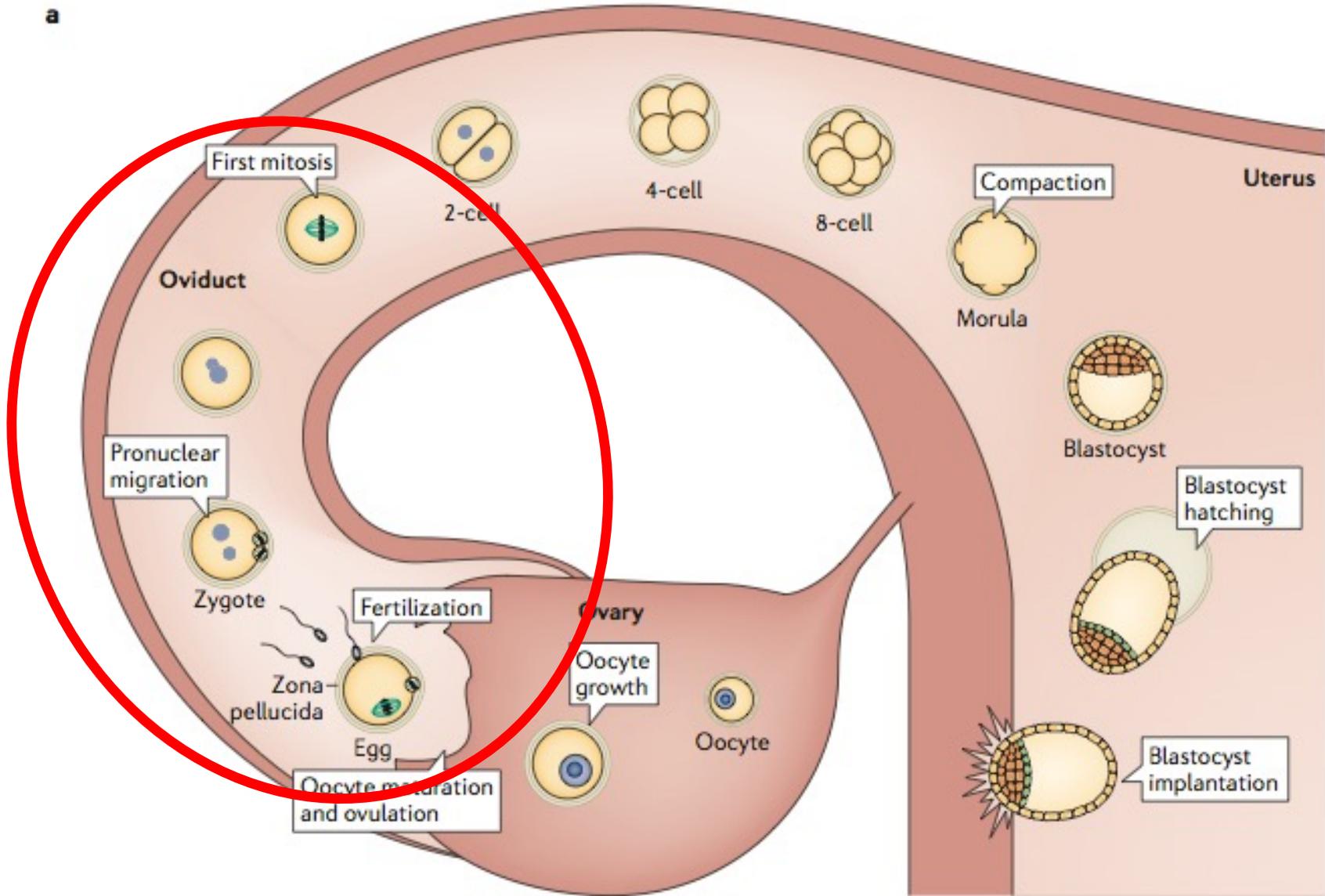
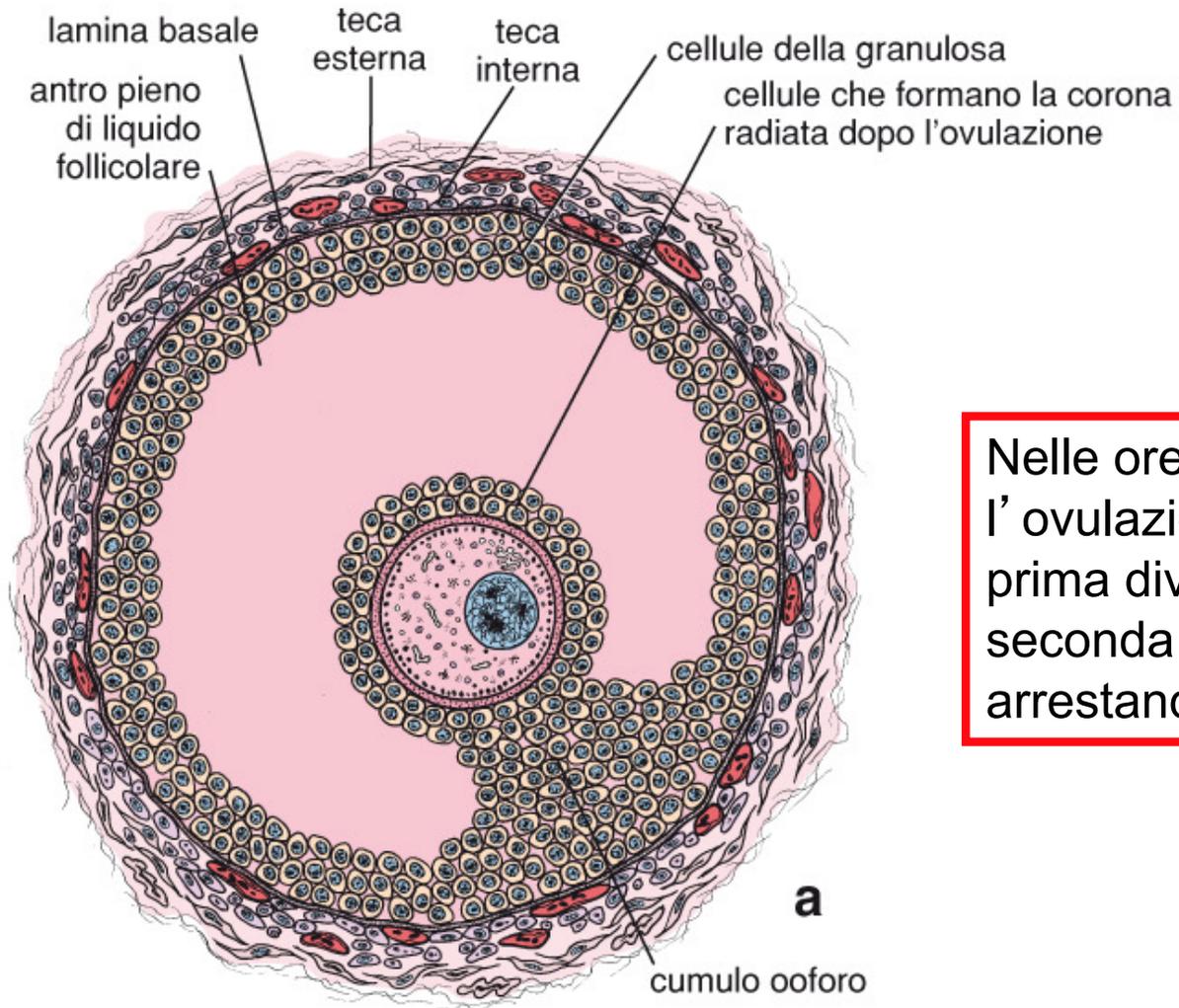


a

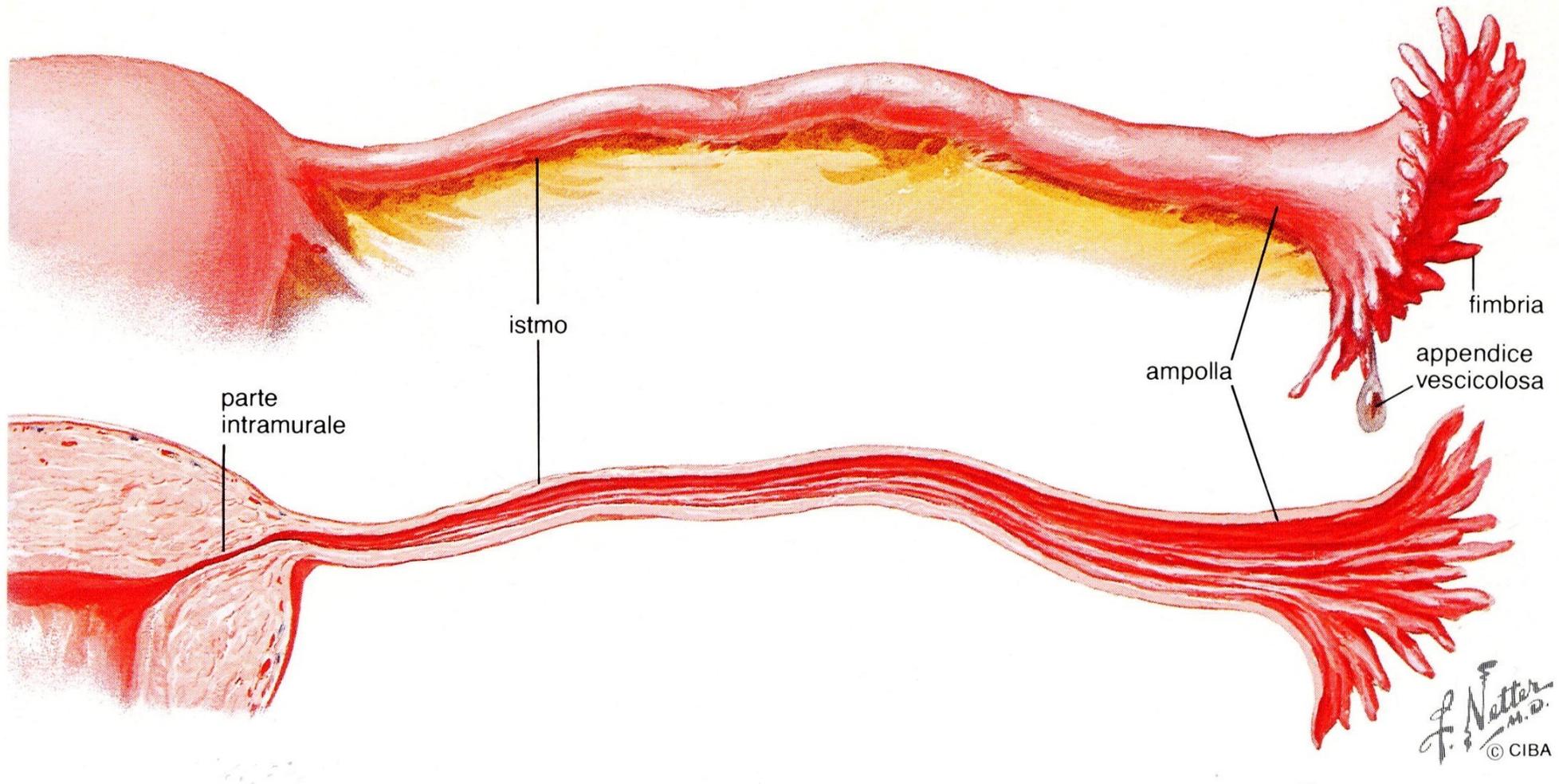




**FOLLICOLO MATURO O DI GRAAF**

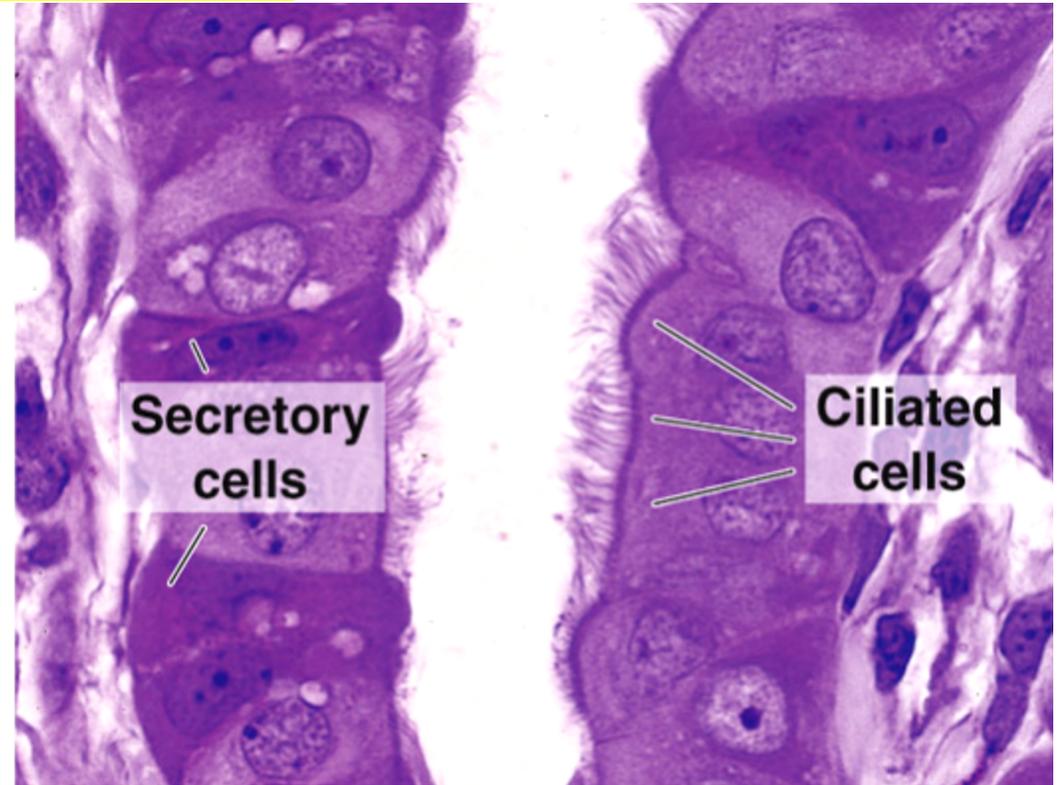
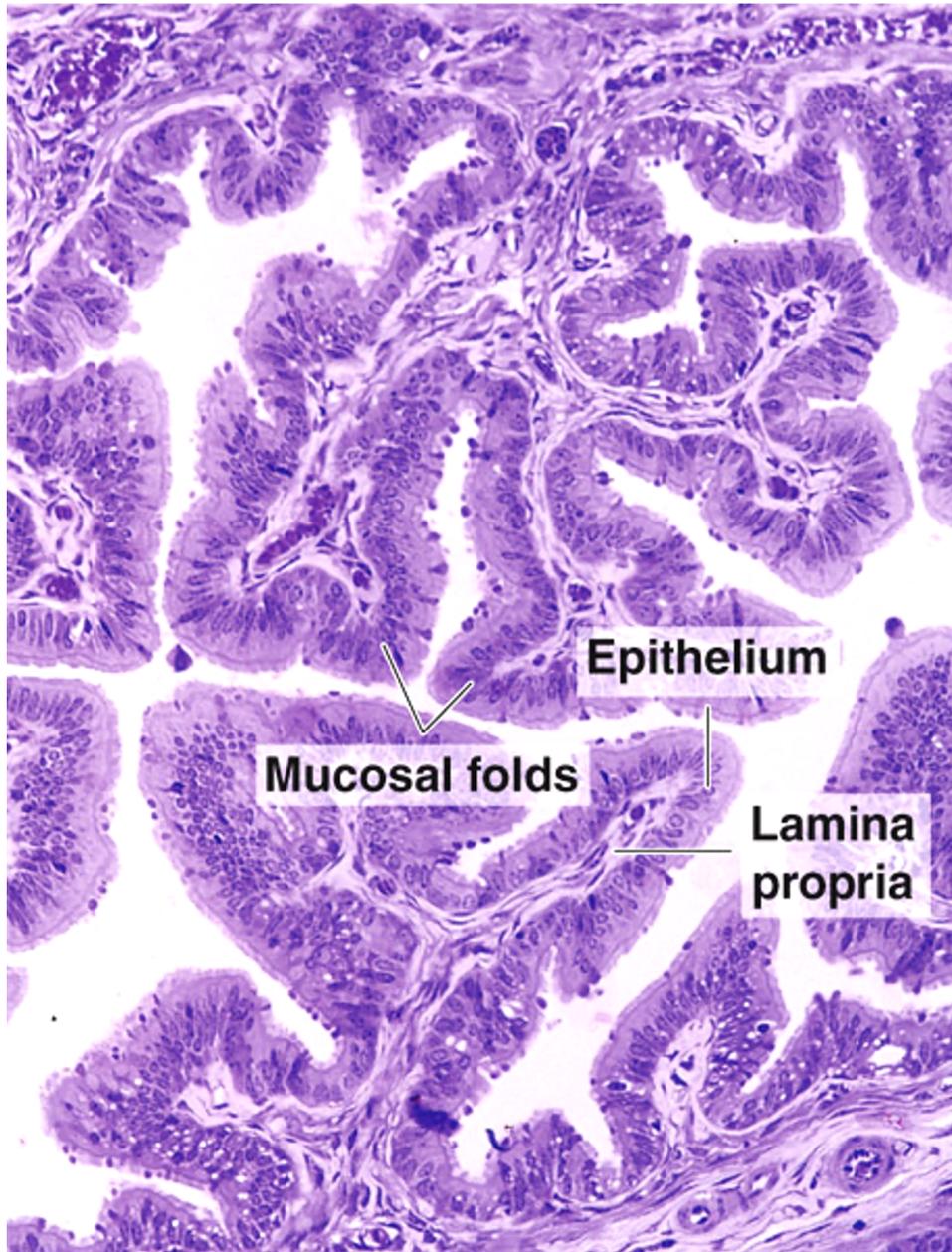
Nelle ore che precedono l'ovulazione l'ovocito completa la prima divisione meiotica e inizia la seconda divisione meiotica arrestandosi in metafase.

# Tuba uterina



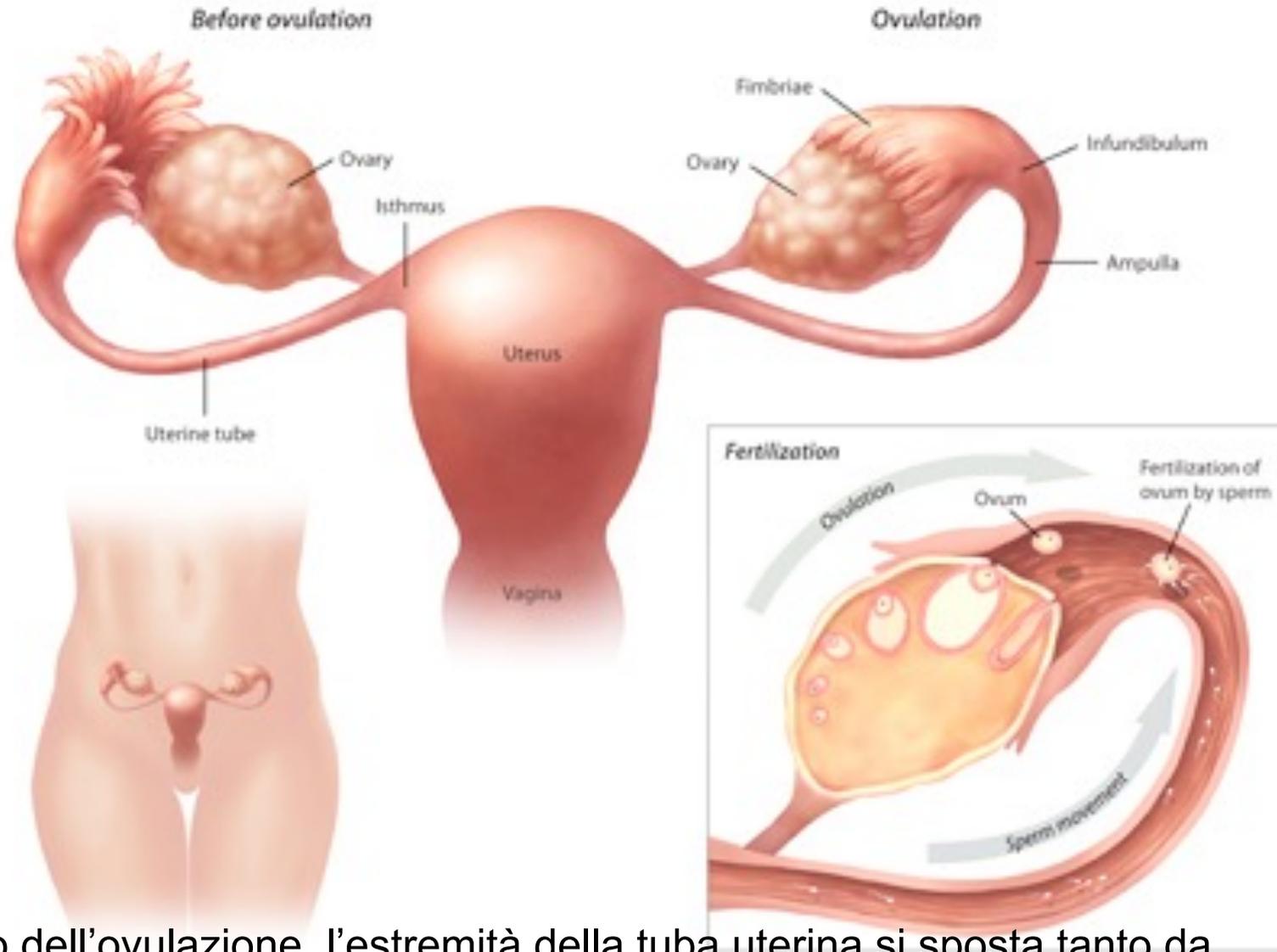
- estremità ovarica: **ampolla con fimbrie**
- parte media: **istmo**
- estremità uterina: **parte intramurale**

# Tuba uterina



- L'epitelio è cilindrico semplice con cellule cigliate e cellule secernenti.
- Il movimento delle ciglia, e l'attività della muscolature, favoriscono la progressione dell'embrione verso l'utero.
- Il secreto crea un ambiente favorevole per la sopravvivenza degli spermatozoi e per la fecondazione.

## Anatomy and Physiology of the Female Reproductive Tract



Al momento dell'ovulazione, l'estremità della tuba uterina si sposta tanto da coprire parte dell'ovario, garantendo così all'oocita secondario di essere raccolto nelle vie genitali femminili.

L'oocita viene gradualmente spostato con il movimento ciliare verso l'utero. Durante questo tragitto, spesso nell'ampolla, incontra gli spermatozoi

## TRASLOCAZIONE E CAPACITAZIONE

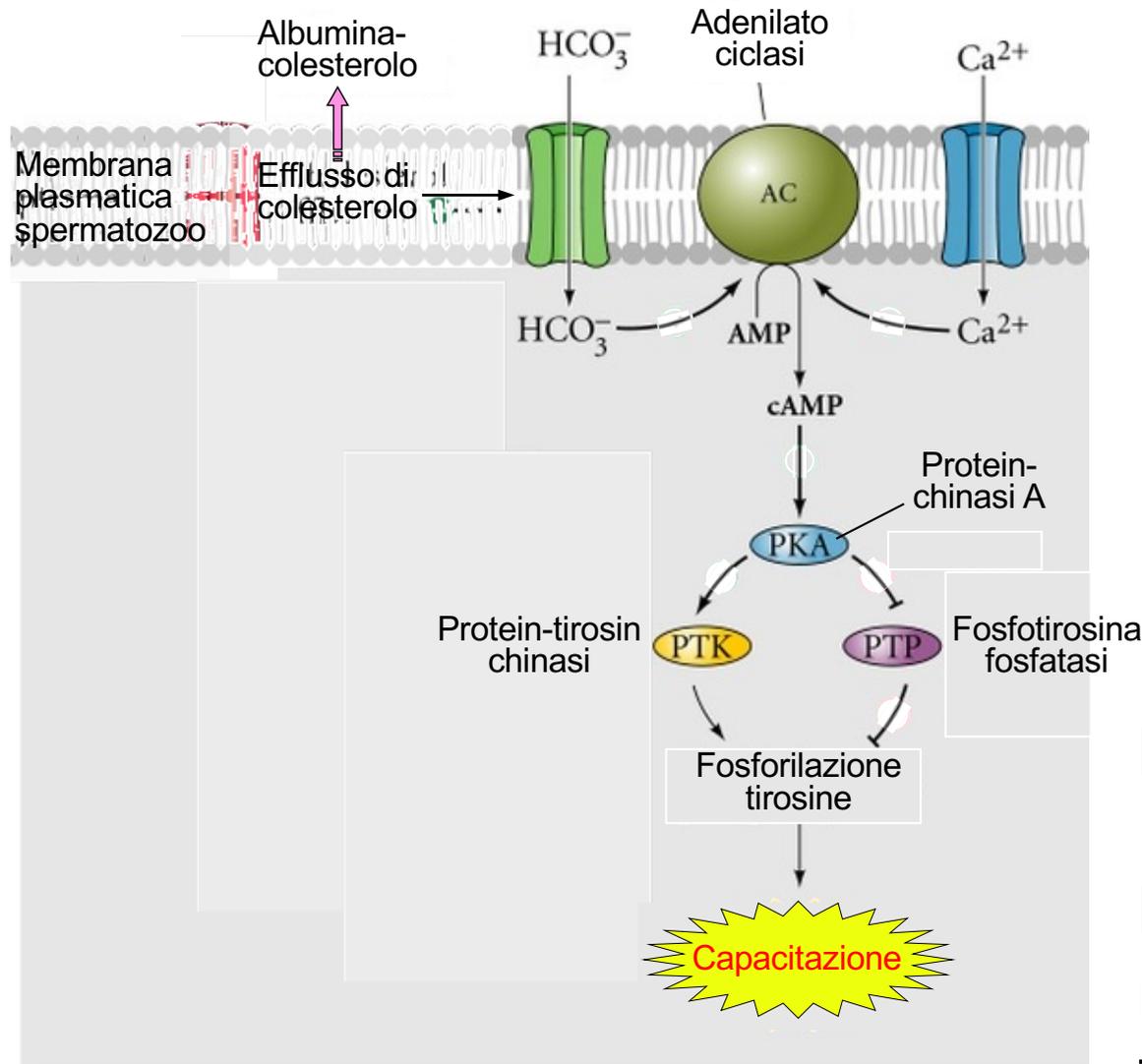
Nell' uomo il volume medio dell' eiaculato è di 3,5 cc. Di questi, circa il 10% è costituito da spermatozoi. Il resto, detto *plasma seminale*, è costituito dalla secrezione delle vescichette seminali, della prostata e di altre ghiandole. Ogni eiaculato contiene circa 200-300 milioni di spermatozoi (concentrazione  $50-150 \times 10^3$  cellule/mm<sup>3</sup>).

Solo 1 spermatozoo su 10.000 arriverà vicino all' uovo

Lo spostamento degli spermatozoi fino all' ampolla (dove avviene la fecondazione ) non è dovuto solo alla loro motilità, ma essi sono trasportati principalmente dalle contrazioni muscolari dell' utero e della tuba

Il passaggio degli spermatozoi nelle vie genitali femminili li rende competenti alla fecondazione, attraverso un processo chiamato *capacitazione*.

# LA CAPACITAZIONE DELLO SPERMATOZOO

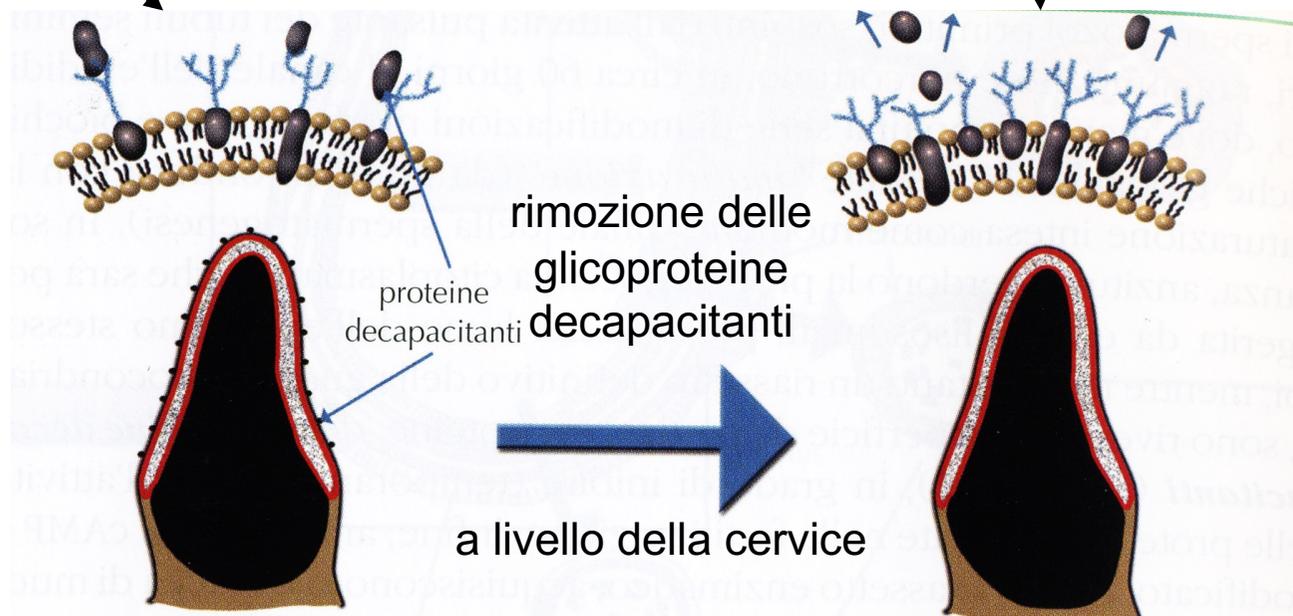
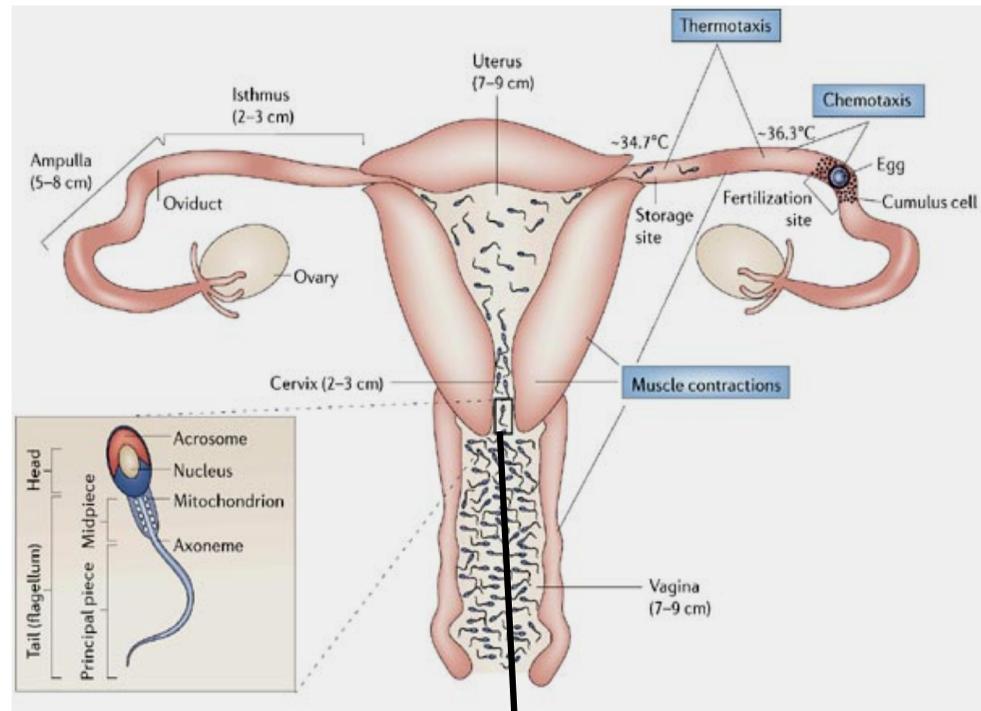
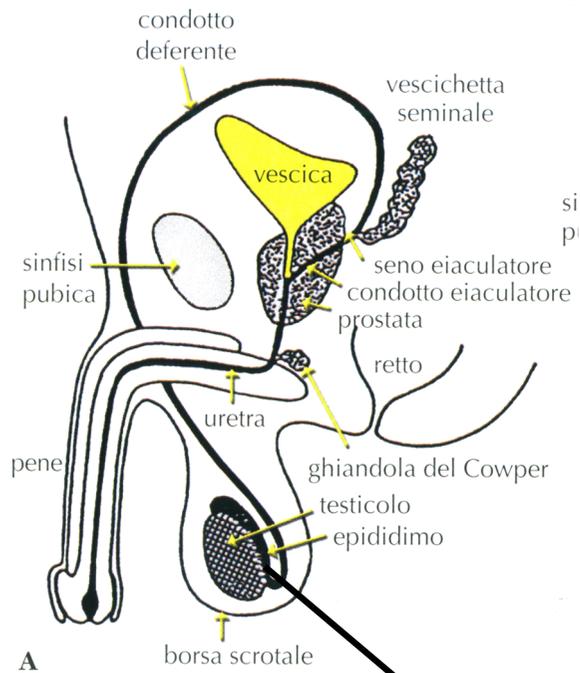


Esposizione recettori ZP

Riorganizzazione membrana plasmatica x fusione

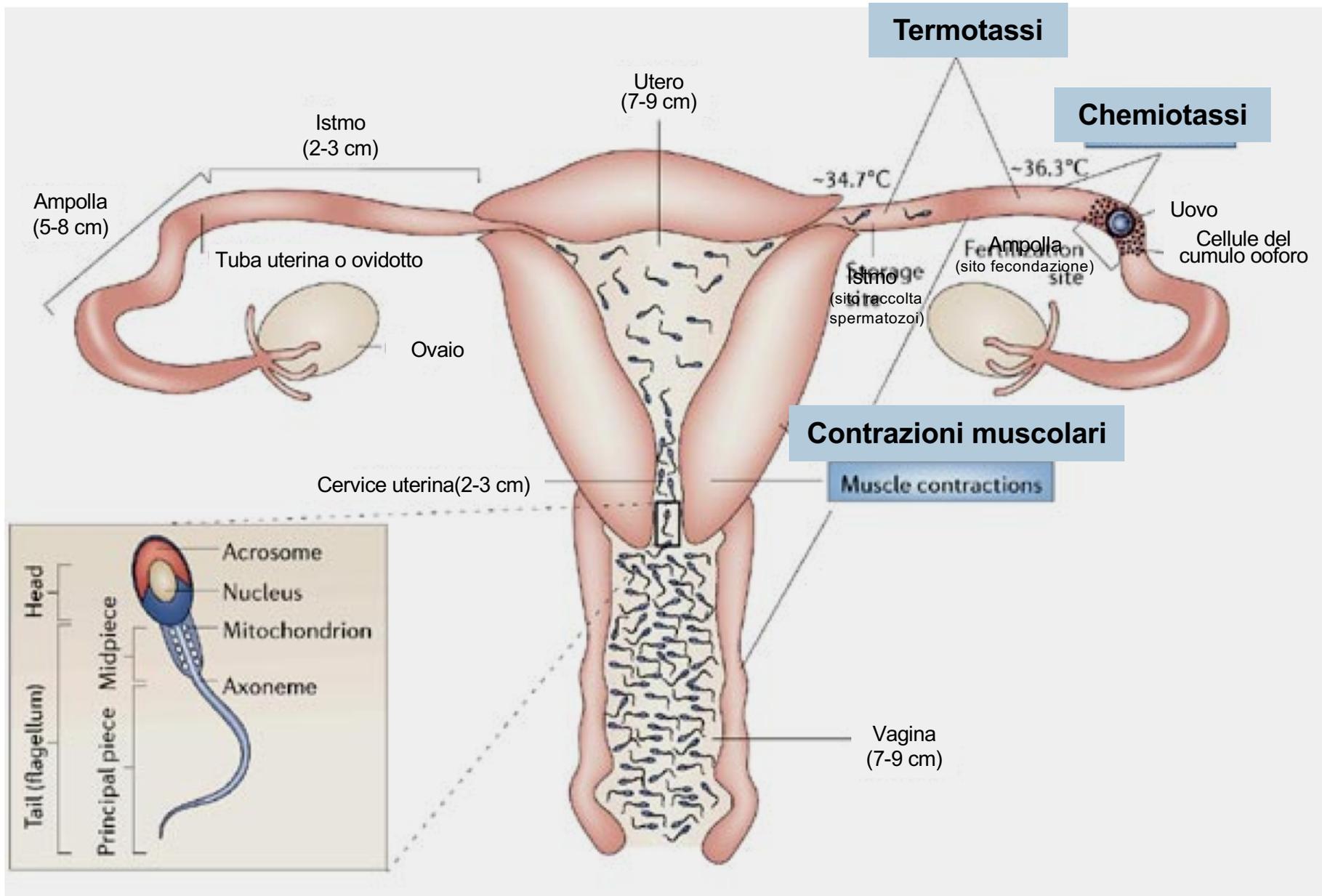
Il liquido cervicale e' ricco di ioni bicarbonato

Iperattività del flagello



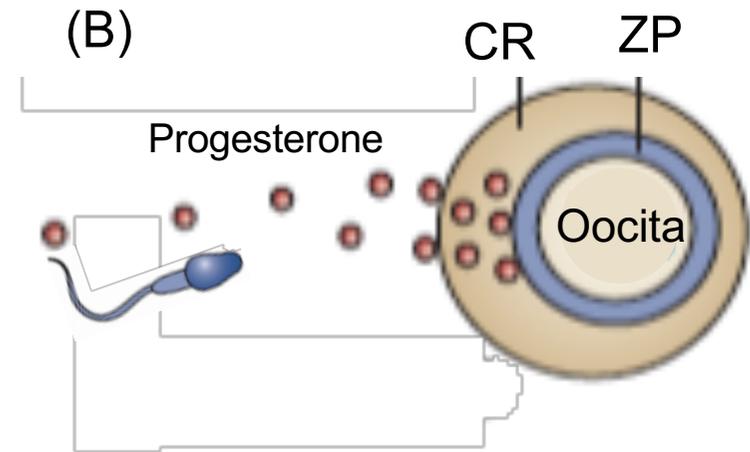
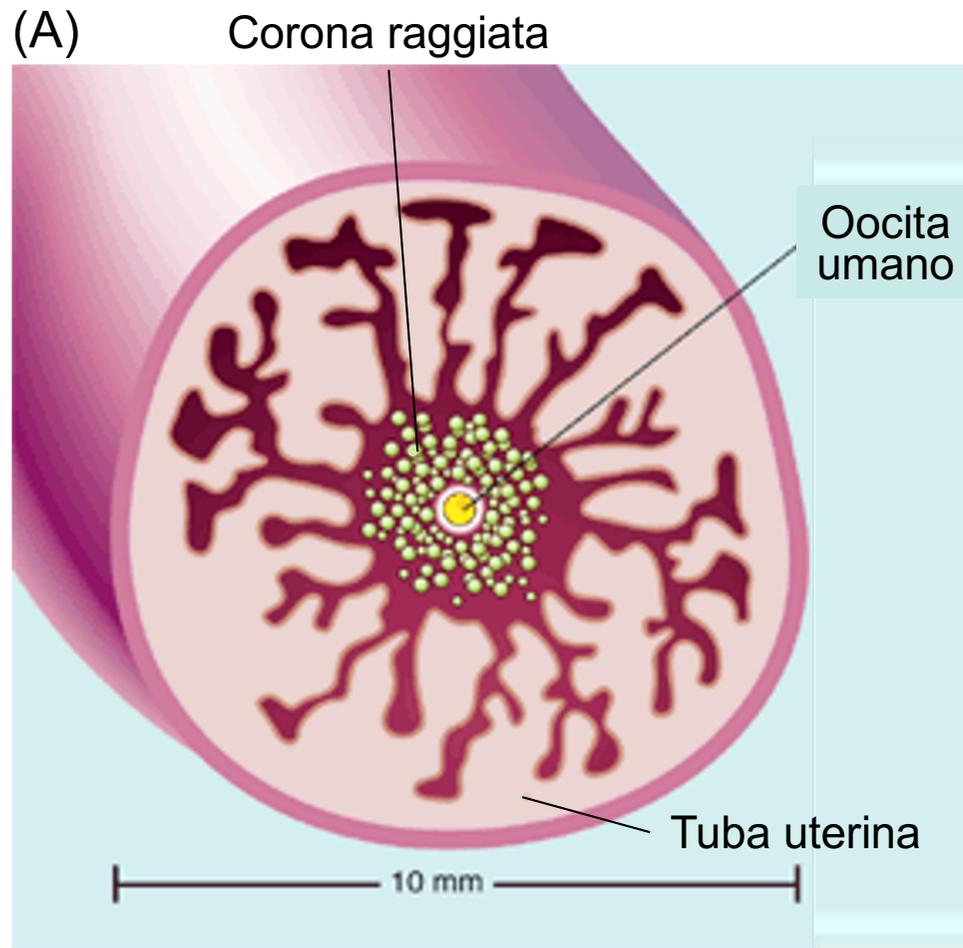
**DECAPACITAZIONE**

**CAPACITAZIONE**



movimento degli spermatozoi:

contrazioni muscolari  
flagello



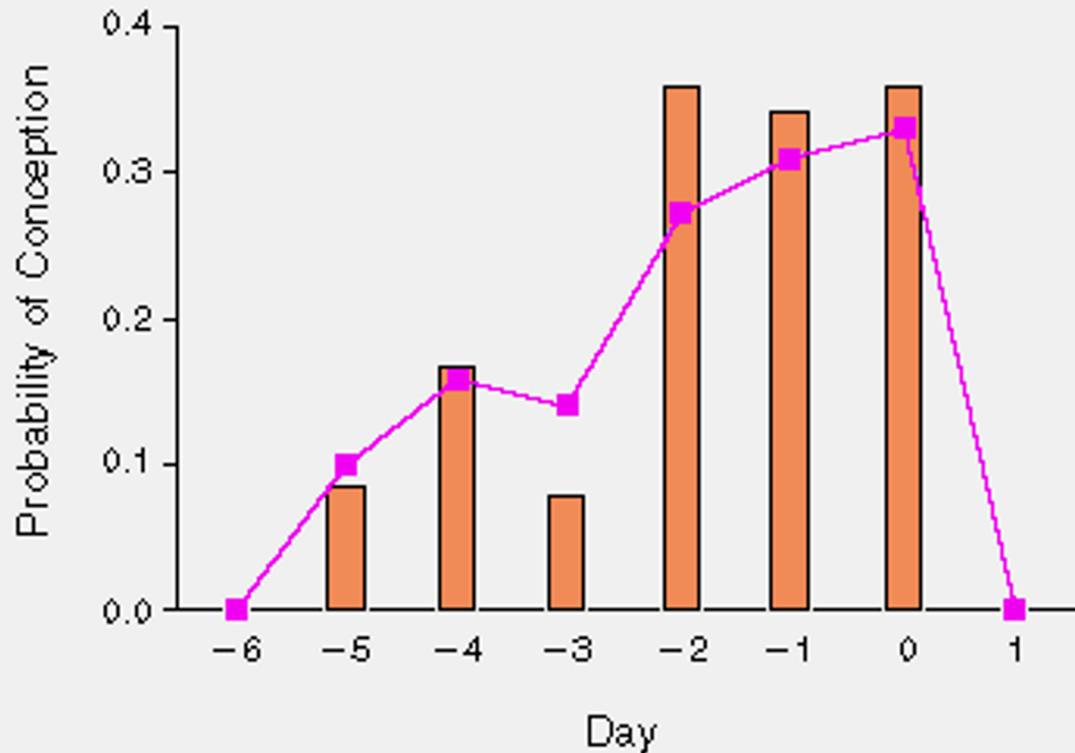
**Gli spermatozoi si muovono verso le regioni in cui alcune sostanze chimiche (chemoattrattanti) sono più concentrate. Questo fenomeno si chiama chemoattrazione.**

**Uno dei chemoattrattanti più importanti per lo spermatozoo è il progesterone, prodotto dalle cellule della corona radiata che circondano l'ovocita secondario. Il progesterone si trova anche presente nel liquido follicolare espulso insieme all'ovocita.**

## Chemoattractants for mammalian spermatozoa

Substance	Female source	Species	Reference
<i>Confirmed substances</i>			
Atrial natriuretic peptide	FF	Human	59,60
Bourgeonal	Unknown	Human	36
Lyral	Unknown	Mouse	51
Peptides (<1.3 and ~13 kDa)	FF	Human	92
Progesterone*	CO, FF, OF	Human, rabbit	50
RANTES	FF	Human	54
<i>Putative chemoattractants**</i>			
Acetylcholine	FF	Mouse	93
Adrenaline	FF	Mouse	94
Antithrombin III	FF	Pig	95
Calcitonin	FF	Mouse	93
β-Endorphin	FF	Mouse	96
Heparin	FF	Human, mouse	97,98
Hyaluronic acid	CO	Human	99
Oxytocin	FF	Mouse	94
Peptide (8.6 kDa)	FF	Pig	21
Substance P	FF	Mouse	96

\*Of the currently identified chemoattractants, only progesterone has been shown to be present near the egg in an aspirated human egg-cumulus complex<sup>50</sup>. \*\*Substances that have been reported to cause sperm accumulation but have not been confirmed as chemoattractants. CO, cumulus oophorus; FF, follicular fluid; OF, oviductal fluid.



Probability of conception on specific days near the day of ovulation  
(from: Wilcox et al, N Engl J Med 333: 1517, 1995)

Istogramma: dati basati su 129 cicli in cui si era verificato un solo rapporto sessuale durante i 6 giorni precedenti all'ovulazione.

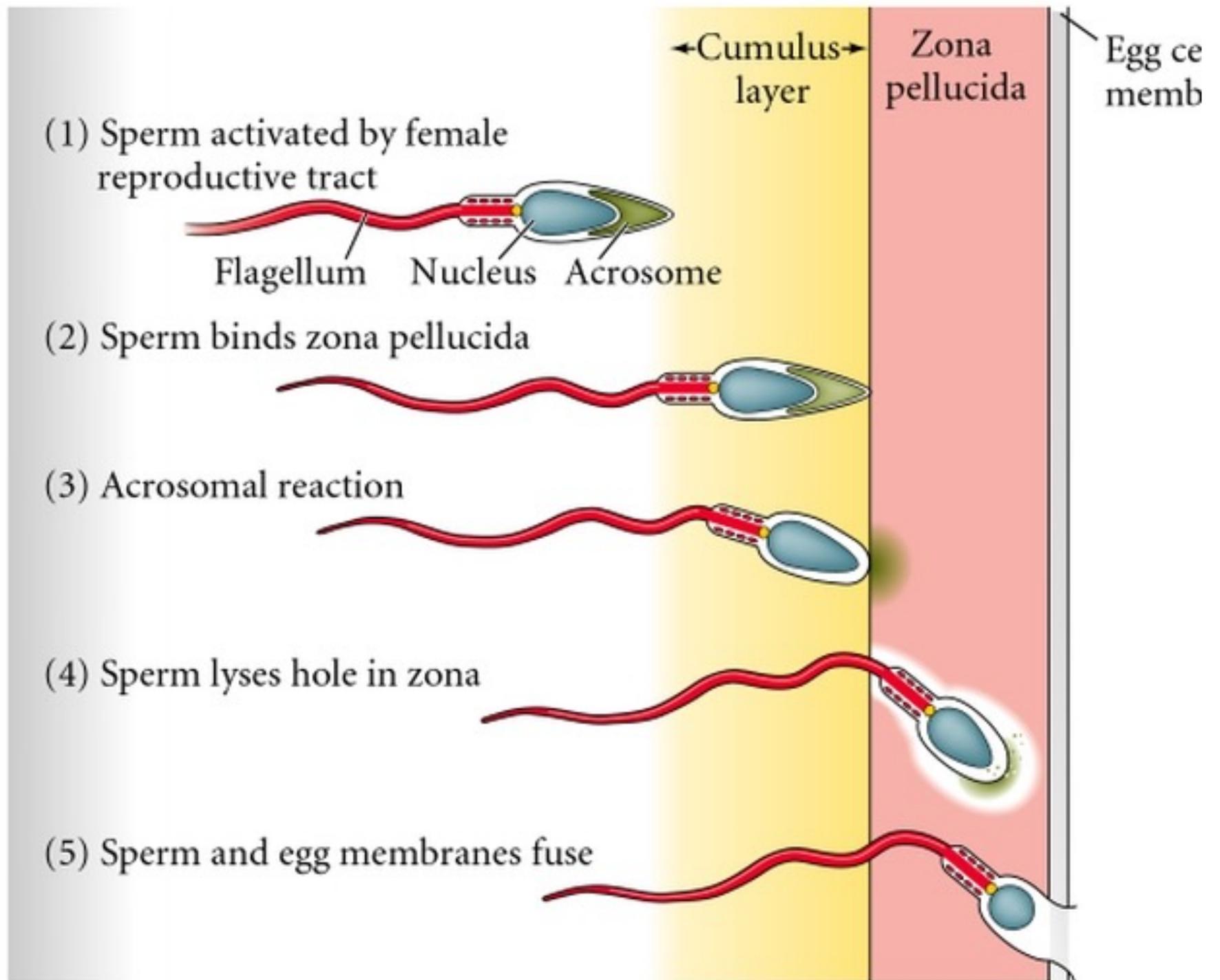
Linea continua: probabilità calcolata sulla base di tutti i cicli disponibili (625).

Gli spermatozoi hanno una vita media di 2 giorni, grazie anche alle secrezioni delle tube uterine.

Questo significa che la probabilità del concepimento è uguale nel giorno dell'ovulazione e nei due giorni immediatamente precedenti.

La probabilità di concepimento va a zero il giorno successivo all'ovulazione, perché gli spermatozoi arrivano troppo tardi.

# MOUSE



## Avvicinamento dello spermatozoo:

- Attraversamento corona raggiata
- Attraversamento della ZP

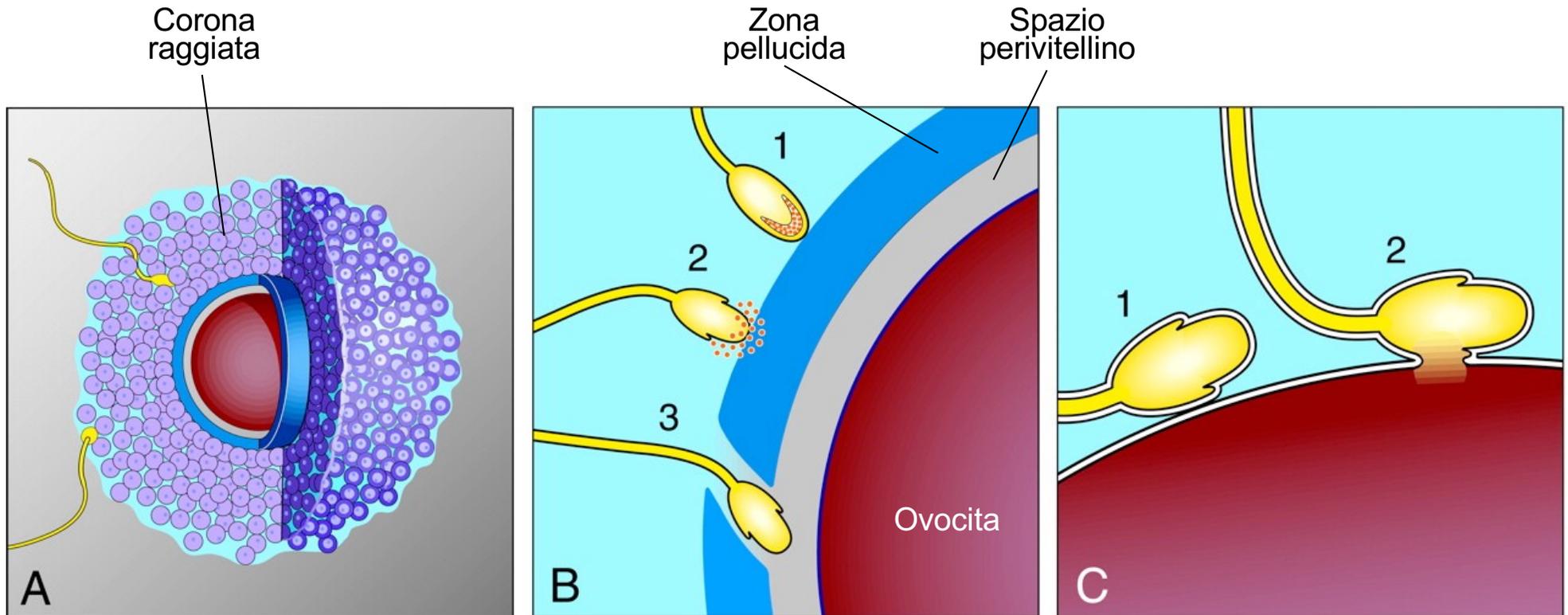
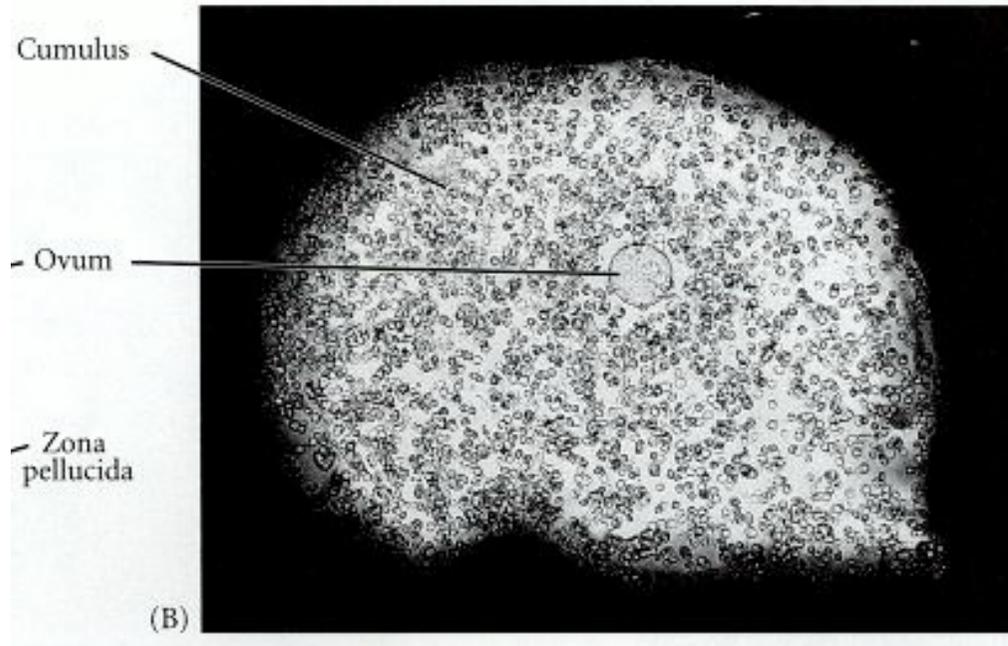
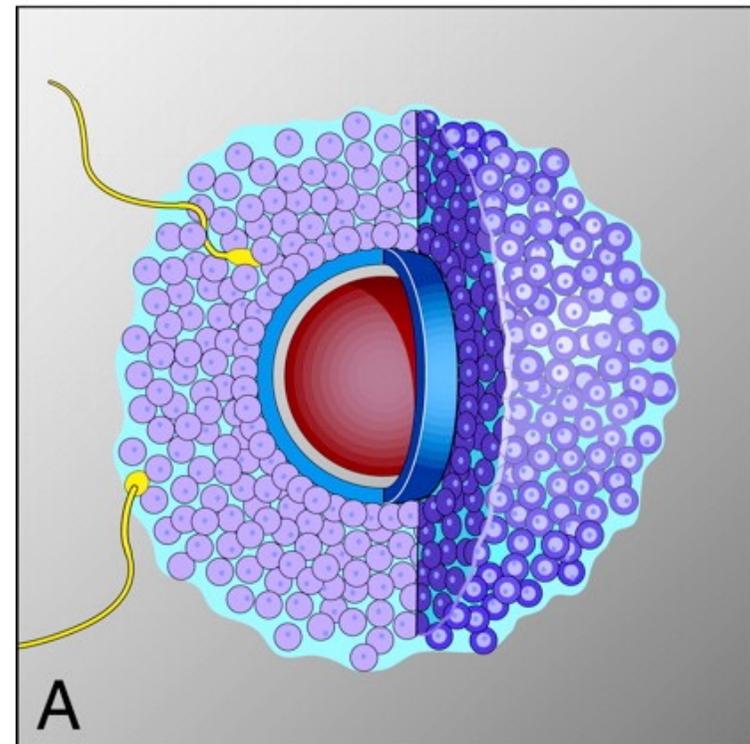
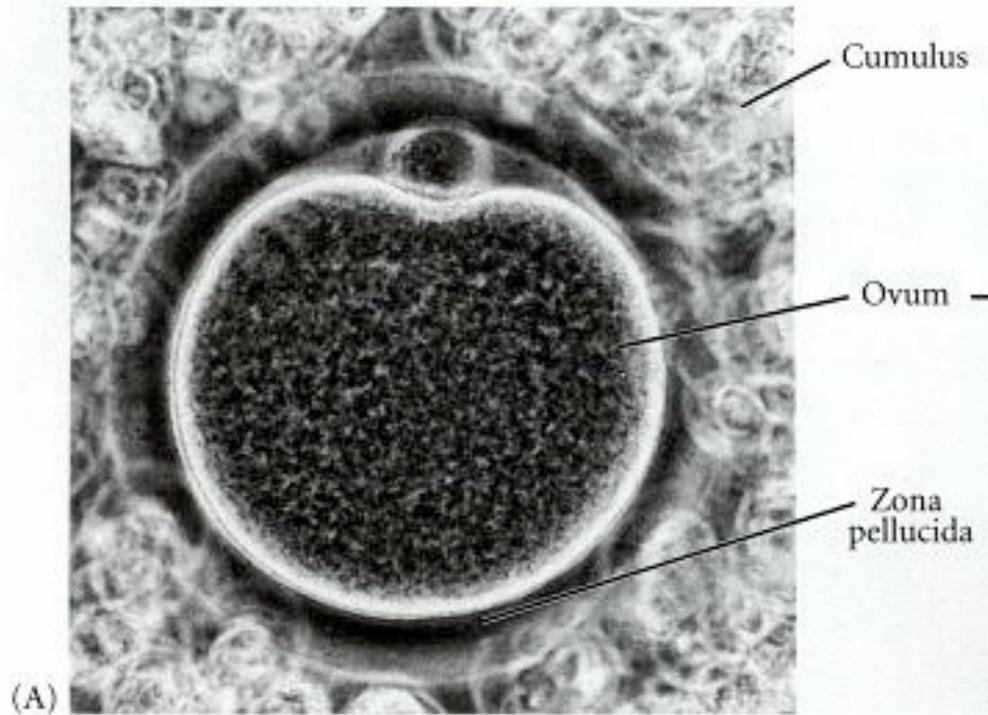


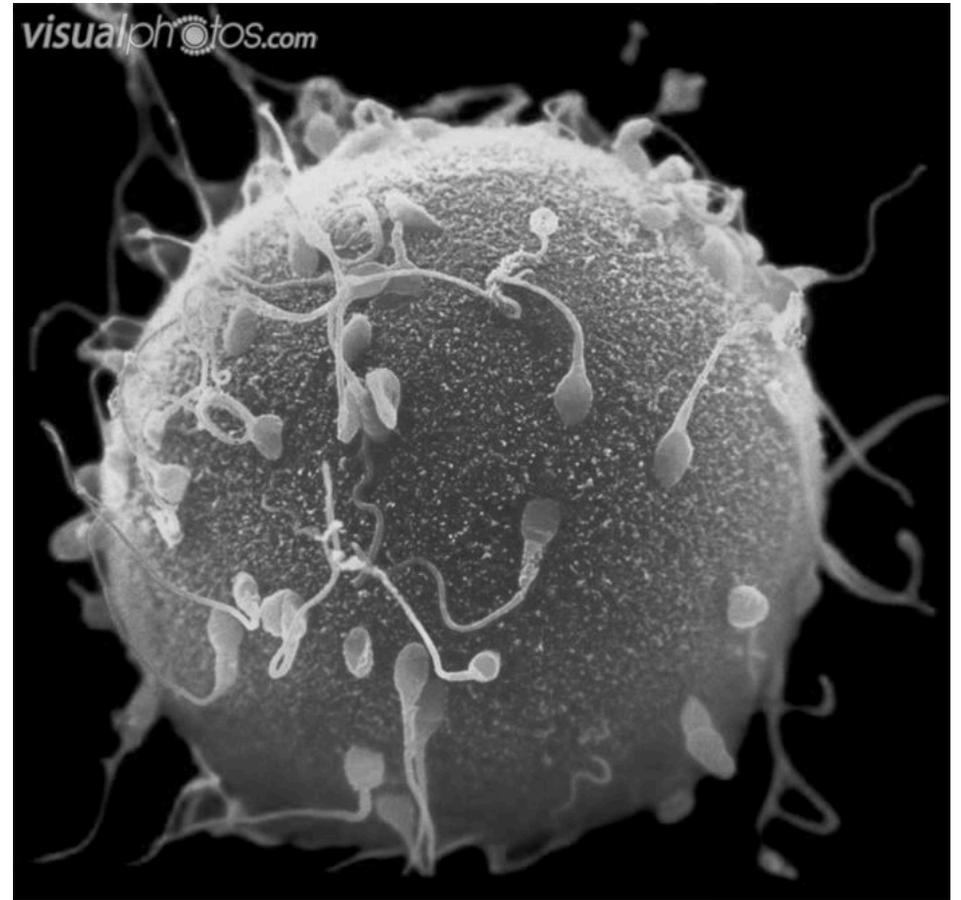
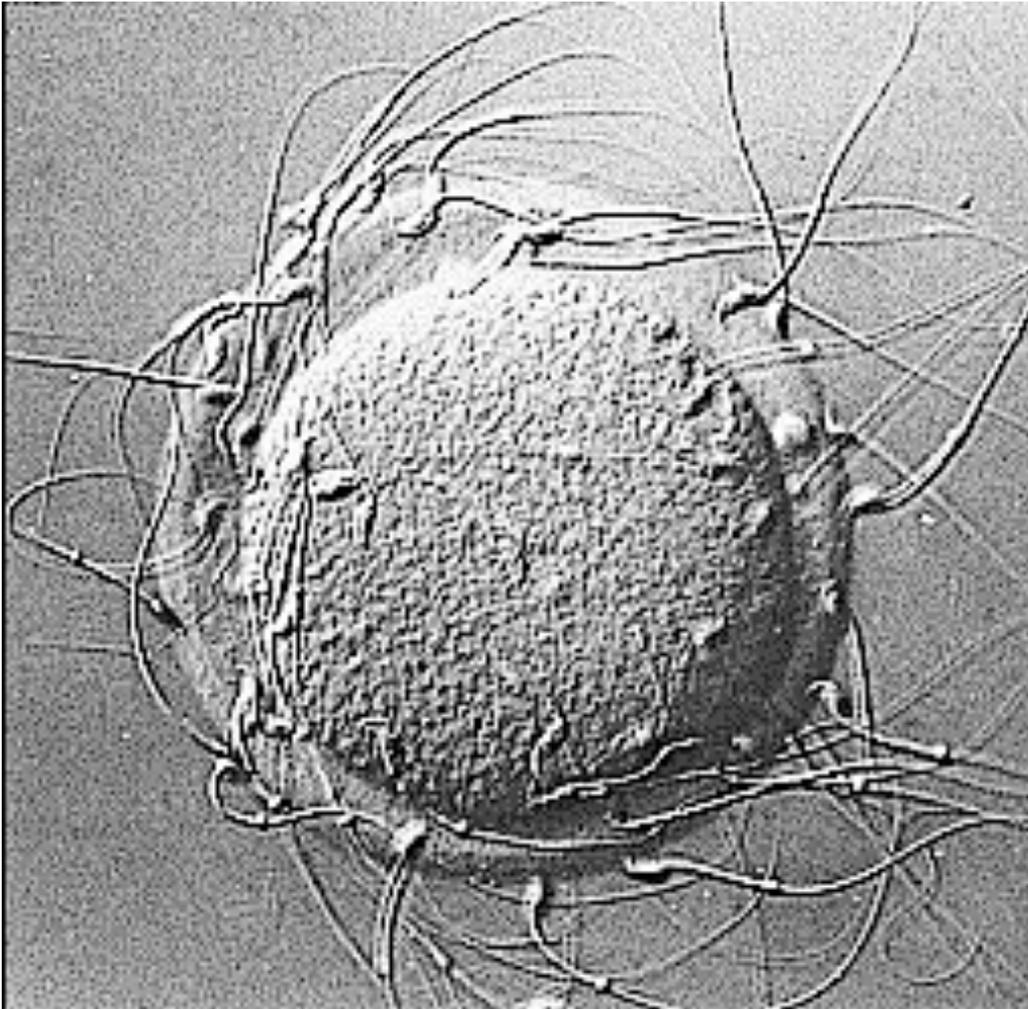
Figura 5



Gli spermatozoi penetrano all'interno della corona radiata in direzione dell'oocita secondario grazie ai **movimenti della coda** e alla presenza di **ialuronidasi** di membrana.

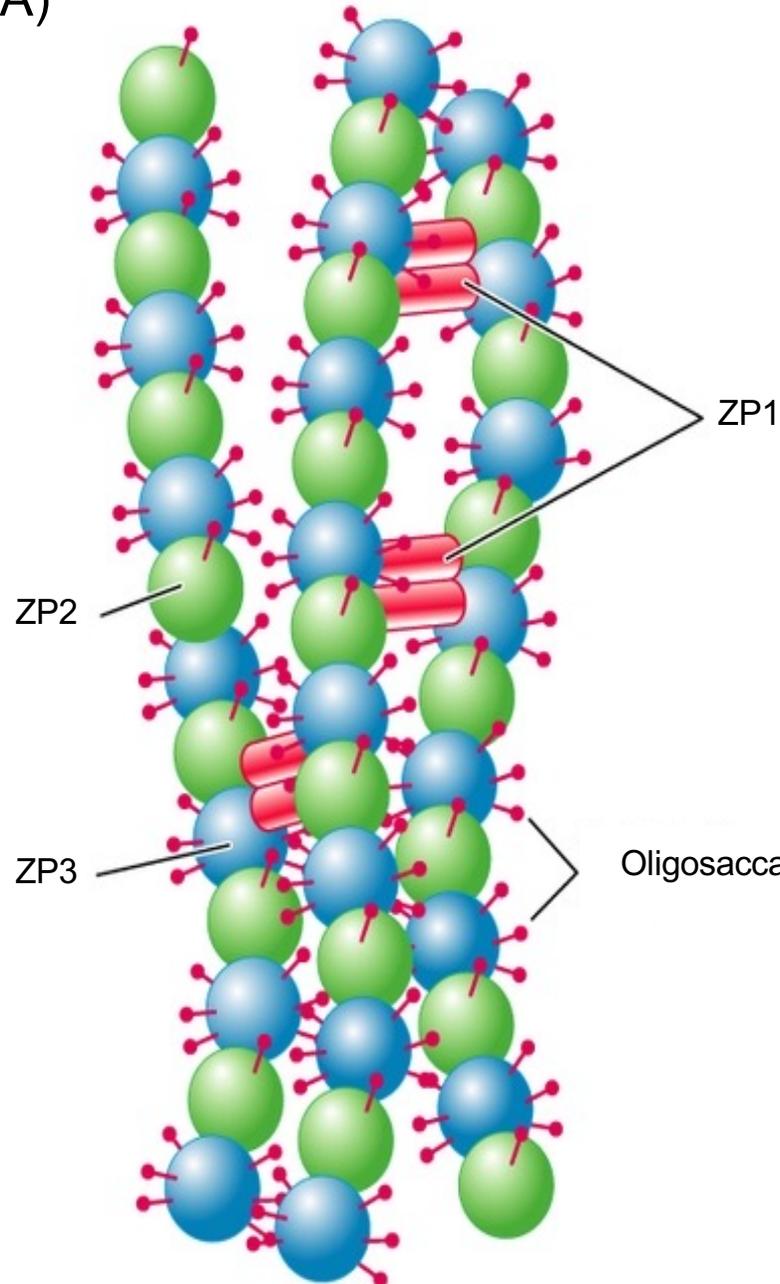


Una volta attraversata la corona radiata, gli spermatozoi aderiscono alla Zona Pellucida tramite la loro testa



P6573 [RM] © www.visualphotos.com

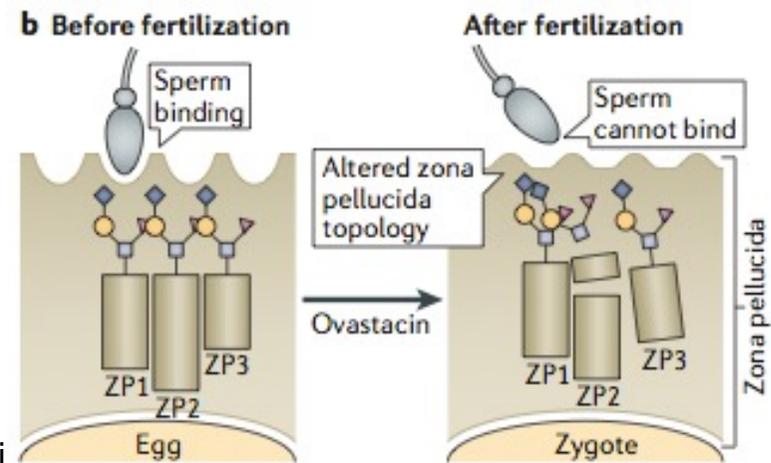
(A)



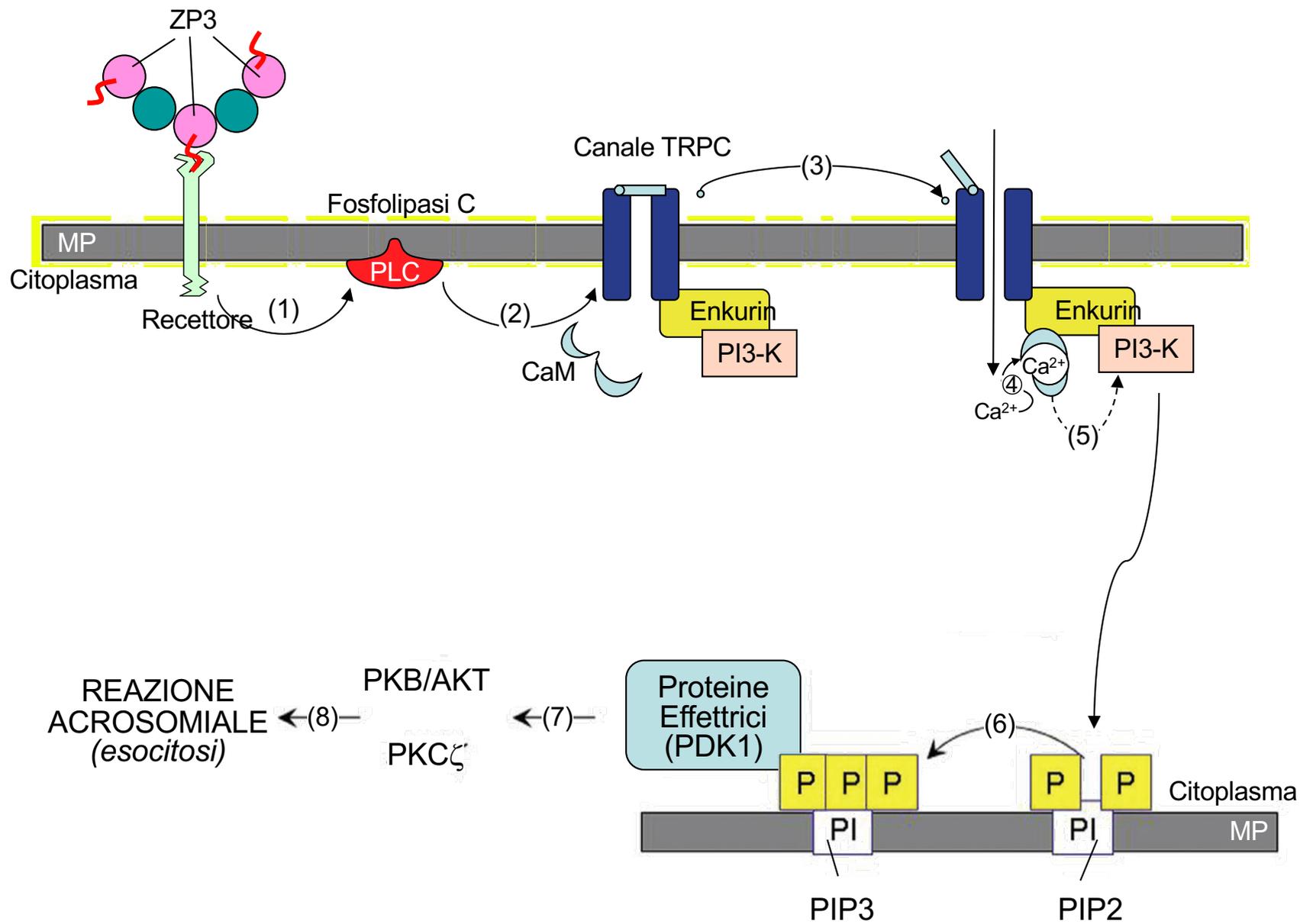
## ZONA PELLUCIDA:

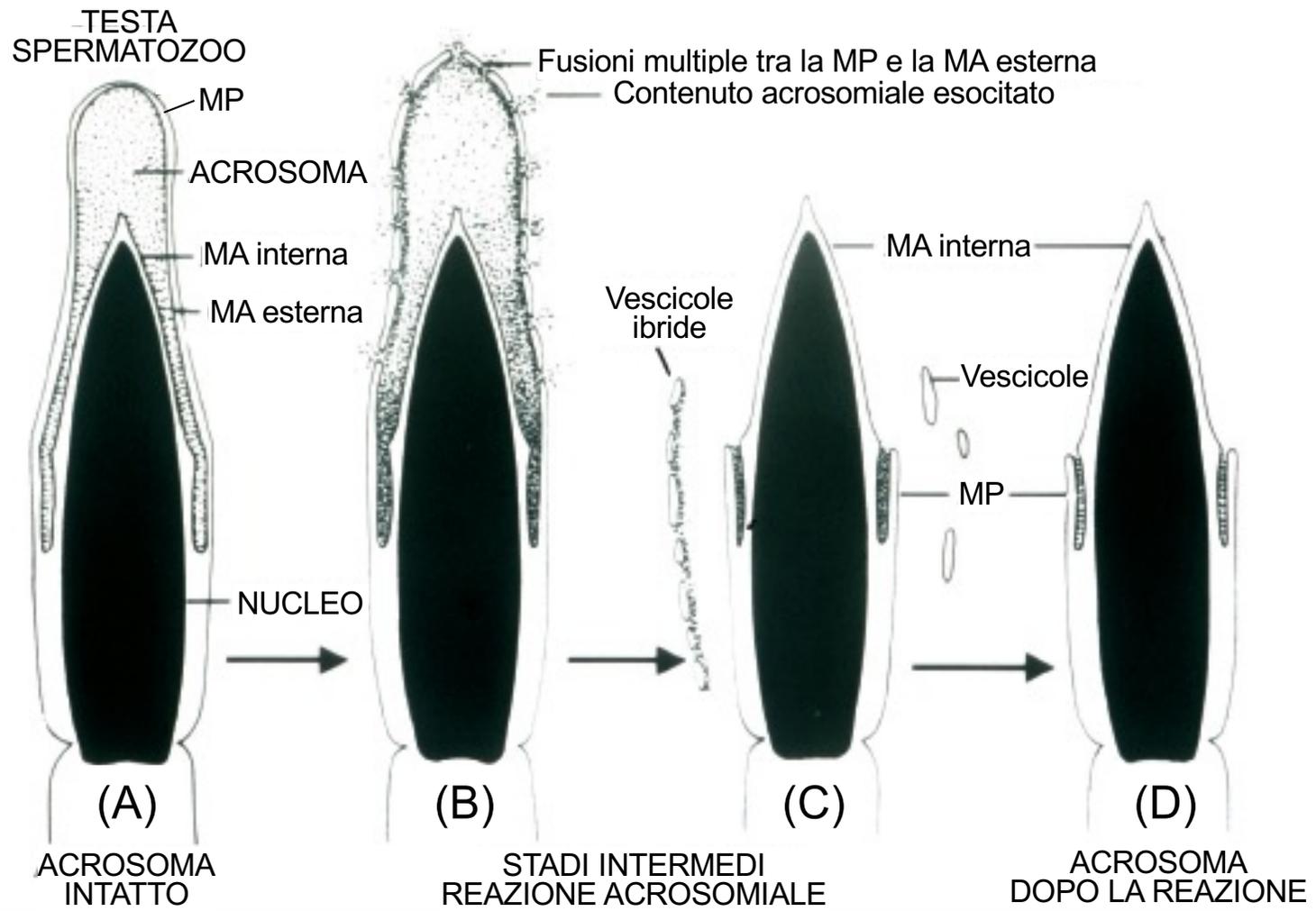
- Lega gli spermatozoi

Meccanismo non interamente noto; modello corrente basato sul riconoscimento di una struttura 3D che viene meno in seguito a taglio della ZP2 (proteasi granuli corticali)

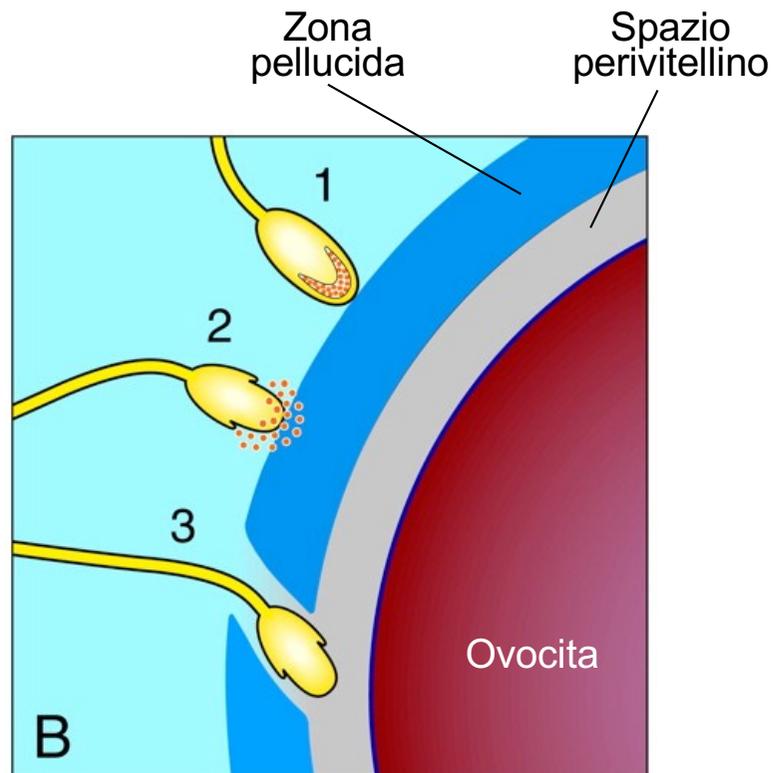


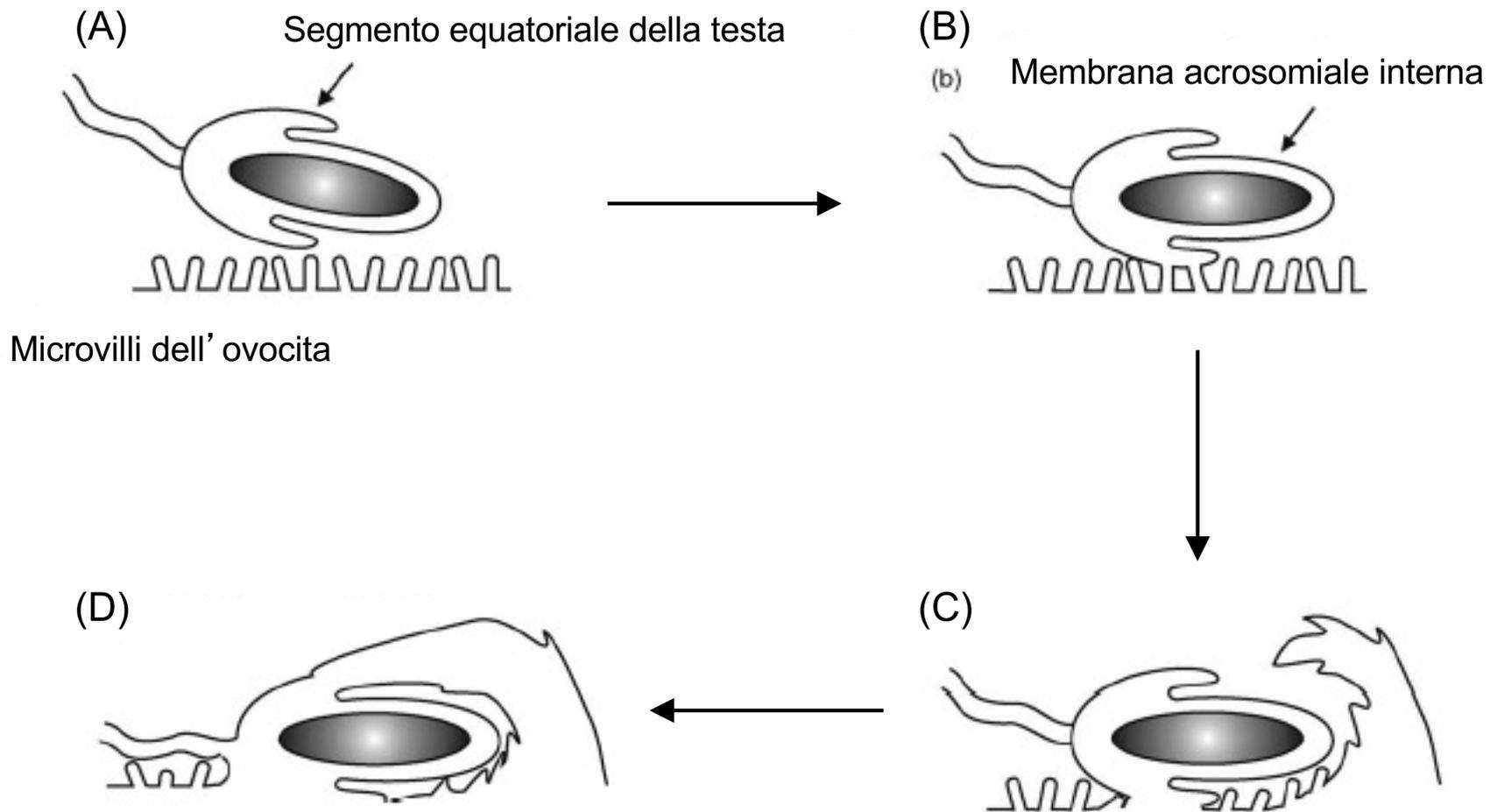
- Induce la reazione acrosomiale
- Partecipa al blocco della polispermia
- Impedisce adesione alla tuba





gli enzimi acrosomiali  
servono alla  
degradazione della ZP

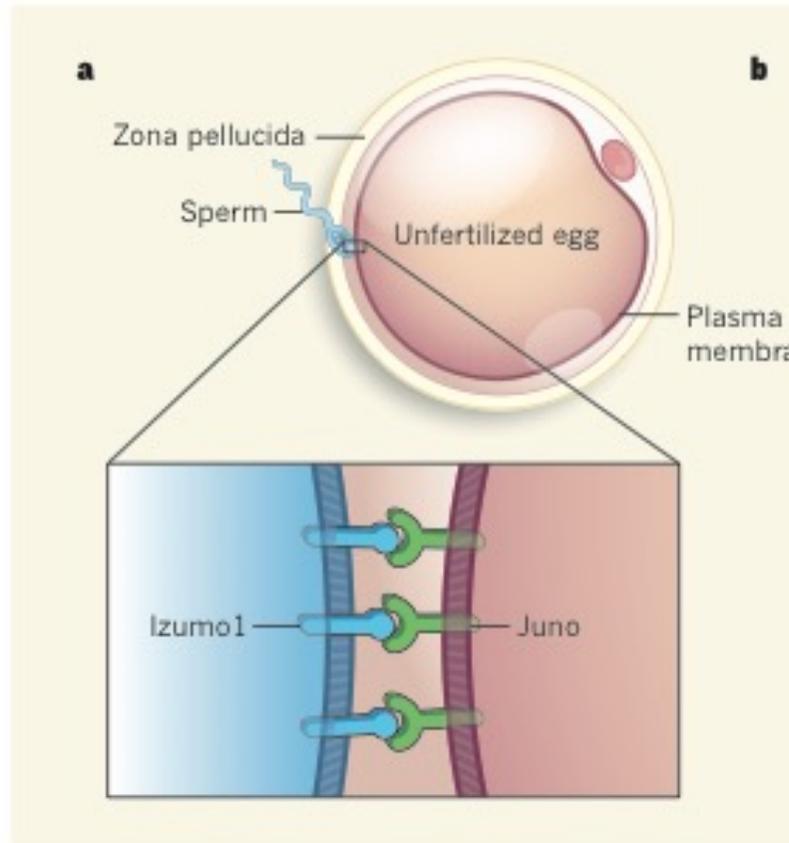




Un processo attivo di fagocitosi garantisce l'entrata nell'ovocita del centriolo paterno

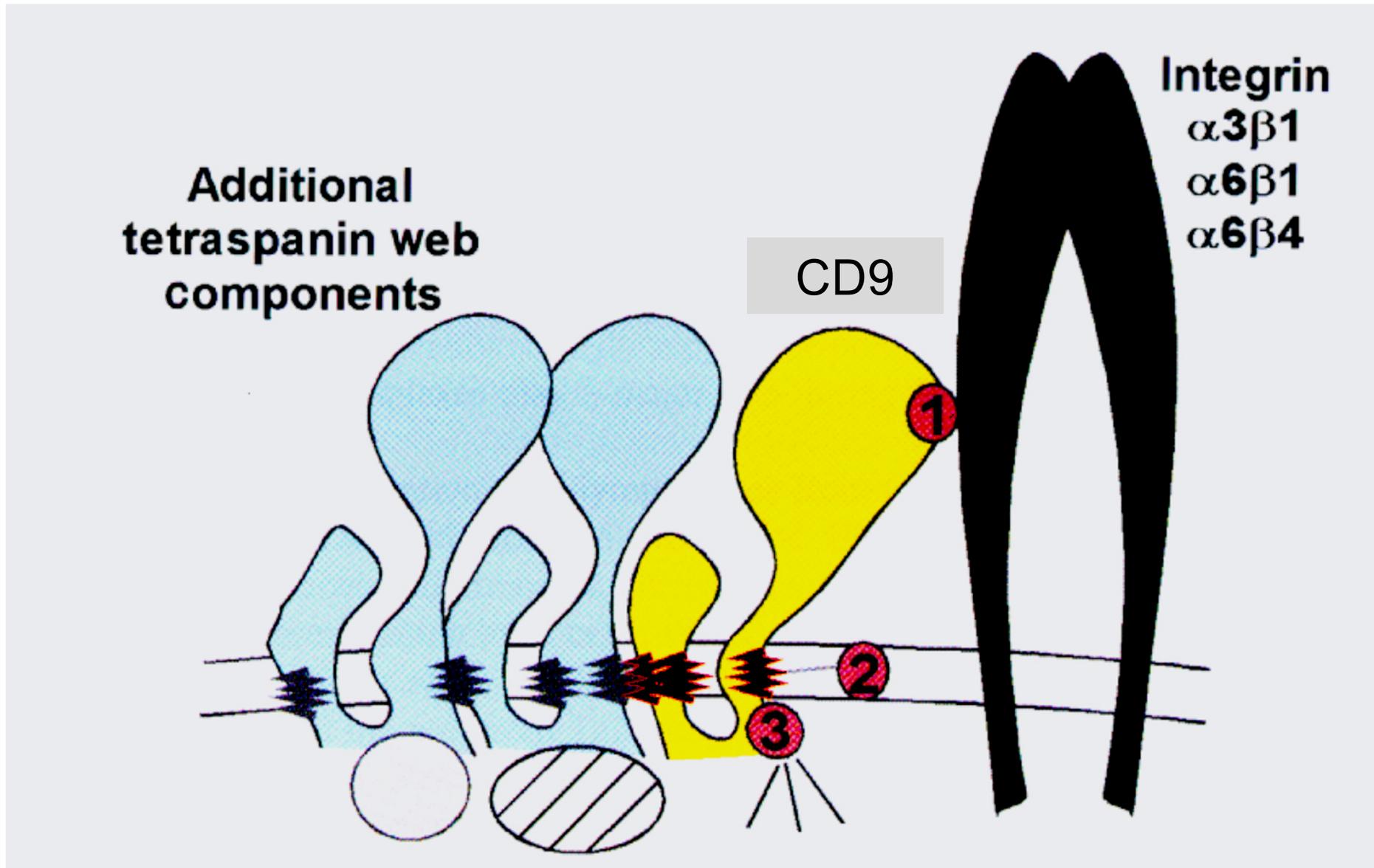
# Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization

Enrica Bianchi<sup>1</sup>, Brendan Doe<sup>2</sup>, David Goulding<sup>3</sup> & Gavin J. Wright<sup>1</sup>



**Figure 1 | An adhesion complex mediates binding of sperm to eggs.** **a**, During fertilization, a single sperm binds to the egg's membrane, which lies under an extracellular coat, the zona pellucida. Bianchi *et al.*<sup>1</sup> report that the protein Izumo1, which is tethered to the membrane of sperm, forms an adhesion complex with its receptor protein, Juno, which spans the egg's membrane. Fertilization does not take place in the absence of this complex. **b**, After fertilization, Juno is lost from the egg's membrane, exiting in extracellular vesicles, thereby preventing the binding and fusion of additional sperm (known as the block to polyspermy).

Le TETRASPANINE permettono la formazione di complessi macromolecolari sulla superficie cellulare detti TEM (Tetraspanins Enriched Microdomains)



Tetraspanina CD9 si trova sulla membrana plasmatica dell' ovocita

# **EFFETTI DELLA FECONDAZIONE SULL'OVOCITA**

## **1) Blocco della polispermia**

- Rapido**
- Reazione corticale**

## **2) Completamento della 2° divisione meiotica**

## **3) Attivazione dell'attività metabolica (trascrizione e traduzione) (geni di effetto materno e zigotici)**

## **4) Decondensazione dei cromosomi dello spermatozoo e formazione dei pronuclei**

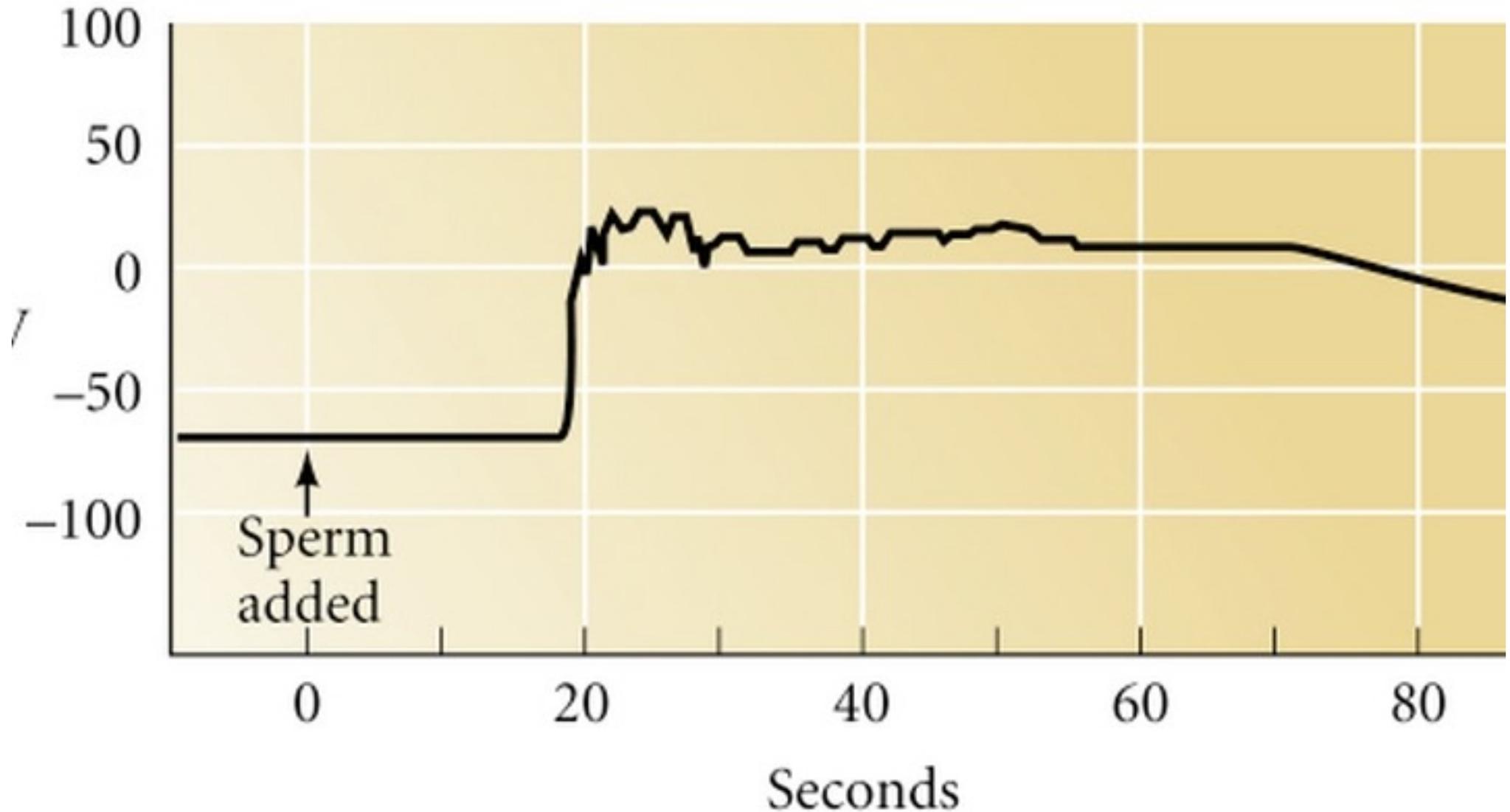
## **5) Definizione del sesso genetico**

## **6) Cancellazione delle modificazioni epigenetiche della cromatina**

## Eventi che seguono la fecondazione (riccio di mare)

EVENTO	TEMPO	MEDIATORE
Depolarizzazione oolemma	< 5 sec	Aumento permeabilità del Na <sup>+</sup>
Idrolisi di PIns4,5P	< 10 sec	Attivazione fosfolipasi C
Aumento [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>c</sub>	10-40 sec	PIns4,5P
Esocitosi granuli corticali	10-50 sec	Aumento [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>c</sub>
Aumento pH intracellulare	60 sec	Attivazione antiporto Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> da parte di PK-C
Decondensazione nucleo spermatozoo	2-12 min	Aumento [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>c</sub> e pH intracellulare
Aumento sintesi proteica	8 min	Aumento [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>c</sub> e pH intracellulare
Fusione pronuclei	30 min	Aumento [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>c</sub> e pH intracellulare
Replicazione DNA	20-40 min	Aumento [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>c</sub> e pH intracellulare
Completamento 2° divisione meiotica nei mammiferi		Aumento [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>c</sub> e pH intracellulare

# L'entrata dello sperma causa una velocissima depolarizzazione della membrana



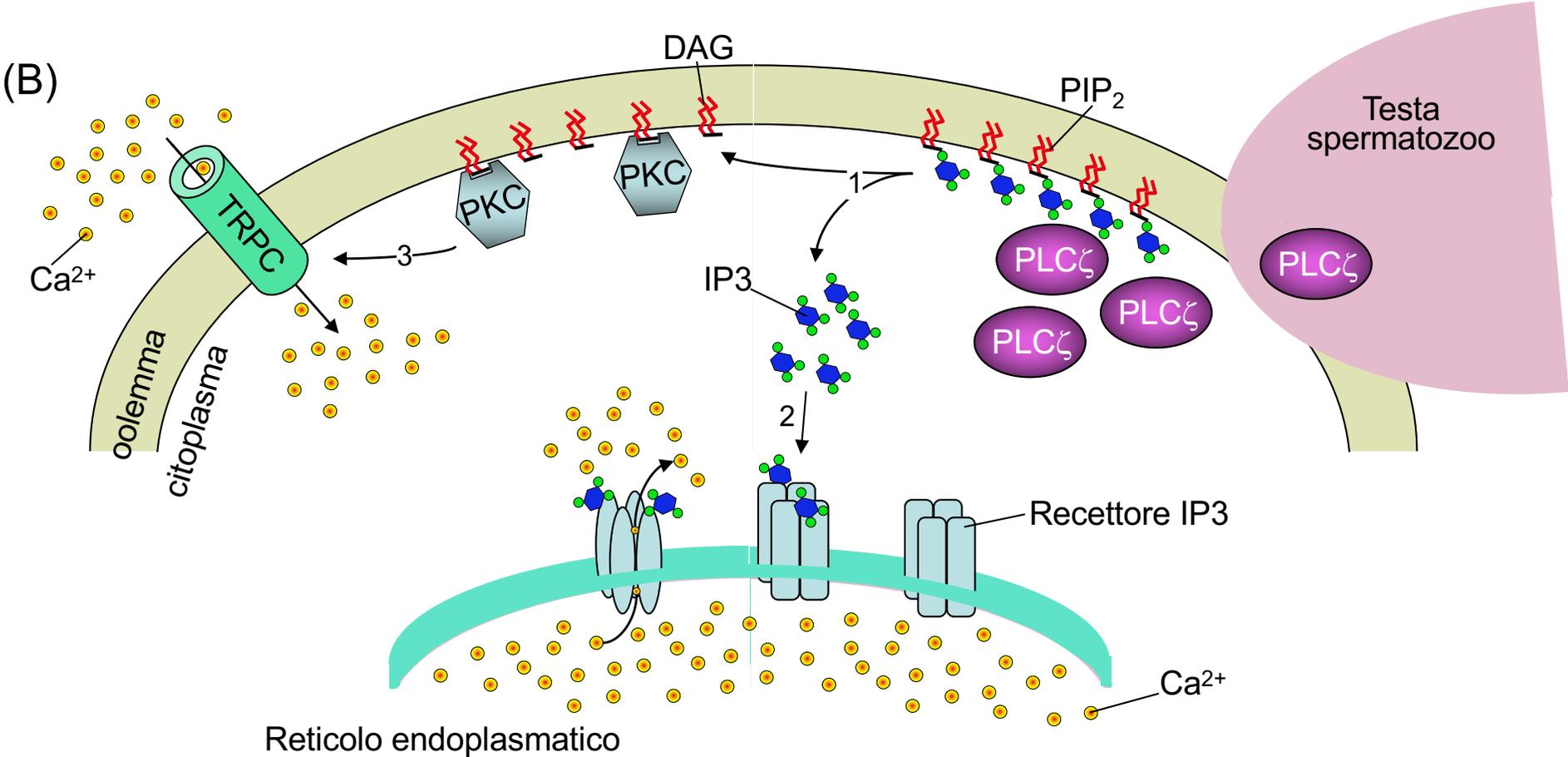
Gli spermatozoi non sono in grado di fondersi ad una cellula depolarizzata: blocco veloce della polispermia

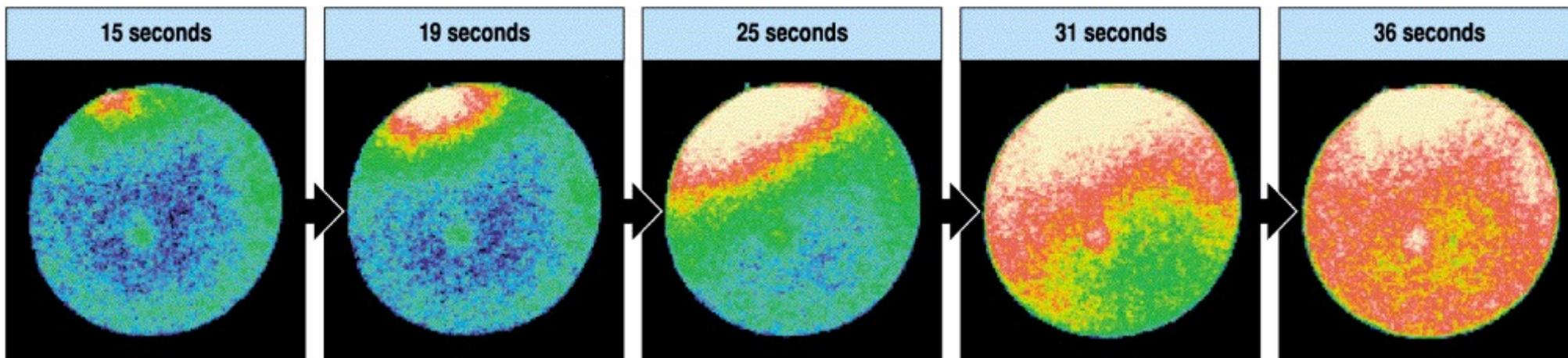
Non è noto il meccanismo del blocco veloce della

## Eventi che seguono la fecondazione (riccio di mare)

EVENTO	TEMPO	MEDIATORE
Depolarizzazione oolemma	< 5 sec	Aumento permeabilità del Na <sup>+</sup>
Idrolisi di PIns4,5P	< 10 sec	Attivazione fosfolipasi C
Aumento [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>c</sub>	10-40 sec	PIns4,5P
Esocitosi granuli corticali	10-50 sec	Aumento [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>c</sub>
Aumento pH intracellulare	60 sec	Attivazione antiporto Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> da parte di PK-C
Decondensazione nucleo spermatozoo	2-12 min	Aumento [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>c</sub> e pH intracellulare
Aumento sintesi proteica	8 min	Aumento [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>c</sub> e pH intracellulare
Fusione pronuclei	30 min	Aumento [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>c</sub> e pH intracellulare
Replicazione DNA	20-40 min	Aumento [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>c</sub> e pH intracellulare
Completamento 2° divisione meiotica nei mammiferi		Aumento [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>c</sub> e pH intracellulare

L'entrata dello spermatozoo produce un aumento della concentrazione del calcio citoplasmico





# Oscillazioni del $\text{Ca}^{2+}$ sono necessarie a coordinare gli eventi successivi alla fecondazione.

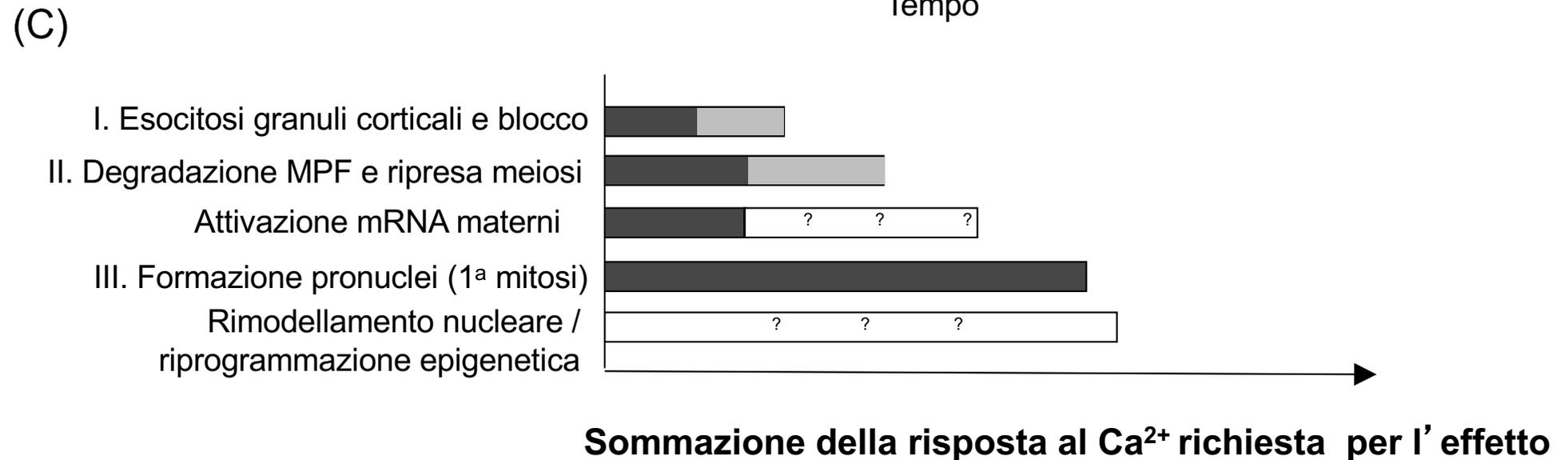
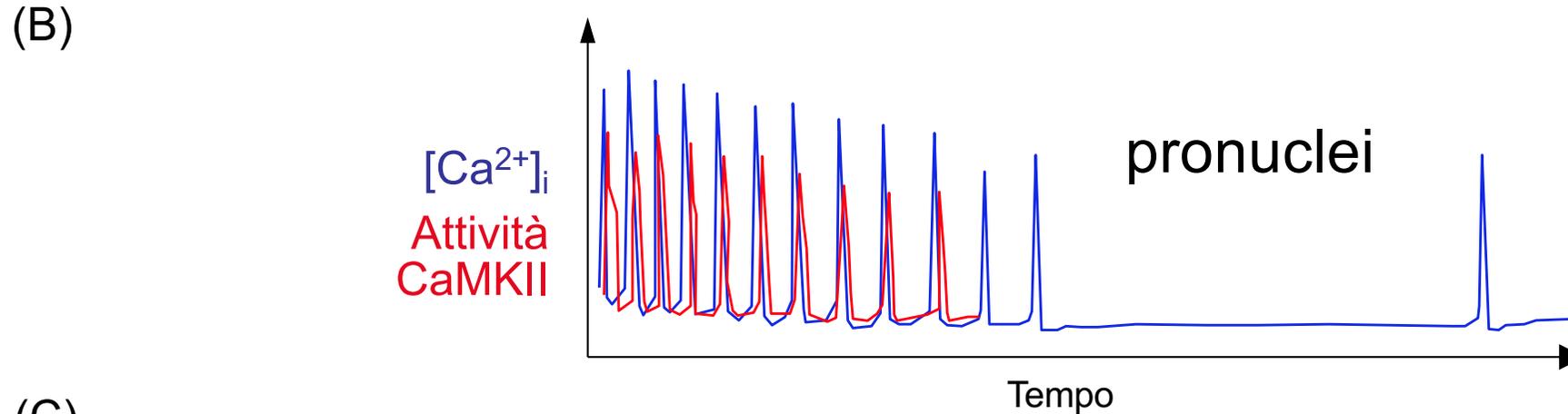
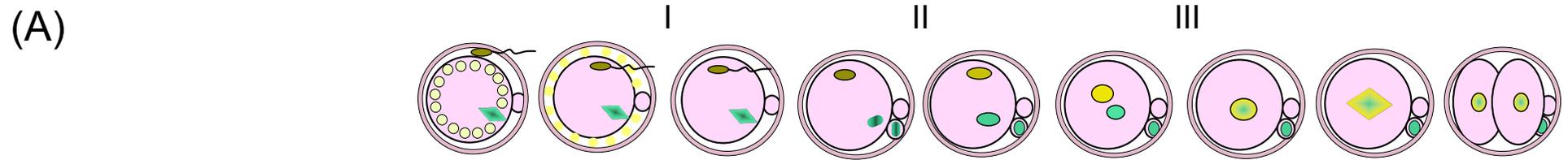


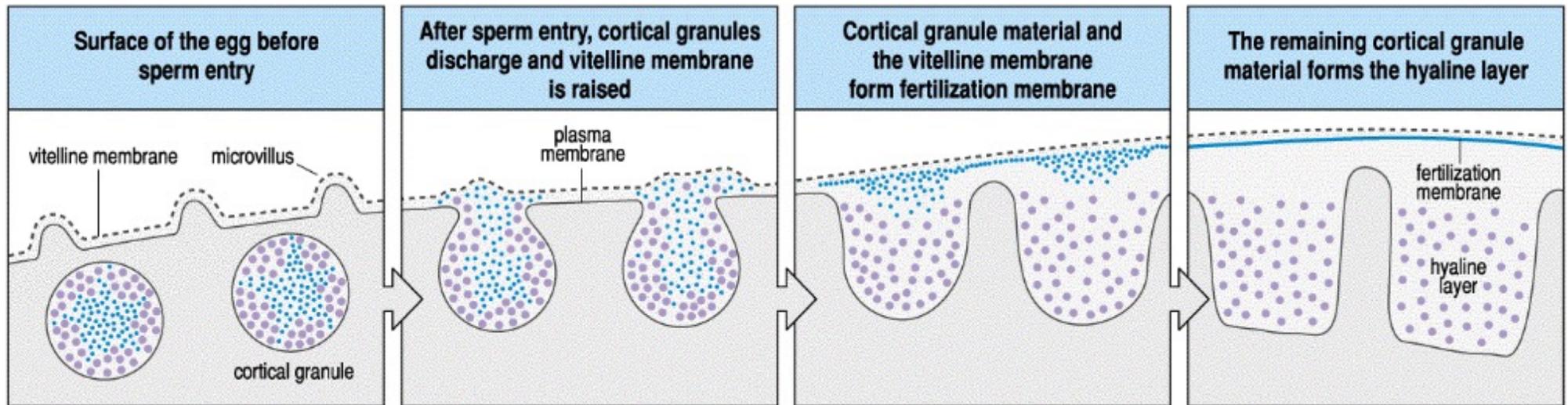
Figura 13

## Eventi che seguono la fecondazione (riccio di mare)

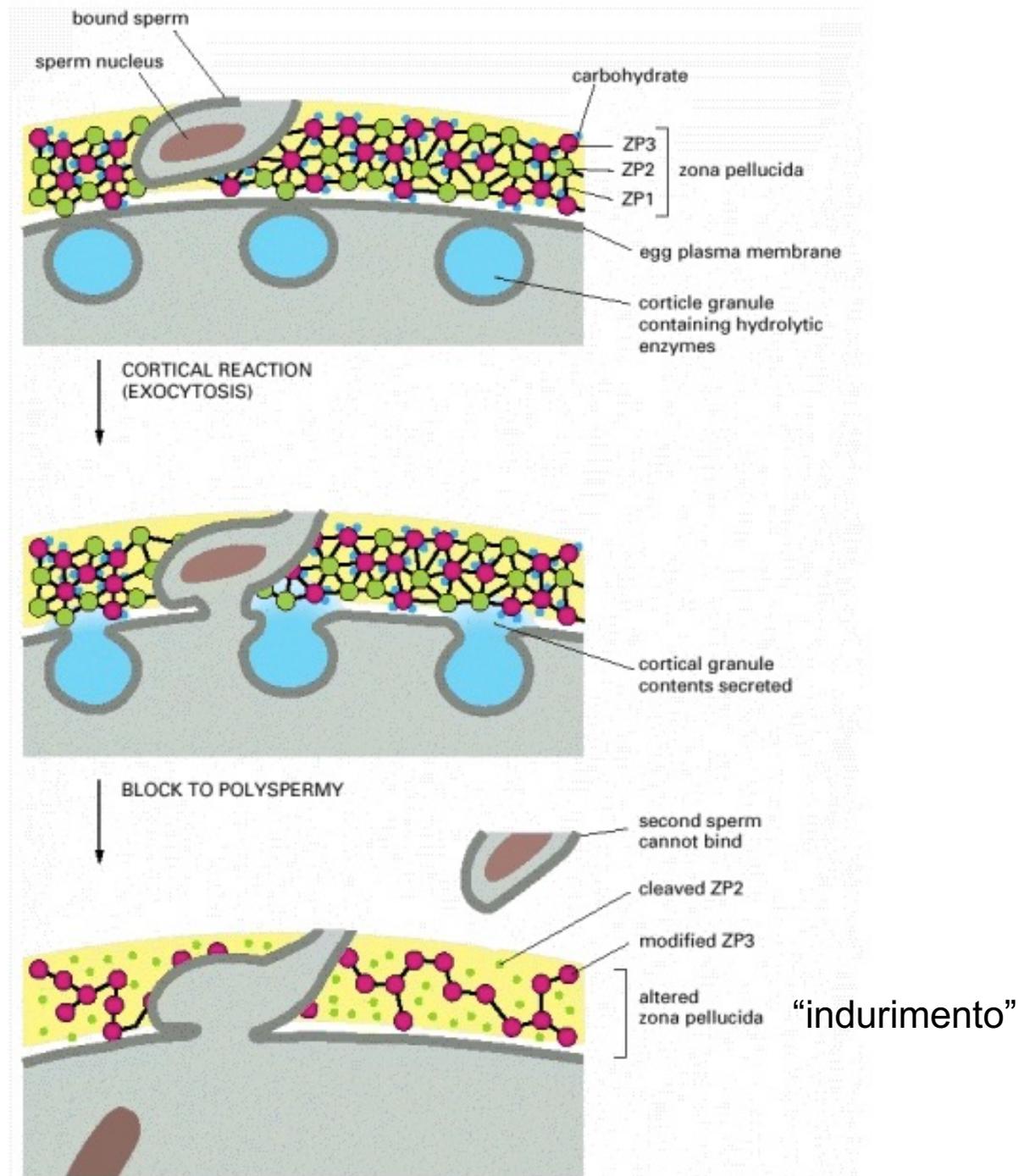
EVENTO	TEMPO	MEDIATORE
Depolarizzazione oolemma	< 5 sec	Aumento permeabilità del Na <sup>+</sup>
Idrolisi di PIns4,5P	< 10 sec	Attivazione fosfolipasi C
Aumento [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>c</sub>	10-40 sec	PIns4,5P
Esocitosi granuli corticali	10-50 sec	Aumento [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>c</sub>
Aumento pH intracellulare	60 sec	Attivazione antiporto Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> da parte di PK-C
Decondensazione nucleo spermatozoo	2-12 min	Aumento [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>c</sub> e pH intracellulare
Aumento sintesi proteica	8 min	Aumento [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>c</sub> e pH intracellulare
Fusione pronuclei	30 min	Aumento [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>c</sub> e pH intracellulare
Replicazione DNA	20-40 min	Aumento [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>c</sub> e pH intracellulare
Completamento 2° divisione meiotica nei mammiferi		Aumento [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>c</sub> e pH intracellulare

# Il blocco tardivo della polispermia: la reazione corticale

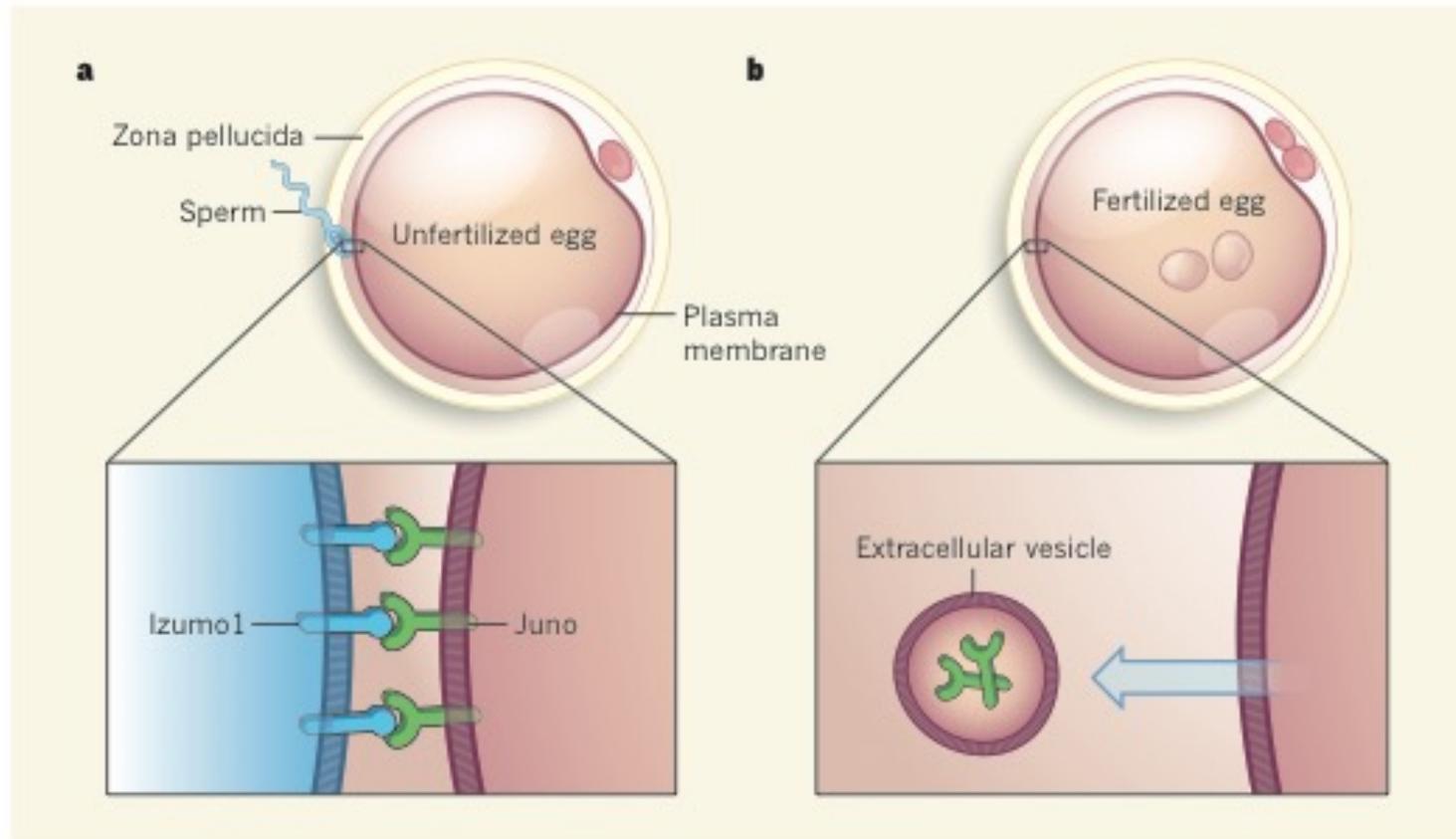
L'aumento dei livelli di  $\text{Ca}^{2+}$  nel citosol dell'ocita porta alla secrezione dei granuli corticali, che così rilasciano gli enzimi in essi contenuti verso la Zona Pellucida.



# La reazione corticale induce un “indurimento” della ZP



Un secondo meccanismo è basato sulla eliminazione tramite esocitosi dei recettori per il legame dello sperma

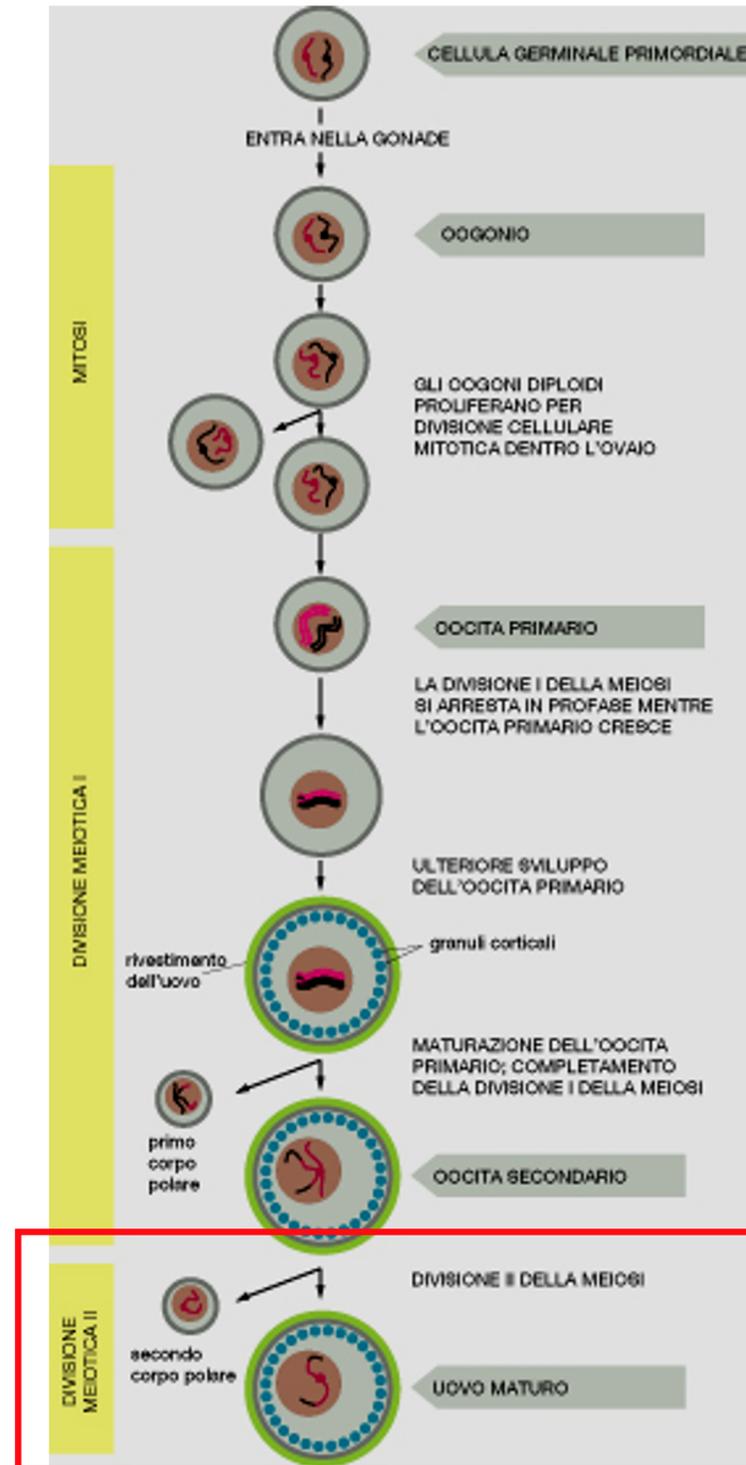


**Figure 1 | An adhesion complex mediates binding of sperm to eggs.** **a**, During fertilization, a single sperm binds to the egg's membrane, which lies under an extracellular coat, the zona pellucida. Bianchi *et al.*<sup>1</sup> report that the protein Izumo1, which is tethered to the membrane of sperm, forms an adhesion complex with its receptor protein, Juno, which spans the egg's membrane. Fertilization does not take place in the absence of this complex. **b**, After fertilization, Juno is lost from the egg's membrane, exiting in extracellular vesicles, thereby preventing the binding and fusion of additional sperm (known as the block to polyspermy).

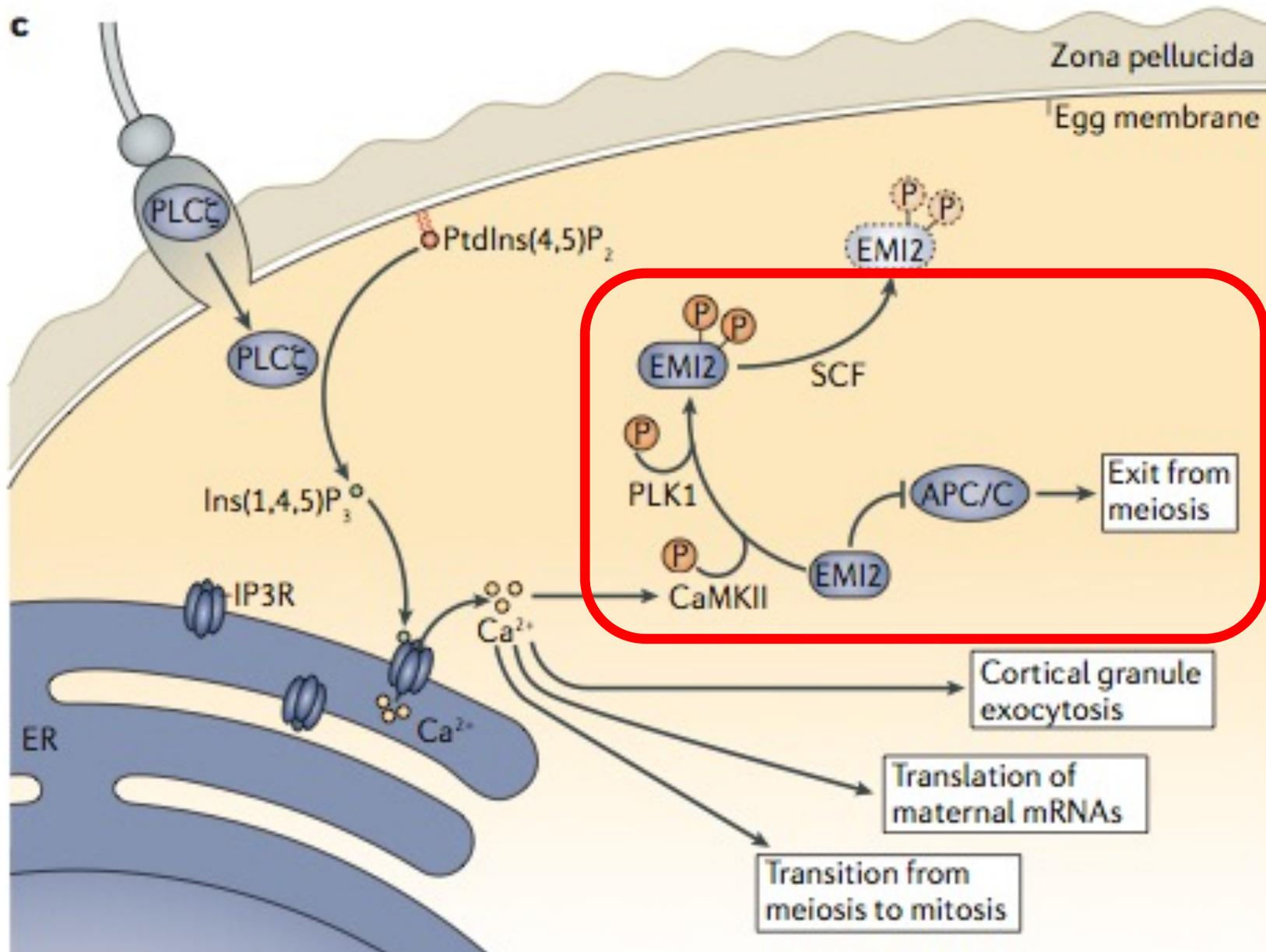
## Eventi che seguono la fecondazione (riccio di mare)

EVENTO	TEMPO	MEDIATORE
Depolarizzazione oolemma	< 5 sec	Aumento permeabilità del Na <sup>+</sup>
Idrolisi di PIns4,5P	< 10 sec	Attivazione fosfolipasi C
Aumento [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>c</sub>	10-40 sec	PIns4,5P
Esocitosi granuli corticali	10-50 sec	Aumento [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>c</sub>
Aumento pH intracellulare	60 sec	Attivazione antiporto Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> da parte di PK-C
Decondensazione nucleo spermatozoo	2-12 min	Aumento [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>c</sub> e pH intracellulare
Aumento sintesi proteica	8 min	Aumento [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>c</sub> e pH intracellulare
Fusione pronuclei	30 min	Aumento [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>c</sub> e pH intracellulare
Replicazione DNA	20-40 min	Aumento [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>c</sub> e pH intracellulare
Completamento 2° divisione meiotica nei mammiferi		Aumento [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>c</sub> e pH intracellulare

# IL COMPLETAMENTO DELLA MEIOSI : DA OOCITA AD UOVO



Per effetto delle oscillazioni del calcio riparte la seconda divisione meiotica dell'oocita secondario.

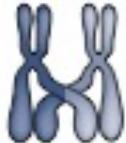


**b**



Prophase arrest

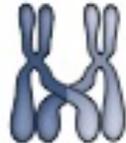
4n



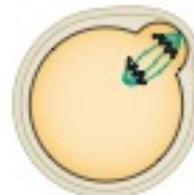
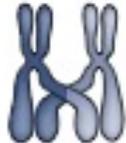
Homologous chromosome recombination



Spindle assembly



Spindle relocation



First polar body extrusion

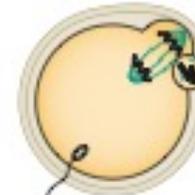


Homologous chromosome segregation



Metaphase II arrest

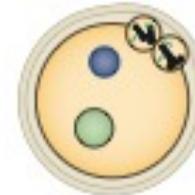
2n



Second polar body extrusion



Sister chromatid segregation

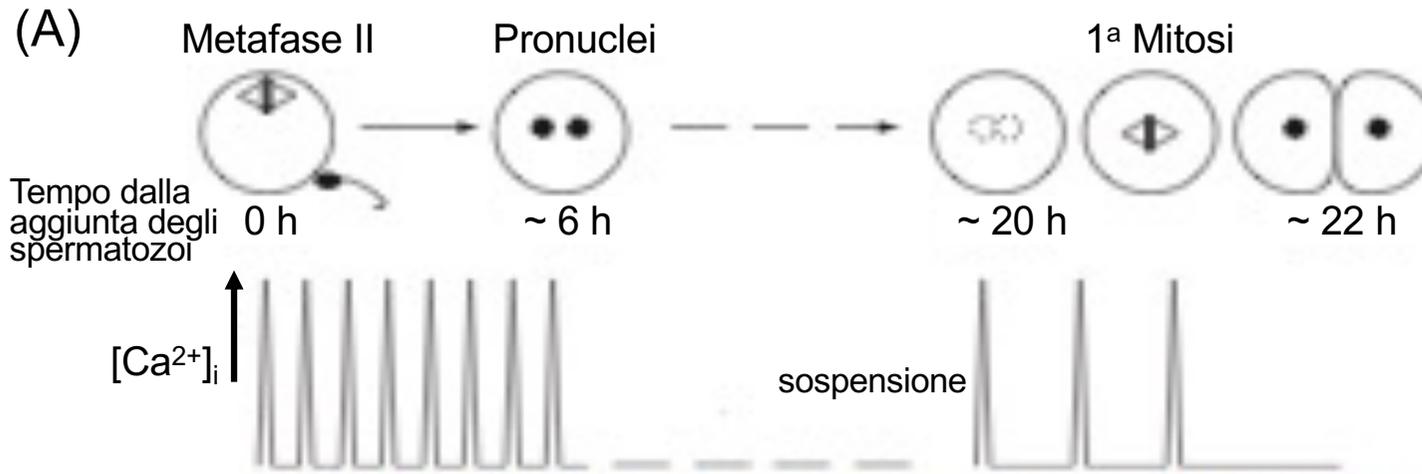


Pronuclei formation

1n



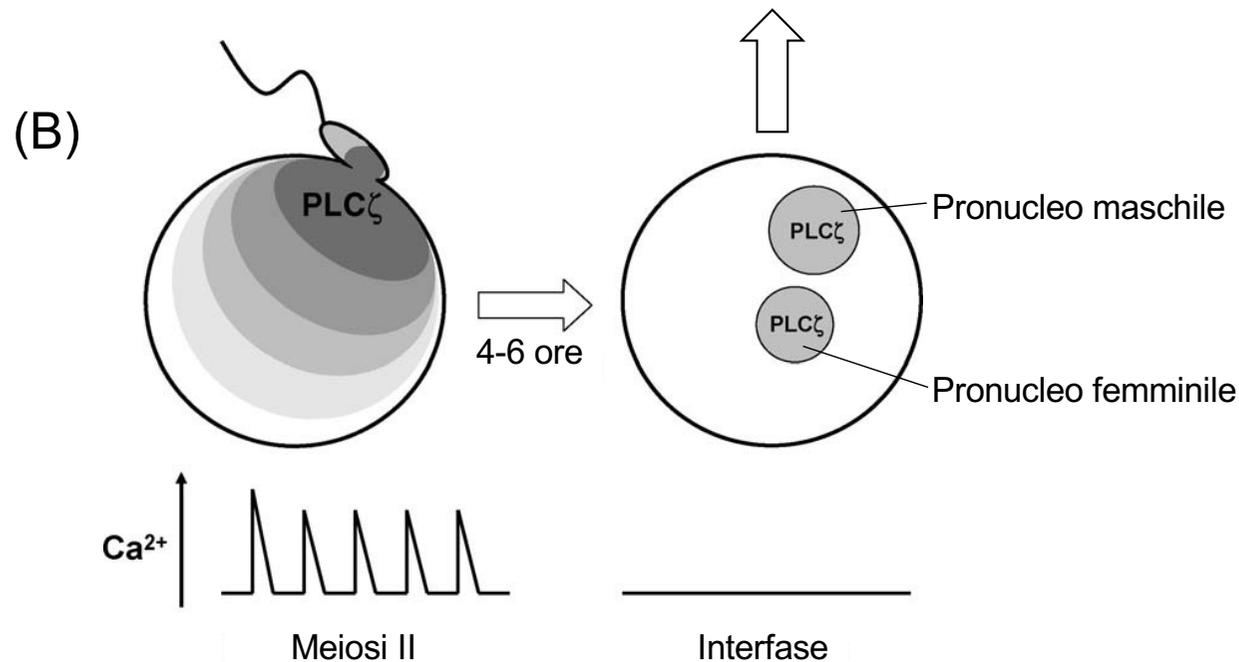
Haploid pronuclei

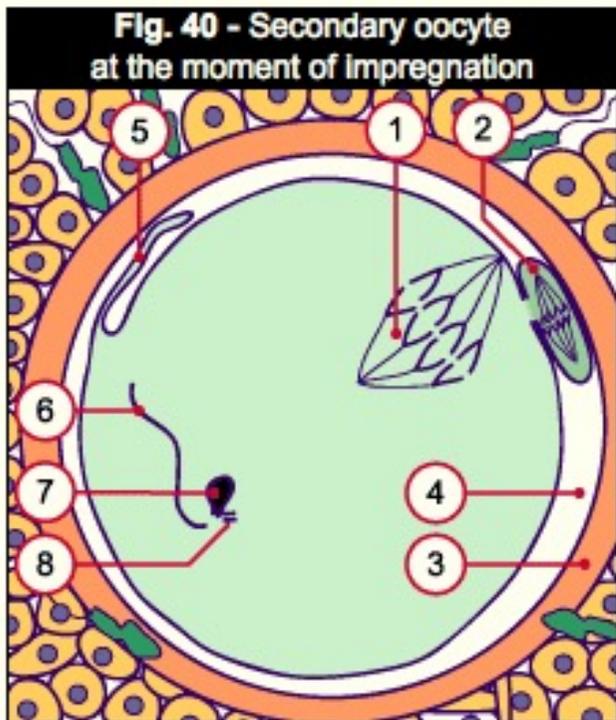


la formazione dei pronuclei "intrappola" la PLC e sospende il rilascio di  $Ca^{2+}$

avviene la fase S

con la dissoluzione dei pronuclei (fase M), la PLC è di nuovo libera e riparte l'aumento ciclico del  $Ca^{2+}$





- 1 Mitotic spindle with chromatids
- 2 1st polar body
- 3 Pellucid zone
- 4 Perivitelline space
- 5 Cell membrane of the spermatozoon (Remainder as appendage)
- 6 Kinocillium
- 7 Nucleus (compact) of the spermatozoon
- 8 Proximal centrosome of the spermatozoon

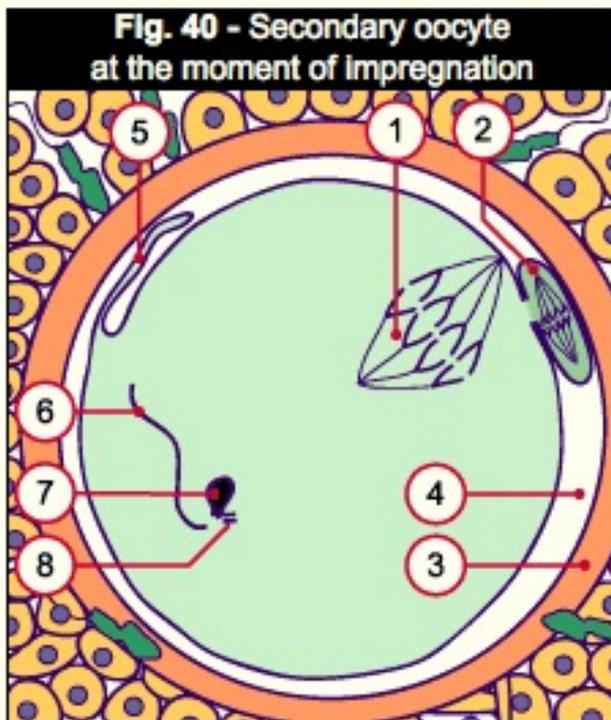


L'ocita svolge le fasi terminali della meiosi in assenza di centrioli propriamente detti

Il fuso si forma in posizione eccentrica, nelle vicinanze del primo corpuscolo polare. A volte anche il primo corpuscolo polare va incontro a divisione.

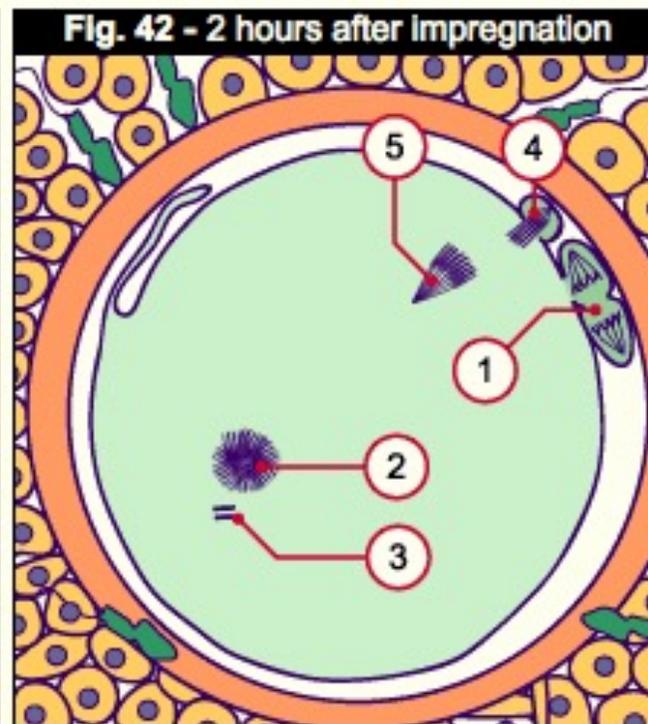
Il nucleo, il centriolo figlia, il corpo basale (centriolo madre) e parte dell'assonema dello spermatozoo vengono completamente inglobati dall'ocita.

Nella stragrande maggioranza dei casi i mitocondri degli spermatozoi vengono degradati: i mitocondri dello zigote derivano solo da quelli dell'ocita secondario



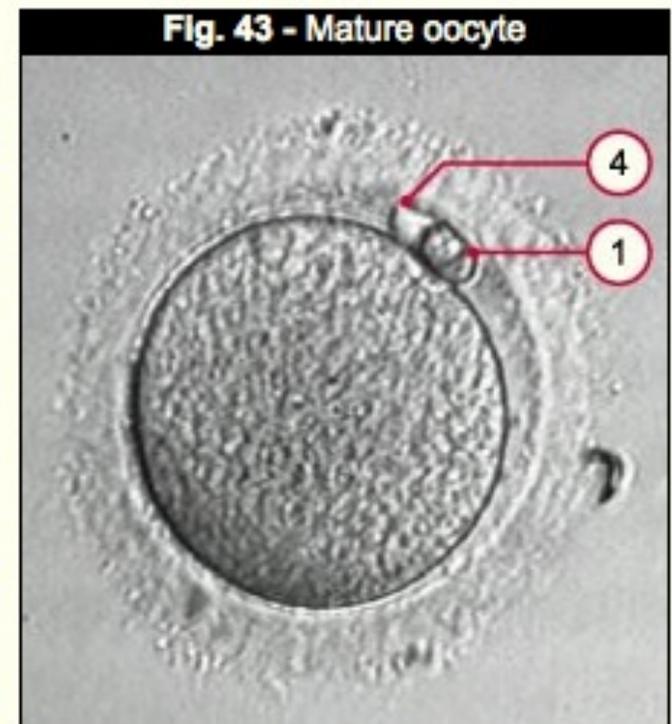
**Fig. 40 - Secondary oocyte at the moment of impregnation**

- 1 Mitotic spindle with chromatids
- 2 1st polar body
- 3 Pellucid zone
- 4 Perivitelline space
- 5 Cell membrane of the spermatozoon (Remainder as appendage)
- 6 Kinocillium
- 7 Nucleus (compact) of the



**Fig. 42 - 2 hours after impregnation**

- 1 1st polar body
- 2 Nucleus (slightly unpacked) of the spermatozoon
- 3 Proximal centrosome of the spermatozoon
- 4 2nd polar body (being formed)
- 5 Remainder of the mitotic spindle with maternal chromosomes 1n,1C

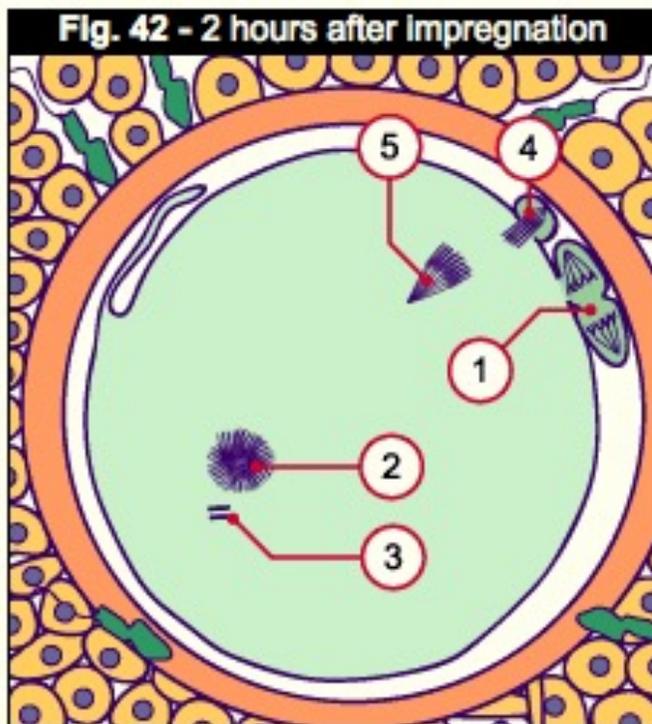


**Fig. 43 - Mature oocyte**

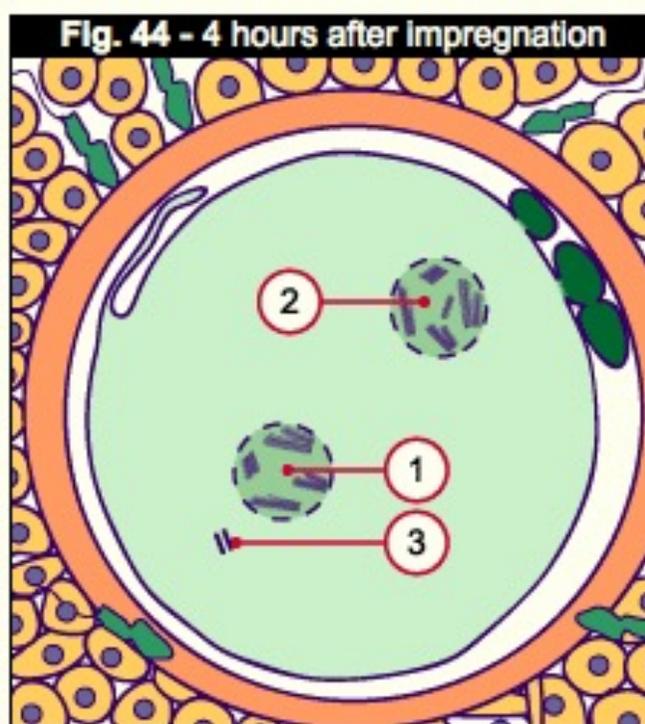
Il completamento della seconda divisione meiotica porta alla formazione del **secondo corpuscolo polare**. Da questo momento in poi parliamo di **cellula uovo**.

Contemporaneamente, l'involucro nucleare dello spermatozoo viene rotto e la cromatina viene decondensata: le protamine vengono sostituite con istoni.

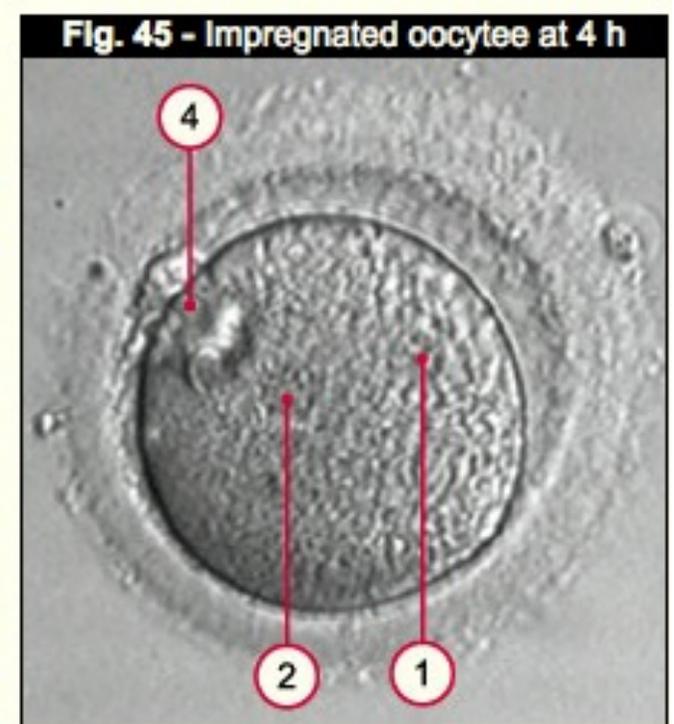
Il corpo basale dello spermatozoo ridiventa il centriolo madre grazie al contributo di material epericentriolare dell'oocita.



- 1 1st polar body
- 2 Nucleus (slightly unpacked) of the spermatozoon
- 3 Proximal centrosome of the spermatozoon
- 4 2nd polar body (being formed)
- 5 Remainder of the mitotic spindle with maternal chromosomes  $1n, 1C$



- 1 Paternal pronucleus
- 2 Maternal pronucleus
- 3 Centrosome brought in by the spermatozoon

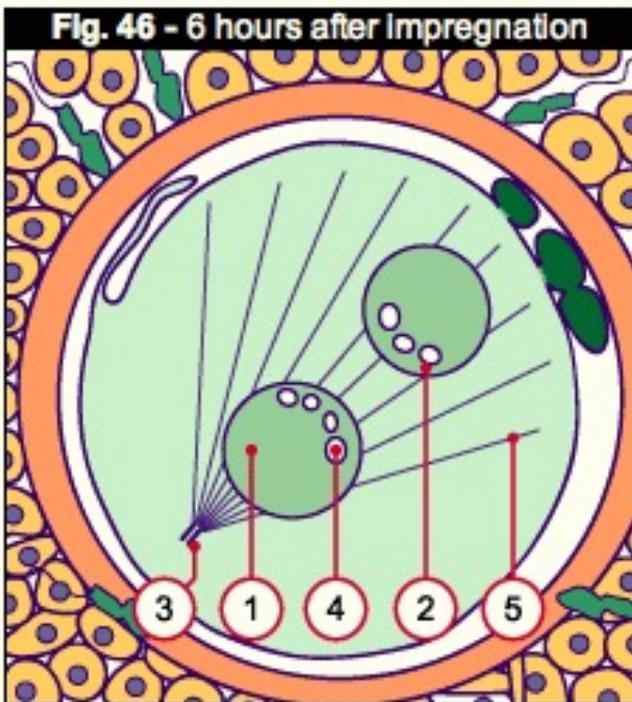


- 4 Group of polar bodies

Il nucleo dello s.zoo

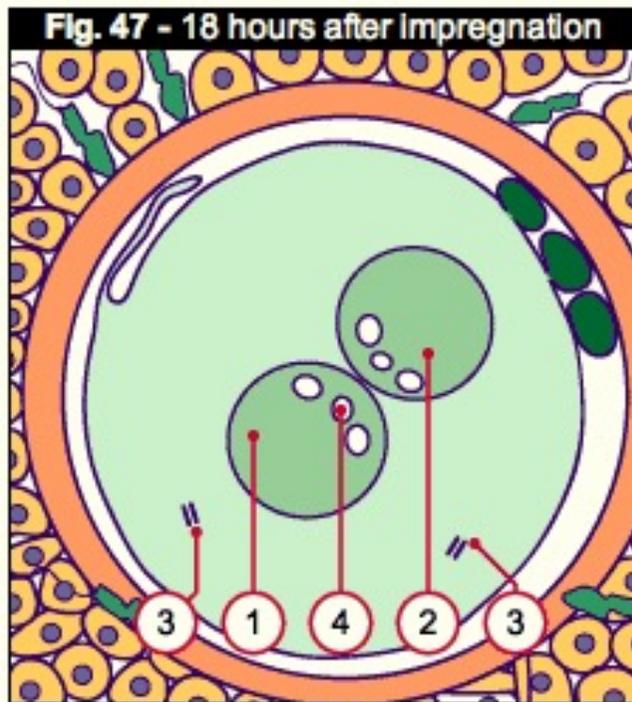
Acquisisce un nuovo involucro nucleare (origine materna) = pronucleo

(Viene temporaneamente bloccata l'oscillazione del  $Ca^{2+}$ )



- 1 Paternal pronucleus
- 2 Maternal pronucleus
- 3 Paternal centrosome
- 4 "Inner bodies"
- 5 Maternal astral microtubule

Il centrosoma paterno guida il pronucleo maschile verso quello femminile

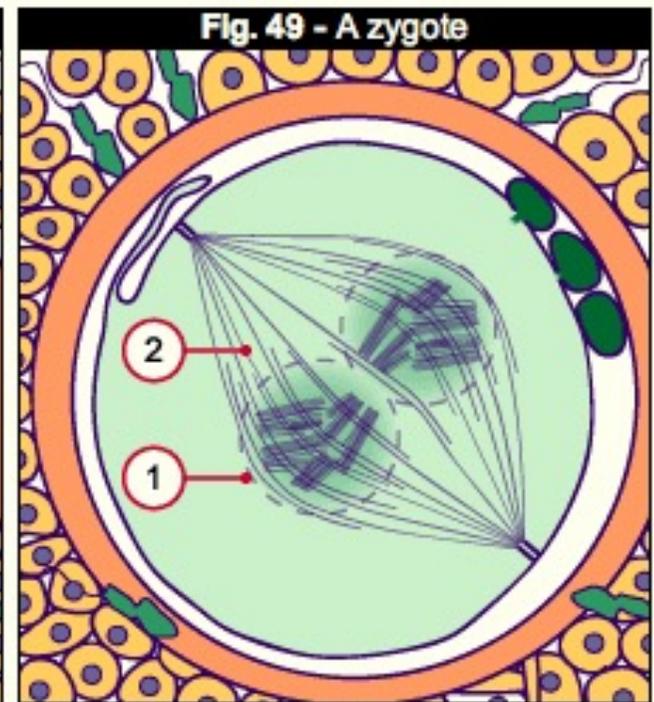


- 1 Paternal pronucleus
- 2 Maternal pronucleus
- 3 Duplicated paternal centrosome
- 4 "Inner bodies"

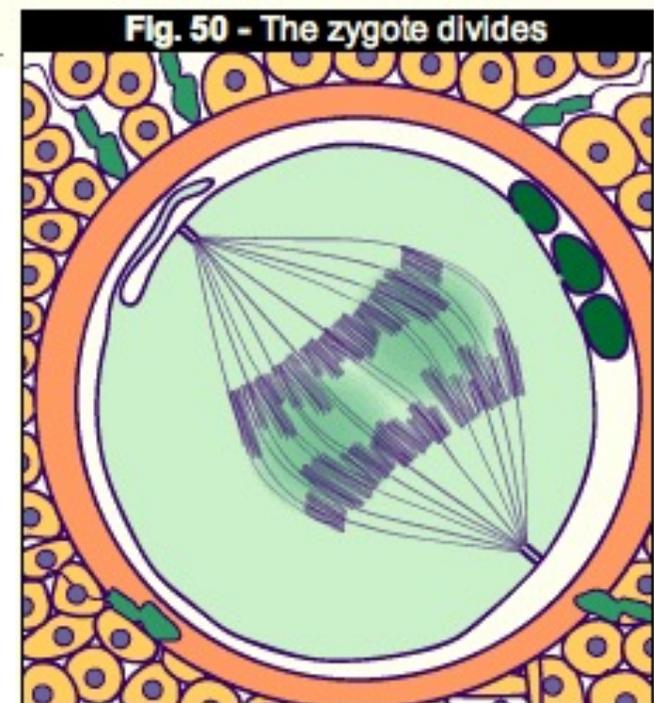
Il centrosoma paterno si duplica

Inizia il processo di meiosi

Dissoluzione dell'involucro nucleare dei pronuclei = ripartono le oscillazioni di  $Ca^{2+}$

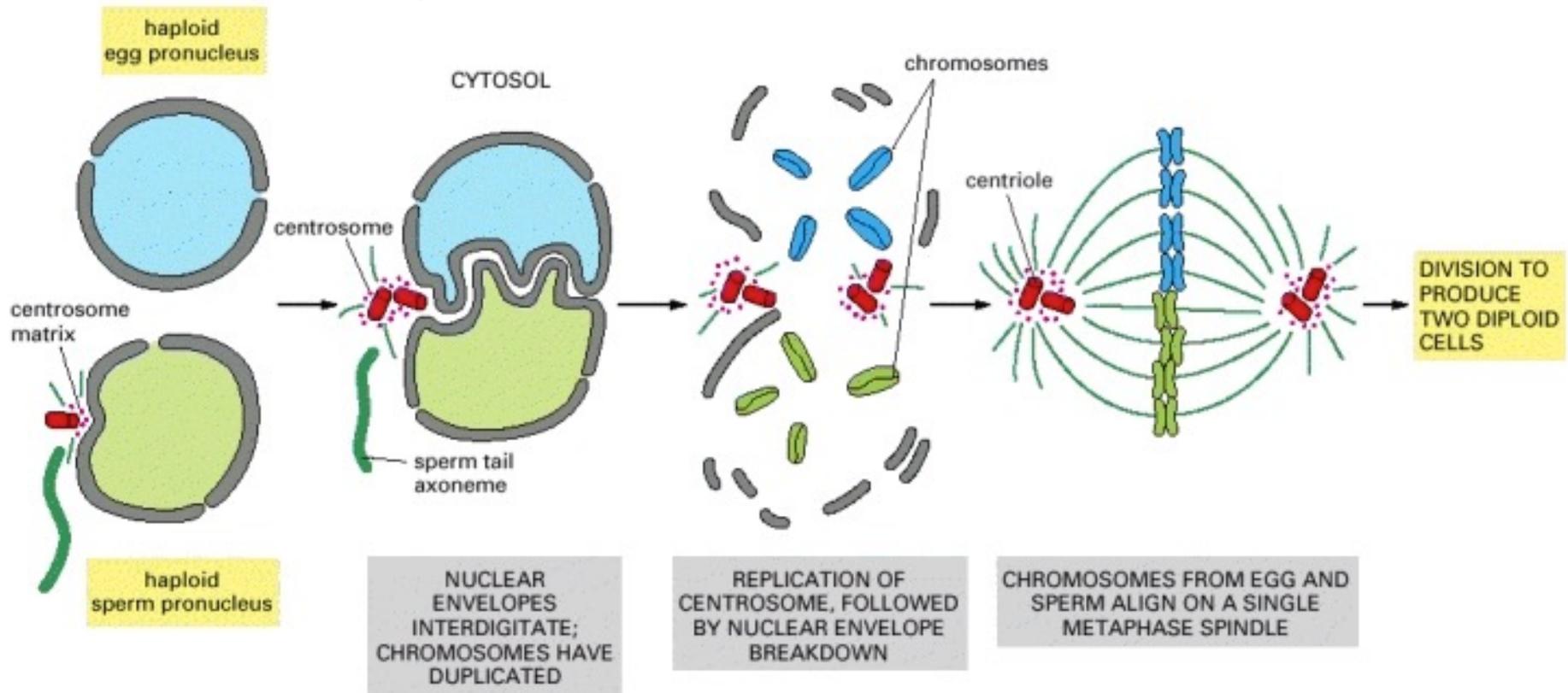


- 1 Nucleic membranes of the pronuclei, as they are dissolving
- 2 Microtubules of the mitotic spindle



# UOVO FECONDATO (ootide)

# ZIGOTE



La fusione dei due patrimoni genetici paterno e materno conseguente alla rottura degli involucri dei pronuclei segna il passaggio da cellula uovo a **zigote**

I centrosomi dello zigote e delle cellule del nuovo embrione hanno origine dal centrosoma dello spermatozoo

## **Fase**

Penetrazione della zona pellucida

Fusione tra le membrane cellulari

Formazione del PB II

Formazione dei pronuclei

Giustapposizione dei pronuclei

Replicazione dei cromosomi

Scomparsa dei pronuclei

Prima divisione cellulare

## **Tempo post inseminazione**

Entro 30-40 min. p.i. (solo standard IVF)

Dal 45° a 60° min. p.i. (solo standard IVF)

Dalla 2 alla 8 ora p.i.

Dalla 3 alla 12 ora p.i.

Dalla 5 alla 13 ora p.i.

Dalla 8 alla 17 ora p.i.

Dalla 15 alla 30 ora p.i.

Dalla 18 ad oltre la 35 ora p.i.

## **Tempo totale inseminazione ICSI**

Dalla 16 ad oltre la 33 ora p.i.

## **Tempo totale standard IVF**

Dalla 18 ad oltre la 35 ora p.i.

*Legenda – IVF: fecondazione in vitro; PB II: secondo globulo polare;; ICSI: iniezione intracitoplasmatica dello spermatozoo.*