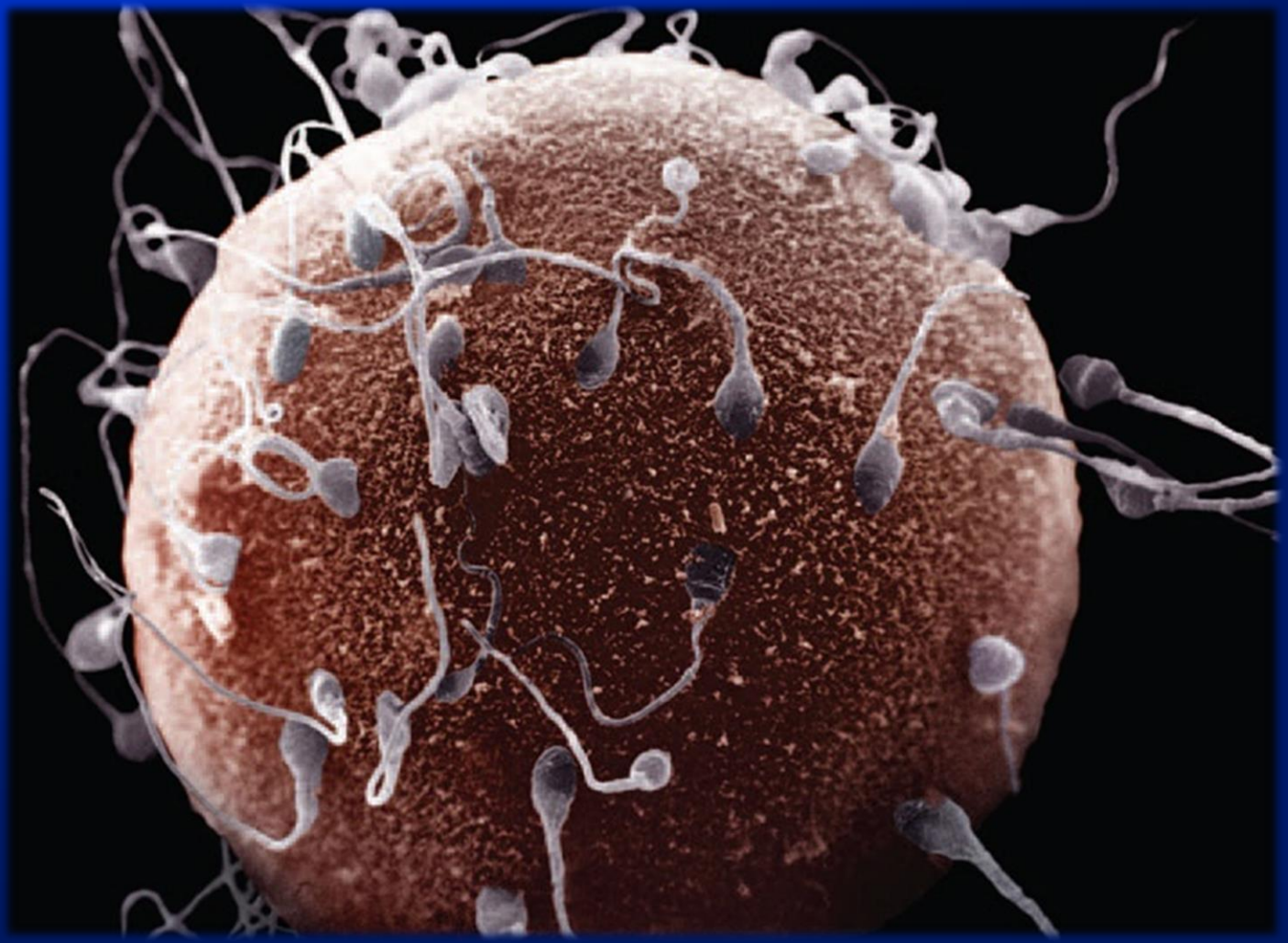
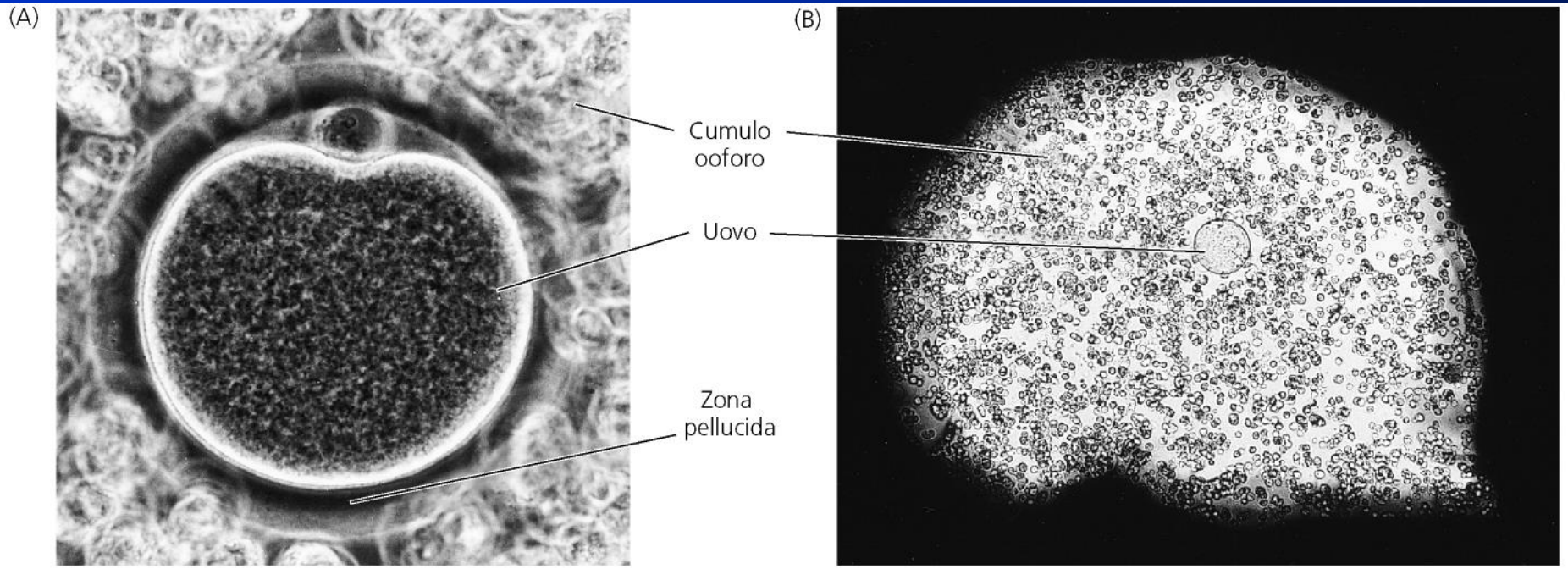
La fecondazione interna

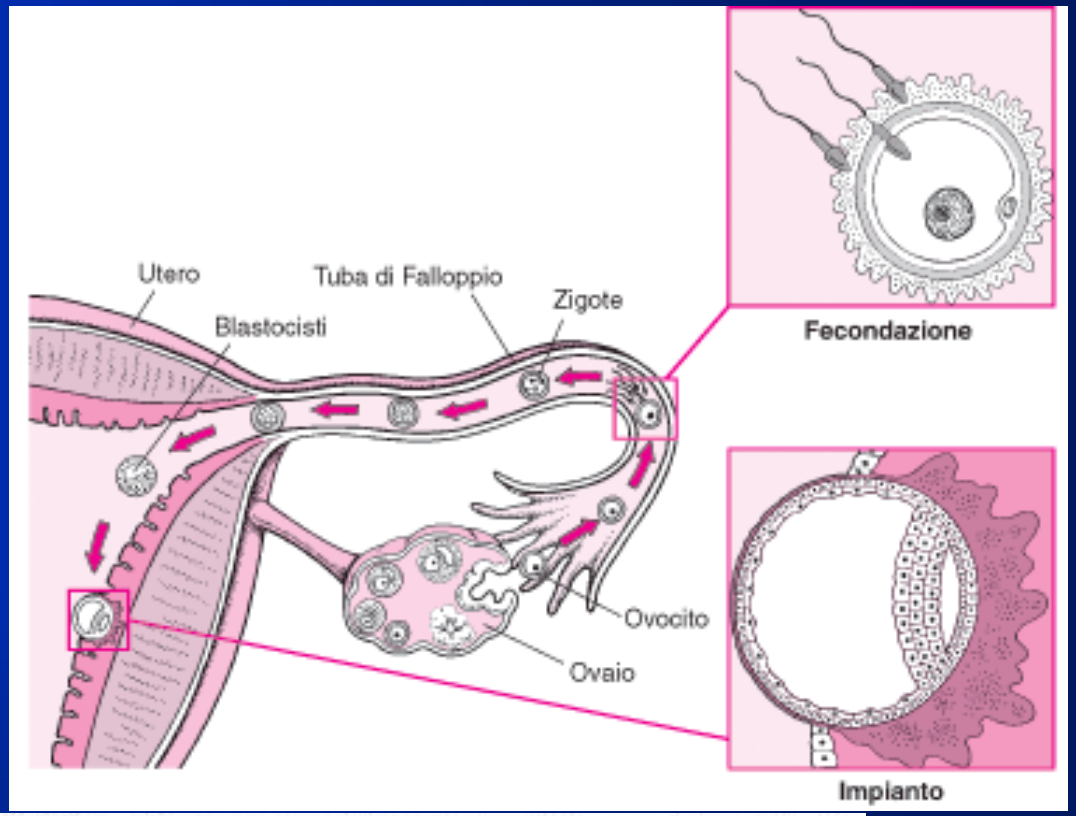


Cellula uovo di mammifero appena ovulata



Fattori che guidano lo spermatozoo verso l'uovo:

Chemiotassi: rilascio di molecole chemiotattiche da parte del cumulo ooforo, fra cui il progesterone, che attiva la motilità del gamete



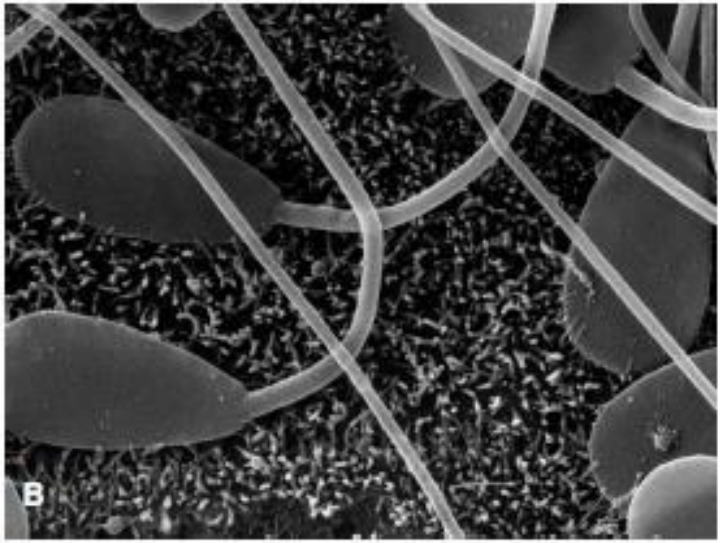


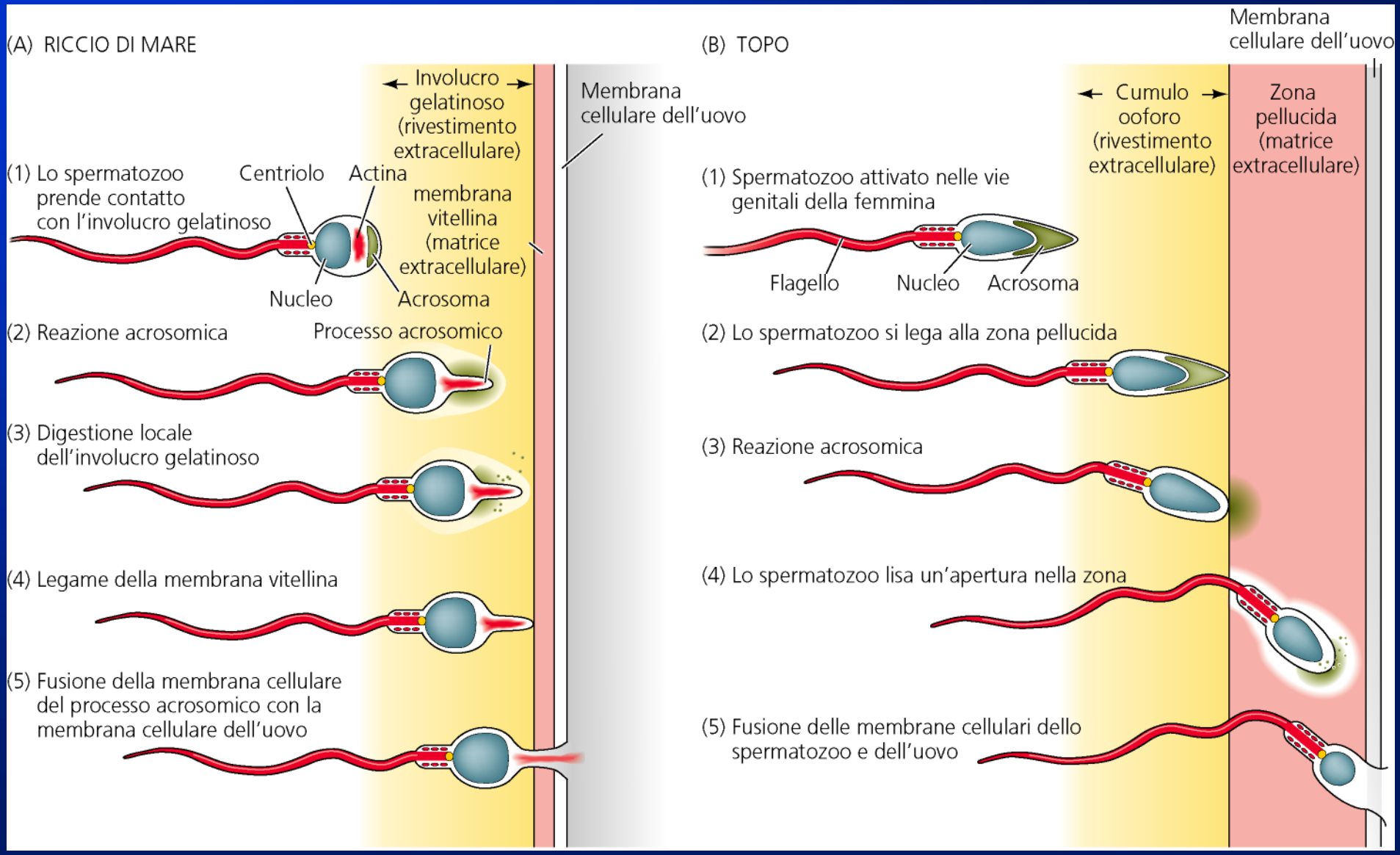
Figura 19

- **CAPACITAZIONE: acquisizione della capacita' di fecondare**
- ***Modificazioni di membrana***
- Albumina presente nelle vie genitali femminili **rimuove il colesterolo** dalla membrana dello spermatozoo. Cio' aumenta la fluidità della membrana rendendo possibile la reazione acrosomiale, e permette di esporre in superficie e localizzare nella parte anteriore dello spermatozoo molecole necessarie all'interazione con l'uovo. Avviene rimozione di proteine/carboidrati dalla membrana che potrebbero inibire le interazioni con l'uovo. Anche la membrana dell'acrosoma si modifica in preparazione per la reazione acrosomale.

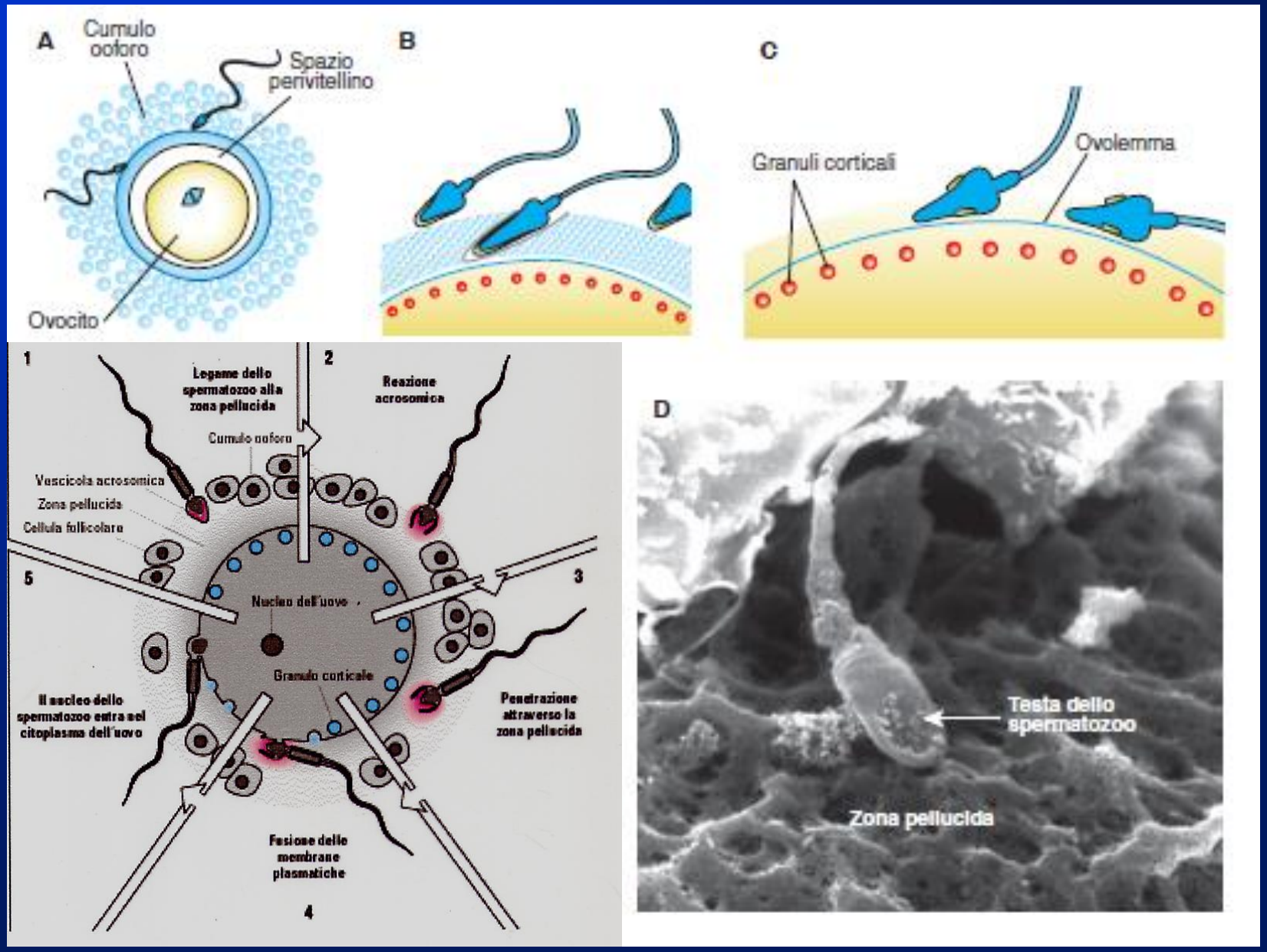
- ***Modificazioni biochimiche intracellulari***
- Rilascio di ioni K+ causa iperpolarizzazione di membrana nello spermatozoo e, insieme all'efflusso di colesterolo, conduce all'**ingresso di ioni Ca++** e HCO_3- e all'aumento dei livelli di cAMP, con attivazione di vie di segnale che promuovono ulteriore aumento della motilità e regolano l'attivita' di proteine importanti per la fecondazione.

- La capacitazione è un evento asincrono, e potrebbe essere importante anche per massimizzare la possibilità di un evento di fecondazione al tempo stesso diminuendo la probabilità di polispermia.

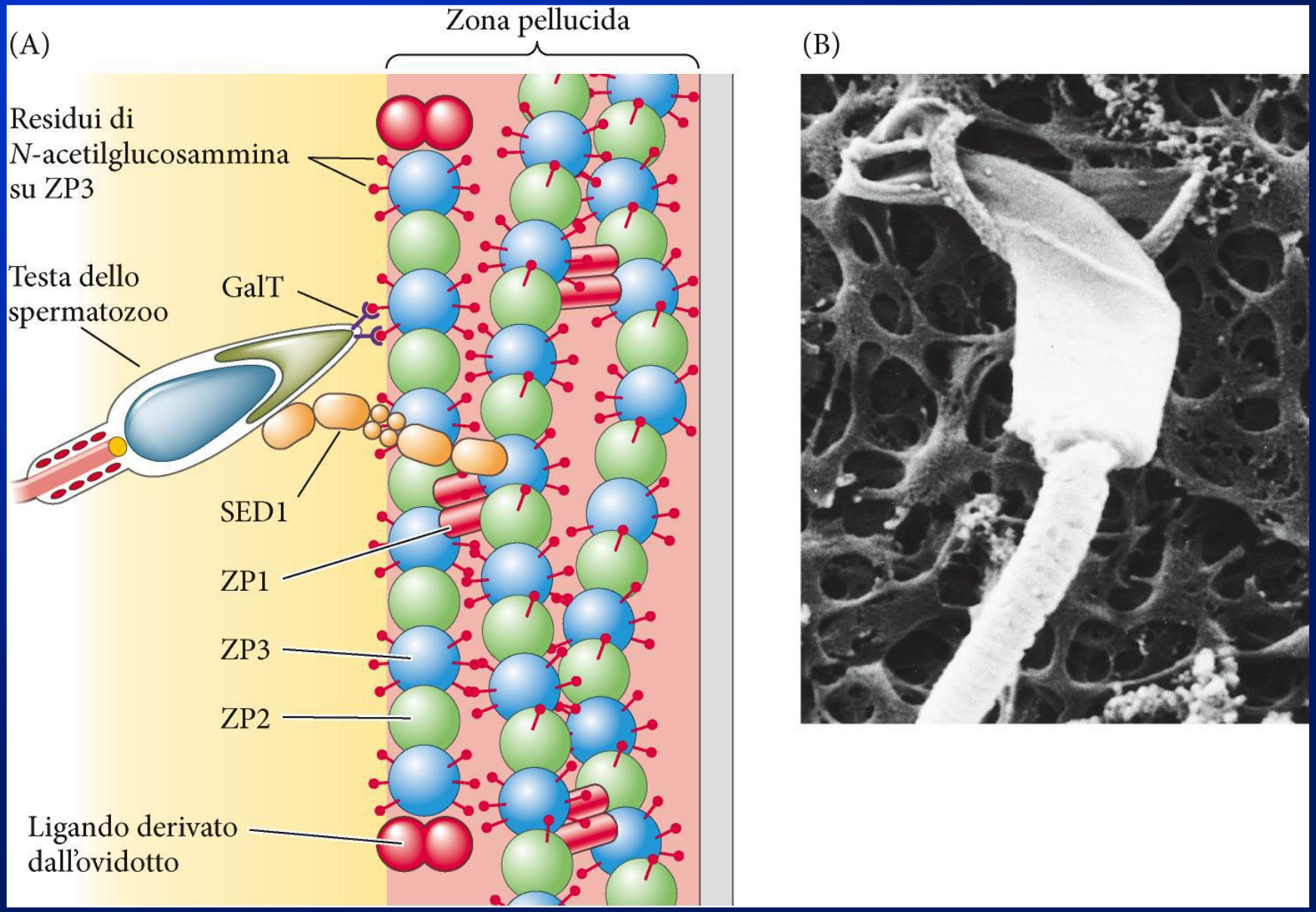
- Prima della capacitazione, lo spermatozoo aderisce alle pareti dell'ovidotto e questa interazione prolunga la vitalità del gamete. La capacitazione provoca **ipermotilità** dello spermatozoo e indebolisce il suo legame all'ovidotto.


(A) RICCIO DI MARE
Involucro gelatinoso (rivestimento extracellulare)
Membrana cellulare dell'uovo
(1) Lo spermatozoo prende contatto con l'involucro gelatinoso
Centriolo
Actina
membrana vitellina (matrice extracellulare)
Nucleo
Acrosoma
(2) Reazione acrosomica
Processo acrosomico
(3) Digestione locale dell'involucro gelatinoso
(4) Legame della membrana vitellina
(5) Fusione della membrana cellulare del processo acrosomico con la membrana cellulare dell'uovo
(B) TOPO
Membrana cellulare dell'uovo
Cumulo ooforo (rivestimento extracellulare)
Zona pellucida (matrice extracellulare)
(1) Spermatozoo attivato nelle vie genitali della femmina
Flagello
Nucleo
Acrosoma
(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

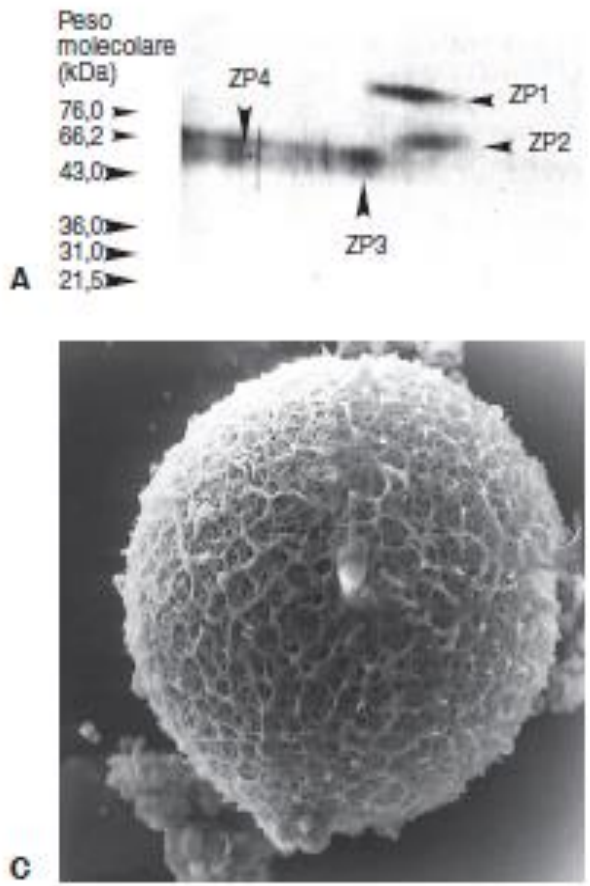
La fecondazione interna nel mammifero

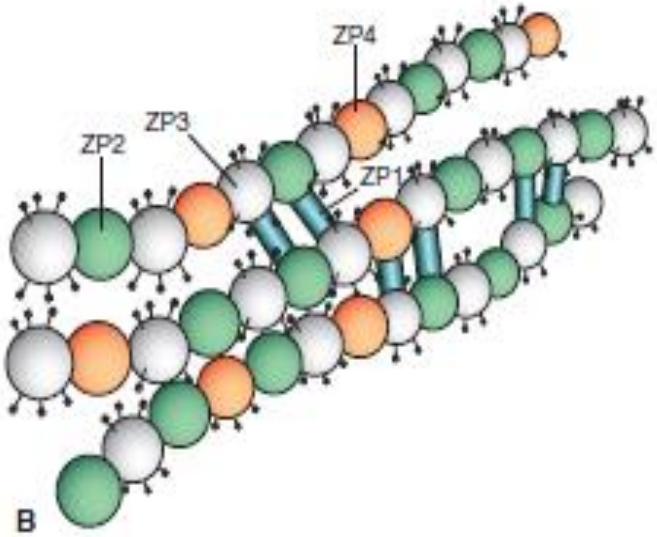


La zona pellucida è costituita dall'aggregazione di glicoproteine (ZP)



La Zona Pellucida





ZP1-ZP2-ZP3-ZP4

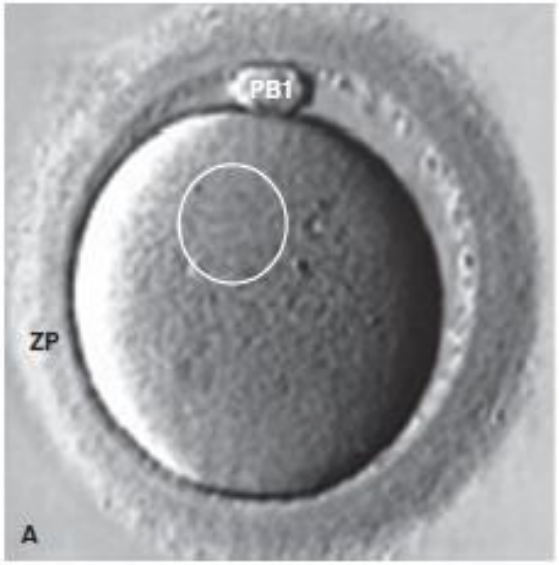


FIGURA 8-10 ■ *A)* Elettroforesi bidimensionale delle proteine della zona pellucida dell'ovocito umano. *B)* Schema della struttura molecolare della zona pellucida. *C)* Fotografia al SEM della morfologia spugnosa più comune della zona pellucida di un ovocito umano.

ZP3- riconoscimento primario

ZP2- riconoscimento secondario

ZP1-ZP4 solo ruolo strutturale strutturale della Zona Pellucida

La reazione acrosomica permette allo spermatozoo di attraversare la zona pellucida e venire a contatto con l'uovo

Zona pellucida

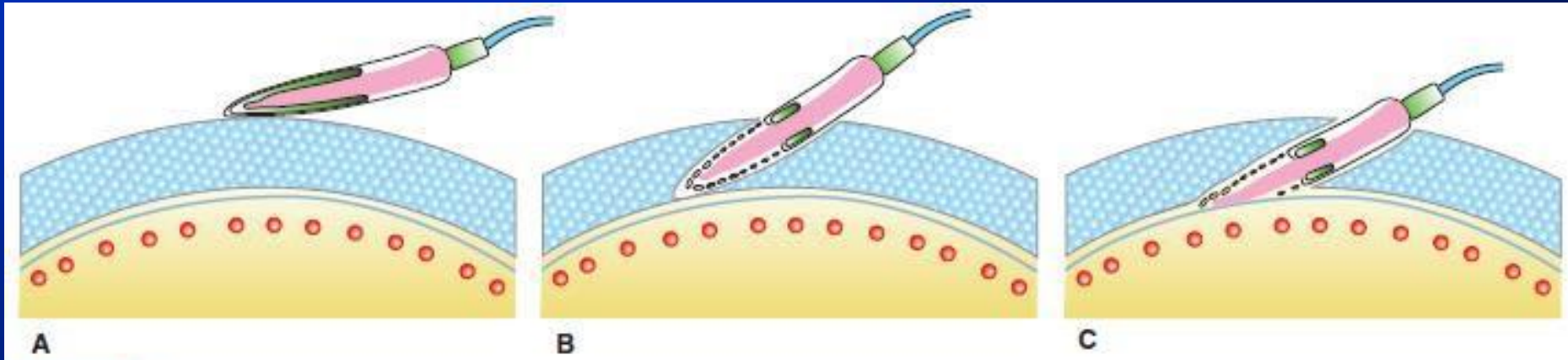


Figura 22

Legame primario
Attivazione reazione acrosomica

Legame secondario
Attivazione acrosina e digestione della zone pellucida

Legame terziario
con la membrana dell'uovo

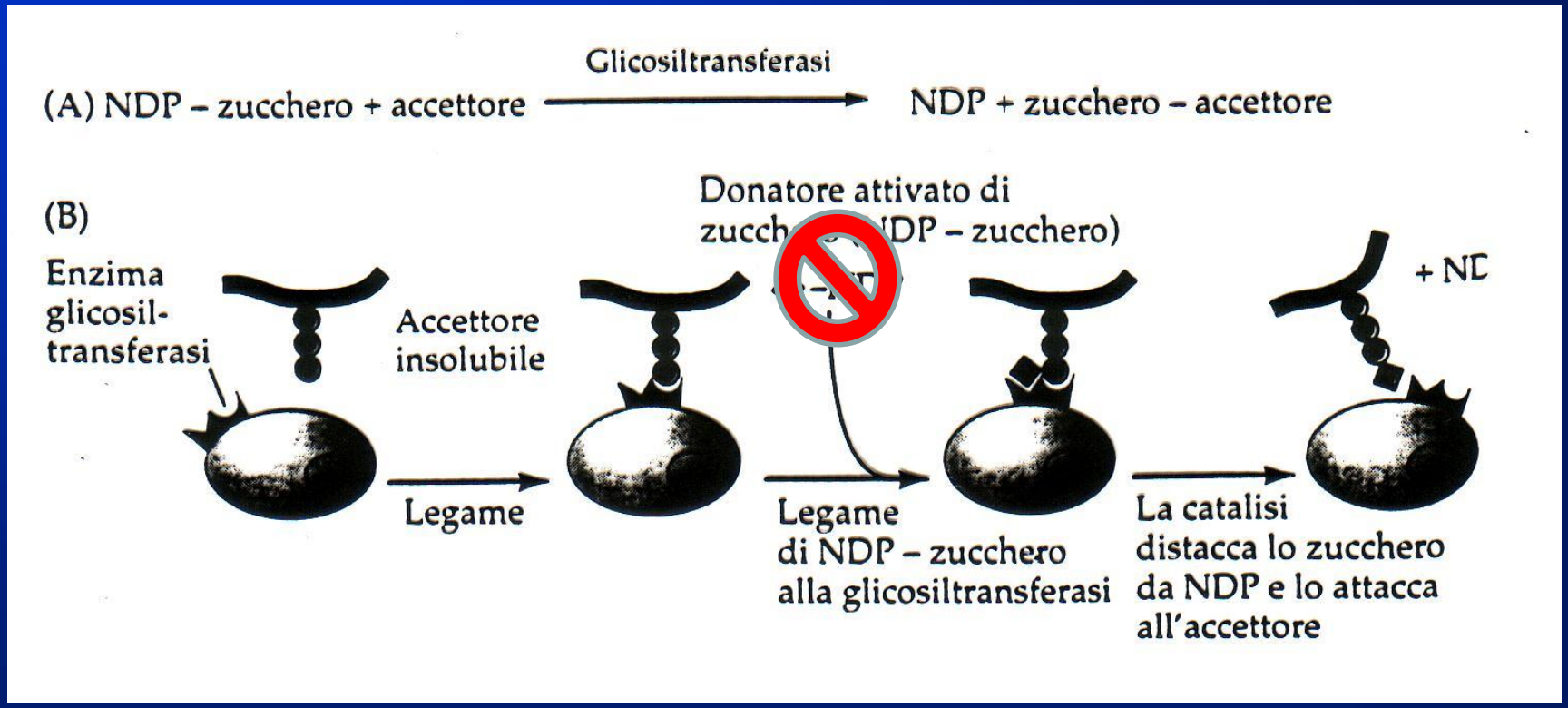
Recettori per la ZP3 sullo spermatozoo

1. Recettore per il galattosio
2. Glicosiltransferasi che lega N-acetilglucosammina

UDP-galattosio+ N-acetilglucosammina $\longrightarrow$
UDP+ gal-N-acetilglucosammina

3. Proteina trans-membrana di 95kDa con attività tirosina chinasica

Glicosiltransferasi



Reazione acrosomiale nel mammifero
Il legame con la ZP3 attiva la reazione acrosomiale

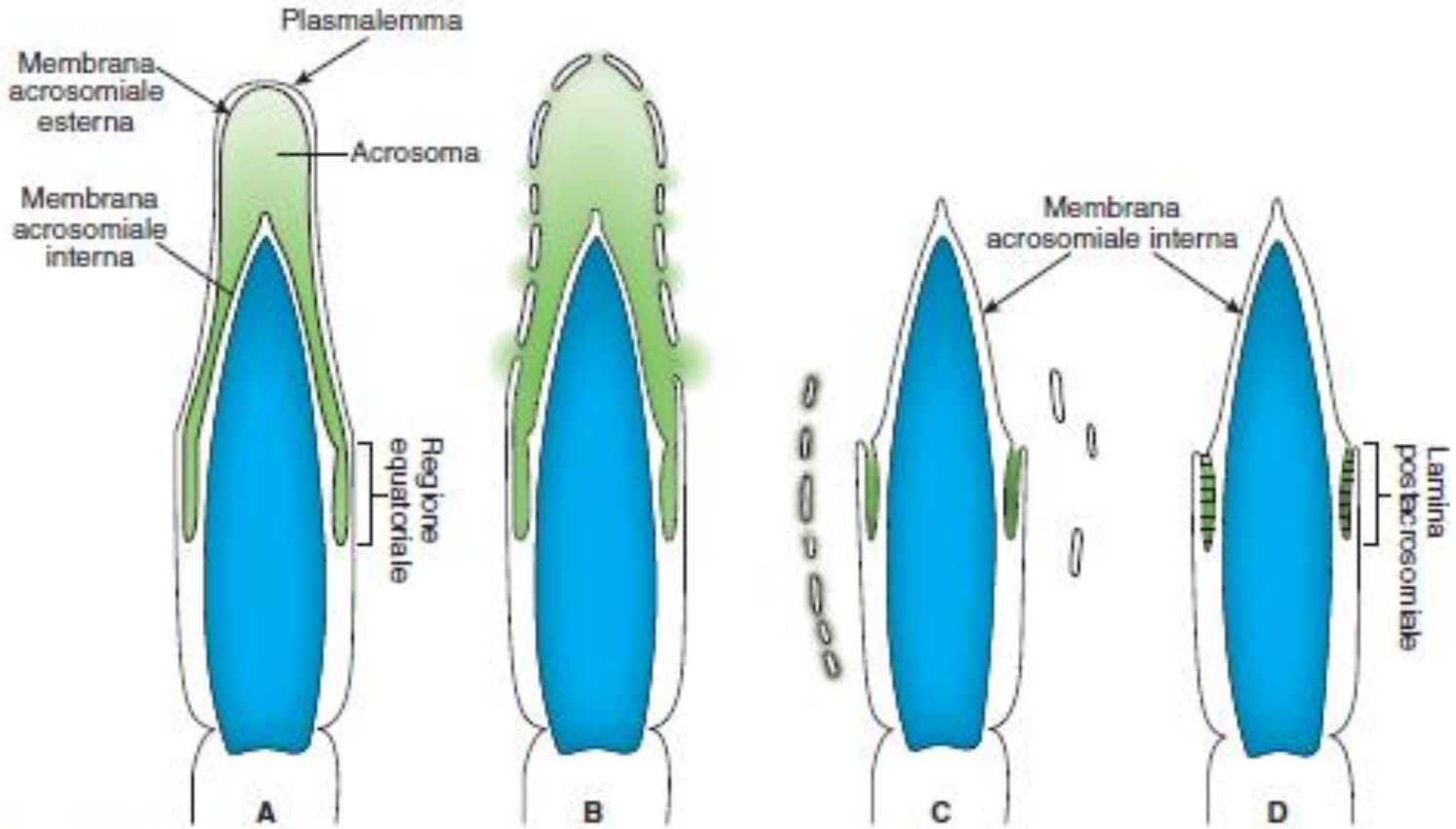


FIGURA 8-5 ■ Reazione acrosomiale dello spermatozoo. *A)* Spermatozoo intatto, munito di tipico cappuccio dell'acrosoma. *B)* Reazione acrosomiale in atto, come osservata al microscopio elettronico. *C,D)* Fusione e vescicolazione tra membrana plasmatica e membrana acrosomica esterna. Al di sotto della regione equatoriale del plasmolemma si organizza la lamina postacrosomiale.

Reazione acrosomiale nel mammifero

Il legame ZP2 + secondario alla reazione acrosomiale

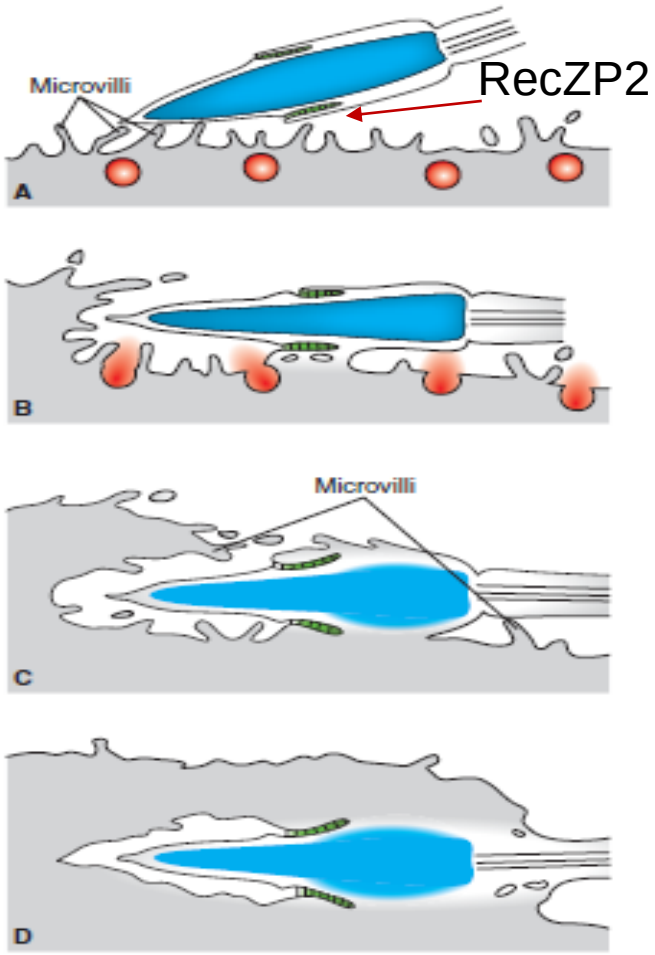
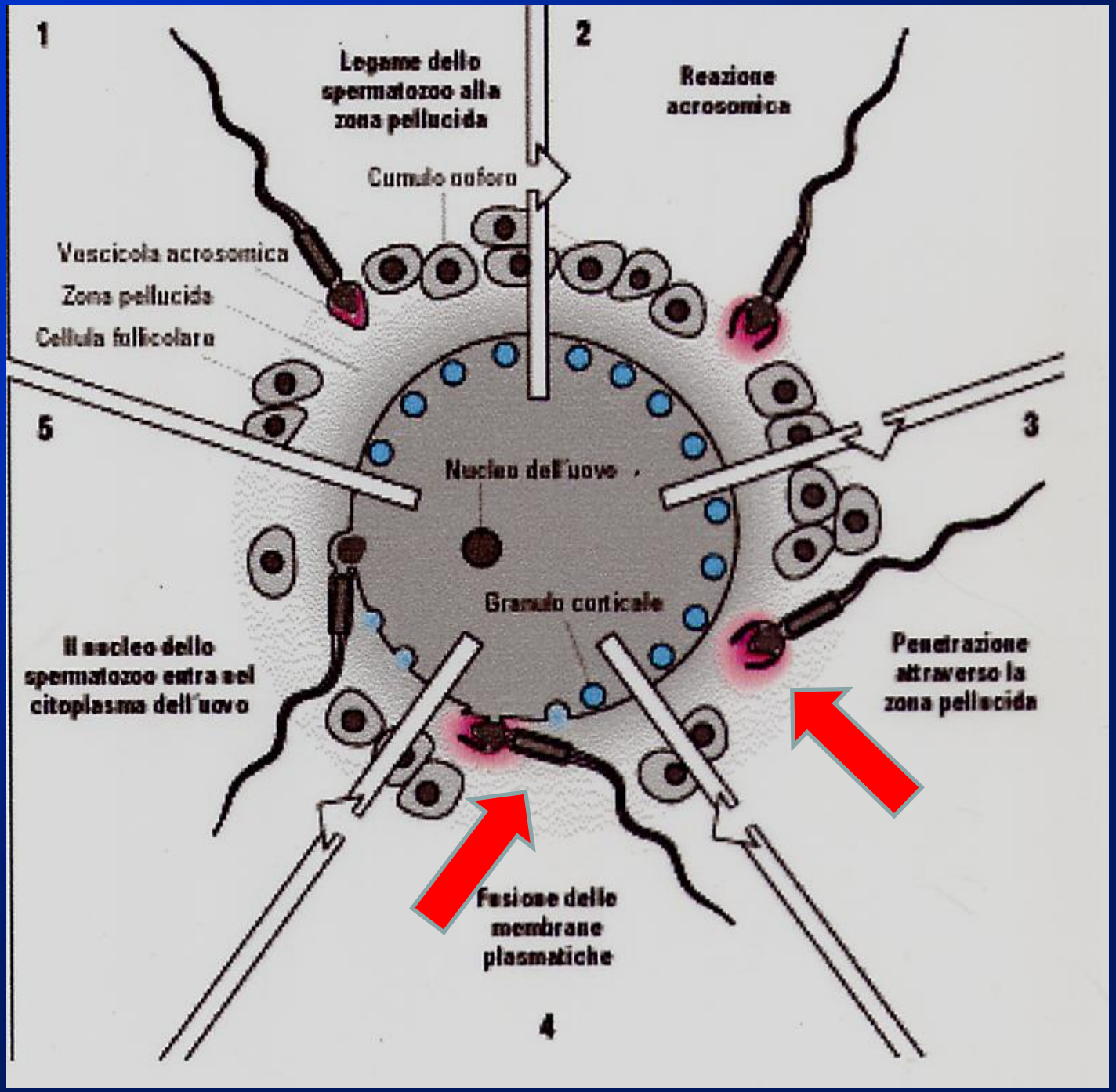


FIGURA 8-6 ■ Lo schema indica le fasi di legame e di adesione dello spermatozoo all'ovolemma dell'ovocito. Notare i microvilli che catturano lo spermatozoo.

Il recettore per ZP2 si esprime sulla zona laterale della membrana plasmatica dello sprmatozoo solo dopo rottura della vescicola acrosomiale


1
Legame dello spermatozoo alla zona pellucida
2
Reazione acrosomica
Cumulo ooforo
Vescicola acrosomica
Zona pellucida
Cellula follicolare
5
3
Nucleo dell'uovo
Granulo corticale
Il nucleo dello spermatozoo entra nel citoplasma dell'uovo
Penetrazione attraverso la zona pellucida
Fusione delle membrane plasmatiche
4

La Zona Pellucida media l'interazione uovo-spermatozoo

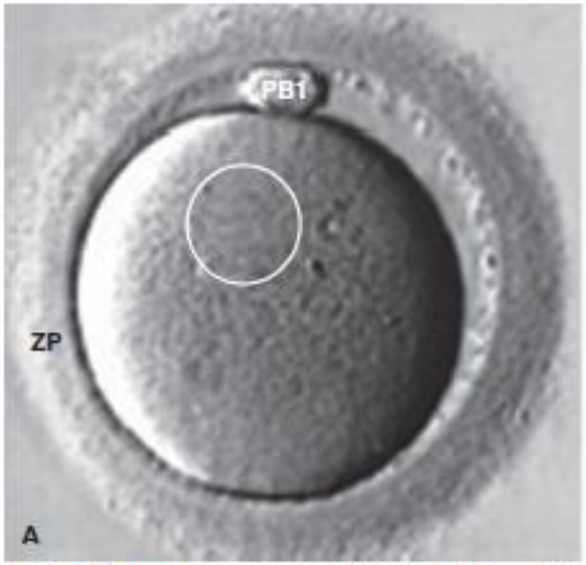


FIGURA 8-8 ■ Un ovocito prima (*A*) e dopo la fecondazione (*B*
i due pronuclei (freccia), il pronucleo maschile è quello di maggi
= zona pellucida.

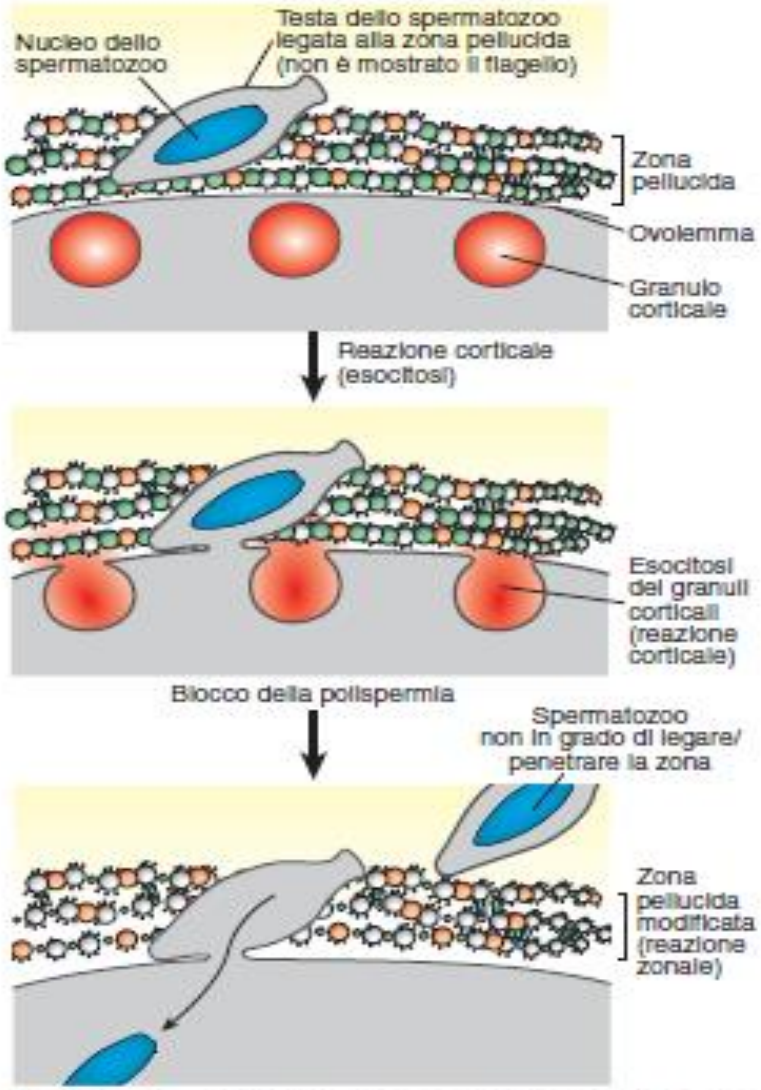
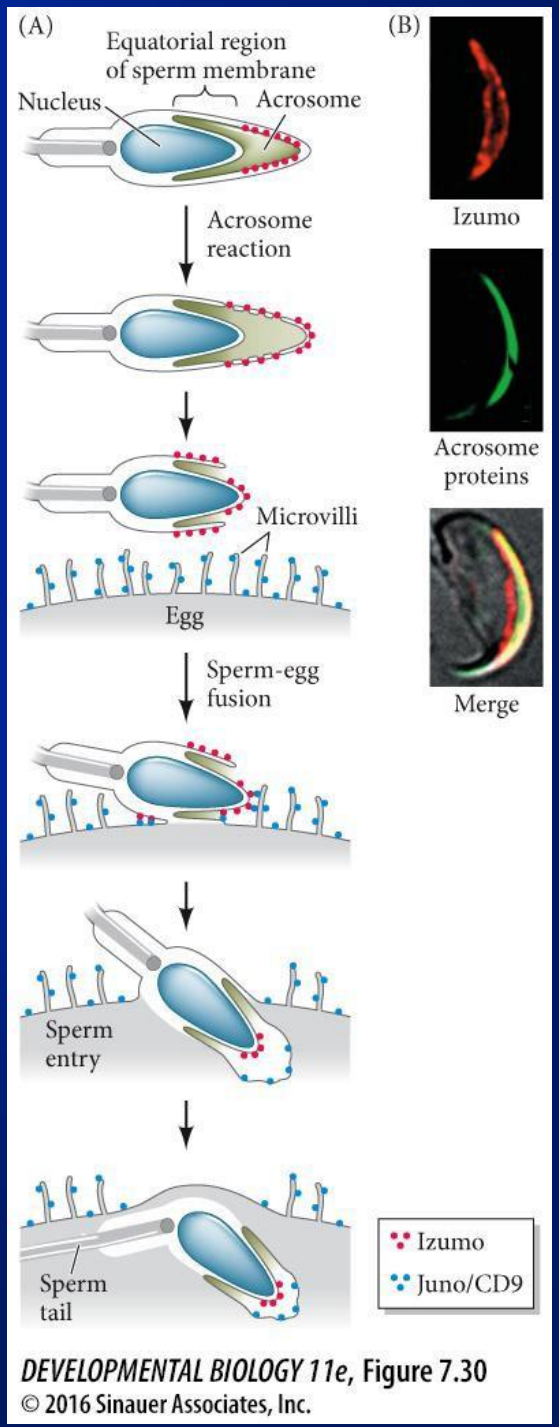


FIGURA 8-7 ■ Fasi della reazione corticale e zonale in un ovocito fecondato.

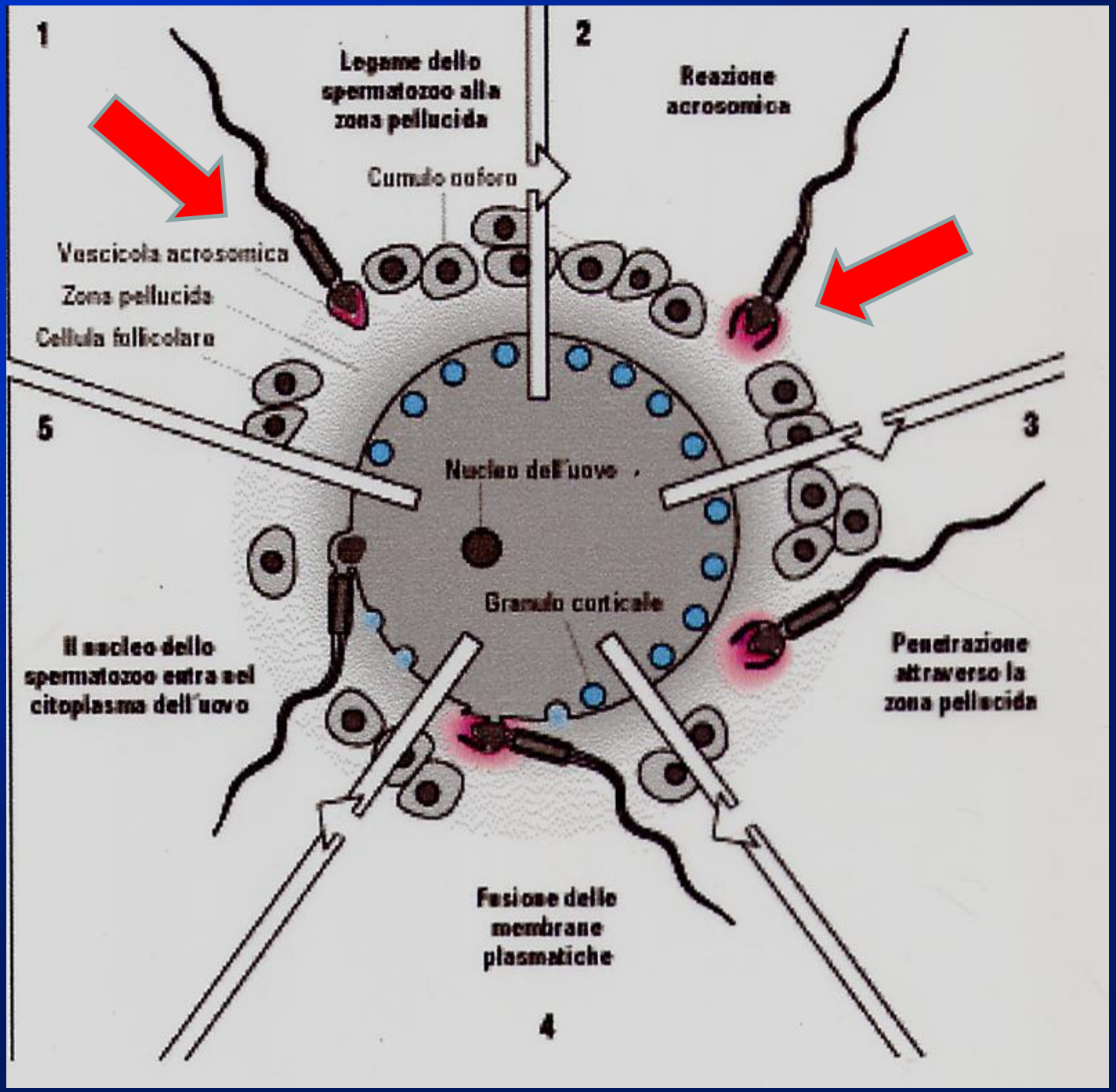
Legame terziario: spermatozoo interagisce con la membrana plasmatica dell'uovo

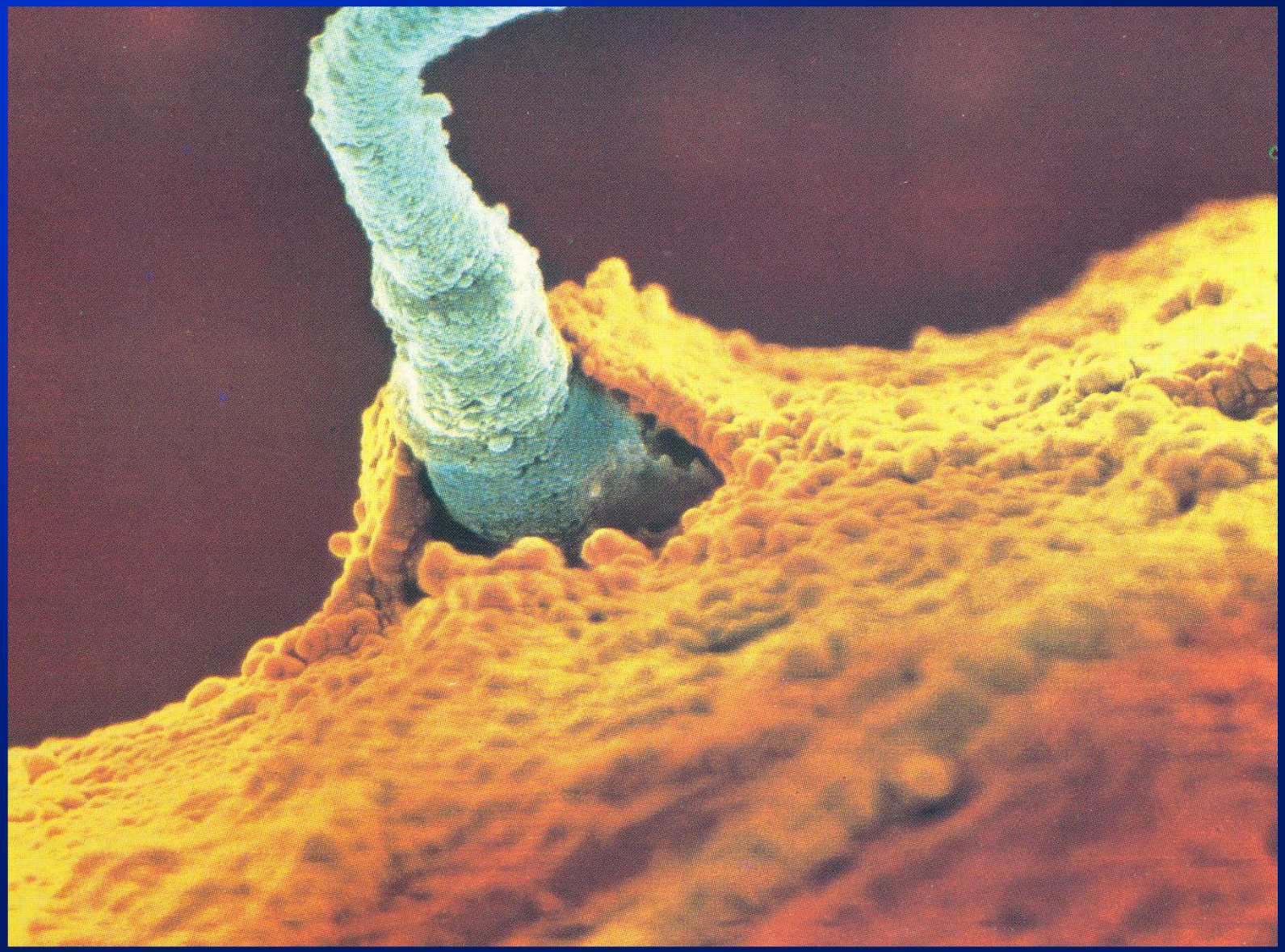
Una proteina simile alle immunoglobuline, **Izumo**, si trova sulla membrana dell'acrosoma e viene localizzata sulla superficie dello spermatozoo in seguito alla reazione acrosomale.
Izumo lega il complesso proteico **Juno/CD9** sui microvilli della membrana dell'uovo, avviando la fusione dei gameti.

Dopo l'ingresso del primo spermatozoo, Juno viene rilasciata dalla membrana impedendo il legame di altri spermatozoi.

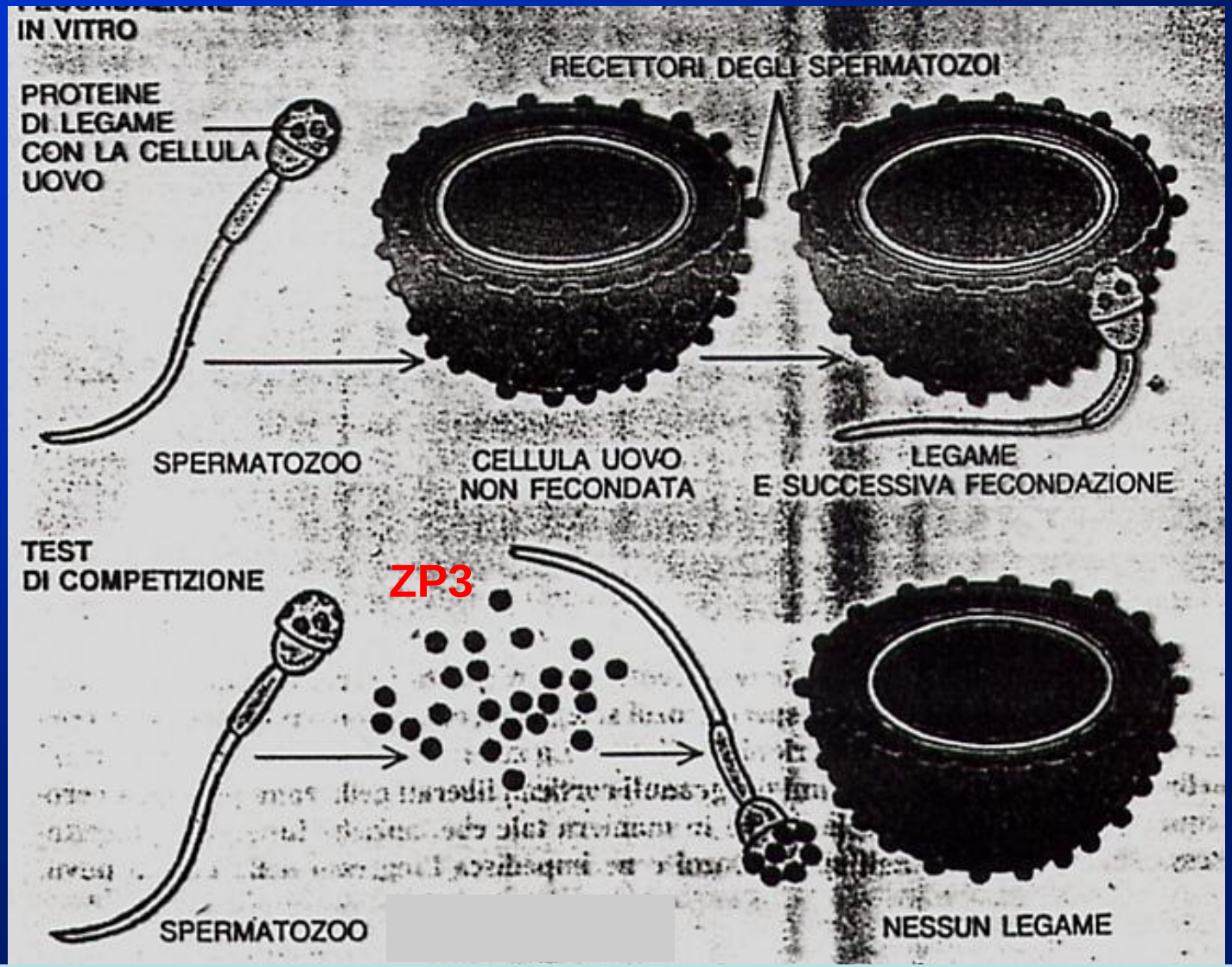


DEVELOPMENTAL BIOLOGY 11e, Figure 7.30
© 2016 Sinauer Associates, Inc.

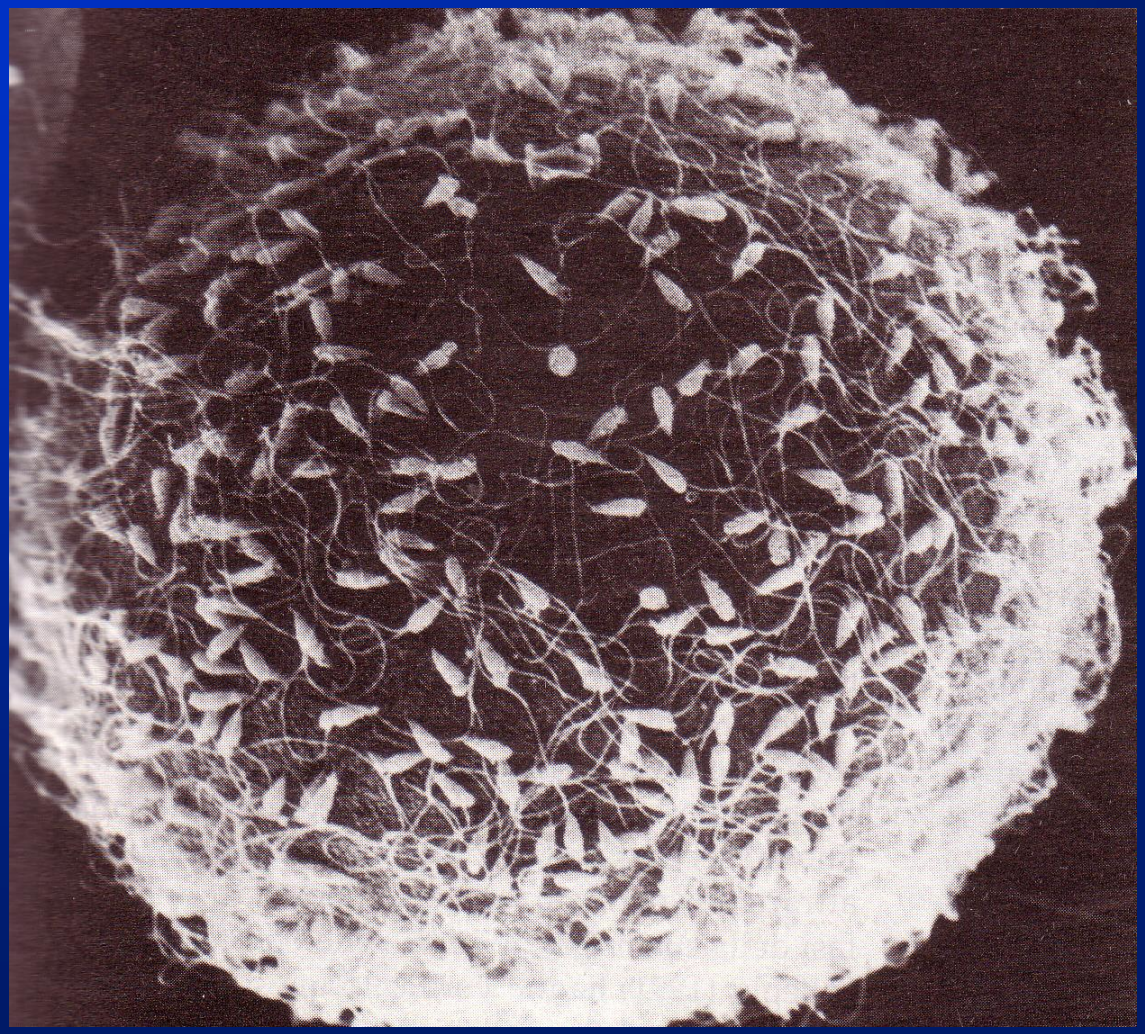

1
Legame dello spermatozoo alla zona pellucida
2
Reazione acrosomica
Cumulo ooforo
Vescicola acrosomica
Zona pellucida
Cellula follicolare
5
3
Nucleo dell'uovo
Granulo corticale
Il nucleo dello spermatozoo entra nel citoplasma dell'uovo
Penetrazione attraverso la zona pellucida
Fusione delle membrane plasmatiche
4



Test di competizione



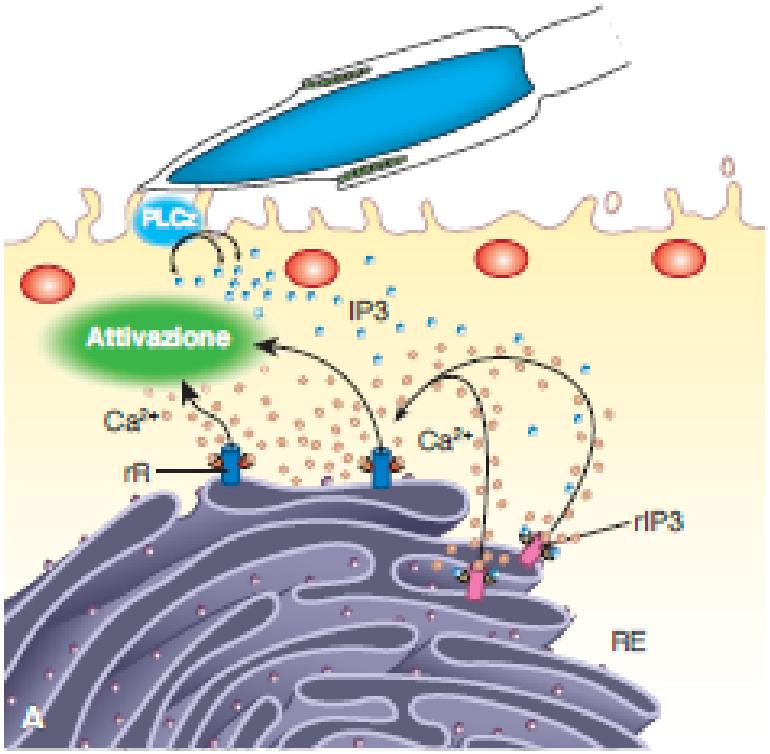
Il blocco dei recettori per ZP3 inibisce la fecondazione
Il blocco dei recettori per ZP2 non inibisce la fecondazione, ma può bloccare la fecondazione dopo reazione acrosomiale.

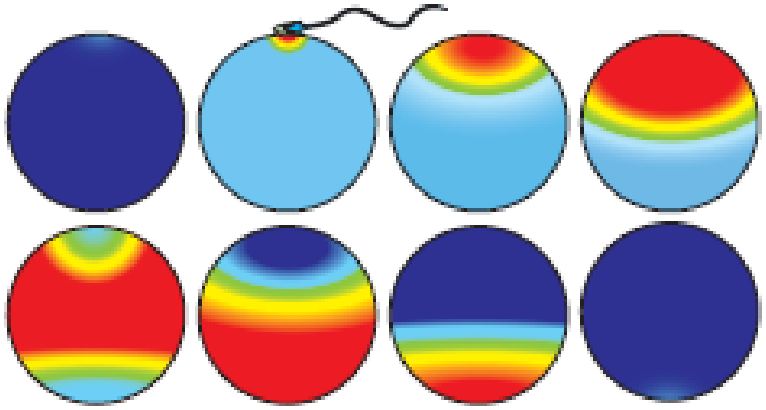


Blocco polispermia

Nel mammifero è attivo solo il blocco lento

Il blocco lento nel mammifero





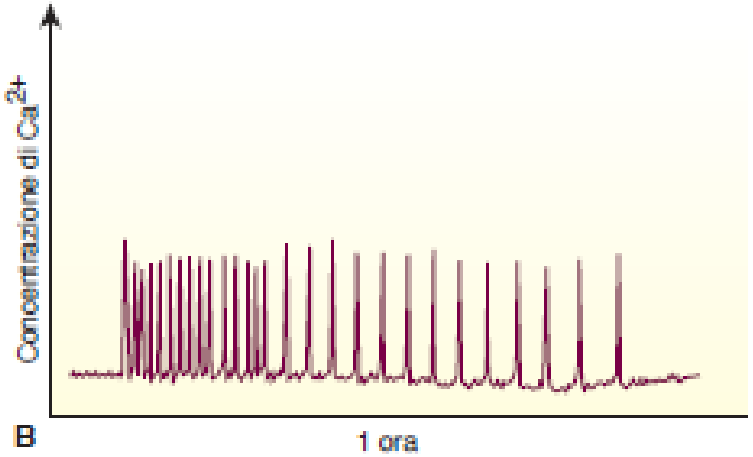
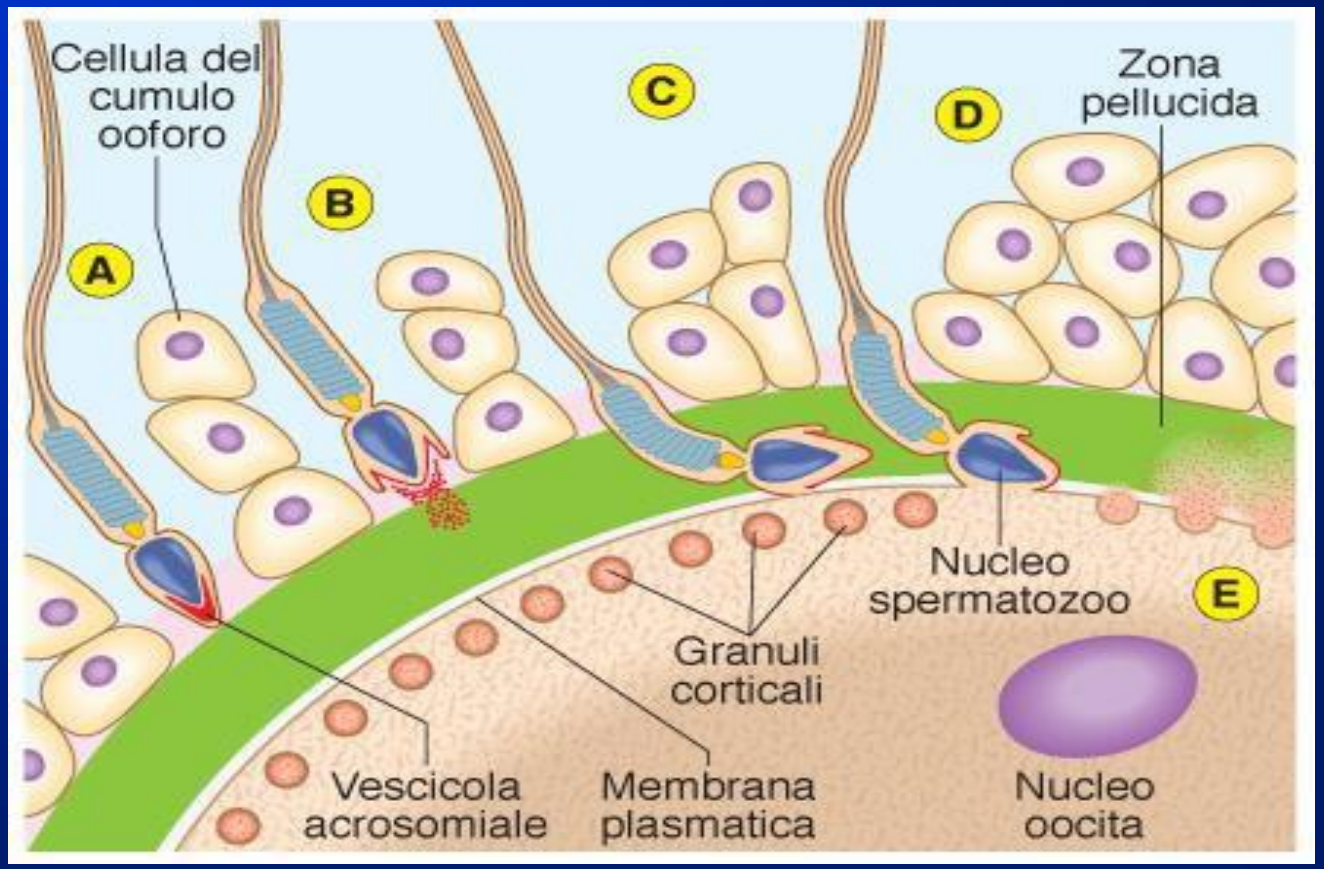


FIGURA 8-13 ■ *A)* Schema del possibile meccanismo di rilascio di Ca^{2+} alla fecondazione. Al momento della penetrazione dello spermatozoo, questo rilascia o provoca il rilascio di un fattore chiamato SF, forse una fosfolipasi zeta (PLCz) che causa il rilascio di IP3 dall'ovolemma; l'IP3 causa l'apertura di canali del Ca^{2+} situati nel reticolo liscio e in sequenza l'attivazione di recettori rianodinici associati ad altri canali del Ca^{2+}; RE = reticolo endoplasmatico, rR = recettore rianodinico, rIP3 = recettore IP3. *B)* In alto, visualizzazione al microscopio a fluorescenza dell'aumento di Ca^{2+} (in rosso) in un ovocito di riccio di mare. In basso, registrazione di oscillazioni dei livelli di Ca^{2+} alla fecondazione.

Reazioni di blocco della polispermia nei mammiferi

La reazione corticale porta al rilascio del contenuto dei **granuli corticali** e alla **reazione della zona**: modificazione della zona pellucida che impedisce l'ingresso nell'uovo di altri spermatozoi.



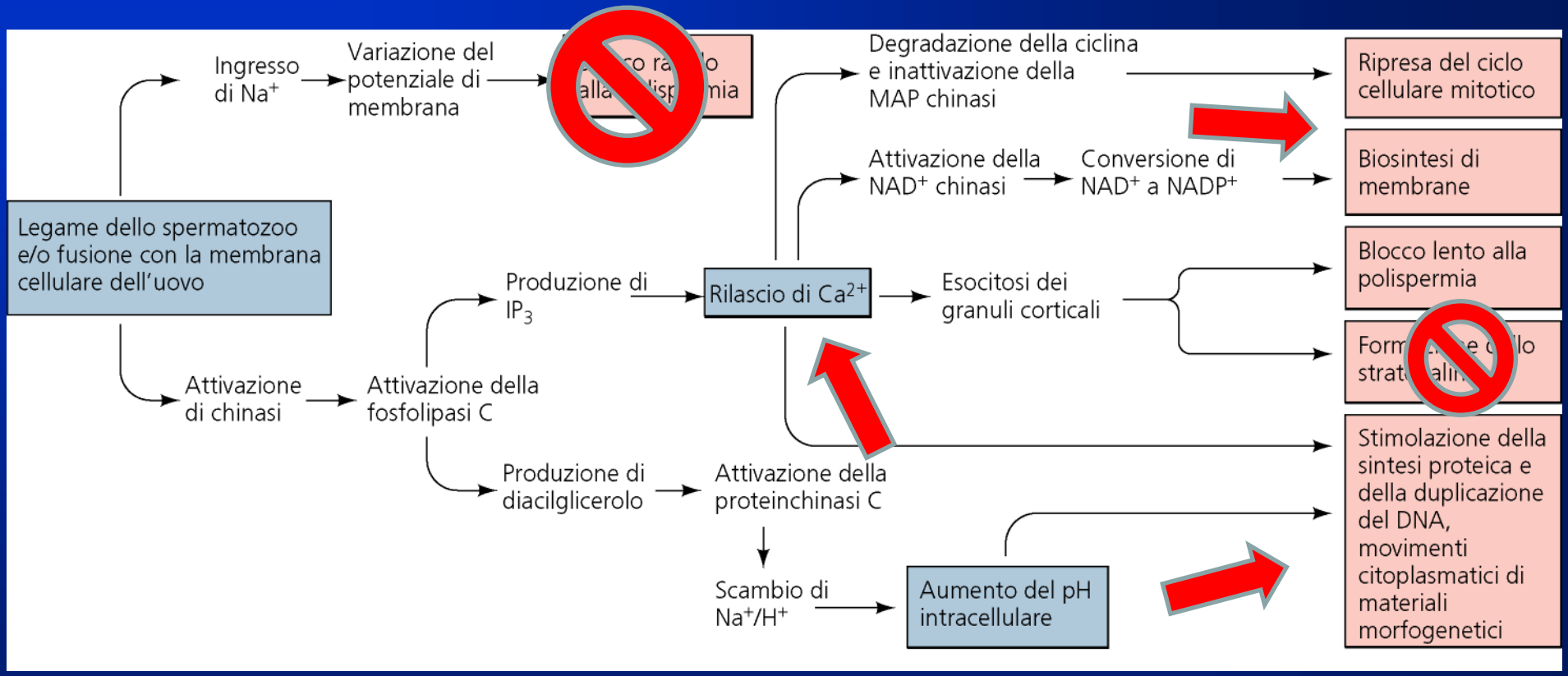
-Non si forma una membrana di fecondazione

-Si ha la modifica della zona pellucida

Attivazione dell'uovo dopo fecondazione

- Blocco polispermia
- Completamento meiosi per l'uovo
- Decondensazione DNA paterno
- Fusione dei due pronuclei
- Ridistribuzione del materiale citoplasmatico
- Ripresa sintesi proteica
- Attivazione divisioni mitotiche dello zigote

Reazioni nell'uovo subito dopo la fecondazione

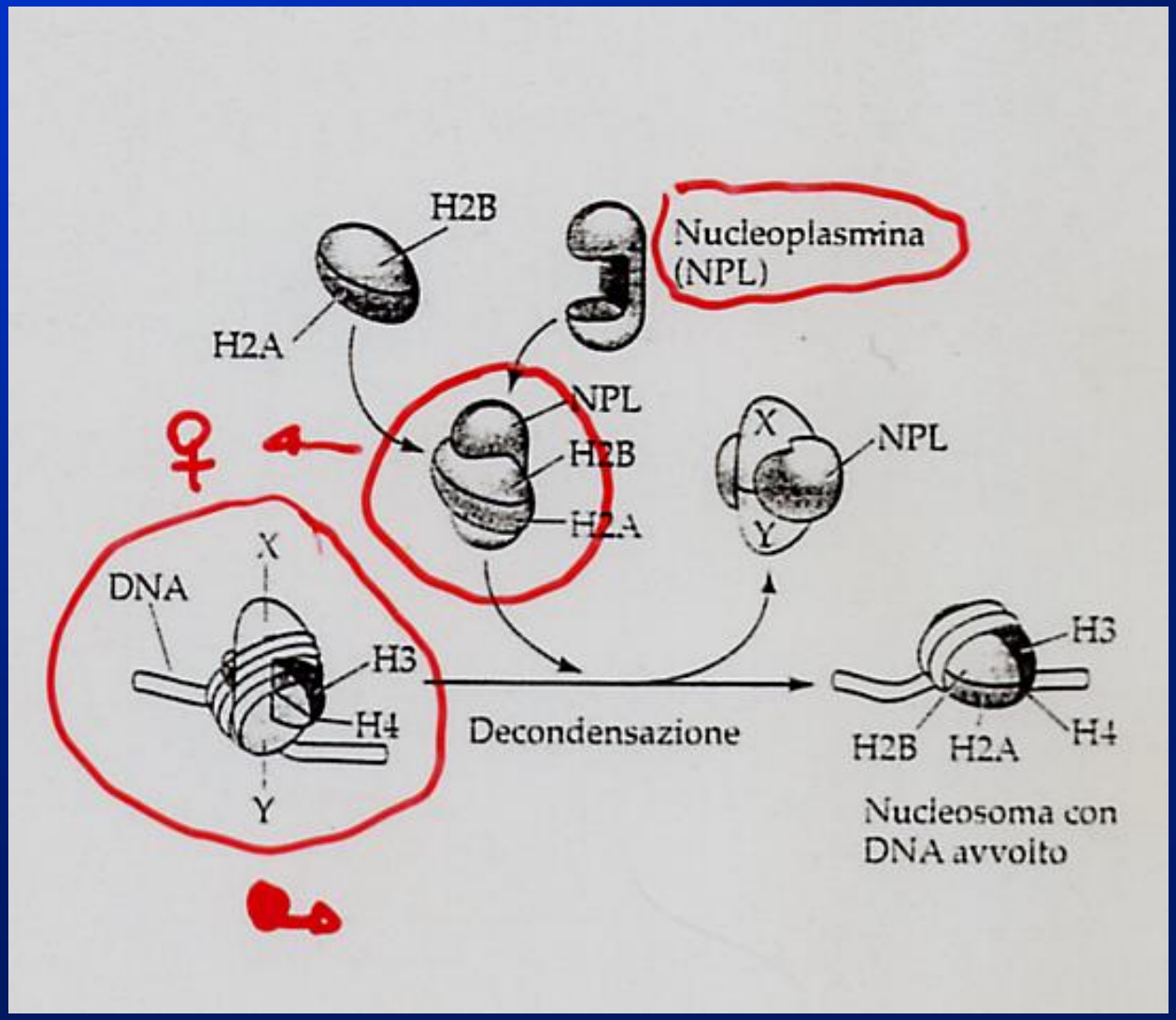


pH 6.8

pH 7.2

Queste fasi mancano nel mammifero

Decondensazione nucleare negli anfibi



Completamento della meiosi II nell'uovo
Decondensazione del pronucleo maschile

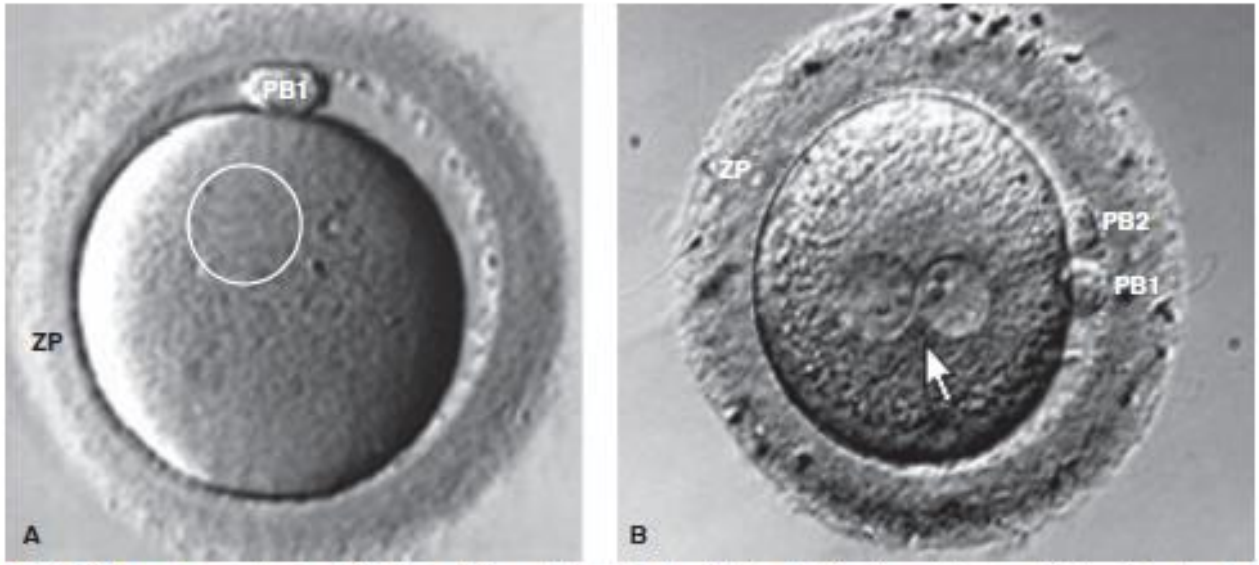
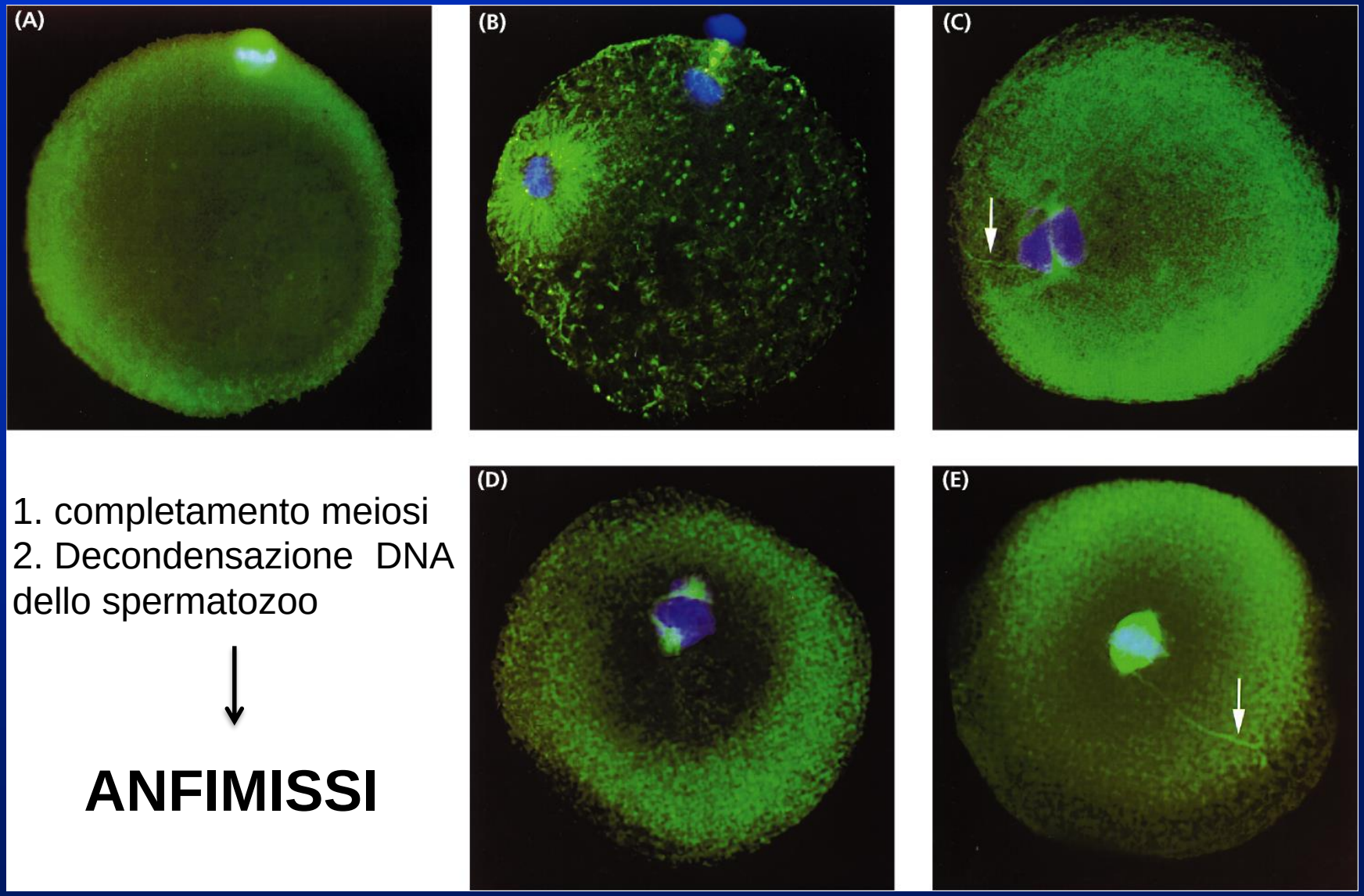


FIGURA 8-8 ■ Un ovocito prima *(A)* e dopo la fecondazione *(B)*. Il cerchio in *A* indica l'area del fuso metafasico II, in *B* notare i due pronuclei (freccia), il pronucleo maschile è quello di maggiore dimensione (a sinistra). PB1 e PB2 = globulo polare 1 e 2; ZP = zona pellucida.



1. completamento meiosi
2. Decondensazione DNA dello spermatozoo

↓

ANFIMISSI

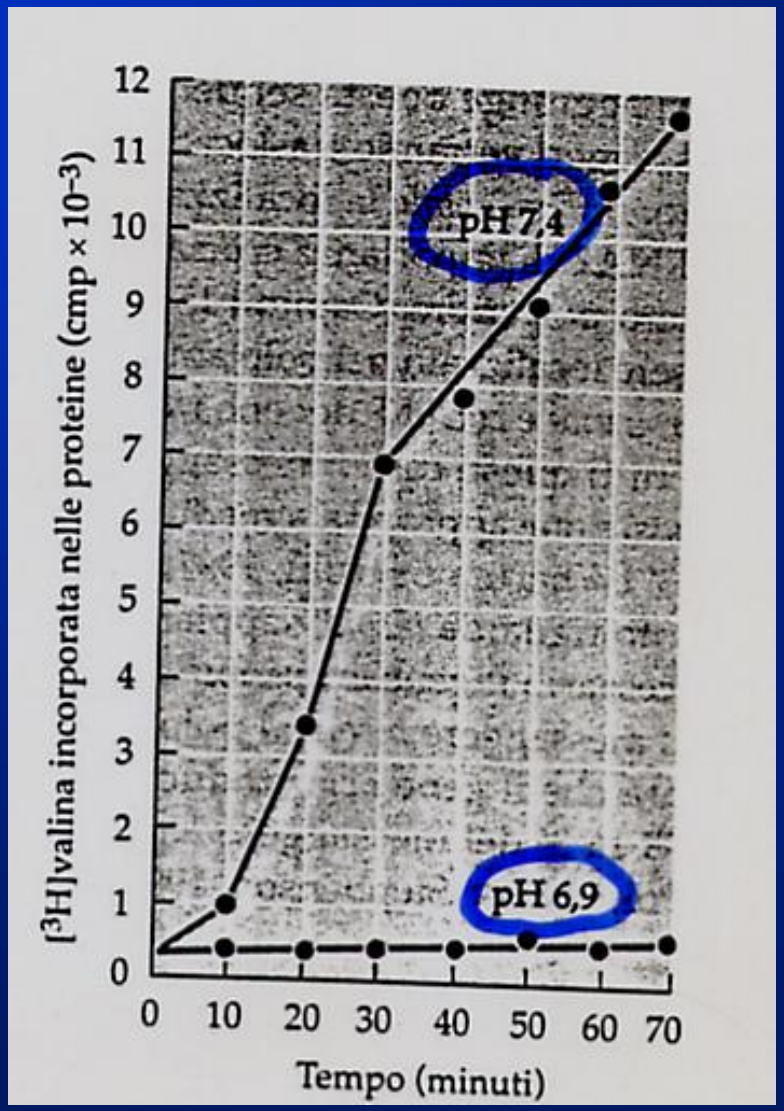
Nei Mammiferi ⇒

- la fusione dei pronuclei dura circa 12 ore
- cromatina del pronucleo maschile si decondensa
- Pronucleo femminile completa la meiosi

1) migrazione dei due pronuclei e duplicazione del DNA
2) Rottura delle membrane nucleari
3) Cromatina si condensa in cromosomi i quali si orientano nella regione equatoriale e contattano il fuso mitotico

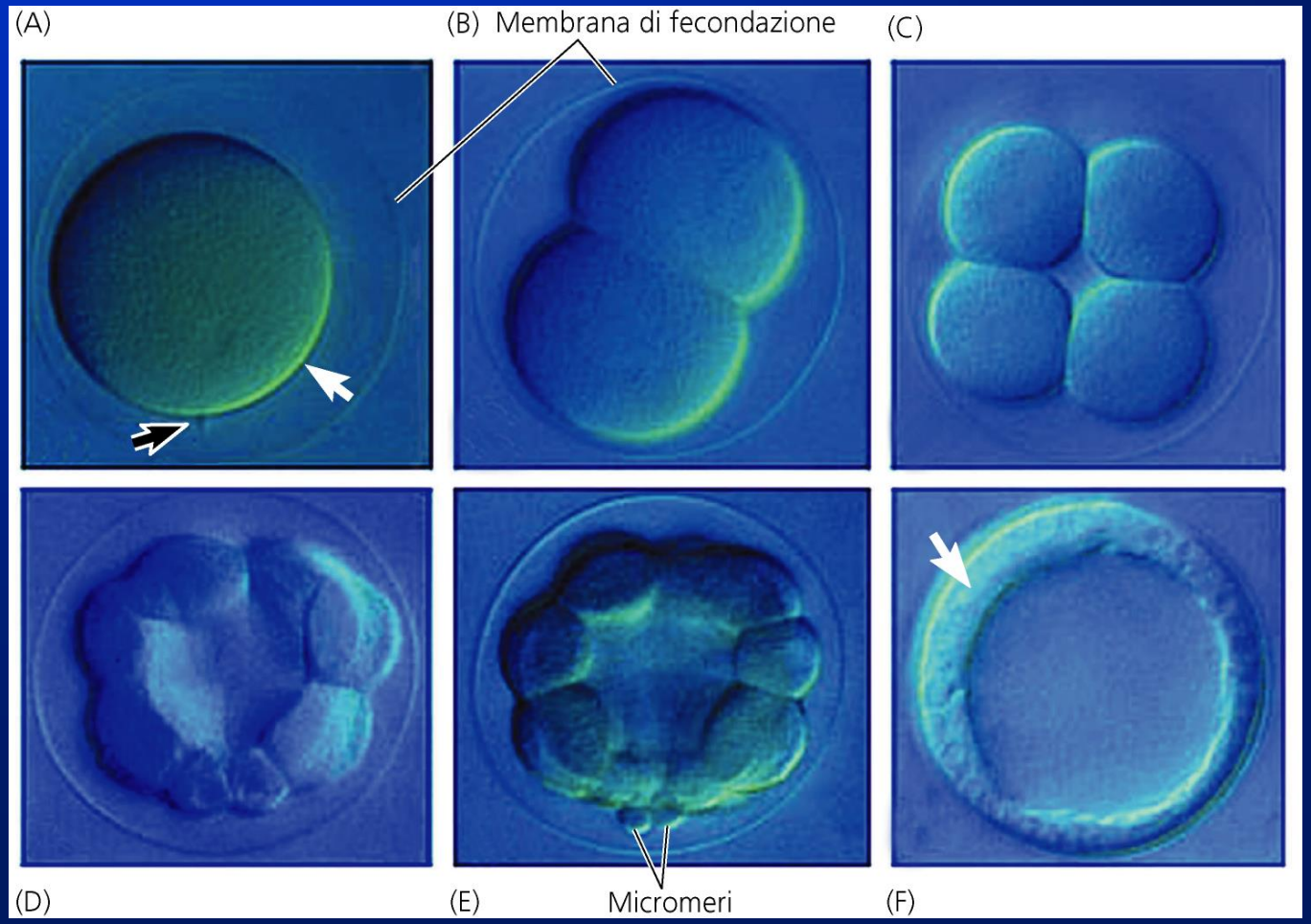
a) Manca una reale fusione del materiale genico proveniente dai due gameti dopo la fecondazione
b) Il nucleo zigotico è realmente visibile solo **dopo la prima divisione**

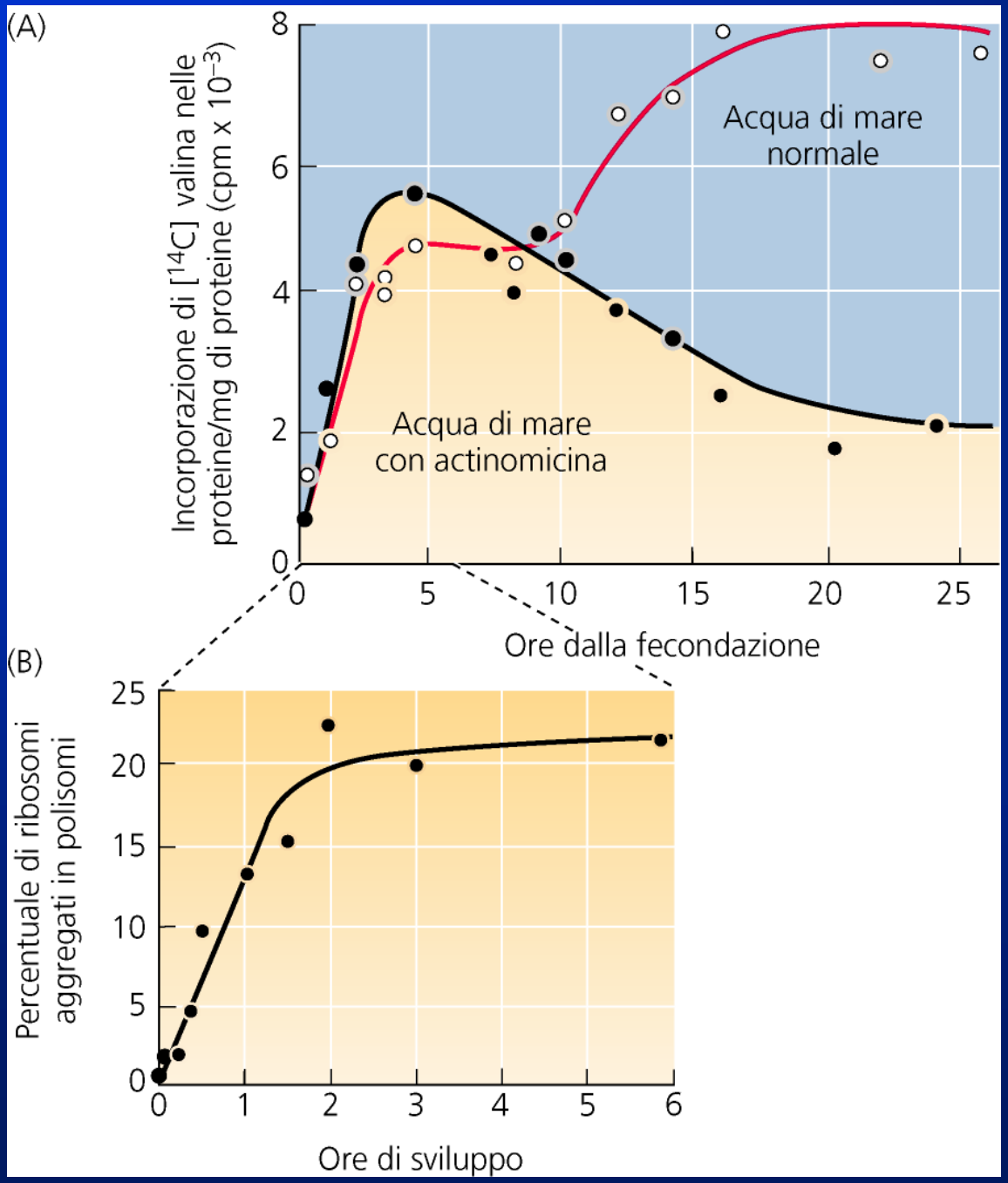
Attivazione della sintesi proteica



Actinomicina D- Inibizione della trascrizione (non blocca lo sviluppo embrionale)

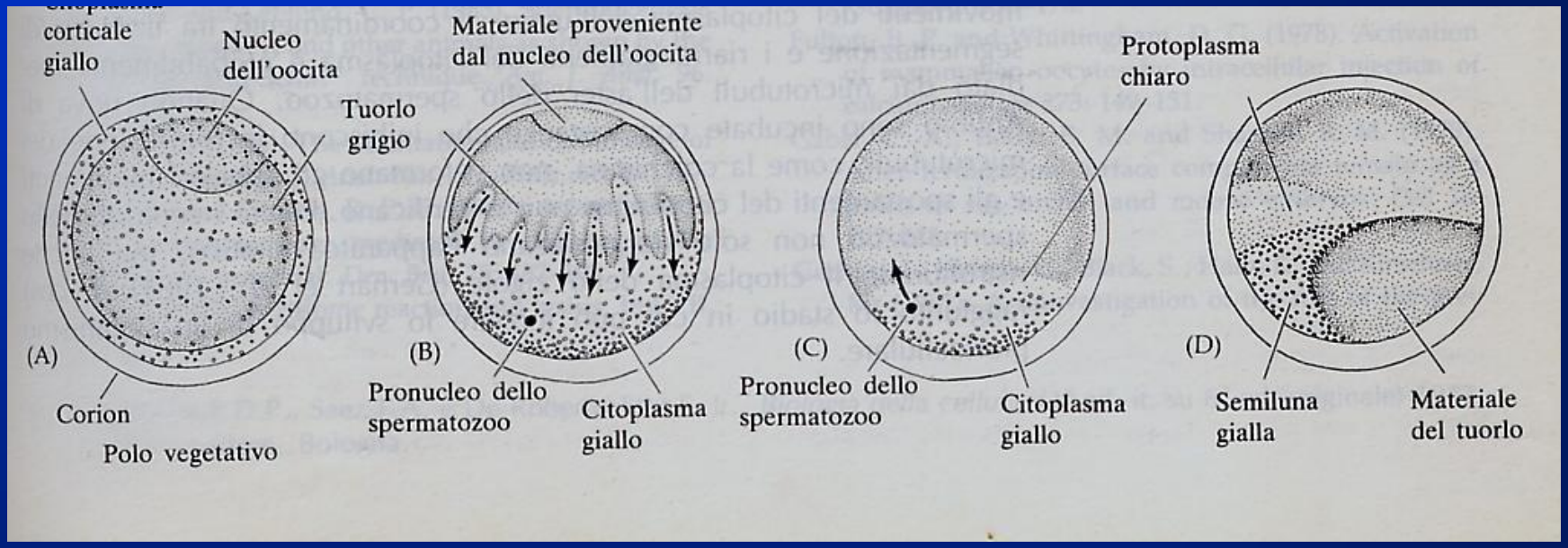
Cicloeximide- Inibizione della traduzione (blocca sviluppo embrionale)



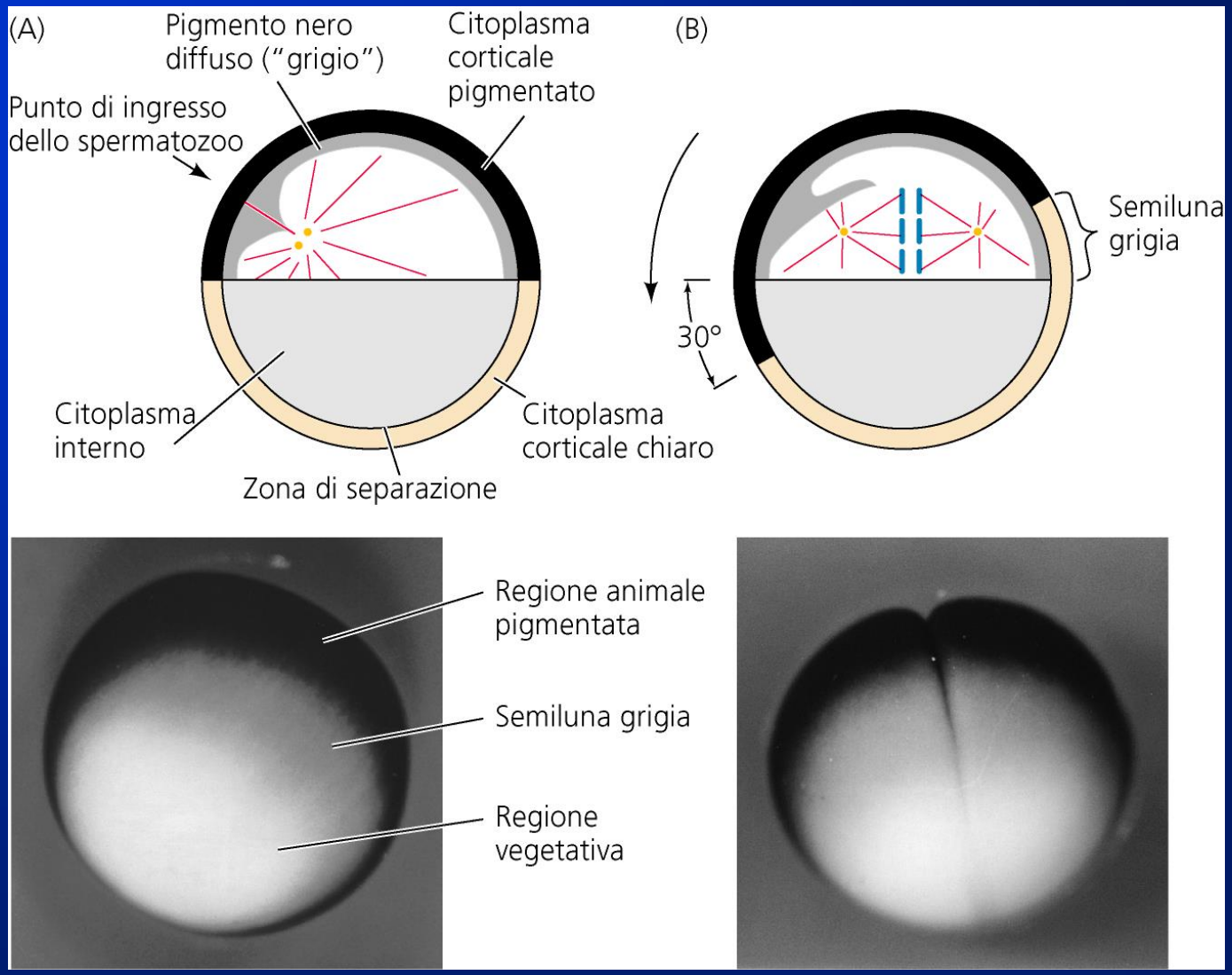


La prima parte dello sviluppo embrionale è in molti modelli animali dipendente dall'accumulo di trascritti materni

Riarrangiamenti citoplasmatici



Il materiale citoplasmatico si ridistribuisce nell'ovo fecondato in modo diverso rispetto a come era distribuito nell'uovo prima della fecondazione



Materiale citoplasmatico della cellula uovo fecondata viene ridistribuito

1. Contenuto del citoplasma non ha più una omogenea distribuzione
2. Ciò che è contenuto nel citoplasma dell'uovo si posiziona all'interno dello zigote lì dove servirà durante le prime fasi dell'embriogenesi