the extra set



The resulting embryos usually die within days but stem cells can be extracted if they survive long enough



Parthenogenetic activation is a way to create pluripotent stem cells without disruption of the viable embryo

