

## Gametogenesi

La prima tappa della riproduzione sessuale è la **gametogenesi**, una complessa serie di eventi che hanno luogo nelle **gonadi** (o ghiandole sessuali o genitali) e portano alla formazione dei **gameti**. I goni non si originano nelle gonadi ma derivano da **cellule germinali primordiali (PGC, Primordial Germ Cells)** o protogoni che, durante lo sviluppo dell'embrione, migrano da specifici distretti e colonizzano le **creste genitali**. Nella gonade maschile o **testicolo** gli **spermatozoi** (o gameti maschili) si originano a partire dagli spermatogoni attraverso la **spermatogenesi**; nella gonade femminile o **ovario** le **cellule uovo** (o gameti femminili) si formano a partire dagli oogoni mediante l'**oogenesi**. Durante la spermatogenesi ogni spermatocita primario che si divide meioticamente origina quattro spermatidi, ognuno dei quali è destinato a diventare uno spermatozoo funzionale. Al contrario, nell'oogenesi, delle quattro cellule prodotte dall'oocita primario che affronta la meiosi, solo una diviene la cellula uovo. Le altre cellule, i globuli polari, andranno incontro a degenerazione.

I vertebrati sono, in genere, costituiti da specie **gonocoriche** in cui le due gonadi sono presenti in due individui diversi.

Le specie **ermafrodite** presentano, invece, le due gonadi nello stesso individuo (diversi intervertebrati e tra i vertebrati alcuni pesci).

L'ermafroditismo può essere:

- **simultaneo** quando le due gonadi sono presenti contemporaneamente in un individuo (es. *C. elegans*, ascidie). In questo caso può avvenire che l'individuo feconda sé stesso (**autofecondazione**). Tale ermafroditismo è detto **ermafroditismo sufficiente**;
- **successivo** quando un individuo presenta in momenti diversi prima il testicolo e poi l'ovario (**ermafroditismo proterandrico**, per esempio i molluschi e alcuni pesci come le orate) oppure prima l'ovario e poi il testicolo (**ermafroditismo proteroginico**, per esempio pesci come *coris julis*). In questo caso l'individuo non feconda sé stesso ma un altro individuo (**ermafroditismo insufficiente**).

L'evoluzione ha favorito l'affermarsi dell'ermafroditismo insufficiente questo perché la fecondazione incrociata permette una migliore variabilità genetica rispetto all'autofecondazione.

Tramite la **determinazione del sesso** si stabilisce se una gonade è femminile o maschile. Tale determinazione può essere:

- **primaria** o cromosomica ed è dovuta alla presenza dei cromosomi sessuali diversi.

Nell'uomo ci sono **46 cromosomi** ovvero **23 coppie** di cui: **22 coppie** di **autosomi** e **una coppia** di **cromosomi sessuali**: le femmine possiedono due cromosomi X (XX) mentre i maschi un cromosoma X e un cromosoma Y (XY).

- **secondaria** che è sotto il controllo degli ormoni sessuali;
- **ambientale** spesso dipendente dalla temperatura.

### Determinazione primaria

- Nell'uomo esiste il sistema cromosomico X-Y:  
**XX**= individuo femmina, **XY**= individuo maschio (X0= individuo femmina sterile).
- In *Drosophila melanogaster*, invece, esiste il sistema X-0:  
**X0**= individuo maschio, **XX**= individuo femmina.
- Nei polli esiste il sistema Z-W:  
**ZW**= individuo maschio, **ZZ**=individuo femmina.
- Negli insetti esiste il sistema aploide-diploide  
**aploide**= individuo maschio, **diploide**= individuo femmina.

### Determinazione secondaria

L'ipotalamo produce i **fattori di rilascio e di inibizione** che agiscono sull'ipofisi (situata sotto l'ipotalamo), la quale è stimolata a produrre ormoni sia nei maschi che nelle femmine.

Nell'ovaio, tali fattori inducono la produzione di **estrogeni** e **progesterone** (che sono responsabili per esempio dello sviluppo delle mammelle e della comparsa del ciclo mestruale). Nel testicolo avviene invece la produzione dell'ormone maschile **testosterone** (responsabile per esempio dello sviluppo di barba e muscoli).

### Determinazione ambientale

Il sesso delle gonadi viene influenzato anche dalla **temperatura ambientale** o da **fattori fisici** o **chimici** o da **interazioni sociali**.

Un'influenza dovuta alla temperatura la possiamo ritrovare, per esempio, negli alligatori. Infatti, le loro uova se si sviluppano a una temperatura più alta (intorno ai 34°C) daranno origine a maschi mentre se si sviluppano a una temperatura più bassa (intorno ai 30°C) daranno origine a femmine. Un esempio, invece, di influenza dovuta a 'interazioni sociali' è il caso della **Bonellia viridis**, un invertebrato marino. Alla schiusa delle uova, le larve nascono indifferenziate. Quelle che entrano nella proboscide di una femmina adulta vengono indotte, dalla presenza della **bonellina**, un ormone prodotto da questa, a diventare un maschio. Le larve che, invece, rimangono libere e non entrano in contatto con la femmina adulta si sviluppano come femmine.

### Determinazione primaria del sesso

Sin dal 1959 è noto che nei mammiferi il cromosoma Y contiene un gene determinante per lo sviluppo del testicolo. Tale gene è stato chiamato **SRY (sex-determining region of the Y chromosome)**. L'attivazione di Sry è ristretta a un preciso spazio temporale. A partire dalla quarta settimana dalla fecondazione nell'embrione XY, poco dopo l'attivazione del gene Sry, si compie rapidamente la progressiva differenziazione della **gonade bipotente** in **testicolo**.

Sry attiva una proteina, **TDF (testis-determining factor)** che dà inizio al differenziamento della gonade indifferenziata in testicolo agendo come fattore di trascrizione e promuovendo l'espressione del gene **SOX9** (gene autosomico, presente in tutti i vertebrati). Questo gene inibisce la linea femminile cioè l'espressione del gene **Wnt-4\*** e blocca la produzione della  $\beta$ -catenina mentre permette l'attivazione dell'**ormone anti-Mülleriano** e la produzione di **testosterone**. Il gene Sry, oltre ad essere presente

nei maschi normali XY, lo troviamo anche in topi transgenici XX, la cui presenza comporta lo sviluppo dei testicoli e alla completa inversione di sesso.

Nel caso delle femmine dove il cromosoma Y non è presente e di conseguenza neanche il gene Sry, sul cromosoma X esiste un gene, detto **DAX-1** che blocca l'espressione di Sox-9 e attiva **Wnt-4** il quale inibisce la produzione di testosterone. Dax-1 inoltre, blocca l'espressione del gene *Amh* favorendo lo sviluppo del dotto di Müller.

#### Differenziazione delle gonadi

Gli abbozzi delle gonadi maschili e femminili si sviluppano da due **creste genitali** o **creste gonadiche** e formati da mesoderma intermedio rivestito da uno strato di **splanchnopleura** (mesoderma laterale). Ogni cresta è costituita principalmente da cellule epiteliali che assumono una forma cilindrica nei primi stadi di sviluppo. Tra queste cellule si osserva un secondo tipo cellulare, le **cellule germinali primordiali** (PGC) o protogoni. I protogoni daranno origine, poi, ai gameti (spermatozoi e ovociti) mentre le cellule epiteliali si differenzieranno nelle cellule somatiche della gonade con funzioni di sostegno (cellule di Sertoli nel maschio, cellule follicolari nella femmina) e con funzioni di produzioni di ormoni (cellule di Leydig nel maschio e cellule della teca nella femmina). I protogoni compaiono nell'embrione in regioni diverse dalle creste genitali, e raggiungono questa sede in seguito a un processo di migrazione.

Nella gonade in differenziazione, si distinguono uno strato epiteliale esterno, detto **cortex** o zona corticale, contenente i protogoni, e una regione interna detta **medulla** o zona midollare, costituita dai **cordoni sessuali primari**. Fino a questo stadio di differenziazione (circa la settima settimana nell'uomo), non vi è alcuna distinzione tra gonade maschili e gonade femminili.

Nel **maschio**, i protogoni migrano dal cortex della gonade verso i cordoni sessuali primari della medulla, che assumano l'aspetto di strutture cave e si trasformano nei **tubuli seminiferi**. Nella parte dorsale della gonade si sviluppa un sistema di tubuli molto sottili che darà origine alla **rete testis**. I canali della rete testis entrano in connessione con i tubuli seminiferi e con il **dotto di Wolff** (mentre il **dotto di Müller** scomparirà per l'azione dell'ormone **anti-mülleriano (AMH)**), il quale darà origine alle strutture per l'emissione esterna degli spermatozoi: **dotto deferente**, **epididimo**, **vescichetta seminale**. La medulla quindi diviene la parte funzionale del testicolo (quindi la più sviluppata) mentre il cortex che si riduce trasformandosi in un sottile strato epiteliale che riveste la superficie del testicolo.

Nelle **femmine**, la medulla si riduce mentre il cortex si ispessisce notevolmente. Durante l'accrescimento del cortex, le cellule epiteliali si organizzano in cordoni che circondano una o più cellule germinali, costituendo i **follicoli**, mentre i protogoni diventeranno ovociti negli stadi iniziali dell'ovogenesi. In questo caso, il dotto di Wolff degenera mentre si forma il **dotto di Müller** dal quale avranno origine le **Tube di Falloppio** che collegano l'ovaio all'utero. Infatti, questi due organi tubulari (Tube di Falloppio) consentono il passaggio dell'ovocita dall'ovaio all'utero ed è il luogo dove si verifica la **fecondazione**. L'ostruzione tubarica è una delle principali cause di infertilità.

Nella maggior parte dei Mammiferi, le gonadi, in particolare i testicoli, migrano in direzione caudale: nella cavità addominale o in diverticoli ventrali posteriori della cavità addominale, i **sacchi scrotali**, in modo temporaneo (es. roditori, pipistrelli) o permanente (molti mammiferi, inclusi i Primati superiori). Tale migrazione sembra da mettere in relazione alla necessità di una temperatura più bassa a quella corporea, per la spermatogenesi.

Le cellule della linea germinale rivestono un ruolo importante nella produzione dei gameti, nella trasmissione dei caratteri ereditari da una generazione all'altra e nell'evoluzione. In molti organismi, come Insetti, Nematodi e Vertebrati, durante lo sviluppo embrionale la separazione tra cellule della linea germinale e cellule somatiche avviene precocemente, prima ancora che la gonade si sia formata. In altri organismi, quali ad esempio Cnidari, Tunicati e Platelminti, non solo questa distinzione non si verifica, ma le cellule somatiche possono diventare cellule germinali anche se già differenziate. Le **cellule germinali primordiali** (PGC) vengono specificate secondo due modi:

- il **preformismo** prevede una specificazione molto precoce che si basa sull'acquisizione di determinanti definiti **plasma germinale** (ad es. in *C. elegans* e in *Xenopus laevis*) o **plasma polare** (in *Drosophila*). Questo materiale citoplasmatico è formato da fibrille e granuli elettron-densi (RNA e proteine), detti **granuli germinali**, associati a numerosi mitocondri
- l'**epigenesi** prevede una specificazione in risposta a segnali induttivi, come in topo e probabilmente in tutti i Mammiferi.

Inizialmente in *C. elegans* il plasma germinale è disperso nel citoplasma dell'ovocita e durante la fusione dei pronuclei viene trasferito nella regione posteriore dello zigote dove viene segregato durante le prime fasi della segmentazione cosicché il blastomero P4 eredita tutti i granuli germinali (granuli P) e diventa la singola cellula germinale primordiale.

In *Drosophila* il plasma polare viene assemblato al polo posteriore dell'ovocita prima della fecondazione e con la cellularizzazione di quest'area, prima che si formi il blastoderma, si individuano 4-5 cellule polari, uniche progenitrici delle PGC.

In *X. laevis* il plasma germinale è localizzato in prossimità del polo vegetativo dell'ovocita e, in seguito alla rotazione corticale imposta dalla fecondazione, si stacca dal vitello e si organizza in isole. Solo le cellule che riceveranno una sufficiente quantità di plasma germinale rimarranno totipotenti e daranno origine alle PGC. Gli altri blastomeri acquisendo il fattore trascrizionale VegT, vanno incontro ad un destino somatico divenendo cellule endodermiche.

I componenti dei granuli germinali delle PGC inibiscono il loro apparato trascrizionale rendendo queste cellule insensibili ai segnali che le indirizzerebbero verso un destino somatico. Alla base di questa regolazione ci sono i membri della famiglia genica **nanos**, identificati per la prima volta in *Drosophila*.

In *Drosophila*, la mancanza di questi geni determina uno sviluppo anomalo delle PGC: le cellule hanno una morfologia alterata e trascrivono mRNA che normalmente viene espresso dalle cellule somatiche.

La specificazione delle cellule germinali che segue la via dell'epigenesi avviene nelle fasi più avanzate dello sviluppo in seguito a **segnali induttivi** provenienti dai tessuti circostanti e non da un plasma germinale preformato.

#### Migrazione delle PGC nelle creste germinali

In *Drosophila*, per esempio, le PGC migrano attraverso l'epitelio intestinale, disponendosi nel sovrastante mesoderma.

Nel topo, invece, in una regione embrionale localizzata tra il sacco vitellino e l'allantoide, le PGC invadono l'endoderma e attraverso l'intestino giungono al mesoderma delle creste genitali.

### Formazione dei gameti maschili

La formazione degli spermatozoi include tre fasi principali:

- la **spermatogenesi**, caratterizzata dalla proliferazione degli spermatozoni attraverso divisioni mitotiche e dalla formazione di spermatidi;
- la **spermiogenesi**, durante la quale gli spermatidi differenziano in spermatozoi;
- la **spermiazione**, fase in cui gli spermatozoi vengono rilasciati dal testicolo.

#### Spermatogenesi

Consideriamo la spermatogenesi nei Mammiferi.

Nel testicolo in differenziamento si riconoscono due tipi cellulari: le **cellule del Sertoli** e gli **spermatozoni di tipo A1** (cellule staminali derivate dopo alcune divisioni mitotiche dalle PGC). Le cellule del Sertoli, somatiche, svolgono una funzione trofica e di sostegno per gli spermatozoni che entrano in uno stato quiescente e vi rimangono fino alla maturità sessuale. Da questo momento in poi, sotto influenza ormonale, gli spermatozoni quiescenti si attivano andando incontro a **proliferazione**. Inizia così la **spermatogenesi** che può essere **ciclica** (negli organismi con riproduzione stagionale) oppure **continua** (come ad esempio nell'uomo, in cui la produzione di spermatozoi avviene per tutta la vita fertile dell'organismo).

Gli spermatozoni di tipo A1 si dividono mitoticamente formando due popolazioni cellulari: la prima ancora formata da spermatozoni di tipo A1 mentre la seconda formata da spermatozoni di tipo A2, i quali attraverso successive mitosi, producono cloni di spermatozoni di tipo A3 e A4.

Gli spermatozoni di tipo A4 possono andare incontro a tre diversi destini: autorinnovarsi (cioè generare altri A4), andare incontro ad apoptosi o differenziarsi in **spermatozoni intermedi** destinati ad intraprendere la meiosi. Gli spermatozoni intermedi si dividono in spermatozoni di tipo B, precursori degli **spermatociti primari**. Il passaggio da spermatozoni di tipo B a spermatociti primari avviene per mezzo del fattore neurotrofico **GDNF** (Glial cell line Derived Neurotrophic Factor), prodotto dalle cellule del Sertoli. Livelli bassi di GDNF determinano altre divisioni mitotiche degli spermatozoni mentre alti livelli di GDNF favoriscono il differenziamento degli spermatozoni in spermatociti primari.

Ogni spermatocita primario va incontro alla meiosi I da cui avranno origine due **spermatociti secondari** morfologicamente identici, con un numero di cromosomi aploide. A sua volta ogni spermatocita secondario compie la meiosi II originando due **spermatidi**, cellule aploidi ma ancora morfologicamente immature. A questo punto gli spermatidi vengono gradualmente trasformati in **spermatozoi** maturi attraverso il processo della **spermiogenesi**.

Un aspetto peculiare della spermatogenesi è che le cellule germinali, a partire dallo spermatozono di tipo A2 fino alla fine della spermiogenesi, sono unite tra loro mediante ponti citoplasmatici, residui di una incompleta citodieresi delle divisioni mitotiche e meiotiche a cui sono andate incontro.

#### Spermiogenesi e spermiazione

Gli spermatidi, cellule rotondeggianti con un nucleo eucromatico, vanno incontro, attraverso la **spermiogenesi**, a graduali cambiamenti morfologici che li trasformeranno in spermatozoi. Questo processo di differenziamento include sia modificazioni del nucleo che sia l'elaborazione di strutture cellulari specifiche, quali l'**acrosoma** e il **flagello**. Nel nucleo si assiste alla condensazione della cromatina. Tale condensazione consiste nella sostituzione di proteine istoniche con **protammine** (spermina e spermidina), proteine di piccole dimensioni, altamente basiche e ricche di arginina. Come conseguenza, la cromatina non è più trascrivibile. Il DNA, molto impacchettato, si condensa in toroidi del diametro di circa 50 nm. Il filamento di 50 nm si ripiega quindi in anse legate a molecole della matrice nucleare formando una sorta di ciambella. La rimozione degli istoni procede per **proteolisi specifica**.

A livello citoplasmatico si assiste alla fusione di alcune vescicole dell'apparato di Golgi, contraddistinte dalla presenza di **granuli preacrosomici**, a formare un'unica grande vescicola (che non è altro che un lisosoma) chiamata **acrosoma**. L'acrosoma contiene diversi enzimi lisosomiali tra cui esterasi, neuraminidasi, acrosina (proteasi simile alla tripsina). Al momento della fecondazione, l'acrosoma libera tali enzimi che vanno ad interagire con la membrana della cellula uovo (**reazione acrosomiale**). La vescicola acrosomiale si dispone nella parte anteriore del futuro spermatozoo e aderendo al nucleo lo rivestirà come un cappuccio.

L'ultima fase della spermiogenesi comporta l'eliminazione del **corpo residuo** costituito dalla maggior parte del citoplasma dello spermatidio e dai ponti citoplasmatici. Infine, avviene la **spermiazione** che consiste nel rilascio all'esterno degli spermatozoi formati e nel fatto che i corpi residui verranno fagocitati dalle cellule del Sertoli.

Lo spermatozoo libero (incapace ancora di muoversi) che lascia il tubulo seminifero (spinto dalla pressione del liquido seminale) deve andare incontro a un'ulteriore "maturazione" e ciò si verifica nell'epididimo. Qui subisce delle modificazioni che interessano, per esempio, la membrana plasmatica che a livello dell'epididimo si arricchisce in colesterolo e di conseguenza essa non sarà più fluida ma rigida divenendo incapace di fondersi con la membrana della cellula uovo (**decapacitazione**). Lo spermatozoo acquista nuovamente la capacità di fecondare (**capacitazione**) durante la sua permanenza nelle vie genitali femminili, le cui secrezioni contengono **albumina** in grado di rimuovere il colesterolo dalla membrana dello spermatozoo. Nell'ultimo tratto dell'epididimo (**cauda**) lo spermatozoo acquisisce, inoltre, motilità. Si ritiene che la motilità sia dipendente dall'attivazione dell'**adenilato ciclasi** che comporta la mobilitazione del **calcio intracitoplasmatico** ( $Ca^{2+}$ ). Altre modifiche che si verificano nell'epididimo riguardano il metabolismo degli spermatozoi che acquisiscono la capacità di sfruttare come fonte di energia **fruttosio**, **sorbitolo** e **glicerilfosfato**. Il fruttosio può essere utilizzato sia in condizioni aerobiche sia anaerobiche. Mentre il sorbitolo e la **glicerilfosfolina** solo in condizioni aerobiche. La glicerilfosfolina viene poi scissa in **colina** e **glicerilfosfato** da un enzima

presente nelle vie genitali femminili. Gli spermatozoi contengono anche **plasmalogeno**, un lipide di riserva che costituisce un'ulteriore fonte di energia.

### Morfologia

Lo spermatozoo di Mammiferi è caratterizzato da una testa e da un flagello che, può essere suddiviso in tratti strutturalmente distinti detti: **collo**, **segmento intermedio**, **segmento principale** e **segmento terminale**. La testa è occupata interamente da un nucleo eterocromatico. Anteriormente al nucleo si trova l'acrosoma che presenta una **membrana acrosomiale interna** rivolta verso il nucleo e una **membrana acrosomiale esterna** rivolta verso la membrana plasmatica.

Testa spermatozoo (struttura)

MEMBRANA PLASMATICA → MEMBRANA ACROSOMIALE ESTERNA → ACROSOMA → MEMBRANA ACROSOMIALE INTERNA → INVOLUCRO NUCLEARE → NUCLEO

In molti invertebrati, come per esempio, il riccio di mare, tra l'involucro nucleare e la membrana acrosomiale interna si osserva un deposito di actina globulare che, al momento della fecondazione, polimerizzerà a dare actina filamentosa formando così il

**processo acrosomico**.

Il **collo** costituisce il tratto di connessione tra la testa e il flagello. Questa regione è caratterizzata dalla presenza del **centriolo prossimale** e da una **piastra basale** (la parte terminale della coppia centrale di microtubuli dell'assonema) da cui originano 9 fibre proteiche (**fibre dense**), dette **colonne segmentate**. Queste fibre proteiche circondano l'**assonema**, struttura originata dai centrioli e costituita da una coppia di microtubuli centrali circondata da nove coppie periferiche in una caratteristica disposizione "9+2". I microtubuli centrali dell'assonema presentano una parete completa, mentre nelle coppie periferiche un microtubulo è completo ed è costituito da tredici protofilamenti mentre l'altro è incompleto ed è costituito da undici protofilamenti. Inoltre, le coppie esterne di microtubuli presentano dei bracci laterali contenenti **dineina**, una proteina motrice con attività adenosintrifosfatasi (ATP-asi) responsabile della conversione di energia chimica in movimento meccanico. Nel **tratto intermedio** (midpiece) intorno alle 9 fibre dense si trova la **guaina mitocondriale**, formata da mitocondri disposti a spirale, fonte di ATP fondamentale per il movimento del flagello. Anomalie nelle fibre dense possono causare problemi di infertilità.

- **Immotile cilia syndrome (ICS)** è una malattia autosomica recessiva caratterizzata dal fatto che tutte le ciglia e i flagelli sono immobili. Tale immobilità è dovuta all'assenza di dineina o a difetti di altre proteine coinvolte nell'ancoraggio tra i microtubuli. Spesso questa malattia è accompagnata da bronchite cronica, sinusite, otite media e infertilità maschile.

Il tratto intermedio termina con una struttura proteica ad anello chiamata **annulus** o **anello di Janssen** che segna il confine tra il tratto intermedio e quello principale. Nel **segmento principale** l'assonema continua ad essere circondato dalle fibre proteiche, di cui due continuano con una struttura circolare denominata **guaina fibrosa**. La maggior parte del **segmento terminale** risulta formata esclusivamente dall'assonema rivestito dalla membrana plasmatica.

### Liquido seminale

Il **liquido seminale**, noto anche come **sperma**, è costituito da spermatozoi immersi in un mezzo liquido chiamato **plasma seminale**. Quest'ultimo è essenziale per la sopravvivenza degli spermatozoi dopo **eiaculazione**. Il liquido seminale proviene dalle cellule di Sertoli, dalla ghiandola bulbo-uretrale (che nell'uomo ha solo una funzione lubrificante), dalla prostata e dalle vescichette seminali. Alla composizione del plasma seminale concorrono varie sostanze prodotte a livello dell'epididimo, delle vescichette seminali e delle ghiandole accessorie, come la prostata. Tra queste sostanze rientrano **proteine**, **lipidi**, **prostaglandine**, **ormoni**, **ioni**, **acido citrico**, **fruttosio**, **vitamina C** ed enzimi come **zinco** e **carnitina**. Ad ognuna di queste sostanze è attribuita una specifica funzione:

- fruttosio e carnitina sono importanti nel metabolismo e nella motilità degli spermatozoi;
- lo zinco ha probabilmente una funzione battericida diretta e indiretta, e stabilizza la cromatina degli spermatozoi;
- ioni bicarbonato svolgono una funzione tampone, utile per neutralizzare l'acidità dell'ambiente vaginale;
- i lipidi stabilizzano le membrane degli spermatozoi e possono rappresentare una fonte addizionale di energia.

Caratteristiche dello sperma

- Il volume medio dello sperma eiaculato: 3/5 ml
- Numero di spermatozoi nello sperma eiaculato: da 300 a 500 milioni
- pH leggermente alcalino: 7,2/8
- osmolarità del liquido seminale: isoosmotica
- percentuale di spermatozoi anomali o immobili: non inferiore al 10%, se maggiore del 35%, la fertilità può essere compromessa.

La spermatogenesi può essere danneggiata dai seguenti fattori:

- temperatura elevata (che nell'uomo causa criptorchidismo ovvero la mancata discesa di uno o di entrambi i testicoli nel sacco scrotale).
- Carenze di vitamine (soprattutto di vitamine A ed E).
- Le radiazioni ionizzanti: piccole dosi creano un arresto momentaneo della produzione di spermatozoi mentre dosi elevate rendono l'individuo colpito sterile.
- Le radiazioni elettromagnetiche emesse dai tubi catodici.
- Alcuni pesticidi

### Ovogenesi

L'**ovogenesi** è il processo che consiste nella formazione del gamete femminile chiamato **ovocita** o **cellula uovo**. Questa serie di eventi avviene a livello della gonade femminile, l'**ovaio**. Lo scopo di questo processo è quello di concentrare nella cellula uovo tutti quei materiali necessari per sostenere lo sviluppo dell'embrione. I meccanismi dell'ovogenesi variano da una specie all'altra molto di più di quelli della spermatogenesi. In questo processo, sono riconoscibili le seguenti tappe: **proliferazione degli ovogoni**, **formazione degli ovociti** e **follicologenesi**.

### Proliferazione degli ovogoni

Nell'ovaio gli ovogoni vanno incontro a una fase proliferativa caratterizzata da divisioni mitotiche da cui si originano altri **ovogoni**, che per incompleta citodieresi, rimangono uniti tra di loro da ponti citoplasmatici che garantiscono uno sviluppo sincrono. Gli ovogoni sono cellule tondeggianti con nucleo diploide. Al termine di queste mitosi, l'ovogonio si è differenziato in **ovocita primario**. L'ovocita primario, che entra in meiosi I, è caratterizzato da mitocondri ed organuli organizzati intorno al nucleo al cui interno si osservano due nucleoli voluminosi. Nei Vertebrati il primo blocco della meiosi si verifica in **diplotene** (profase meiosi I), che permarrà fino alla pubertà nel caso dell'uomo o ad un cambiamento climatico nel caso degli Anfibi. Negli Anfibi, in particolare in *Xenopus laevis*, il cambiamento climatico stimola l'ipotalamo al rilasciare gonadotropine, ormoni sessuali che spingono l'ovaio a produrre progesterone. Il progesterone attiva la produzione della proteina c-Mos che fosforila un dimero formato da ciclina e da **chinasi ciclica dipendente (CDK)**, anche note come **p34 chinasi**, che non è altro il fattore **MPF** inattivo (Maturation promoting factor) il quale favorisce la meiosi (o mitosi) e viene attivato dalla fosforilazione. In questo modo, la profase I riprende. La meiosi si bloccherà nuovamente in metafase II per una nuova molecola, il **fattore citostatico CSF** costituito da c-Mos e dalla chinasi cdk-2. Con la fecondazione, nel citoplasma vengono rilasciati ioni calcio legati alla calmodulina (CaM), i quali agiscono su due enzimi, le protein-chinasi (CaM-PKII e calpaina II) degradando il fattore CSF. La meiosi II si completa e i due pronuclei possono fondersi e avviene così la fecondazione.

La meiosi nella cellula uovo, quindi, può bloccarsi a vari stadi: nello stadio di ovocita primario, nella metafase I (es. il mollusco *Dentalium*, molti insetti), nella metafase II (es. anfibi o la maggior parte dei mammiferi) o a meiosi completa (es. riccio di mare).

Gli ovociti primari sono circondati da uno strato di cellule follicolari appiattite o **cellule della granulosa** che costituiscono i **follicoli primordiali**. La disposizione delle cellule follicolari intorno agli ovociti determina l'interruzione dei ponti citoplasmatici che fino a quel momento avevano tenuto uniti gli ovociti. Il follicolo permette l'accumulo di nutrienti e l'accrescimento dell'ovocita primario. Al microscopio elettronico, la membrana plasmatica dell'ovocita (detta anche **oolemma**) presenta sottili estroflessioni, i **microvilli**, che si interconnettono con i **macrovilli** presenti sulla membrana delle cellule follicolari. Tra la membrana plasmatica dell'ovocita e le cellule follicolari, c'è una matrice extracellulare detta **membrana primaria** che, a seconda dei Taxa, viene denominata in modo diverso (**membrana vitellina** negli Echinodermi, **involucro vitellino** negli Anfibi, **corion** nei pesci, **zona pellucida** nei Mammiferi) e svolge un ruolo importante nell'interazione ovocita-spermatozoo. I follicoli ovarici sono separati da uno stroma connettivale che accoglie vasi sanguigni e linfatici, nervi e cellule endocrine. Le cellule dello stroma formano la **teca** che nei Mammiferi è distinta in **teca interna**, riccamente vascolarizzata, e **teca esterna**, con caratteristiche fibrose. Alcune cellule della teca interna, stimolate da LH, producono ormoni androgeni che trasferiti alle cellule follicolari sottostanti vengono trasformati in estrogeni.

### Follicologenesi

L'accrescimento dei follicoli primordiali avviene attraverso un processo denominato **follicologenesi**. Nella follicologenesi, si possono distinguere tre fasi: **preantrale**, **antrale** ed **ovulatoria**.

#### Fase preantrale

L'accrescimento dell'ovocita è accompagnato dalla modificazione della morfologia delle cellule follicolari che si organizzano in uno strato di cellule cubiche (**follicolo primario**) e successivamente si dispongono su più strati a formare un **follicolo primario multilaminare**. In questo follicolo, le cellule follicolari più interne sono disposte radialmente a formare la **corona radiata**. Gli strati più esterni per la loro disposizione meno ordinata costituiscono la **granulosa**. Esternamente, l'ultimo strato di cellule follicolari si organizza in uno stroma connettivale suddiviso in una teca interna ed una teca esterna. Gli eventi che caratterizzano la fase preantrale, sono ormono-indipendenti e sembrano essere regolati da fattori paracrini secreti dall'ovocita e dalle cellule follicolari.

#### Fase antrale

Un ulteriore aumento delle dimensioni del follicolo segna la transizione dalla fase preantrale a quella antrale dando origine al **follicolo secondario**. Mentre l'ovocita ha raggiunto le dimensioni definitive, le cellule follicolari continuano a proliferare, si dispongono a formare 6-10 strati e tra di esse cominciano a comparire piccoli spazi che inizialmente si riempiono di un liquido chiaro, il **liquor follicoli**, ed in seguito confluiscono a formare una cavità detta **antro follicolare**. Il liquor follicoli deriva dai capillari della teca a cui si aggiungono prodotti secreti dall'ovocita e dalle cellule follicolari, tra cui glicosaminoglicani solforati ed ormoni steroidei. L'ampliarsi della cavità antrale spinge le cellule della granulosa alla periferia, mentre un piccolo gruppo di esse continua a circondare l'ovocita costituendo il **cumulo ooforo**. Solo uno, tra i follicoli antrali completa la sua crescita, ed è il follicolo dominante (o **follicolo terziario** o di **Graaf**). Tutti gli altri follicoli vanno incontro ad atresia.

#### Fase ovulatoria

Sotto l'azione di FSH il follicolo di Graaf diventa un organo endocrino secernente estrogeni, i quali inducono le cellule follicolari ad esprimere recettori per LH. L'aumento di LH provoca una profonda trasformazione del follicolo che diviene altamente vascolarizzato, a cui segue la secrezione, da parte del cumulo ooforo, di materiale extracellulare ricco in acido ialuronico, e lo sblocco della profase I in cui l'ovocita si trovava.

Al completamento della meiosi I, con la formazione dell'ovocita secondario e del primo globulo polare, segue l'inizio della II divisione meiotica, che si bloccherà allo stadio di metafase II. La meiosi II si completerà solo se avverrà fecondazione. Prima dell'ovulazione, l'ovocita secondario accompagnato dal cumulo ooforo viene espulso dal follicolo di Graaf. Questo avviene perché c'è un assottigliamento del tratto della parete del follicolo e della superficie dell'ovaio seguito dalla loro rottura. Il cumulo ooforo viene, poi, catturato dalle fimbrie e trasferito nell'ampolla tubarica (Tube di Falloppio) dove rimarrà fecondabile per 24 ore. In assenza di fecondazione, ovocita e cumulo ooforo degenerano e vengono rimossi per fagocitosi dai leucociti presenti nel fluido delle tube. Dopo l'espulsione del cumulo ooforo, le altre cellule follicolari rimaste nell'ovaio, sotto l'influenza dell'LH, si trasformano in una ghiandola endocrina detta **corpo luteo** capace di secernere progesterone ed estrogeni (a quantità sempre minore). Il progesterone stimola l'endometrio a ispessirsi e a produrre le sostanze necessarie per l'impianto dell'embrione. Nel caso in cui avviene una fecondazione, dopo qualche mese dall'impianto, il corpo luteo smette di funzionare e il compito di secernere ormoni sarà svolto dalla placenta. In caso contrario (non ha luogo la fecondazione), il corpo luteo si trasforma in **corpus albicans** (struttura di tipo cicatriziale), determinando una caduta dei livelli di progesterone.

### Asse ipotalamo-ipofisi-ovaio

Il primo elemento di questa catena è l'**ipotalamo**. Esso, situato alla base del cervello, libera **GnRH** (ormone o "fattore" di rilascio delle gonadotropine). Questo arriva all'**ipofisi** anteriore (Adenoipofisi) stimolando la secrezione di gonadotropine, **FSH** (ormone follicolo-stimolante) e **LH** (ormone luteinizzante). \* Questi, poi, agiscono sull'**ovaio**.

\*Nella fase follicolare, l'ipofisi inizia a secernere quantità sempre maggiori di FSH. Poco dopo questo periodo l'ipofisi inizia a secernere LH che raggiungerà un picco altissimo permettendo l'ovulazione. Tale picco è seguito dall'aumento di **estradiolo**, prodotto dal follicolo.

Nella fase postovulatoria, LH stimola lo sviluppo del corpo luteo. L'elevata concentrazione di progesterone riduce la secrezione di FSH e LH.

#### Ciclo mestruale nella donna

Il **ciclo mestruale**, che dura in media 28 giorni, è controllato dalle gonadotropine ipofisarie e dagli ormoni gonadici e si divide in: **ciclo ovarico** composto da una fase **follicolare** (circa 15 giorni) che termina con l'ovulazione e una fase **luteinica** (13-14 giorni);

**ciclo endometriale** composto da una proliferativa e secretiva. Durante questo ciclo, l'endometrio (parete dell'utero), sotto l'azione di estrogeni, si accresce e conseguentemente aumenta la concentrazione di arteriole, preparando il terreno fertile per l'annidamento dell'embrione (fase proliferativa). Una volta avvenuta l'ovulazione l'endometrio entra nella fase secretiva. Sotto l'azione del progesterone si arricchisce ulteriormente di vasi. Se non avviene la fecondazione, la concentrazione di estrogeni e progesterone cala e l'endometrio si sfalda dando origine al flusso mestruale.

L'ovogenesi avviene con modalità diverse a seconda della specie:

- nelle specie, come per esempio il riccio di mare o i Teleostei, la presenza degli ovogoni persiste per tutta la vita riproduttiva;

- nelle specie, come per esempio gli uccelli o i mammiferi, la presenza degli ovogoni è limitata ad alcune fasi dello sviluppo embrionale. Nel caso dell'uomo, gli ovogoni sono presenti fino al 7° mese di gestazione (di gravidanza) della vita intrauterina.

Nei **vertebrati anamni**, gli ovogoni hanno attività mitotica stagionale (es. Anfibi e alcuni pesci ossei). Mentre nei **vertebrati amnioti**, gli ovogoni cessano di dividersi per mitosi prima della fine della vita embrionale o poco dopo la nascita.

In **Drosophila** ciascuno ovogonio subisce 4 mitosi, producendo 16 cellule dette **cistociti** chiuse in una struttura, la camera ovarica formata da cellule follicolari. Tra queste cellule è presente una struttura citoscheletrica composta essenzialmente da actina, il **fusoma**. Solo la cellula che contiene una quantità maggiore di fusoma e presenta 4 ponti citoplasmatici potrà affrontare la meiosi per diventare ovocita mentre tutte le altre cellule diventeranno **cellule nutrici**.

#### Ovogenesi negli Anfibi

Gli eventi che caratterizzano il differenziamento degli ovociti in diplotene sono riconducibili a due fasi: **fase di previtellogenesi** (durata due anni circa) e **fase di vitellogenesi** (durata un anno circa). Nella previtellogenesi la crescita dell'ovocita primario è lenta ed è caratterizzata da:

- un aumento del numero dei mitocondri, dei ribosomi e dei nucleoli
- una marcata attività trascrizionale del DNA per la produzione di molecole di mRNA, tRNA e rRNA.

Per rispondere ad una maggior richiesta di mRNA, i cromosomi in diplotene tendono a separarsi rimanendo uniti solo a livello dei chiasmi e ogni cromatidio presenta tratti condensati, trascrizionalmente inattivi, intervallati a tratti ad ansa, sede di un'intensa attività trascrizionale. Per l'aspetto piumoso che acquisiscono, sono detti **cromosomi a spazzola**. Le proteine che verranno prodotte, in parte serviranno a sostenere la divisione dei blastomeri durante la segmentazione e in parte verranno utilizzati dall'ovocita stesso (per la costruzione della membrana primaria, ad esempio).

Durante la previtellogenesi, a livello del reticolo endoplasmatico, si verifica la sintesi di enzimi, mucopolisaccaridi e proteine ialine che saranno successivamente inglobate in vescicole che, durante la vitellogenesi, si localizzeranno nel cortex cellulare formando così i **granuli corticali**.

Durante la vitellogenesi, viene prodotto **vitello**. Quest'ultimo è costituito da **fosvitina** e **lipovitellina**, due proteine che si formano a partire dalla glicofosfolipoproteina **vitellogenina**. La vitellogenina (quindi il vitello) è prodotta nel fegato materno e, tramite il circolo ematico della teca interna, raggiunge attraverso le cellule follicolari la membrana plasmatica dell'ovocita che la incorpora mediante micropinocitosi. Il vitello accumulandosi nel citoplasma, favorisce l'accrescimento dell'ovocita e, distribuendosi secondo un gradiente, determina la comparsa dell'asse animale-vegetativo che conferisce alla cellula uovo una polarità. Contemporaneamente alla deposizione del vitello, si verifica la riorganizzazione di alcuni organuli citoplasmatici: i granuli corticali, che migrano alla periferia della cellula, e i mitocondri, che in seguito a duplicazione incrementano in numero formando la cosiddetta **nuvola mitocondriale**.

In base alla quantità di vitello contenuto, le uova possono essere classificate in:

**macrolecitiche**, uova con contenuto in vitello molto elevato, a loro volta suddivisibili in base alla posizione del vitello in: **centrolecitiche** (Insetti (Drosophila), 1mm circa) accumulato in una massa centrale e **telelecitiche** (pesci, Rettili, Uccelli e Mammiferi Prototeri da pochi mm fino oltre 10cm) quando occupa la maggior parte del citoplasma tranne una piccola area al polo animale contenente citoplasma formativo;

**mesolecitiche** (Anfibi, Anellidi, 2mm circa) uova con contenuto in vitello moderato e distribuito secondo un gradiente che va dal polo animale al polo vegetativo;

**oligolecitiche** (ascidia e riccio di mare, 100 µm) con scarso vitello distribuito omogeneamente;

**alecitiche** (Mammiferi Euteri, 100µm circa) prive di vitello.

A seconda della modalità di sviluppo, ritroviamo uova il cui vitello deve sostenere lo sviluppo completo dell'organismo (Rettili ed Uccelli), oppure uova con una quantità di vitello sufficiente a garantire lo sviluppo di una larva capace di nutrirsi autonomamente (ad es.

Echinodermi, Anfibi, pesci Teleostei). La completa assenza di vitello (nei Mammiferi più evoluti) è giustificata dal fatto che l'embrione riceverà il sostentamento dalla madre attraverso la placenta.

Inoltre, la quantità di vitello influenzerà le modalità con cui l'embrione andrà incontro alla segmentazione.

La cellula uovo per poter interagire con lo spermatozoo, è circondata da una **membrana primaria** e da **involucri** secondari e terziari. Sia nei Vertebrati che negli invertebrati, all'esterno della membrana plasmatica dell'ovocita, la membrana primaria costituisce uno strato chiamato **involucro vitellino** o **zona pellucida** nei Mammiferi. Questo involucro gioca, spesso, un ruolo cruciale nella fecondazione ovvero presenta delle molecole che riconoscono lo spermatozoo e lo spingono a fare la reazione acrosomiale.

Nei pesci Teleostei e negli insetti le cellule uovo hanno, come involucro di rivestimento, il **corion**, il quale presenta un'apertura, il **micropilo**, attraverso la quale gli spermatozoi passano per raggiungere l'oolemma.

In base alle condizioni ambientali in cui si trova l'ovocita quando viene deposto, gli involucri di rivestimento presentano una diversa composizione:

- l'involucro **gelatinoso** che riveste le uova deposte in ambiente acquatico (ad es. riccio di mare e Xenopus) e permette di tenerle unite di farle galleggiare;
- gli involucri che circondano le uova deposte in ambiente subaereo (Rettili, Uccelli e Mammiferi) si specializzano ulteriormente per svolgere una funzione protettiva, di termoregolazione ed accumulo di acqua, sali e proteine. Per esempio, l'uovo degli Uccelli,

dopo la fecondazione, passando attraverso la Tuba di Falloppio si arricchisce di vari strati, quali l'**albume** con ruolo nutritivo, **due membrane** costituite da fibre di cheratina e infine il **guscio** di natura calcarea.

Il citoplasma della cellula uovo può essere suddiviso in:

- un sottile strato (**cortex cellulare**) ricco di actina globulare e granuli corticali. L'actina globulare, al momento della fecondazione, polimerizzerà in actina filamentosa necessaria per la formazione dei microvilli, utili all'ingresso dello spermatozoo e per le prime divisioni mitotiche. I granuli corticali, vescicole di origine golgiana, contengono enzimi proteolitici, mucopolisaccaridi, perossidasi e la proteina ialina;
- **citoplasma formativo** caratterizzato da organuli, ioni, molecole in grado di garantire l'omeostasi cellulare;
- **citoplasma di riserva**, che durante l'ovogenesi si forma e si arricchisce di proteine, molecole di RNA, determinanti morfogenetici e vitello.

**Sviluppo embrionale indiretto:** Un uovo oligolecitico o mesolecitico, che si sviluppa in acqua, ha un'embriogenesi rapida che porta alla formazione di una larva capace di nutrirsi autonomamente. In queste modalità di sviluppo, solo una percentuale piccola dei numerosi embrioni prodotti sopravvive alle condizioni ambientali in cui si trova.

**Sviluppo embrionale diretto:** Un uovo teleolecitico potrà dare luogo ad un embrione a spese delle sue sole energie senza dover passare per una forma larvale. In tal caso, saranno ovulate un numero ristretto di uova, visto il grande sforzo energetico materno richiesto per la costruzione di questo tipo di uovo.

## Fecondazione

La riproduzione sessuale è una strategia di sopravvivenza che permette agli organismi appartenenti ad una determinata specie di mescolare il loro patrimonio genetico per produrre variazioni genetiche nella nuova generazione. La **fecondazione**, un processo essenziale nella riproduzione sessuale, ha come obiettivo l'unione del gamete maschile con il gamete femminile a formare lo zigote. In questo processo, possiamo riconoscere sei fasi principali:

1. acquisizione della motilità dello spermatozoo e chemiotassi in direzione della cellula uovo;
2. riconoscimento e legame dello spermatozoo agli involucri che rivestono l'uovo;
3. reazione acrosomiale, un processo di esocitosi a carico dello spermatozoo che determina il rilascio di enzimi idrolitici;
4. penetrazione dello spermatozoo nell'uovo;
5. legame e fusione dello spermatozoo alla membrana plasmatica dell'uovo;
6. attivazione del metabolismo dell'uovo e fusione del materiale genetico dello spermatozoo con quello dell'uovo (anfimissi) per dare inizio allo sviluppo del nuovo organismo.

## Storia

Nel 1784, **Lazzaro Spallanzani** dimostrò la necessità dell'interazione tra l'uovo e un qualcosa (gli spermatozoi, che ancora non si conoscevano) per formare uno zigote nelle rane. Successivamente, **Rudolf von Kölliker**, grazie all'utilizzo del microscopio, localizzò gli spermatozoi nel testicolo dei rospi. Nel 1876, **Hertwig** e **Fol** dimostrarono la penetrazione dello spermatozoo nell'uovo di riccio di mare.

Esistono due tipi di fecondazione: **esterna** ed **interna**. Negli animali a fecondazione esterna, l'incontro fra il gamete maschile e il gamete femminile ha luogo nell'ambiente acquatico. In questo tipo di fecondazione, gli organismi devono adottare delle strategie che incrementino la probabilità di incontro degli spermatozoi con le cellule uovo della stessa specie. Soluzioni parziali adottate prevedono, ad esempio, che i maschi e le femmine della stessa specie vivano in prossimità, che sincronizzino la gametogenesi e il rilascio di un gran numero di gameti nell'acqua. Queste condizioni non sono sufficienti perché, una volta rilasciati, gli spermatozoi devono trovare la cellula uovo omologa ed interagire con essa, evitando di fecondare uova di altre specie. Questa specie-specificità avviene grazie alla produzione, da parte della cellula uovo, di sostanze chemio-attraenti necessarie per attrarre lo spermatozoo. Nella fecondazione interna (tipica principalmente dei Mammiferi e degli Uccelli) vengono prodotti meno gameti soprattutto quello femminile, il quale richiede maggior spreco energetico da parte della madre.

## Fecondazione nel riccio di mare

I ricci di mare (echinodermi), invertebrati marini, hanno sessi separati e si riproducono mediante **fecondazione esterna**. Le prime fasi della fecondazione richiedono che lo spermatozoo acquisisca motilità.

Gli spermatozoi di riccio di mare sono immobili finché risiedono nel testicolo, ma appena vengono rilasciati in acqua il battito flagellare ha inizio ed essi cominciano a nuotare. I cambiamenti delle concentrazioni ioniche, che si verificano quando lo spermatozoo entra in contatto con l'acqua di mare, sono i fattori responsabili dell'attivazione della motilità. Infatti, l'elevata tensione della  $CO_2$  presente all'interno delle gonadi mantiene il pH intracellulare dello spermatozoo intorno a 7,2, valore al quale la dineina che guida il movimento del flagello, è inattiva. Quando gli spermatozoi vengono rilasciati in acqua di mare la tensione della  $CO_2$  diminuisce e il pH intracellulare aumenta fino a 7,6 con la conseguente attivazione della dineina.

Il contatto con l'acqua di mare determina anche un'iperpolarizzazione della membrana (il potenziale di membrana aumenta) causata dalla fuoriuscita di  $K^+$ . L'iperpolarizzazione attiva diverse proteine tra cui l'adenilato ciclasi che porta ad un innalzamento di cAMP, un secondo messaggero capace di attivare proteine chinasi cAMP dipendenti, le quali a loro volta fosforilano proteine dell'assonema flagellare, importanti per iniziare la motilità.

L'avvicinamento dello spermatozoo alla cellula uovo può essere 'guidato' mediante la **chemiotassi**. Nei ricci di mare, sono state ritrovate diverse molecole che portano a questo movimento direzionale dello sperma. In particolare, nell'involucro gelatinoso dell'uovo sono state individuate due piccoli peptidi (10-15 amminoacidi), **speract** e **resact**, i quali istaurano un legame con un recettore di membrana localizzato a livello della coda dello spermatozoo.

L'involucro gelatinoso della cellula uovo è costituito, oltre che da piccoli peptidi, anche da polisaccaridi solforati tra cui il **solfato di fucosio** che si lega ai recettori presenti nella membrana della testa degli spermatozoi. Nei ricci di mare, questo legame diretto determina l'apertura dei canali di  $Ca^{2+}$ , il cui incremento intracellulare scatena la **reazione acrosomiale** e l'attivazione di una pompa antiporto  $Na^+/H^+$  che fa entrare il  $Na^+$  e fuoriuscire l' $H^+$  con conseguente aumento del pH intracellulare.

La **reazione acrosomiale** è caratterizzata da due fasi principali: esocitosi dell'acrosoma e l'estensione del processo acrosomico. L'esocitosi della **vescicola acrosomiale** si verifica grazie alla fusione tra la membrana acrosomiale esterna e la sovrastante membrana plasmatica che circonda la testa dello spermatozoo. Questa esocitosi determina il rilascio degli enzimi proteolitici (ad esempio, la ialuronidasi) contenuti nella vescicola acrosomiale, i quali iniziano a digerire i costituenti dell'involucro gelatinoso dell'uovo (come per esempio l'acido ialuronico) perforandolo. Pochi secondi dopo l'esocitosi, si verifica la formazione del **processo acrosomico**, una protrusione della membrana acrosomiale interna sostenuta da un fascio di filamenti di actina. Il processo acrosomico raggiunge la membrana vitellina dell'uovo alla quale aderisce strettamente. L'adesione è mediata da una proteina acrosomiale specie-specifica denominata **bindina**. Questa proteina è localizzata sulla superficie della membrana acrosomiale interna e successivamente alla reazione acrosomiale, viene esposta sulla superficie del processo acrosomico. È stato evidenziato che la bindina si lega saldamente ad una glicoproteina presente nella membrana vitellina, il **recettore EBR1 (Egg Bindin Receptor1)**. L'adesione bindina/ligandina porta la membrana del processo acrosomico a fondersi con la membrana plasmatica della cellula uovo.

Il primo contatto tra i due gameti scatena nell'uovo una serie di risposte rapide, che nell'insieme prendono il nome di **attivazione dell'uovo**. I componenti chiave dell'attivazione dell'uovo nel riccio di mare sono i cambiamenti delle concentrazioni ioniche che derivano da scambi di ioni  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  e  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  attraverso la membrana, ma soprattutto dalla liberazione di  $\text{Ca}^{2+}$  dal reticolo endoplasmatico liscio. L'incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  all'interno della cellula uovo avviene in risposta al contatto con lo spermatozoo. L'onda del  $\text{Ca}^{2+}$  può essere messa in evidenza iniettando nella cellula uovo equorina (una proteina estratta da batteri simbiotici di Medusa equorea che in presenza di  $\text{Ca}^{2+}$  diventa luminescente). In seguito al contatto dello spermatozoo, una chinasi appartenente alla famiglia Src (SFK) viene attivata e questa, a sua volta, attiva una fosfolipasi C (PLC- $\gamma$ ). Il substrato della fosfolipasi C, il fosfatidilinositolo difosfato (PIP2), viene idrolizzato, generando due molecole: inositolo trifosfato (IP3) e il diacilglicerolo (DAG). L'IP3 diffonde nel citoplasma e si lega a canali del  $\text{Ca}^{2+}$  (recettori dell'IP3) localizzati nella membrana del reticolo endoplasmatico liscio, inducendone l'apertura. Il DAG, invece, agisce, all'interno della membrana plasmatica dell'uovo, su una proteinchinasi C, che a sua volta, attiva un trasportatore  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  responsabile dell'innalzamento del pH intracellulare da un valore di 6,6 ad uno di 7,2. L'alcalinizzazione del citoplasma dell'uovo riattiva molti enzimi rimasti silenti fino a quel momento stimolando la sintesi proteica, la duplicazione del DNA e l'attività respiratoria. L'incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  induce una serie di eventi come: la **reazione corticale**, la **formazione del cono di fecondazione** e l'attivazione dell'enzima  $\text{NAD}^+$  chinasi che converte il  $\text{NAD}^+$  in  $\text{NADP}^+$ , coenzima importante per molte attività metaboliche come la sintesi dei lipidi, necessari per rifornire le membrane che saranno utilizzate durante la segmentazione.

Inoltre, le uova, al momento del contatto con lo spermatozoo, rispondono con un cambiamento del potenziale di membrana molto simile al potenziale d'azione che si osserva nei neuroni e nelle cellule muscolari. La membrana plasmatica della cellula uovo costituisce una barriera selettivamente permeabile tra il citoplasma e l'ambiente esterno, i quali presentano concentrazioni ioniche molto diverse. In particolare, l'acqua di mare ha una concentrazione più elevata di ioni  $\text{Na}^+$  rispetto al citoplasma dell'uovo e una concentrazione meno elevata di ioni  $\text{K}^+$ . Il potenziale di riposo si attesta intorno ai -70 mV ma in seguito al legame con lo spermatozoo il potenziale passa ad un valore di +20 mV a causa di un piccolo influsso di ioni  $\text{Na}^+$  nell'uovo.

Le uova possono essere raggiunte da un gran numero di spermatozoi ma tutti, eccetto uno, devono essere respinti dalla superficie per prevenire la condizione letale derivante dalla **polispermia**. L'ingresso di più spermatozoi, infatti, determinerebbe la formazione di un nucleo di fecondazione poliploide e l'organizzazione di più fusi mitotici che guiderebbero i cromosomi a distribuirsi in modo casuale. La probabilità che più spermatozoi arrivino contemporaneamente alla superficie dell'uovo viene eliminata mediante due **blocchi della polispermia**: il **blocco rapido della polispermia**, un meccanismo transitorio che si attua pochi secondi dopo il contatto con lo spermatozoo, e il **blocco lento della polispermia**, un meccanismo stabile che si attiva più tardivamente.

Il blocco rapido alla polispermia si realizza grazie all'inversione del potenziale della membrana plasmatica dell'uovo, mediato dall'influsso iniziale di  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  che dal valore di riposo pari a -70 mV passa ad un valore di +20 mV entro 1-3 secondi dal legame con lo spermatozoo. Poiché il cambiamento del potenziale di membrana è transitorio, gli spermatozoi legati agli involucri ovarici potrebbero fondersi con l'uovo se non venissero in qualche modo rimossi. Questa rimozione viene ottenuta grazie alla **reazione corticale**, che innescava una trasformazione biochimica della matrice extracellulare dell'uovo che da membrana vitellina diviene **membrana di fecondazione**. Si realizza quindi il blocco lento della polispermia che avviene entro 20 secondi dalla reazione corticale. Questa consiste nell'esocitosi dei granuli corticali, localizzati nella cortex. Quando la membrana dei granuli corticali si fonde con la membrana plasmatica il loro contenuto viene riversato nello **spazio perivitellino**, compreso tra l'oolemma e la membrana vitellina. Tra le molecole rilasciate abbiamo:

- una proteina ad attività perossidasi, che agendo sull' $\text{H}_2\text{O}_2$  porta all'ossidazione dei residui di tirosina di proteine adiacenti e alla formazione di legami crociati. Ciò causa un indurimento della membrana vitellina, che così modificata diviene una barriera meccanica all'entrata di altri spermatozoi;
- proteasi, come ialuronidasi e tripsina, che idrolizzano i legami tra le proteine della membrana vitellina e l'oolemma e tagliano i recettori della bindina con gli eventuali spermatozoi legati;
- glicosaminoglicani (mucopolisaccaridi) richiamano acqua nello spazio perivitellino il quale si espande spingendo la membrana vitellina, ora non più ancorata alla membrana dell'uovo, ad allontanarsi da essa;
- la proteina ialina, che si deposita sulla superficie dell'uovo formando uno strato più denso chiamato strato ialino.

In seguito al legame con lo spermatozoo, nel sito di fusione tra i due gameti si genera una struttura denominata **cono di fecondazione**, una sporgenza citoplasmatica. Il cono di fecondazione è sostenuto da un fascio di filamenti di actina che allungandosi arrivano ad invadere lo spazio compreso tra la membrana plasmatica e il nucleo dello spermatozoo, favorendo così l'incorporazione di nucleo e tratto intermedio nel citoplasma ovarico.

L'uovo di riccio di mare ha già completato la meiosi e il suo nucleo è pronto a fondersi con quello dello spermatozoo. Una volta che lo spermatozoo è stato incorporato nel citoplasma ovarico attraverso il cono di fecondazione, i mitocondri e il flagello degenerano mentre il nucleo subisce dei cambiamenti che lo trasformano in **pronucleo maschile**. Il processo di fusione dei pronuclei maschile e femminile, o **anfimissi**, è necessario per ripristinare la diploidia. Nel riccio di mare questo processo comincia quando il nucleo dello spermatozoo e il centriolo prossimale posizionato posteriormente ad esso subiscono nel citoplasma dell'uovo una rotazione di  $180^\circ$ . In questo modo, il centriolo viene a trovarsi davanti al nucleo, e qui organizza lo **spermaster**, ossia un aster di microtubuli che si agganciano ai due pronuclei per avvicinarli. Contemporaneamente l'involucro nucleare dello spermatozoo si disorganizza grazie ad un processo di fosforilazione delle lamine e viene circondato dalle cisterne del reticolo endoplasmatico dell'uovo. Gli istoni dello spermatozoo che tenevano strettamente condensata la cromatina vengono allontanati e sostituiti da istoni della cellula uovo, cosicché la cromatina assume un aspetto fibrillare. La despiralizzazione della cromatina è accompagnata dalla ripresa dell'attività di sintesi del DNA che si verifica in entrambi i pronuclei prima

dell'anfimissi. I due pronuclei migrano verso il centro dell'uovo e in seguito alla loro fusione (anfimissi) costituiscono il nucleo dello zigote circondato da un unico involucro nucleare.

### Fecondazione nei mammiferi

Nei Mammiferi la fecondazione avviene all'interno dell'apparato riproduttivo femminile e, precisamente, in una regione delle Tube di Falloppio detta **ampolla tubarica**. Il primo evento è il legame tra lo spermatozoo e la zona pellucida (ZP), l'involucro che circonda l'ovocita. Questo evento innesca nello spermatozoo la **reazione acrosomiale**, prerequisito per favorire il passaggio dello spermatozoo attraverso la ZP e la sua successiva interazione e fusione con la membrana plasmatica dell'ovocita. Mentre l'ovocita rilasciato dall'ovaio è in grado di interagire con gli spermatozoi, quest'ultimi rilasciati nel lume del tubulo seminifero del testicolo non sono ancora in grado di fecondare l'ovocita. Infatti, gli spermatozoi devono subire un processo di maturazione denominato **maturazione post-testicolare** che ha inizio nelle vie genitali maschili dove gli spermatozoi acquisiscono particolari proteine e la capacità di muoversi, e si completerà, in seguito, nelle vie genitali femminili dove gli spermatozoi vanno incontro a **capacitazione**.

Durante il transito degli spermatozoi nell'epididimo (inizio della maturazione post-testicolare), questi acquisiranno: diverse glicoproteine di membrana, specifiche proteine che, adsorbite sulla superficie dello spermatozoo, creano un rivestimento che lo rendono invisibile nei confronti del sistema immunitario femminile e infine acquisiscono la motilità. Tuttavia, una volta eiaculati, i gameti maschili non sono ancora competenti per fecondare l'ovocita. Per esserlo, devono andare incontro a capacitazione. Tale processo prevede cambiamenti fisiologici essenzialmente a carico della membrana plasmatica dello spermatozoo che consistono nella:

- rimozione del colesterolo da parte dell'albumina, una proteina secreta dalle cellule delle tube uterine. Questo favorisce un aumento della fluidità di membrana del gamete maschile, prerequisito per la reazione acrosomiale;
- rimozione delle molecole che fino a quel momento avevano rivestito la superficie dello spermatozoo.

Dopo che gli spermatozoi sono stati capacitati, essi devono raggiungere l'ampolla dove si trova l'ovocita. Il loro movimento non è casuale ma è guidato da due meccanismi: la **chemiotassi** e la **termotassi**. La prima sembra essere determinata dall'azione di molecole chemoattrattive presenti nei fluidi tubarici e rilasciate dalle cellule follicolari. Queste molecole determinerebbero un aumento delle concentrazioni intracellulari di cAMP e  $Ca^{2+}$ . Ne consegue un aumento della frequenza del battito flagellare indispensabile allo spermatozoo per attraversare il cumulo ooforo. Il movimento del gamete maschile è influenzato anche dalla temperatura (termotassi). Raggiunta l'ampolla, lo spermatozoo raggiunge la ZP dell'ovocita grazie all'azione dell'enzima ialuronidasi, presente sulla superficie della sua membrana, che digerisce la matrice extracellulare (poiché è formata da acido ialuronico). A questo punto, tra i ligandi localizzati sulla membrana plasmatica dello spermatozoo, EBP (Egg Binding Proteins), e le proteine ZP3 della zona pellucida si crea un **legame primario**, che innesca una serie di segnali, tra cui l'aumento della concentrazione di  $Ca^{2+}$  e del pH intracellulare. L'enzima galattosio-transferasi e diverse proteine dello spermatozoo formano legami con varie molecole ZP3 innescando la reazione acrosomiale.

La reazione acrosomiale provoca cambiamenti nella morfologia dello spermatozoo dovuti alla vescicolazione della membrana plasmatica con la membrana acrosomiale esterna. Alla dispersione delle vescicole segue l'esocitosi degli enzimi litici contenuti nell'acrosoma. Il rilascio di tali enzimi favorisce il graduale avvicinamento dello spermatozoo all'ovocita. A ciò segue l'esposizione del recettore PH20 associato alla membrana acrosomiale interna, necessario per istaurare con ZP2 un **legame secondario**. Infatti, dopo aver subito la reazione acrosomiale, lo spermatozoo perde affinità per ZP3 ma la acquisisce per ZP2. ZP1 è una molecola ponte che mantiene insieme ZP3 e ZP2. A questo punto, lo spermatozoo attraversa la zona pellucida e si avvicina sempre più all'ovocita per prendere contatto con la membrana plasmatica. Il legame tra le membrane dei due gameti e la loro successiva fusione è mediato da proteine quali l'integrina  $\alpha6\beta1$  e CD9 (una proteina appartenente alla superfamiglia delle tetraspanine) presenti sull'ovocita e da due ligandi per l'integrina, proteine transmembrana appartenente alla famiglia ADAM, presenti sulla membrana plasmatica dello spermatozoo.

L'attivazione dell'ovocita consiste di una serie di eventi. Innanzitutto, avviene il rilascio di  $Ca^{2+}$  in seguito all'attivazione del recettore per l'inositolo-3-fosfato (IP3), localizzato sulle membrane del reticolo endoplasmatico. Mentre nel riccio di mare il  $Ca^{2+}$  rilasciato si propaga nell'ovocita come un'onda, nei Mammiferi, dopo un incremento iniziale, si osserva una serie di oscillazioni dei livelli di questo ione.

L'incremento del calcio è necessario per l'esocitosi dei granuli corticali localizzati al di sotto della membrana plasmatica. Il rilascio di enzimi dei granuli, quali glicosidasi e proteasi, determina la rimozione di carboidrati coinvolti nel legame spermatozoo-zona pellucida. Gli spermatozoi quindi non sono più in grado di legarsi alla ZP o attraversa (reazione della zona). L'alterazione della ZP previene la polispermia (nei Mammiferi non esiste il blocco rapido alla polispermia, ad eccezione dei conigli). Nei Mammiferi non si forma una membrana di fecondazione, poiché la membrana plasmatica è già separata dalla ZP dallo spazio perivitellino. Nel frattempo, anche il nucleo dello spermatozoo deve andare incontro a cambiamenti: la cromatina che era stata strettamente impacchettata, per formazione di ponti disolfuro tra le protamine, inizia a decondensarsi. In seguito, le molecole di DNA si assoceranno agli istoni di origine oocitaria. Si forma così il pronucleo maschile. Oltre al nucleo, lo spermatozoo fornisce all'ovocita i suoi mitocondri e il centriolo: i primi verranno degradati tramite i proteasomi, mentre il centriolo organizza l'aster spermatico, una rete microtubulare importante per guidare l'avvicinamento dei due pronuclei.

Affinché il pronucleo femminile possa avvicinarsi a quello maschile, l'ovocita secondario deve completare la seconda divisione meiotica. Nella maggior parte dei Mammiferi, infatti, l'ovocita si trova bloccato in metafase II per la presenza di due fattori: il complesso **MPF** (Mitotic Promoting Factor, formato da due proteine **p34 chinasi** e la **ciclina B1**) e gli enzimi **MAP chinasi**. MPF, oltre ad essere responsabile della formazione del fuso mitotico, con le MAP chinasi coopera per impedire la formazione dell'involucro nucleare. In seguito alla fecondazione, l'innalzamento del livello di  $Ca^{2+}$  provoca la degradazione della ciclina e l'inattivazione di MPF con conseguente ripresa della meiosi che coincide con l'entrata dei cromosomi in anafase II e successivamente in telofase II. Ne consegue, l'espulsione del secondo globulo polare e la formazione del nucleo aploide del gamete femminile. Anche i livelli delle MAP chinasi diminuiscono e questo favorisce la formazione dell'involucro nucleare attorno al pronucleo femminile appena formato. Dopo di che i due pronuclei migrano verso il centro della cellula fondendosi (**anfimissi**).

La **fecondazione artificiale** o **fecondazione assistita** è il processo col quale si attua l'unione dei gameti artificialmente. Una delle tecniche di fecondazione assistita è la fecondazione in vitro. Questa procedura comporta l'unione dei gameti al di fuori del corpo della donna e, successivamente, il transfer dell'embrione nell'utero. Nell'ambito della fecondazione in vitro è possibile distinguere la tecnica **FIVET** (Fecondazione in vitro con Embryo Transfer) e la tecnica **ICSI** (Iniezione intracitoplasmatica dello spermatozoo). La FIVET prevede innanzitutto una stimolazione ovarica che può durare dai 10 ai 20 giorni. La fase successiva consiste nel prelievo degli ovociti effettuato tramite un ago connesso a un sistema di aspirazione. Gli ovuli prelevati vengono poi posizionati sulla piastra di coltura e circondati dagli spermatozoi (gli spermatozoi appena eiaculati non possiedono capacità fecondante, funzione che viene acquisita solo dopo alcune ore di permanenza nelle vie genitali femminili: **capacitazione**). Per preparare gli spermatozoi e quindi per far avvenire la capacitazione in

laboratorio, essi vengono separati dal liquido seminale ed esposti successivamente a specifiche condizioni culturali. Gli embrioni ottenuti vengono analizzati e classificati in base a morfologia e capacità di scissione. Dopo di che, tali embrioni saranno oggetto di un transfer nell'utero della donna.

L'ICSI è una tecnica di laboratorio che consente l'inserimento di un singolo spermatozoo all'interno dell'ovocita maturo attraverso una piccola cannula. Come nella tecnica FIVET, gli embrioni ottenuti vengono trasferiti nell'utero.

La **vitrificazione** consiste nel preservare un determinato numero di ovuli maturi di una donna. È un processo di solidificazione durante il quale gli ovociti sono trattati con sostanze crioprotettive (capaci di proteggere i tessuti dai danni da congelamento) e immersi in azoto liquido.

La **partenogenesi** (tipica di alcune piante e animali) è un tipo di riproduzione caratterizzato dal fatto che la cellula uovo si sviluppa senza essere stata fecondata. Viene definita come una riproduzione sessuale "**asessuata**" perché, pur implicando la formazione di gameti, non richiede fecondazione. Essa può essere spontanea (naturale) oppure provocata artificialmente (sperimentale). La partenogenesi sperimentale è importante per la formazione delle cellule staminali.

Le api hanno due modalità di riproduzione: sia per partenogenesi che per fecondazione.

La partenogenesi delle api si dice **arrenotoca** in quanto dà luogo solo a individui di sesso maschile, i **fuchi** (corredo cromosomico aploide). Nelle femmine e quindi nell'ape regina e nelle operaie, che si sviluppano da uova fecondate, invece il corredo cromosomico è diploide.

Se si verifica, invece, la fecondazione si sviluppa un maschio diploide chiamato **drone** che è notevolmente più grande di un'ape normale ed è utilizzato nei momenti di accoppiamento. Un'altra funzione del drone è il mantenimento della termoregolazione nel nido. Quando arriva il freddo, i droni riscaldano le uova con il loro calore.

## Segmentazione

Il primo evento che si verifica dopo la fecondazione è la **segmentazione** in cui lo zigote va incontro ad una serie di divisioni mitotiche. Alla fine di questo processo, si forma la **blastula**, composta da cellule chiamate **blastomeri**. Nel corso della segmentazione e della gastrulazione si formano gli **assi embrionali**. Per esempio, negli Anfibi, il primo asse embrionale che si sviluppa durante la fecondazione è l'**asse dorso-ventrale** (la zona ventrale rappresenta la zona di entrata dello spermatozoo mentre la zona opposta, dove si forma la semiluna grigia, è la zona dorsale). Gli altri assi si formeranno poi nella segmentazione e nella gastrulazione.

Le divisioni cellulari che avvengono durante la segmentazione si susseguono, generalmente, in maniera molto rapida, tanto che le fasi  $G_1$  e  $G_2$  della mitosi vengono eliminate. Per tale motivo le cellule che derivano da ogni divisione non vanno incontro ad accrescimento, non c'è, quindi, sintesi di nuovo citoplasma. Ciò comporta i blastomeri divengono man mano più piccoli fino a raggiungere, al termine del processo, un rapporto nucleo-citoplasmatico simile a quello delle cellule somatiche dell'adulto. Quindi la segmentazione in un ciclo cellulare è abbastanza breve (ore o giorni). Il caso più lungo di segmentazione è quella dei Mammiferi che può durare dai 4/5 giorni circa.

Dalla segmentazione di uno zigote originatosi da un uovo con citoplasma omogeneo (come per esempio quello di un Mammifero Euterio), deriveranno blastomeri simili tra loro, tanto che da ciascuno di essi, si potrebbe originare un nuovo organismo completo. Uova che originano embrioni con queste caratteristiche sono dette **regolative**. Viceversa, uova con citoplasma molto disomogeneo daranno origine a blastomeri diversi tra loro e destinati a dare origine a specifiche parti dell'organismo. Uova di questo tipo si dicono **a mosaico**.

La segmentazione è il risultato di due processi ciclici coordinati: la **cariocinesi** e la **citodieresi** entrambi dipendenti dal citoscheletro. La cariocinesi è la divisione mitotica del nucleo ed il fattore responsabile di tale divisione è il fuso mitotico\*, costituito da microtubuli composti di tubulina. La citodieresi è la divisione della cellula ed il fattore responsabile di tale divisione è l'anello contrattile\* composto di microfilamenti di actina.

\*In base alla posizione del fuso mitotico, le cellule si dividono.

\*L'anello contrattile stringe il citoplasma delle cellule portando alla formazione di due cellule figlie.

\*La velocità di segmentazione è strettamente legata alla temperatura ambientale negli organismi eterotermi (temperatura del corpo varia con quella dell'ambiente esterno).

Il coordinamento della cariocinesi e della citodieresi non si verifica negli Insetti dove avviene prima la cariocinesi e poi la citodieresi.

Il processo di segmentazione viene regolato da vari fattori presenti nel citoplasma dell'uovo, come per esempio **MPF** (Maturation Promoting Factor). Infatti, l'entrata in mitosi dei blastomeri dipende dall'accumulo della **ciclina B**, la subunità maggiore dell'MPF. Essa attiva la **chinasi ciclica dipendente (CDK)**, subunità minore di MPF che va a fosforilare diverse proteine come istoni e le lamine. A questo punto, la cromatina si condensa, si forma il fuso mitotico e inizia la mitosi.

Il ruolo di MPF, durante la segmentazione, venne scoperto da **Masui** e **Market**, nel 1971, i quali dimostrarono che iniettando il citoplasma prelevato da ovociti stimolati con progesterone in ovociti immaturi (fermi in fase  $G_2$ ), questo era sufficiente a completare la prima divisione meiotica. Si dedusse, quindi, che il citoplasma di cellule uovo adulte dovesse contenere un fattore proteico che venne, poi, chiamato MPF.

### Tipi di segmentazione

La segmentazione è influenzata dalle caratteristiche del citoplasma della cellula uovo e, soprattutto, dalla presenza e dalla distribuzione del vitello. Uova con molto vitello non sono in grado di dividersi completamente poiché la regione ricca di vitello non possiede l'apparato adeguato alla costruzione di membrane cellulari, per la replicazione del DNA e per la formazione del fuso mitotico. Queste uova si segmenteranno solo dove è presente il citoplasma formativo (**blastodisco**). Questo tipo di segmentazione si dice **meroblastica discoidale** (divisione parziale) poiché i blastomeri formano una struttura a forma di disco chiamata blastodisco.

Oltre ai Pesci, gli Uccelli, anche negli Insetti, come in *Drosophila*, la segmentazione è di tipo meroblastico, ma visto che il vitello si forma al centro dell'uovo circondato da citoplasma formativo, la segmentazione si dice **superficiale**, poiché interessa tutta la superficie dello zigote.

Uova oligolecitiche o mesolecitiche sono in grado di dividere completamente il citoplasma ovarico. La segmentazione è, quindi, di tipo **oloblastico** (divisione completa). Nelle uova isolecitiche, in cui il poco vitello è distribuito più o meno omogeneamente, la segmentazione dello zigote darà origine a blastomeri di eguali dimensioni (**oloblastica eguale** o **subeguale**, Echinodermi, Mammiferi Euteri). Nelle uova mesolecitiche (Anfibi), in cui si osserva una polarizzazione del vitello verso il polo vegetativo, la segmentazione sarà **oloblastica ineguale**, poiché più rapida al polo animale, con conseguente maggior numero di blastomeri di piccole dimensioni (**micromeri**), più lenta e quindi con blastomeri più grandi al polo vegetativo (**macromeri**).

In base a come si dispongono i piani di segmentazione, si disporranno i blastomeri. Possiamo così distinguere, nelle uova oloblastiche, una **segmentazione radiale** (Echinodermi, Anfibi) in cui i primi due piani di segmentazione sono meridiani ed ortogonali tra loro, mentre il terzo piano è equatoriale e ortogonale ai primi due.

Nei Molluschi la segmentazione è di tipo **spirale**: i piani di segmentazione non sono mai tra loro perpendicolari o paralleli, ma obliqui, conferendo ai blastomeri una disposizione spiralata (non si ha la formazione del blastocele).

Nei Mammiferi Euteri si assiste ad una **segmentazione rotazionale**. La prima divisione avviene secondo un piano meridiano; nella seconda divisione un blastomero si divide ancora secondo un piano meridiano, l'altro secondo un piano equatoriale.

Verso la fine della segmentazione radiale, nell'embrione compare al centro una cavità chiamata **blastocele** o cavità di segmentazione, dovuta a secrezione di liquidi da parte dei blastomeri (**schizocelia**). Il blastocele gioca un ruolo importante nelle fasi successive dello sviluppo poiché permette la migrazione dei blastomeri durante la gastrulazione e contemporaneamente impedisce che i blastomeri possano interagire tra loro prima del momento opportuno.

La blastula dei Mammiferi Euteri, detta **blastocisti**, presenta una cavità che non è omologa al blastocele. Essa è delimitata da un monostrato di blastomeri che costituiscono il **trofoblasto** da cui origineranno solo strutture extraembrionali. Ad un polo della blastocisti, in un'area pluristratificata, alcuni blastomeri si spingono verso la cavità della blastocisti: queste cellule costituiscono il **nodo embrionale**, da cui avrà origine il corpo dell'embrione.

Negli Insetti la blastula è priva di una cavità centrale: l'embrione prende il nome di **sterroblastula** o **stereoblastula**, per il fatto che manca di una cavità o di **periblastula**, dovuta al fatto che solo la porzione periferica è segmentata.

Queste differenze tra i blastomeri sono dovute alla sintesi e all'accumulo di determinanti citoplasmatici in zone specifiche del citoplasma dell'uovo durante la sua maturazione, che con la fecondazione, vengono ridistribuiti nel citoplasma ovulare, e con la segmentazione vengono segregati nei blastomeri che via via si formano.

Poiché i determinanti citoplasmatici indirizzano i blastomeri verso destini diversi, è possibile costruire delle **mappe presuntive**.