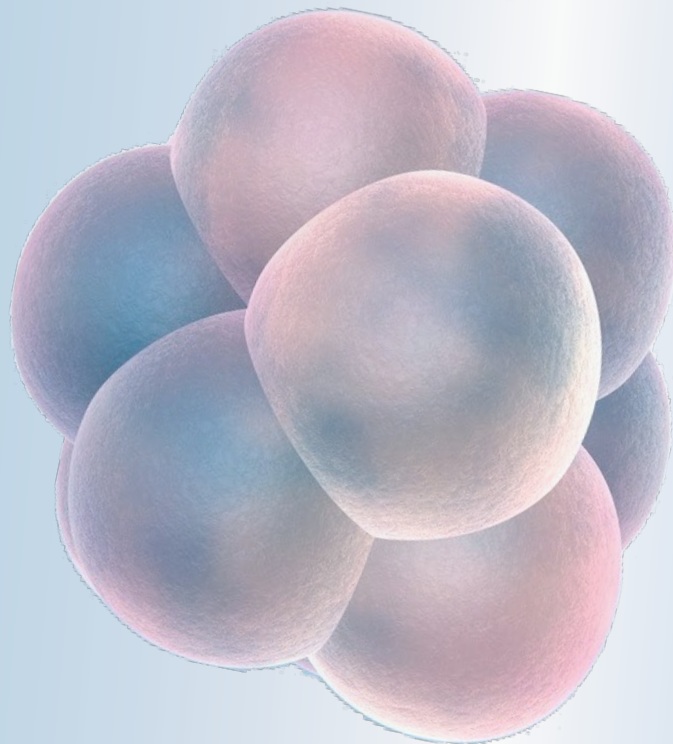
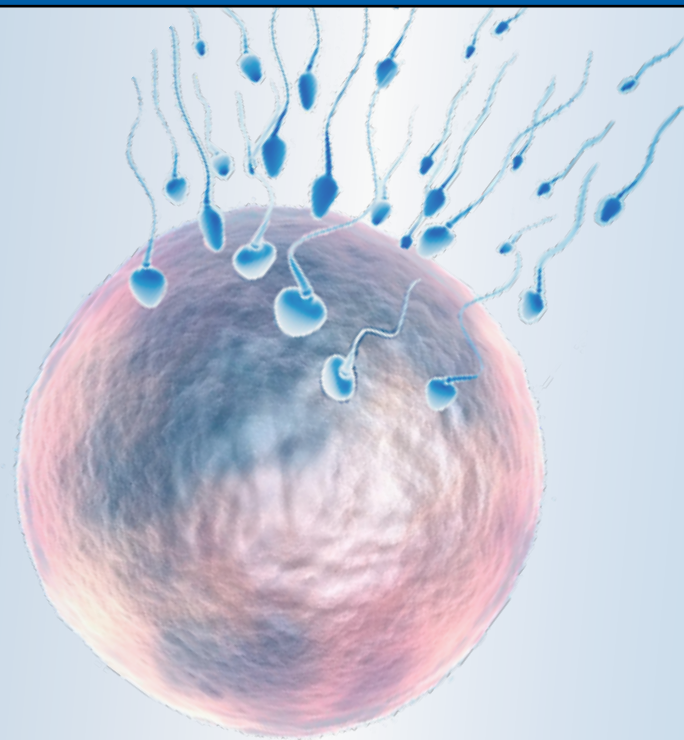


BIOLOGIA e TECNICHE della RIPRODUZIONE

a cura di **Lucia Rocco**

Edizione digitale

Natalia Battista
Giovanni Battista Bernardini
Liana Bosco
Antonio Capalbo
Angela Catizone
Fulvio Cesaroni
Nicola Colacurci
Vincenzo Cuniato
Mariabeatrice Dal Canto
Massimo De Felici
Umberto Galderisi
Csilla Gabriella Krausz
Mauro Maccarrone
Filomena Mottola
Antonio Novelli
Cinzia Rapino
Giulia Ricci
Maria Carmela Roccheri
Lucia Rocco
Marianna Santonastaso
Vincenzo Stingo
Carlo Trotta
Daniela Zuccarello



BIOLOGIA e TECNICHE della RIPRODUZIONE

BIOLOGIA CELLULARE E MOLECOLARE DELLA RIPRODUZIONE

- 1 Anatomia del sistema genitale
- 2 Meiosi
- 3 Spermatogenesi
- 4 Oogenesi
- 5 Ormoni, fattori di crescita e riproduzione
- 6 Determinazione del sesso
- 7 Fecondazione
- 8 Sviluppo embrionale
- 9 Riproduzione e fecondazione: meccanismi e strategie
- 10 Cellule staminali:
caratteristiche e potenzialità terapeutiche

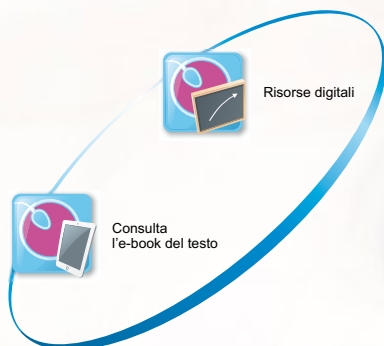
INFERTILITÀ UMANA

- 11 Infertilità umana: cause, diagnosi e terapia
- 12 Esame del liquido seminale
- 13 Infezioni urogenitali e infertilità
- 14 Fattori genetici dell'infertilità
- 15 Tecniche per lo screening genetico dell'infertilità
- 16 Qualità del DNA spermatico e infertilità
- 17 Basi biochimiche della fertilità

TECNOLOGIE LEGATE ALLA RIPRODUZIONE UMANA

- 18 Crioconservazione di gameti ed embrioni
- 19 Stimolazione ormonale e induzione dell'ovulazione
- 20 Tecniche di procreazione medicalmente assistita
- 21 Coltura degli embrioni
- 22 Maturazione in vitro degli oociti
- 23 Micromanipolazione di gameti ed embrioni
- 24 Diagnosi genetica preimpianto

VIRTUAL CAMPUS



BIOLOGIA e TECNICHE della RIPRODUZIONE

QUATTRO OPERAZIONI PER ACCEDERE AI CONTENUTI DIGITALI

- 1 COLLEGATI** Collegarsi al sito indicato sull'etichetta che riporta il codice di accesso
- 2 REGISTRATI** Registrarsi (solo la prima volta) per ricevere username e password
- 3 ACCEDI** Inserire username e password per accedere ai contenuti riservati
- 4 DIGITA IL CODICE** Digitare il codice personale di accesso posizionato sotto la protezione dell'etichetta applicata su questa pagina

Dopo il primo accesso i contenuti digitali saranno disponibili nella pagina web inserendo username e password.

L'**accesso online** prevede l'accettazione della **licenza personale** limitata a un **singolo utilizzatore** per ciascun codice.

L'**accesso è permesso all'utente individuale** e non consente l'utilizzo di licenze di accesso per biblioteca o per istituzione.

La **condivisione di password e/o codice non è permessa** e qualsiasi tentativo di uso improprio del codice personale invaliderà lo stesso, rendendolo inutilizzabile. L'accesso non può essere condiviso e scadrà secondo le modalità temporali definite nel contratto di licenza di utilizzo che si sottoscrive al primo accesso.

Ulteriori dettagli potranno essere forniti all'atto dell'accettazione del contratto di licenza di utilizzo. L'impiego dei codici è soggetto all'accettazione delle condizioni d'uso. Non sarà accettata la resa di un testo che presenti la manomissione della protezione del codice.

Requisiti hardware e software:

personal computer con sistema operativo Windows, Macintosh o Linux
browser internet di ultima generazione quali: Internet Explorer (a partire dalla versione 9), Firefox, Chrome ecc.; connessione Internet.

Help desk tecnico: disponibile all'indirizzo di posta elettronica: tutortecnico@eenet.it

Rimuovere la protezione grattando
con una moneta
o un oggetto simile

**Per accedere all'area digitale
Virtual Campus
seguire le istruzioni alla pagina
<http://dginfo.digibook24.it>**

BIOLOGIA e TECNICHE della RIPRODUZIONE

BIOLOGIA e TECNICHE della RIPRODUZIONE

a cura di Lucia Rocco

Natalia Battista
Giovanni Battista Bernardini
Liana Bosco
Antonio Capalbo
Angela Catizone
Fulvio Cesaroni
Nicola Colacurci
Vincenzo Cuniato
Mariabeatrice Dal Canto
Massimo De Felici
Umberto Galderisi
Csilla Gabriella Krausz
Mauro Maccarrone
Filomena Mottola
Antonio Novelli
Cinzia Rapino
Giulia Ricci
Maria Carmela Roccheri
Lucia Rocco
Marianna Santonastaso
Vincenzo Stingo
Carlo Trotta
Daniela Zuccarello

edi-ermes

Biologia e tecniche della riproduzione • Prima edizione

a cura di Lucia Rocco

Hanno collaborato: Natalia Battista, Giovanni Battista Bernardini, Liana Bosco, Antonio Capalbo, Angela Catizone, Fulvio Cesaroni, Nicola Colacurci, Vincenzo Cuniato, Mariabeatrice Dal Canto, Massimo De Felici, Umberto Galderisi, Csilla Gabriella Krausz, Mauro Maccarrone, Filomena Mottola, Antonio Novelli, Cinzia Rapino, Giulia Ricci, Maria Carmela Roccheri, Lucia Rocco, Marianna Santonastaso, Vincenzo Stingo, Carlo Trotta, Daniela Zuccarello

Copyright © 2021 Edi.Ermes s.r.l. - Milano

ISBN 978-88-7051-747-7 - Edizione a stampa

ISBN 978-88-7051-748-4 - Edizione digitale

Tutti i diritti letterari e artistici sono riservati. I diritti di traduzione, di memorizzazione elettronica, di riproduzione e di adattamento totale o parziale, con qualsiasi mezzo (compresi i microfilm e le copie fotostatiche) sono riservati per tutti i Paesi.

Le fotocopie per uso personale del lettore possono essere effettuate nei limiti del 15% di ciascun volume/fascicolo di periodico dietro pagamento alla SIAE del compenso previsto dall'art. 68, commi 4 e 5, della legge 22 aprile 1941 n. 633. Le fotocopie effettuate per finalità di carattere professionale, economico o commerciale o comunque per uso diverso da quello personale possono essere effettuate a seguito di specifica autorizzazione rilasciata da CLEARedi, Centro Licenze e Autorizzazioni per le Riproduzioni Editoriali, Corso di Porta Romana 108, 20122 Milano, e-mail autorizzazioni@clearedi.org e sito web www.clearedi.org.

L'Editore, per quanto di propria spettanza, considera rare le opere fuori del proprio catalogo editoriale. La riproduzione a mezzo fotocopia degli esemplari esistenti nelle biblioteche di tali opere è pertanto consentita, senza limiti quantitativi. Non possono considerarsi rare le opere di cui esiste, nel catalogo dell'Editore, una successiva edizione, le opere presenti in catalogo di altri Editori o le opere antologiche.

Un libro è il prodotto finale di una serie molto articolata di operazioni che esige numerose verifiche sui testi e sulle immagini.

È quasi impossibile pubblicare un volume senza errori.

Saremo grati a quanti, avendone riscontrato la presenza, vorranno comunicarceli.

Per segnalazioni o suggerimenti relativi a questo volume vogliate utilizzare il seguente indirizzo:

Relazioni esterne - Edi.Ermes srl - viale Enrico Forlanini, 65 - 20134 Milano

Tel. 02.70.21.121 - Fax 02.70.21.12.83

e-mail: redazione@enet.it

L'Editore è a disposizione degli aventi diritto con i quali non è stato possibile comunicare, nonché per eventuali involontarie omissioni e inesattezze nella citazione delle fonti o dei brani riprodotti nel presente volume.

Disegni di Andrea Rossi Raccagni, Andrea Bellingeri, Marco Fanuli e Raffaella Stilo/Archivio Edi.Ermes

Stampato nel mese di maggio da Logo srl - Borgoricco (PD)

per conto di Edi.Ermes - viale Enrico Forlanini, 65 - 20134 Milano

<http://www.ediermes.it> - tel. 02.70.21.121 - fax 02.70.21.12.83

PREFAZIONE

L'insieme dei fenomeni alla base dei meccanismi riproduttivi costituisce da sempre uno dei più affascinanti capitoli della biologia. Con il passare degli anni, insieme a un gruppo di Colleghi, abbiamo sempre più sentito l'esigenza di disporre di un testo aggiornato sull'argomento, che considerasse il continuo ampliarsi delle conoscenze, anche in relazione alle innovazioni in ambito tecnologico e metodologico-sperimentale messe a disposizione dalla comunità scientifica. È nata così l'idea di scrivere un volume diretto *in primis* ai nostri studenti dei corsi di laurea in Biologia e Biotecnologie, ma anche a professionisti impegnati in attività formative post laurea, come master o corsi di perfezionamento su tematiche attinenti, o semplicemente desiderosi di svolgere le loro attività lavorative nel campo della riproduzione, nonché a quanti necessitano di un aggiornamento continuo.

Il libro tratta i meccanismi cellulari e molecolari coinvolti nei processi riproduttivi, sia umani sia di specie animali. Il linguaggio è semplice, ma rigoroso, e la trattazione è accattivante dal punto di vista grafico. L'opera offre, inoltre, la possibilità di soddisfare eventuali curiosità scientifiche e culturali. Per questo le conoscenze certe e fondamentali costituiscono il nucleo fondamentale del testo, mentre le nozioni più avanzate o di approfondimento e quelle comunque ritenute importanti, sulle quali, però, non esiste ancora consenso unanime nella comunità scientifica, sono state inserite in specifici riquadri.

Il piano generale dell'opera prevede una prima sezione in cui sono stati descritti i contenuti ritenuti basilari per la comprensione della biologia della riproduzione umana e animale. Essi comprendono l'anatomia del sistema genitale, la gametogenesi e la fecondazione. Sono quindi descritte le strategie e le modalità riproduttive presenti in molti vertebrati, anche non mammiferi. Vengono poi trattati lo svilup-

po embrionale e la determinazione del sesso e, infine, le caratteristiche e le potenzialità delle cellule staminali. Una seconda sezione, interamente dedicata alle problematiche legate all'infertilità umana, fornisce ampio spazio alle procedure diagnostiche e alle metodologie di laboratorio che sono utilizzate per accertare le cause d'infertilità maschile, femminile e di coppia. La terza sezione è rivolta alle metodologie di laboratorio legate alla procreazione medicalmente assistita. Ulteriori approfondimenti di rilevanza clinica sono stati inseriti in appendici. Ogni capitolo è stato strutturato tenendo conto di precisi sussidi didattici: illustrazioni schematiche e immagini al microscopio, termini in colore e concetti chiave che riassumono i contenuti più importanti e consentono un rapido richiamo all'argomento specifico.

Il libro ha un valore aggiunto, perché inserito all'interno di un progetto multimediale, la piattaforma online *Virtual Campus*, accessibile attraverso un codice presente nel volume stesso. In questo modo l'opera mantiene elevato e costante il suo aggiornamento, per quanto riguarda metodiche, tecniche, esemplificazioni, casistiche, cioè quanto utile al professionista interessato alla riproduzione. In *Virtual Campus* sono disponibili risorse digitali che consentono di fruire di aggiuntivi e aggiornati approfondimenti.

Ovviamente questo progetto è stato reso possibile grazie alla completa e profonda conoscenza delle tematiche proposte da tutti gli Autori coinvolti, un team costituito da personalità eccellenti provenienti dal mondo accademico, ma anche da professionisti altamente qualificati. Il mio ringraziamento va a tutti loro.

Per concludere desidero ringraziare l'editore Raffaele Grandi, per aver creduto in questo progetto, Adriana Lombardi, per la sua dedizione e il suo continuo sostegno agli Autori, ed Elena di Toma, per la sua elevata competenza e la sua infinita pazienza.

Napoli, 5 maggio 2021

Lucia Rocco

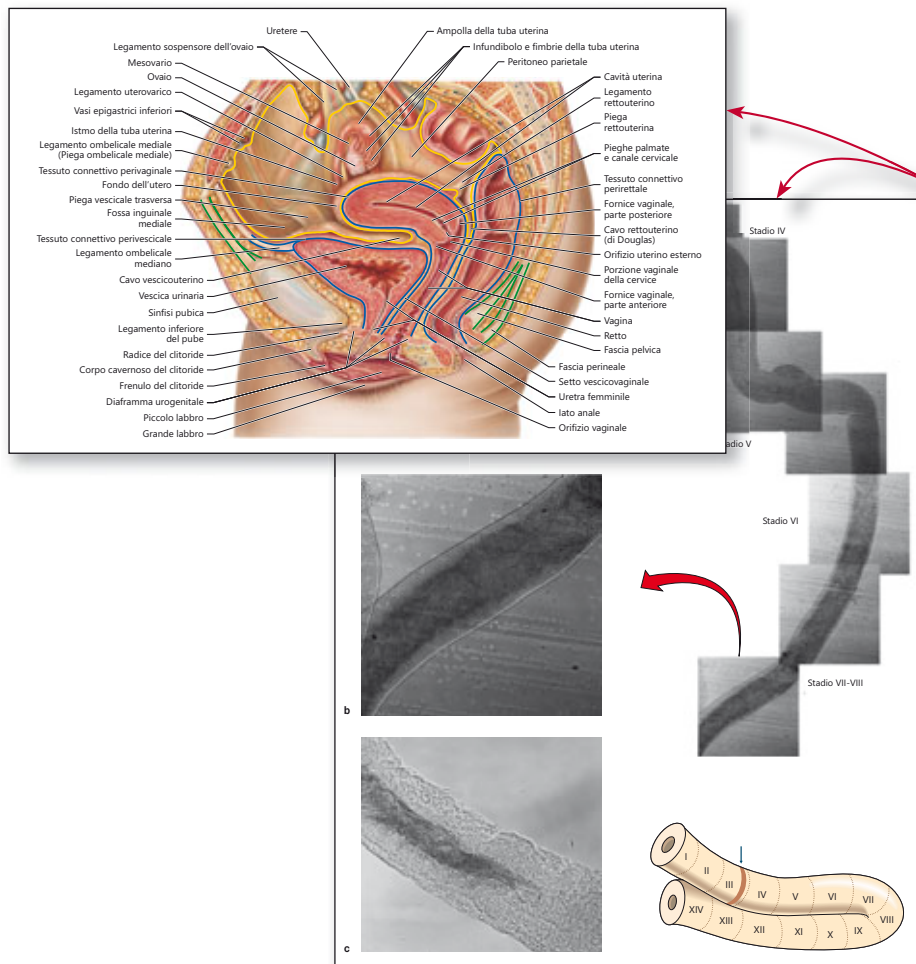
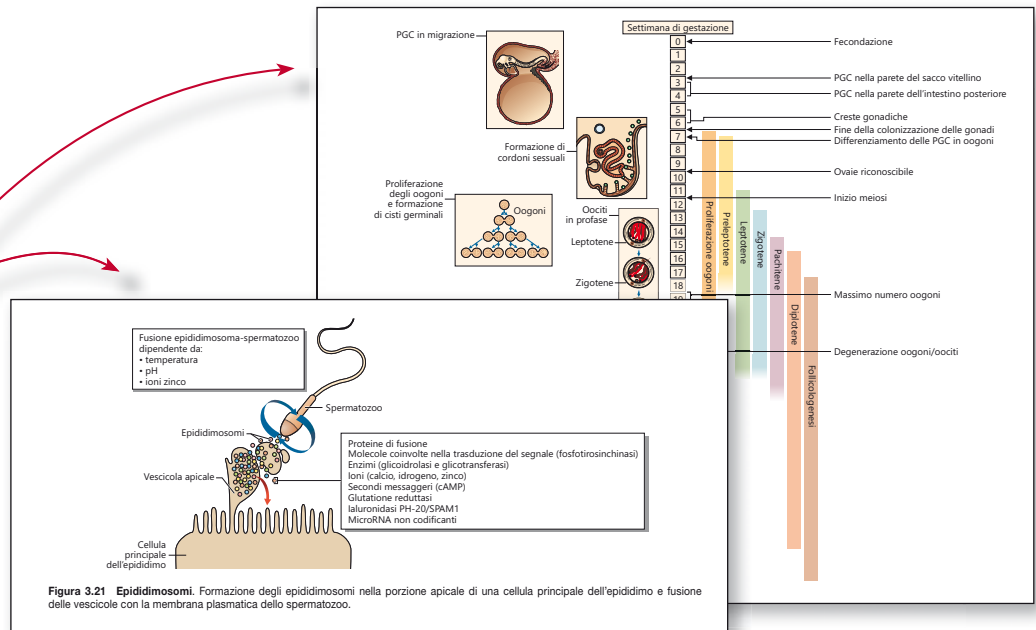
Organizzazione dell'opera

Il testo affronta i temi della biologia e delle tecniche della riproduzione in modo semplice e chiaro, proponendo allo studente vari livelli di approfondimento secondo le sue curiosità e aspettative.

La trattazione si sviluppa intorno a punti cardine fondamentali presentati in maniera esaustiva e accattivante dal punto di vista grafico. Molti sono gli elementi di supporto offerti, tra cui la ricca iconografia, i numerosi approfondimenti, le appendici e i concetti chiave.

Visualizzazione

L'ampio apparato iconografico, comprensivo di disegni, *flowchart* e grafici, arricchisce il testo e aiuta lo studente grazie a un apprendimento di tipo visivo.



Morfologia macroscopica e microscopica

Le immagini di microscopia e le precise illustrazioni anatomiche e istologiche coadiuvano lo studente nella comprensione delle basi morfologiche della biologia della riproduzione.

Riquadri di approfondimento e appendici

Gli approfondimenti e le appendici analizzano in dettaglio aspetti specifici legati alla fisiopatologia della riproduzione e alle più moderne tecniche e metodologiche di indagine.

APPENDICE I MODELLI ANIMALI NELLO STUDIO DEL CONTROLLO ORMONALE DELLA GAMETOGENESI

La generazione dei **topi knock out (KO)** ha fatto chiarezza su molti punti fondamentali della biologia cellulare e molecolare. Nel topo KO viene sperimentalmente eliminato dal genoma un gene di interesse a livello delle cellule staminali

le FLC (Cap. 6) fosse sotto il controllo proprio della stimolazione di questo recettore. La mancata alterazione dello sviluppo testicolare dei topi LHRKO ha permesso per la prima volta di stabilire che la produzione di testosterone da

strano diverse alterazioni **topi LHRKO di sesso fem-**
infertilità anovulatoria e

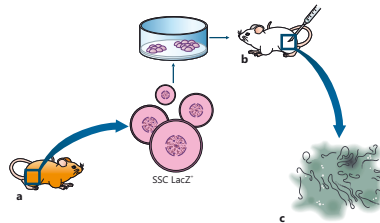


POTENZIALITÀ CLINICHE DELLE CELLULE STAMINALI SPERMATOGONIALI

Le cellule staminali spermatogoniali (SSC) sia del topo sia dei primati descritte nel testo sono state oggetto di numerosi studi, soprattutto per le potenzialità che esse potrebbero presentare in ambito clinico. È ormai noto, infatti, che in animali resi sperimentalmente sterili è possibile ripristinare la spermatogenesi inoculando nel testicolo una popolazione di cellule germinali arricchita in SSC (figura). Questa biotecnologia è stata applicata con successo su mammiferi quali il topo e la scimmia e si stanno facendo ricerche per comprendere se sia applicabile, senza rischi per la salute, anche nell'uomo. In questo caso la tecnica prevedrebbe il prelievo di una biopsia testicolare prima di un trattamento farmacologico che potrebbe rivelarsi citotossico per le SSC del paziente. Da questa biopsia si dovrebbe isolare la frazione di SSC, amplificarla e mantenerla *in vitro* per poi reimpiantarla nel testicolo del paziente, al termine del trattamento farmacologico, in modo da ripristinare la spermatogenesi. In alternativa, si sta studiando la possibilità di riuscire a far differenziare *in vitro* le SSC fino allo stadio di spermatozoi; questi ultimi potrebbero essere uti-

lizzati successivamente per le tecniche di fecondazione assistita nell'uomo.

Sebbene il protocollo di crioconservazione del tessuto testicolare sia già in uso nella pratica clinica, la tecnica di amplificazione *in vitro* delle cellule staminali spermatogoniali e la tecnica del trapianto non garantiscono ancora sufficiente efficienza e sicurezza. Questa tecnica sarebbe clinicamente rilevante per consentire la fertilità anche a soggetti che abbiano perso, per esempio a seguito di trattamento con chemioterapici, le cellule germinali staminali. In particolare, i pazienti che potrebbero avere vantaggio dall'applicazione clinica di questa biotecnologia sono coloro i quali sono andati incontro a trattamenti chemioterapici, tossici per le cellule germinali, in età pediatrica, quando quindi, il testicolo non ha completato la spermatogenesi e non è possibile crioconservare il seme. Per questo motivo, è però necessario sviluppare protocolli che garantiscano che la popolazione di SSC trapiantate sia esente da elementi staminali tumorali che potrebbero attecchire e far ammalare nuovamente il paziente.



Trapianto di cellule staminali spermatogoniali (SSC) in topi resi sterili mediante trattamento con agenti chemioterapici o radiazioni. Le SSC vengono prelevate dal testicolo di un topo donatore transgenico (a), che esprime il gene reporter lacZ nelle cellule germinali, e impiantate nel testicolo del topo reso sterile (b). Dopo un periodo di diversi mesi, le SSC colonizzano i tubuli seminiferi del testicolo del topo ricevente e ristabiliscono la spermatogenesi. Il gene lacZ codifica per l'enzima β -galattosidasi. Le cellule lacZ-positive possono essere evidenziate tramite incubazione con X-galattosio; questo viene scisso dalla β -galattosidasi producendo galattosio e un composto blu insolubile (c).

Concetti chiave

Alla fine di ciascun capitolo i concetti chiave riassumono i contenuti più importanti e consentono un rapido richiamo dell'argomento specifico.

CONCETTI CHIAVE



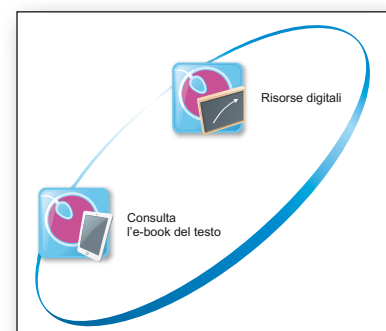
- ♦ La **riproduzione sessuale** (o gamica) genera un nuovo individuo grazie alla fusione di due gameti, quello maschile (spermatozoo) e quello femminile (oocito), mediante l'accoppiamento. Questo tipo di riproduzione comporta una ricombinazione genica, che produce individui non identici ai genitori. Poiché aumenta considerevolmente la variabilità della specie, la riproduzione sessuale risulta particolarmente favorevole qualora si verificino condizioni ambientali avverse o mutevoli.
- ♦ Il **corteggiamento** è una fase preparatoria dell'accoppiamento che consente un avvicinamento e un riconoscimento senza far scattare reazioni di difesa. Di solito è il maschio della specie che usa vari stratagemmi per sedurre la femmina, anche se ci sono eccezioni.
- ♦ La **competizione spermatica** è un fenomeno che prevede una serie di eventi in cui gli ejaculati provenienti da due o più maschi competono per la fecondazione della femmina. Essa si verifica comunemente in molte specie di vertebrati ed è una potente forza evolutiva che influenza la biologia riproduttiva maschile.
- ♦ Numerosi approcci hanno suggerito che le femmine svolgano un ruolo attivo nella competizione spermatica, ma i meccanismi alla base, soprattutto quelli genetici, rimangono ancora poco conosciuti. Comunque, sembra essere dimostrato che sia la competizione spermatica tra maschi sia la scelta del "migliore" da parte della femmina spesso agiscono sul meccanismo dell'**iperattivazione spermatica**.
- ♦ Nei mammiferi e, quindi, anche nell'uomo, il sesso si determina attraverso il **sistema XY**, in cui il sesso eteroga-



Il volume è arricchito da una piattaforma *online* (**Virtual Campus**), accessibile attraverso il codice riportato nel frontespizio. Le risorse disponibili in quest'area virtuale sono **lezioni online** che consentono un approccio visivo e coinvolgente agli argomenti di studio.

Il codice abilita anche il **download della versione digitale del libro**. Le istruzioni sono disponibili nella piattaforma.

Sia l'accesso alla piattaforma sia la consultazione del libro digitale sono disponibili per un periodo di tempo limitato a partire dalla registrazione del codice.



Hanno collaborato all'opera

Natalia Battista

Università degli Studi di Teramo

Giovanni Battista Bernardini

Università degli Studi dell'Insubria

Liana Bosco

Università degli Studi di Palermo

Antonio Capalbo

Igenomix Italia, Roma

Francesca Caprio

Università degli Studi della Campania "Luigi Vanvitelli"

Angela Catizone

Sapienza, Università di Roma

Fulvio Cesaroni

Laboratorio Medicina della Riproduzione
ASL Napoli 1 Centro, Ospedale San Paolo, Napoli

Francesca Cioppi

Università degli Studi di Firenze

Nicola Colacurci

Università degli Studi della Campania "Luigi Vanvitelli"

Vincenzo Cuniato

Microbiologo, Napoli

Mariabeatrice Dal Canto

Centro Biogenesi, Istituti Clinici Zucchi, Monza (MB)

Massimo De Felici

Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"

Maria Diletta D'Eufemia

Università degli Studi della Campania "Luigi Vanvitelli"

Umberto Galderisi

Università degli Studi della Campania "Luigi Vanvitelli"

Csilla Gabriella Krausz

Università degli Studi di Firenze

Mauro Maccarrone

Università degli Studi dell'Aquila

Filomena Mottola

Università degli Studi della Campania "Luigi Vanvitelli"

Antonio Novelli

Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma

Cinzia Rapino

Università degli Studi di Teramo

Giulia Ricci

Università degli Studi della Campania "Luigi Vanvitelli"

Maria Carmela Roccheri

Università degli Studi di Palermo

Lucia Rocco

Università degli Studi della Campania "Luigi Vanvitelli"

Marianna Santonastaso

Università degli Studi della Campania "Luigi Vanvitelli"

Nunzia Scudiero

Università degli Studi della Campania "Luigi Vanvitelli"

Tiziana Squillaro

Università degli Studi della Campania "Luigi Vanvitelli"

Vincenzo Stingo

Università degli Studi della Campania "Luigi Vanvitelli"

Carlo Trotta

Università degli Studi della Campania "Luigi Vanvitelli"





Daniela Zuccarello


UOC Genetica ed Epidemiologia clinica
Azienda Ospedaliera di Padova

INDICE



Prima sezione BIOLOGIA CELLULARE E MOLECOLARE DELLA RIPRODUZIONE


1	ANATOMIA DEL SISTEMA GENITALE ..	3		
	Abbozzi delle gonadi	3		
	Differenziamento ovarico	4		
	Differenziamento testicolare	4		
	Sistema genitale maschile	4		
	Testicoli	5		
	Morfologia esterna e involucri	5		
	Morfologia interna	6		
	Morfologia microscopica	6		
	<i>Cellule germinali</i>	6		
	<i>Cellule di sostegno dell'epitelio</i> <i>spermatogenico o di Sertoli</i>	7		
	<i>Cellule interstiziali o di Leydig</i>	7		
	📌 <i>Fattori che influenzano la spermatogenesi</i>	8		
	Vie spermatiche	8		
	Tubuli seminiferi retti	8		
	<i>Rete testis</i> e condottini efferenti	9		
	Epididimo	9		
	Dotto deferente	9		
	Dotto eiaculatore	10		
	Funicolo spermatico	10		
	Uretra maschile	10		
	Ghiandole annesse	11		
	Vescicole seminali	11		
	Prostata	11		
	Ghiandole bulbouretrali	12		
	Pene	12		
	Organi erettili	12		
	Involucri del pene	13		
	Sistema genitale femminile	13		
	Ovaio	14		
	Morfologia macroscopica	14		
	Morfologia microscopica	14		
	Tube uterine	15		
	Morfologia macroscopica	15		
	Morfologia microscopica	15		
	Utero	16		
	Morfologia esterna	16		
	Morfologia interna	17		
	Modificazioni dell'utero in relazione alla funzione	17		
	Morfologia microscopica	17		
	<i>Tonaca sierosa: perimetrio</i>	17		
	<i>Tonaca muscolare: miometrio</i>	17		
	<i>Tonaca mucosa: endometrio</i>	18		
	Vagina	19		
	Morfologia esterna	19		
	Morfologia interna	19		
	Morfologia microscopica	19		
	Vulva	20		
	📌 Concetti chiave	22		
	Lecture consigliate	22		
2	MEIOSI	23		
	Stadi della meiosi	24		
	Duplicazione del DNA	24		
	Prima divisione meiotica	25		
	📌 <i>Crossing over</i>	26		
	Seconda divisione meiotica	26		
	Meiosi nell'oogenesi e nella spermatogenesi	27		
	📌 <i>Complesso sinaptonemale</i>	28		
	📌 <i>Aneuploidie cromosomiche</i>	28		
	📌 Concetti chiave	30		
	Lecture consigliate	30		
3	SPERMATOGENESI	31		
	Componente somatica: le cellule di Sertoli	32		
	Funzioni delle cellule di Sertoli	32		
	Interazione tra cellule di Sertoli e cellule mioidi peritubulari	33		
	Interazione tra cellule di Sertoli e cellule germinali mitotiche	34		
	Interazione tra cellule di Sertoli e cellule germinali meiotiche e postmeiotiche	35		
	Barriera ematotesticolare	37		
	Funzioni della barriera ematotesticolare	37		
	📌 <i>Dinamismo della barriera ematotesticolare in relazione con l'evento spermatogenetico</i>	38		
	Struttura della barriera ematotesticolare	40		


Strutture giunzionali e molecole coinvolte nella loro formazione	40
<i>Giunzioni occludenti</i>	40
<i>Giunzioni aderenti</i>	42
<i>Giunzioni comunicanti</i>	43
Relazione tra complessi giunzionali e citoscheletro	43
Cellule germinali maschili:	
differenziamento prenatale e postnatale	44
Fase mitotica e differenti popolazioni di spermatogoni	44
Spermatogoni staminali, indifferenziati e differenzianti nel topo	45
<i>Cinetica di amplificazione</i>	45
Spermatogoni staminali, indifferenziati e differenzianti nell'uomo	46
<i>Cinetica di amplificazione</i>	47
Fase meiotica:	
dagli spermatociti agli spermatidi	48
 <i>Potenzialità cliniche delle cellule staminali spermatogoniali</i>	49
Spermiogenesi e formazione degli spermatozoi testicolari	50
Maturazione degli spermatozoi	53
Popolazioni cellulari dell'epididimo	53
Fluido epididimale	54
<i>Epididimosomi</i>	55
Destino degli spermatozoi non eiaculati	56
Ciclo dell'epitelio seminifero	56
Stadi dell'epitelio seminifero nel topo e nel ratto	56
Stadi dell'epitelio seminifero umano	59
Appendice - Anomalie del differenziamento della linea germinale maschile:	
blocco differenziativo e insorgenza di lesioni tumorali	61
 Concetti chiave	65
Lettere consigliate	65
4 OOGENESI	67
Formazione delle cellule germinali primordiali	68
Embrioni murini	68
Embrione umano	68
Formazione degli abbozzi gonadici	68
 <i>Meccanismi molecolari della formazione delle cellule germinali primordiali nel topo</i>	69
Colonizzazione degli abbozzi gonadici	70
Sviluppo e differenziamento delle ovaie	71
Geni che controllano lo sviluppo delle ovaie	72
 <i>Ciclo ovarico e follicologenesi nella donna</i>	74



 Concetti chiave	76
Lettere consigliate	76

5 ORMONI, FATTORI DI CRESCITA E RIPRODUZIONE	77
Asse ipotalamo-ipofisi-gonade	77
Ormone di liberazione delle gonadotropine	78
Kisspeptina	78
Regolazione della produzione di kisspeptina	80
Gonadotropine ipofisarie:	
ormoni luteinizzante e follicolo-stimolante	80
Ormoni gonadici	80
Testosterone	81
Estrogeni	81
Altre molecole segnale	81
Inibine	81
Attivine	81
Endocannabinoidi	82
Regolazione ormonale della spermatogenesi	82
Ruolo dell'ormone follicolo-stimolante	82
Attività mitotica	82
Produzione di fattore neurotrofico derivato dalla glia	83
Produzione del fattore SCF/KITLG	83
Sintesi di sostanze utili per il metabolismo e il differenziamento delle cellule germinali	83
Regolazione della barriera ematotesticolare	83
Produzione di inibina e attivina	83
Produzione di ormone antimülleriano	84
Espressione dell'enzima aromatasi	84
Fertilità maschile	84
Ruolo dell'ormone luteinizzante e del testosterone	84
Funzioni del testosterone	85
Ruolo del diidrotestosterone e degli estrogeni	86
Diidrotestosterone	86
Estrogeni	86
Fattori di crescita e controllo della spermatogenesi:	
autocrinia e paracrinia del testicolo	88
Interleuchine	89
Superfamiglia dei fattori di crescita trasformanti β	89
Acido retinoico	89
Regolazione ormonale e controllo locale dell'oogenesi	90
Regolazione della fase follicolare preantrale	90
Mantenimento della riserva di follicoli primordiali e transizione a follicolo primario e secondario	90
Regolazione della fase follicolare antrale	92
Controllo dell'ovulazione	93
Ripresa della meiosi	93
Promozione della fase ovulatoria	95


Controllo della fase luteinica:	
luteogenesi e luteolisi	95
Relazione tra ciclo ovarico e ciclo uterino	97
 <i>Gli interferenti endocrini</i>	100
Appendice - I modelli animali nello studio	
del controllo ormonale della gametogenesi	103
Topi LHRKO	103
Topi FSHRKO	103
Topi ARKO	104
Topi α ERKO, β ERKO e $\alpha\beta$ ERKO	105
 Concetti chiave	106
Lecture consigliate	106


6	DETERMINAZIONE DEL SESSO	107
	Sesso cromosomico, gonadico e fenotipico	107
	Meccanismi morfogenetici che controllano	
	lo sviluppo del sistema genitale	
	di mammifero	108
	Formazione della cresta gonadica	108
	Sviluppo del testicolo	110
	 <i>Migrazione delle cellule mesonefriche</i>	
	<i>verso il testicolo</i>	111
	Sviluppo dell'ovaio	112
	Sviluppo delle vie e degli organi genitali	
	da primordi comuni	113
	Basi molecolari della formazione	
	della gonade indifferenziata	115
	Basi molecolari della determinazione del sesso ...	116
	Geni coinvolti nella determinazione	
	della gonade maschile	117
	Ruolo di <i>SRY</i>	117
	Ruolo di <i>SOX9</i>	117
	Geni coinvolti nella determinazione	
	della gonade femminile	118
	Ruolo di <i>DAX1</i>	118
	Ruolo di <i>FOXL2</i>	119
	Ruolo di altre molecole segnale	120
	Eventi molecolari necessari	
	all'acquisizione del sesso fenotipico	120
	Regressione dei dotti di Müller nel maschio ...	120
	Differenziamento dei dotti di Wolff	
	nel maschio	121
	Differenziamento dei dotti di Müller	
	e regressione dei dotti di Wolff	
	nella femmina	121
	Imprinting genomico delle cellule germinali	
	maschili e femminili	122
	Appendice - Le anomalie	
	del differenziamento gonadico:	
	patologie umane e modelli animali	124
	DSS cromosomici	125
	DSS 46,XY	125
	DSS 46,XX	126


Patologie umane e modelli animali	126
 Concetti chiave	129
Lecture consigliate	129

7	FECONDAZIONE	131
	Caratteristiche dei gameti	131
	Uovo prima della fecondazione	131
	Morfologia microscopica	131
	<i>Vitello</i>	131
	<i>RNA e ribosomi</i>	132
	<i>Fattori morfogenetici</i>	132
	<i>Nucleo tetraploide</i>	132
	Tipi di uova	132
	Membrane ovariali	133
	Spermatozoo prima della fecondazione	135
	Caratteristiche del processo	
	di fecondazione	135
	Modalità di fecondazione	135
	 <i>Morfologia degli spermatozoi</i>	136
	Fecondazione esterna	136
	Fecondazione interna	137
	Incontro fra spermatozoo e uovo	137
	Strategie riproduttive	138
	Oviparità	138
	Ovoviviparità	138
	Viviparità	138
	Echinodermi	138
	Contatto fra spermatozoo e oocito	138
	Penetrazione dello spermatozoo nell'oocito	140
	Formazione dello zigote	141
	Pesci	141
	Anfibi	141
	Penetrazione dello spermatozoo nell'uovo	141
	Forme giovanili e metamorfosi	142
	Sauropsidi	142
	Mammiferi	143
	Spermatozoi nelle vie genitali femminili	143
	Tappe fondamentali della fecondazione	144
	Formazione dello zigote umano	147
	 Concetti chiave	149
	Lecture consigliate	150


8	SVILUPPO EMBRIONALE	151
	Segmentazione	151
	Caratteristiche e modalità della segmentazione ..	151
	Segmentazione oloblastica: ricci di mare	152
	Segmentazione oloblastica: anfibi	154
	Segmentazione meroblastica: pesci e uccelli	154
	Segmentazione meroblastica nei pesci	154
	Segmentazione meroblastica negli uccelli	156
	Segmentazione nei mammiferi	157
	Compattazione dei blastomeri	157

Estrusione della blastocisti dalla zona pellucida e annidamento	157
Gastrulazione	158
Caratteristiche e modalità della gastrulazione	159
Gastrulazione nei ricci di mare	160
Gastrulazione nei pesci	161
Gastrulazione negli anfibi	162
Gastrulazione nei sauropsidi	164
Gastrulazione nei mammiferi	165
Destino dei foglietti germinativi	166
Differenziamento dell'ectoderma	167
Differenziamento del mesoderma	168
<i>Mesoderma parassiale: somiti</i>	169
<i>Mesoderma intermedio</i>	169
<i>Mesoderma della piastra laterale</i>	169
Differenziamento dell'endoderma	169
Morfogenesi:	
sviluppo embrionale precoce nell'uomo	171
Annessi embrionali	172
Annessi embrionali degli anamni	172
Annessi embrionali degli amnioti	172
Sacco vitellino	172
Amnios	173
Allantoide	173
Corion	173
Cordone ombelicale	173
Placenta	174
<i>Placentazione</i>	174
<i>Tipi di placenta</i>	175
Appendice - Apoptosi e autofagia nello sviluppo embrionale e nel differenziamento cellulare	177
Apoptosi	177
Autofagia	179
 Concetti chiave	182
Lecture consigliate	182





9 RIPRODUZIONE E FECONDAZIONE: MECCANISMI E STRATEGIE	183
 <i>Il periodo riproduttivo femminile: il ciclo estrale</i>	184
Comportamenti riproduttivi nei vertebrati	184
Pesci	185
Anfibi	185
Rettili	186
Uccelli	186
Mammiferi	186
Il sesso è davvero necessario?	186
Partenogenesi	187
Partenogenesi accidentale, facoltativa e obbligata	188
Vantaggi e svantaggi della partenogenesi	189
Competizione spermatica	189
Meccanismi	190









Determinazione del sesso nei vertebrati	191
 Concetti chiave	193
Lecture consigliate	193








10 CELLULE STAMINALI: CARATTERISTICHE E POTENZIALITÀ TERAPEUTICHE	195
Cellule staminali	195
Divisione asimmetrica e divisione simmetrica	195
Classificazione	196
Concetto di nicchia	197
Cellule staminali adulte	198
Proprietà	198
Isolamento, purificazione e caratterizzazione	198
Cellule staminali emopoietiche	199
Proprietà	200
Ruolo fisiologico	201
Isolamento e caratterizzazione	202
Espansione <i>in vitro</i>	202
Applicazioni terapeutiche	203
Cellule staminali mesenchimali	203
Proprietà	204
Ruolo fisiologico	204
Isolamento e caratterizzazione	204
Espansione <i>in vitro</i>	205
Applicazioni terapeutiche	206
 <i>Ruolo della senescenza nell'alterazione della biologia delle cellule staminali</i>	206
Cellule staminali fetali	206
Proprietà	206
Cellule staminali mesenchimali	
da liquido amniotico	208
Caratterizzazione	208
Isolamento	208
Espansione <i>in vitro</i>	209
Applicazioni terapeutiche	209
Cellule staminali embrionali	209
Proprietà	209
Isolamento	210
Caratterizzazione	210
Espansione <i>in vitro</i>	211
Applicazioni terapeutiche	211
Altre forme di pluripotenza	211
Cellule embrionali germinali	211
Isolamento, espansione <i>in vitro</i> e caratterizzazione	212
Applicazioni terapeutiche	212
Cellule staminali pluripotenti	
derivate dalle cellule germinali	212
Caratterizzazione	213
Isolamento ed espansione <i>in vitro</i>	213
Applicazioni terapeutiche	213


Cellule staminali pluripotenti indotte	213	Esempi di clonazione animale o riproduttiva	219
Tecnica di riprogrammazione	214	Clonazione terapeutica	221
Applicazioni terapeutiche: potenzialità	215	Criticità	221
Applicazioni terapeutiche: controversie	215	Appendice 1 - Dalla ricerca alla pratica clinica:	
Fusione cellulare: cellula somatica-		i <i>clinical trial</i>	223
cellula staminale embrionale	215	Appendice 2 - Potenzialità terapeutiche	
Tecniche di fusione cellulare	216	delle cellule staminali	225
Applicazioni terapeutiche: criticità	216	Cellule staminali embrionali:	
Cellule staminali ottenute		il problema etico	225
per trasferimento nucleare	217	Applicazioni terapeutiche	
Applicazioni terapeutiche	218	delle cellule staminali mesenchimali	226
Clonazione	218	 Concetti chiave	231
Tecniche di clonazione	218	Lecture consigliate	231


Seconda sezione INFERTILITÀ UMANA




11	INFERTILITÀ UMANA:		
	CAUSE, DIAGNOSI E TERAPIA		
	Infertilità di coppia		
	Infertilità femminile		
	Fattori femminili di infertilità		
	Fattore età		236
	Fattore endocrino		236
	Fattore tubarico		237
	Fattore uterino		237
	Fattore cervicale		237
	Fattore vaginale		237
	Fattore pelvico		237
	Fattori ambientali		238
	Fattori genetici		238
	Diagnosi		238
	Anamnesi ed esame obiettivo		238
	Diagnosi del fattore endocrino		239
	Diagnosi del fattore tubarico		239
	<i>Isterosalpingografia</i>		239
	<i>Sonoisterosalpingografia</i>		240
	<i>Laparoscopia diagnostica</i>		
	<i>con cromatosalpingoscopia</i>		240
	Diagnosi del fattore uterino		240
	Diagnosi del fattore cervicale		241
	Terapia		241
	Infertilità maschile		241
	Fattori maschili di infertilità		241
	Cause pretesticolari		242
	 <i>Fattori ambientali,</i>		
	<i>stile di vita e infertilità maschile</i>		242
	Cause testicolari		244
	<i>Sindrome di Klinefelter</i>		244
	<i>Microdelezioni del cromosoma Yq</i>		244
	<i>Varicocele</i>		244
	<i>Criptorchidismo</i>		245
	<i>Orchiti</i>		246
	<i>Torsione testicolare</i>		246
	<i>Esposizione a sostanze tossiche</i>		246
	Cause post testicolari		247
	<i>Sindrome di Kartagener</i>		247
	<i>Agenesia mono- o bilaterale</i>		
	<i>dei dotti deferenti</i>		247
	<i>Vasectomia e traumi</i>		247
	<i>Infezioni a carico</i>		
	<i>delle ghiandole sessuali accessorie</i>		247
	<i>Anomalie dell'eiaculazione</i>		247
	<i>Disfunzione erettile</i>		247
	<i>Alterazioni</i>		
	<i>dell'orifizio uretrale esterno</i>		248
	Diagnosi		248
	Anamnesi		248
	Esame obiettivo		248
	Indagini di laboratorio		248
	 <i>Come interpretare il risultato</i>		
	<i>dell'esame del liquido seminale</i>		249
	Indagini strumentali		250
	Terapia		251
	Terapia medica		251
	 <i>Azoospermie, recupero</i>		
	<i>dei gameti maschili</i>		
	<i>e procreazione medicalmente assistita</i>		252
	Terapia chirurgica		253
	<i>Orchidopessi</i>		253
	<i>Varicolectomia</i>		253
	 Concetti chiave		254
	Lecture consigliate		254

12	ESAME DEL LIQUIDO SEMINALE	255			
	Importanza dello spermogramma				
	e suo significato clinico	256			
	Composizione del liquido seminale	256			
	 <i>Vescicole seminali</i>	258			
	Esecuzione dello spermogramma	258			
	Fase preanalitica.....	258			
	Astinenza	259			
	Raccolta del liquido seminale	259			
	Consegna del liquido seminale	259			
	Raccolta del liquido seminale				
	con intervento medico.....	259			
	Fase analitica	260			
	Parametri macroscopici	260			
	<i>Coagulo alla raccolta</i>	260			
	<i>Tempo e qualità della fluidificazione</i>	260			
	<i>Aspetto</i>	260			
	<i>Colore</i>	260			
	<i>Volume</i>	261			
	<i>Viscosità</i>	261			
	<i>Determinazione del pH alla fluidificazione</i> ..	261			
	<i>Odore</i>	261			
	<i>Coaguli post fluidificazione</i>	262			
	Parametri microscopici	262			
	<i>Motilità nemaspermica</i>	262			
	 <i>Valutazione computerizzata</i>				
	<i>della motilità nemaspermica</i>	263			
	<i>Vitalità nemaspermica</i>	263			
	<i>Concentrazione nemaspermica</i>	264			
	<i>Morfologia nemaspermica</i>	265			
	<i>Agglutinazione</i>	266			
	<i>Valutazione del materiale</i>				
	<i>non nemaspermico</i>	266			
	 <i>Infertilità immunologica</i>	267			
	Altri esami	268			
	<i>Indagini proteomica e metabolomica</i>	269			
	<i>Ricerca di marcatori biochimici</i>				
	<i>per la funzionalità delle ghiandole</i>				
	<i>annesse al sistema genitale maschile</i>	269			
	<i>Valutazione della reazione acrosomiale</i>	269			
	<i>Dosaggio delle specie reattive dell'ossigeno</i> ..	269			
	<i>Indice dell'attività mitocondriale</i>	270			
	Alterazioni del liquido seminale	270			
	Alterazioni della motilità				
	e della vitalità nemaspermica.....	270			
	Alterazioni della concentrazione nemaspermica ..	271			
	Alterazioni della morfologia nemaspermica	272			
	Anomalie morfologiche singole e multiple	272			
	Anomalie morfologiche su base genetica.....	273			
	Alterazioni del volume del liquido seminale	274			
	Appendice - Dispositivi per la determinazione				
	della concentrazione di spermatozoi	276			
	Camera di Neubauer migliorata.....	276			
	Camera di Makler	276			
	Conteggio di cellule mediante vetrini.....	276			
	Accettabilità dei valori				
	della conta degli spermatozoi.....	277			
	 Concetti chiave	278			
	Lecture consigliate	278			
13	INFEZIONI UROGENITALI				
	E INFERTILITÀ	279			
	Infezioni del sistema genitale maschile	280			
	Infezioni correlate a infertilità	280			
	Orchiti	280			
	Epididimiti	280			
	Prostatiti	280			
	Vescicoliti	281			
	Uretriti	281			
	 <i>Staphylococcus aureus</i>	282			
	Caratteristiche identificative				
	dei principali microrganismi	282			
	Micoplasmi	282			
	 <i>Micoplasma/ureaplasma</i>	283			
	<i>Enterococcus species</i>	283			
	Enterobatteri	283			
	<i>Escherichia coli</i>	283			
	 <i>Enterococcus species</i>	284			
	<i>Proteus mirabilis e vulgaris</i>	284			
	<i>Klebsiella species</i>	285			
	Infezioni del sistema genitale femminile	286			
	Infezioni correlate a infertilità.....	286			
	Caratteristiche identificative				
	dei principali microrganismi	286			
	<i>Treponema pallidum</i>	287			
	 <i>Treponema pallidum</i>	287			
	Micoplasmi	288			
	<i>Chlamydia trachomatis</i>	288			
	Prelievi microbiologici				
	nelle vie urogenitali maschili	288			
	Tampone uretrale	288			
	 <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	289			
	Conservazione dei campioni	289			
	Procedure diagnostiche.....	289			
	Refertazione	290			
	Esame della secrezione prostatica	290			
	Procedure diagnostiche.....	290			
	Refertazione	291			
	Esame del liquido seminale	291			
	Conservazione dei campioni	291			
	Procedure diagnostiche.....	291			
	Refertazione	291			
	Lavaggio o tampone				
	da solco balanoprepuziale.....	291			
	Conservazione dei campioni	291			
	Procedure diagnostiche.....	291			
	Refertazione	291			



Prelievi microbiologici	
nelle vie urogenitali femminili	291
Tampone vaginale	291
Conservazione dei campioni	292
Procedure diagnostiche	292
 <i>Gardnerella vaginalis</i>	293
 <i>Candida albicans</i>	293
 <i>Streptococcus pyogenes</i>	294
 <i>Streptococcus agalactiae</i>	295
 <i>Listeria monocytogenes</i>	295
Tampone endocervicale	296
Conservazione dei campioni	296
Procedure diagnostiche	296
Tampone uretrale	296
Conservazione dei campioni	297
Procedure diagnostiche	297
Tampone vulvare	297
 <i>Haemophilus Ducreyi</i>	297
Conservazione dei campioni	297
Procedure diagnostiche	297
Refertazione	297
Urinocoltura	298
Conservazione dei campioni	298
Procedure diagnostiche	298
Significatività della carica microbica urinaria	299
Refertazione	301
 Concetti chiave	302
Lecture consigliate	302



14	FATTORI GENETICI DELL'INFERTILITÀ	303
	Fattori genetici dell'infertilità maschile	303
	Anomalie del cariotipo	303
	Anomalie numeriche dei cromosomi	303
	<i>Sindrome di Klinefelter</i>	303
	<i>Sindrome del maschio XX</i>	305
	<i>Sindrome 47,XYY</i>	305
	<i>Aneuploidie degli autosomi</i>	305
	Anomalie strutturali dei cromosomi	305
	<i>Anomalie strutturali del cromosoma Y</i>	305
	<i>Anomalie strutturali degli autosomi</i>	305
	Microdelezioni del braccio lungo	
	del cromosoma Y	306
	Delezioni complete della regione AZF	306
	Delezioni parziali della regione AZFc	306
	 <i>Il significato clinico delle delezioni delle regioni AZF</i>	307
	<i>Delezione gr/gr</i>	308
	Anomalie monogeniche legate al cromosoma X	308
	Gene <i>AR</i>	309
	Gene <i>TEX11</i>	309
	Mutazioni del gene <i>CFTR</i>	309
	Ricerca di cause genetiche nell'infertilità idiopatica	310




Fattori genetici dell'infertilità femminile	311
Insufficienza ovarica precoce	311
Anomalie cromosomiche	312
<i>Sindrome di Turner</i>	312
<i>Trisomia X</i>	312
<i>Anomalie strutturali</i>	312
Anomalie monogeniche legate al cromosoma X	312
Gene <i>FMR1</i>	313
Gene <i>BMP15</i>	314
Altri geni	314
Anomalie monogeniche autosomiche	314
Iter diagnostico	314
Endometriosi	316
Sindrome dell'ovaio policistico	316
Iter diagnostico nella ricerca di possibili cause genetiche	316
Ipogonadismo ipogonadotropo congenito	317
 Concetti chiave	319
Lecture consigliate	320

15	TECNICHE PER LO SCREENING GENETICO DELL'INFERTILITÀ	321
	Tecniche di citogenetica convenzionale	321
	Analisi del cariotipo	322
	Bandeggio cromosomico	322
	Tecniche di citogenetica molecolare	325
	 <i>Cromosomi marcatori soprannumerari</i>	325
	Tecniche di biologia molecolare	326
	Reazione a catena della polimerasi	326
	PCR in tempo reale	327
	Analisi di marcatori microsatelliti polimorfici	328
	Amplificazione ligazione-dipendente multipla della sonda	329
	Tecnica MS-MLPA	329
	Sequenziamento Sanger e di nuova generazione	329
	 <i>Geni imprinted</i>	330
	Utilizzo dei <i>microarray</i>	332
	Array-CGH di oligonucleotidi	333
	Array di polimorfismi a singolo nucleotide	333
	Appendice - Le tecniche FISH, M-FISH, SKY ed mBAND	336
	Ibridazione <i>in situ</i> fluorescente	336
	Ibridazione <i>in situ</i> fluorescente multicolore	338
	Tecnica mBAND	339
	 Concetti chiave	341
	Lecture consigliate	342


16	QUALITÀ DEL DNA SPERMATICO E INFERTILITÀ	343
	Struttura della cromatina spermatica umana	343
	Analisi della qualità del DNA spermatico	344


Frammentazione del DNA spermatico	345
 Valutazione delle anomalie cromosomiche spermatiche	348
Anomalie cromosomiche degli spermatozoi e infertilità	349
Appendice - Test di laboratorio per l'analisi della qualità del DNA spermatico	350
Colorazione con blu di anilina	350
Colorazione con blu di toluidina	350
Colorazione con cromomicina A3	351
COMET assay	351
Saggio della diffusione	352
Saggio SCSA	353
Tecnica TUNEL	353
Acridine Orange Test	354
SCD Test	355
 Concetti chiave	356
Lecture consigliate	356








17 BASI BIOCHIMICHE DELLA FERTILITÀ	357
 Fluidità di membrana degli spermatozoi: un parametro critico per la funzionalità spermatica	358
 Citochine e gravidanza	359
Marcatori molecolari in uso nella pratica clinica	359
Biomarcatori della fertilità femminile	359
Biomarcatori della fertilità maschile	360


Nuovi lipidi bioattivi come potenziali biomarcatori della fertilità umana	361
Sistema endocannabinoide	361
Endocannabinoidi nei processi riproduttivi femminili e maschili	361
 <i>Gli endocannabinoidi nella modulazione dei processi riproduttivi: aspetti evolutivi</i>	363
Endocannabinoidi nelle matrici riproduttive femminili e maschili	364
Concentrazioni degli endocannabinoidi nel plasma materno	365
Concentrazioni degli endocannabinoidi nell'ovaio e nel liquido follicolare	365
Concentrazioni degli endocannabinoidi all'interfaccia materno-fetale	366
 <i>Metodologie per la rilevazione degli endocannabinoidi nelle matrici biologiche</i>	367
Concentrazioni degli endocannabinoidi nel plasma seminale e negli spermatozoi	368
Endocannabinoidi e altri fattori periferici coinvolti nella riproduzione	368
Rilevanza clinica degli endocannabinoidi nella fertilità maschile e femminile	369
Appendice - Criteri di valutazione di un biomarcatore nella medicina clinica riproduttiva	371
 Concetti chiave	373
Lecture consigliate	373

Terza sezione TECNOLOGIE LEGATE ALLA RIPRODUZIONE UMANA


18 CRIOCONSERVAZIONE DI GAMETI ED EMBRIONI	377
 <i>Profilo storico della crioconservazione</i> ..	377
Principi di criobiologia	377
Proprietà fisiche delle cellule e dei tessuti a basse temperature	378
Potenziale chimico	379
Volume	379
Velocità del movimento dell'acqua	379
Stato di aggregazione	380
Modificazioni strutturali delle cellule a basse temperature	380
Tecniche di crioconservazione	380
Crioprotettori	381
Crioconservazione nella fertilità maschile	382
Crioconservazione del liquido seminale	382
Possibili danni	382


Protocolli sperimentali	384
Crioconservazione del tessuto testicolare	384
Protocolli sperimentali	385
Crioconservazione nella fertilità femminile	385
Crioconservazione degli oociti	385
Protocolli sperimentali: congelamento lento	386
Protocolli sperimentali: vitrificazione	386
Valutazione della qualità oocitaria	387
Crioconservazione di oociti immaturi	387
Crioconservazione del tessuto ovarico	388
Crioconservazione degli embrioni	388
Protocolli sperimentali	388
Valutazione della qualità dell'embrione	388
Crioconservazione della blastocisti	389
Appendice - Dispositivi di vitrificazione	390
 Concetti chiave	391
Lecture consigliate	391

19	STIMOLAZIONE ORMONALE E INDUZIONE DELL'OVULAZIONE	393
	Farmaci induttori dell'ovulazione	393
	Clomifene citrato	393
	Indicazioni	394
	Dosaggi e somministrazione	394
	Effetti collaterali e complicanze	394
	Gonadotropine	394
	Gonadotropine utilizzate nell'induzione dell'ovulazione.....	395
	Ormone follicolo-stimolante	396
	Somministrazione e dosaggi.....	396
	Farmaci per la prevenzione della luteinizzazione precoce	396
	Analoghi agonisti dell'ormone di liberazione delle gonadotropine	396
	Analoghi antagonisti dell'ormone di liberazione delle gonadotropine	397
	Farmaci per la supplementazione della fase luteinica	398
	Personalizzazione delle terapie	398
	Valutazione della riserva ovarica.....	398
	Dosaggio plasmatico dell'ormone follicolo-stimolante entro il terzo giorno del ciclo ovarico.....	398
	Dosaggio plasmatico dell'ormone antimülleriano	399
	Conta dei follicoli antrali	399
	Classificazione delle pazienti in base alla valutazione della riserva ovarica.....	399
	Gestione delle pazienti <i>poor-responder</i>	400
	Strategie per la prevenzione della sindrome da iperstimolazione ovarica ...	401
	 Concetti chiave	402
	Lecture consigliate	402
20	TECNICHE DI PROCREAZIONE MEDICALMENTE ASSISTITA	403
	Tecniche di PMA	403
	Tecniche di primo livello.....	403
	 <i>Procreazione medicalmente assistita: dimensioni del fenomeno</i>	404
	Tecniche di secondo livello.....	405
	Tecniche di terzo livello.....	405
	Indicazioni	405
	Inseminazione intrauterina	405
	Procedure.....	406
	Indicazioni e controindicazioni.....	406
	Risultati	407
	Fecondazione <i>in vitro</i>	407
	Fecondazione <i>in vitro</i> e trasferimento di embrioni	407
	 FIVET: <i>i padri della fecondazione in vitro</i>	407
	Procedure	407
	Stimolazione ovarica e <i>pick-up</i>	408
	 <i>Prelievo oocitario</i>	408
	<i>Inseminazione e coltura</i>	409
	Indicazioni	409
	Risultati.....	410
	 <i>Risultati delle tecniche di secondo e terzo livello</i>	410
	Iniezione intracitoplasmatica dello spermatozoo	410
	Procedure	410
	Stimolazione ovarica e <i>pick-up</i>	410
	Decumulazione e inseminazione	410
	Indicazioni	411
	Trasferimento intrauterino	411
	 <i>Gravidanze gemellari</i>	411
	 <i>Analisi dei fattori derivati dall'embrione come marcatori di potenziale di sviluppo</i>	412
	Controllo della fecondazione <i>in vitro</i> e selezione dell'embrione	412
	Check zigotico.....	413
	<i>Estrusione del secondo globulo polare e formazione dei pronuclei</i>	414
	<i>Aspetto morfologico degli zigoti</i>	414
	<i>Punteggio pronucleare</i>	415
	<i>Fecondazioni anomale</i>	416
	Embrione in fase di segmentazione	417
	<i>Citoplasma e anomalie citoplasmatiche</i>	418
	<i>Numero dei blastomeri</i>	419
	<i>Dimensione e disposizione spaziale dei blastomeri</i>	419
	<i>Grado di frammentazione</i>	419
	<i>Multinucleazione</i>	420
	<i>Compattazione della morula</i>	420
	<i>Valutazione embrionale</i>	420
	Blastocisti	421
	<i>Grado di espansione della blastocisti</i>	421
	<i>Morfologia della massa cellulare interna</i> ...	421
	<i>Morfologia del trofoblasto</i>	421
	<i>Degenerazione delle cellule della blastocisti</i> .	421
	<i>Proiezioni citoplasmatiche tra massa cellulare interna e trofoblasto</i> ..	422
	<i>Altre caratteristiche morfologiche</i>	422
	Appendice 1 - Tecniche di capacitazione del liquido seminale	423
	Tecnica di diluizione e lavaggio.....	424
	Tecniche di migrazione: <i>swim-up</i> da strato fisico.....	424
	Tecniche di migrazione: <i>swim-up</i> da pellet	424
	Gradiente di densità con centrifugazione.....	425
	Filtrazione con lana di vetro e biglie di vetro ...	425





Separazione con metodo elettroforetico	
in base alla carica elettrica	426
Tecniche di <i>binding</i> : acido ialuronico	426
Tecniche di <i>binding</i> :	
<i>Magnetic-Activated Cell Sorting</i>	426
Altre tecniche	426
Appendice 2 - Laboratorio di PMA:	
organizzazione e gestione	427
Sistema documentato	
della gestione della qualità	427
Risorse strumentali	428
Requisiti strutturali e norme comportamentali	430
Requisiti ambientali	431
Crioconservazione:	
gestione e stoccaggio in azoto liquido	432
 Concetti chiave	435
Lecture consigliate	436

21	COLTURA DEGLI EMBRIONI	437
	Tecniche e condizioni di coltura	437
	Tempi di coltura dell'embrione	438
	Coltura fino allo stadio	
	di quattro-otto cellule	438
	Coltura prolungata	438
	<i>Coltura singola: "Let the embryo choose"</i>	438
	<i>Coltura sequenziale: "Back to nature"</i>	439
	Cocoltura	439
	Coltura embrionale	
	con bassa tensione di ossigeno	439
	Coltura individuale o di gruppo	439
	Terreni di coltura	440
	Componenti	440
	Acqua	440
	Sali	440
	Glucidi	440
	<i>Sodio piruvato</i>	440
	<i>Sodio lattato</i>	440
	<i>Glucosio</i>	440
	Proteine	440
	<i>Albumina</i>	440
	<i>Aminoacidi</i>	440
	Acido etilendiaminotetracetico	441
	<i>Buffer</i>	441
	<i>Ione bicarbonato</i>	441
	<i>HEPES</i>	441
	Antibiotici	441
	Ialuronato (glucosaminoglicano)	441
	Strumentazione per la coltura embrionale	441
	Supporti per la coltura embrionale	442
	Supporti per la coltura statica	442
	Macrocoltura	443
	Microcoltura	443
	Ultramicrocoltura	444

Supporti per la coltura dinamica	444
Condizioni generali di coltura	445
Olio leggero di paraffina	445
Sistemi tampone dei terreni di coltura	445
Osservazione e selezione morfologica	
degli embrioni	446
Tecnologia <i>timelapse</i>	446
Limiti della tecnologia <i>timelapse</i>	447
Appendice - Terreni di coltura	448
Terreni di coltura semplici	448
Terreni di coltura complessi	448
Terreni per coltura sequenziale	448
Terreni per coltura singola	448
 Concetti chiave	449
Lecture consigliate	450

22	MATURAZIONE IN VITRO	
	DEGLI OOCITI	451
	Applicazione clinica della maturazione	
	<i>in vitro</i>	452
	Efficienza della procedura	
	di maturazione <i>in vitro</i>	453
	Criteri di selezione	453
	Età	453
	Peso corporeo	453
	Conta dei follicoli antrali	453
	Concentrazione	
	dell'ormone follicolo-stimolante	454
	Concentrazione dell'ormone antimülleriano	454
	Concentrazione del 17 β -estradiolo	454
	<i>Priming</i> farmacologico	454
	Temporizzazione del prelievo degli oociti	455
	Preparazione endometriale	457
	Aspetti biologici e di laboratorio	
	della maturazione <i>in vitro</i>	457
	Terreni di coltura	457
	Tempi della procedura	458
	Miglioramento dell'efficienza	
	della maturazione <i>in vitro</i>	458
	Bambini nati da maturazione <i>in vitro</i>	459
	 Concetti chiave	460
	Lecture consigliate	460

23	MICROMANIPOLAZIONE	
	DI GAMETI ED EMBRIONI	461
	Evoluzione delle tecniche	461
	Iniezione intracitoplasmatica	
	dello spermatozoo	462
	Indicazioni	462
	<i>Set up</i> di laboratorio	463
	Preparazione dei campioni seminali	463
	Raccolta del liquido seminale	463

Analisi e preparazione del liquido seminale per la selezione dello spermatozoo	465	 Concetti chiave	479
Preparazione di spermatozoi testicolari ed epididimali.	465	Lettere consigliate	480
Preparazione degli oociti	465		
Procedura	466	24 DIAGNOSI GENETICA PREIMPIANTO .	481
Selezione e immobilizzazione dello spermatozoo	467	Indicazioni	481
Posizionamento dell'ocito e penetrazione nel citoplasma dell'ocito	467	Percorso della coppia	482
Selezione dello spermatozoo per la ICSI	468	Diagnosi genetica preimpianto e tecniche di fecondazione assistita	482
Iniezione intracitoplasmatica di spermatozoi morfologicamente selezionati	468	 <i>La consulenza genetica nel processo di diagnosi preimpianto</i>	483
Procedura	469	Coltura e biopsia embrionale	483
Risultati e indicazioni	469	Biopsia dei blastomeri.	483
Iniezione intracitoplasmatica fisiologica dello spermatozoo	470	 <i>Incidenza e possibilità diagnostiche del mosaicismo nelle prime fasi di sviluppo dell'embrione</i>	485
Procedura	470	Biopsia allo stadio di blastocisti	486
Risultati e indicazioni	471	<i>Tecniche e timing di biopsia</i>	486
Selezione degli spermatozoi su base magnetica.	471	Diagnosi genetica preimpianto	487
Procedura	471	Aneuploidie cromosomiche (PGT-A)	487
Risultati e indicazioni	471	Malattie monogeniche (PGT-M)	488
Selezione degli oociti per la ICSI	472	Riarrangiamenti cromosomici e variazioni del numero di copie patologiche (PGT-SR).	488
Parametri morfologici.	472	Tecniche di diagnosi genetica preimpianto	489
Classificazione in base allo stadio di maturazione.	473	Tecniche di analisi cromosomica estensiva	490
Apoptosi in cellule del cumulo ooforo	474	Sequenziamento di nuova generazione.	490
Tecniche di micromanipolazione su embrioni	475	Diagnosi genetica preimpianto: prospettive	491
Schiusa assistita	475	 Concetti chiave	492
Diagnosi genetica preimpianto.	477	Lettere consigliate	492
Procedure	477		
Vantaggi e svantaggi	478	INDICE ANALITICO	493

Prima sezione

**BIOLOGIA CELLULARE E MOLECOLARE
DELLA RIPRODUZIONE**

ANATOMIA DEL SISTEMA GENITALE

1

ABBOZZI DELLE GONADI

L'evoluzione delle gonadi inizia con una fase indifferenziata più o meno lunga durante la quale gli abbozzi delle gonadi sono assolutamente identici nei due sessi; il differenziamento in ovaie o testicoli compare in un secondo tempo (Fig. 1.1).

Nello stadio indifferenziato, l'abbozzo delle gonadi si forma a carico di due fasce dorsali dell'epitelio celomatico, le

creste gonadiche (o *genitali*), che si prolungano per tutta la lunghezza della cavità celomatica, ai due lati dell'origine del mesentere dorsale.

L'epitelio delle creste gonadiche è rapidamente colonizzato dalle **cellule germinali primordiali**, al termine della loro migrazione dai territori endodermici extragonadici dai quali si sono originate. Questa colonizzazione è raramente totale; nella maggior parte dei casi interessa soltanto una parte delle creste gonadiche, in corrispondenza delle future gonadi

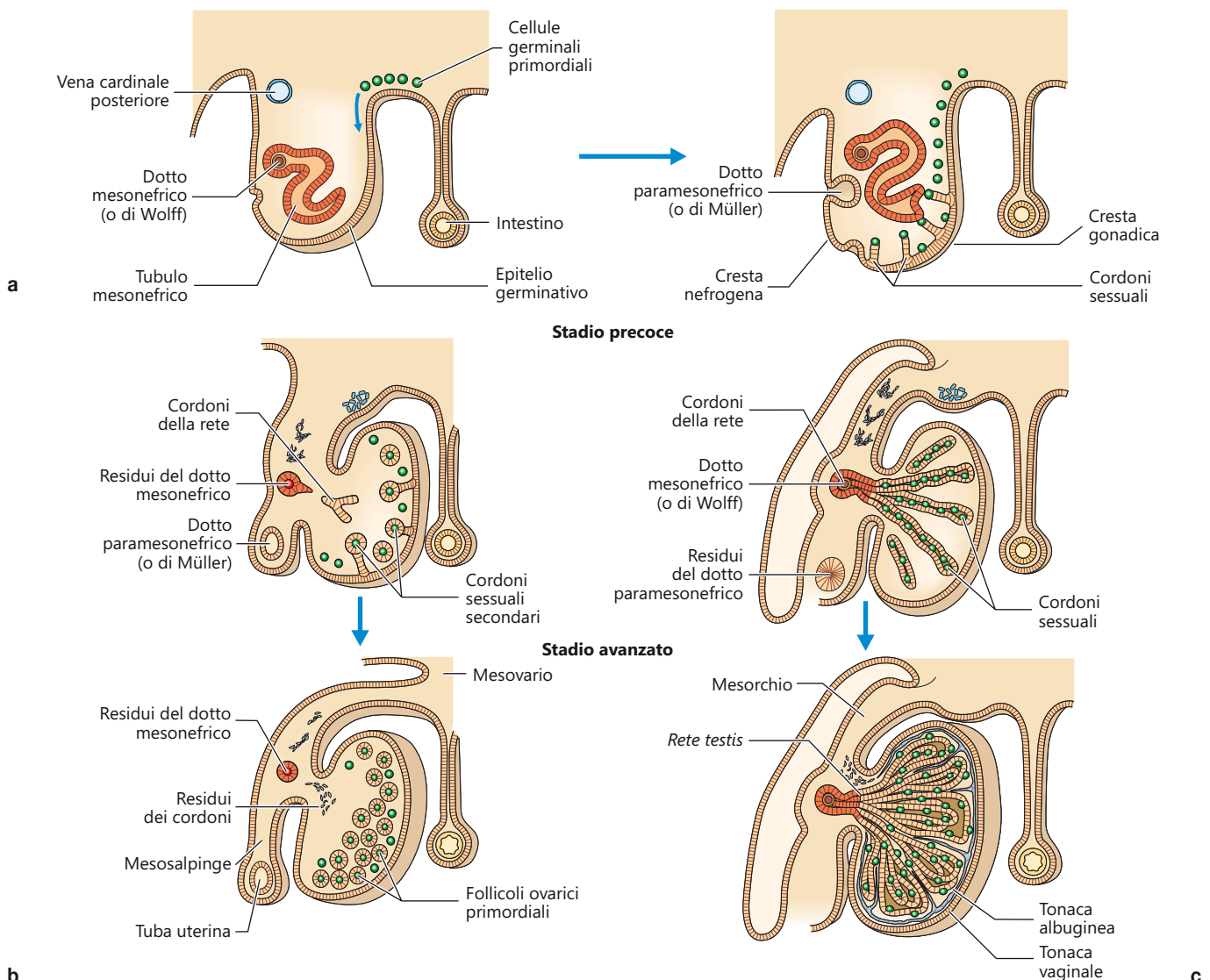


Figura 1.1 Sviluppo delle gonadi. a, Sviluppo della gonade indifferenziata. b-c, Sviluppo precoce e avanzato delle gonadi femminile (b) e maschile (c).

fertili; la parte rimanente, sterile, scompare o, eccezionalmente, persiste come organo linfoide.

Dopo un periodo di riposo più o meno lungo, l'epitelio delle creste gonadiche colonizzato dalle cellule germinali primordiali (chiamato spesso **epitelio germinativo**) si ispessisce e sporge nella cavità celomatica, formando così uno dei due costituenti della gonade, la **zona corticale**, a potenzialità ovarica. Il secondo costituente, la **zona midollare**, a potenzialità testicolare, penetra nel peduncolo della cresta gonadica, futuro meso della gonade, e viene quasi a contatto della zona corticale, da cui resta separato soltanto da un sottile strato di mesenchima.

La **gonade indifferenziata** è quindi costituita da una zona corticale periferica, in cui sono localizzate le cellule germinali primordiali, uno stroma di origine mesenchimatica, in cui sono contenuti i vasi sanguigni, e una zona midollare centrale, sterile (cfr. **Fig. 1.1 a**). È definita "indifferenziata" poiché può evolversi indifferentemente in ovaio o in testicolo secondo la predominanza di uno o dell'altro dei due territori, corticale o midollare.

DIFFERENZIAMENTO OVARICO

Nel caso di differenziamento ovarico, la zona corticale si ispessisce per la rapida moltiplicazione delle cellule germi-

nali, diventate **oogoni primari**. Alcuni di essi, gli **oociti primari**, entrano anche in premeiosi. La zona midollare resta poco sviluppata e sterile; essa si scava in sacchi ovarici o si dispone in teche intorno ai follicoli (cfr. **Fig. 1.1 b**).

DIFFERENZIAMENTO TESTICOLARE

Nel caso di differenziamento testicolare, la zona midollare prolifera e attira le cellule germinali dalla zona corticale, che diventa sterile e si riduce a un sottile epitelio peritoneale che ricopre direttamente il mesenchima, ispessitosi nella tonaca albuginea, e che contiene la maggior parte dei vasi sanguigni della gonade. Le cellule germinali attratte dalla zona midollare diventano gli **spermatogoni primari**, che si moltiplicano lentamente e non manifestano segni di premeiosi.

SISTEMA GENITALE MASCHILE

Il **sistema genitale maschile** (**Fig. 1.2**) è deputato alla formazione degli spermatozoi e alla emissione del liquido seminale, o sperma, liquido nel quale gli spermatozoi sono sospesi.

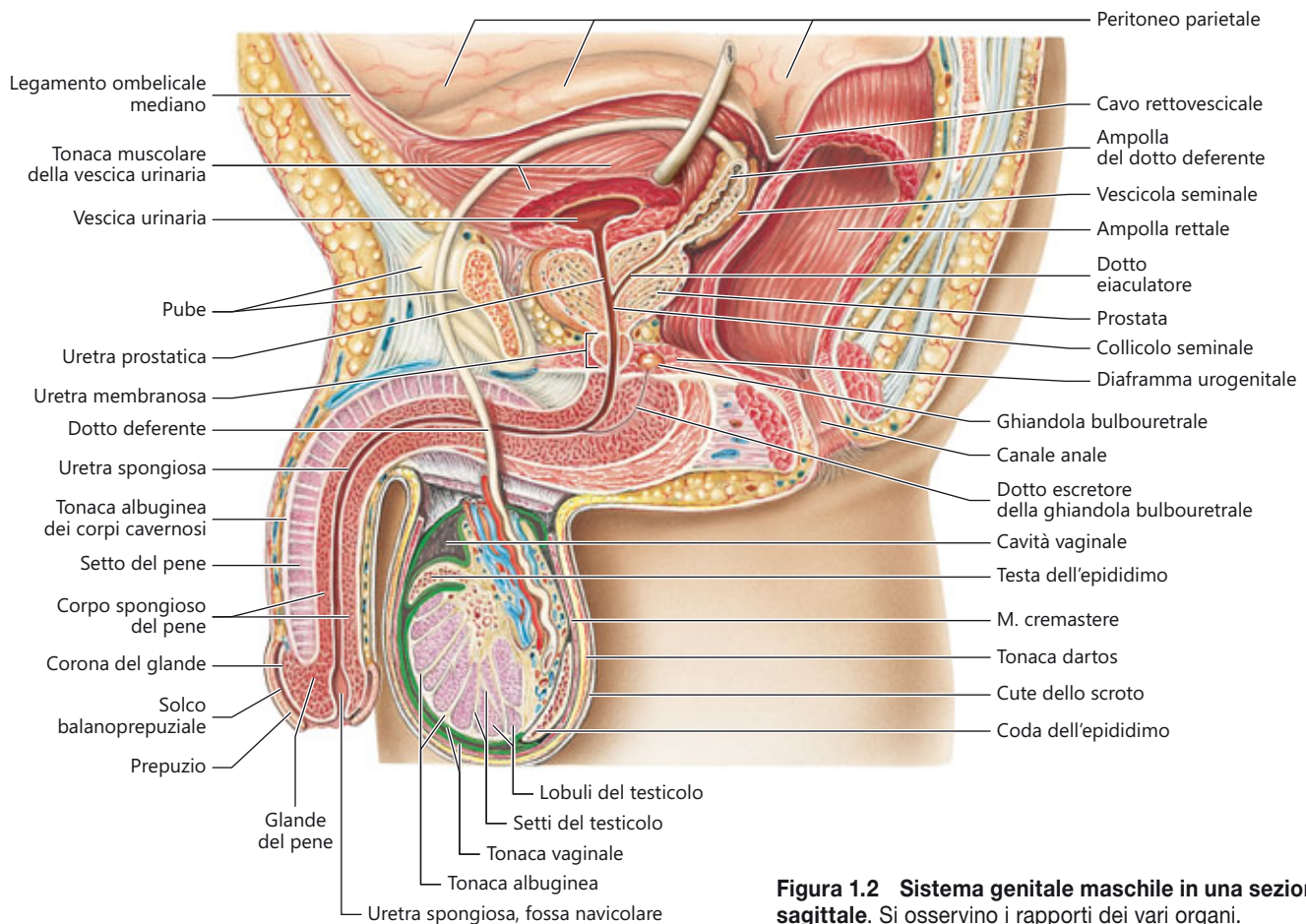
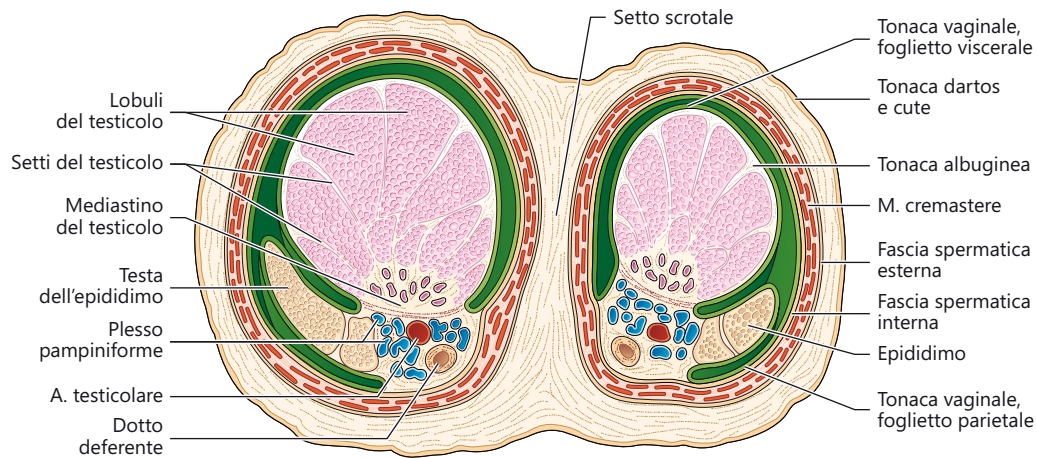
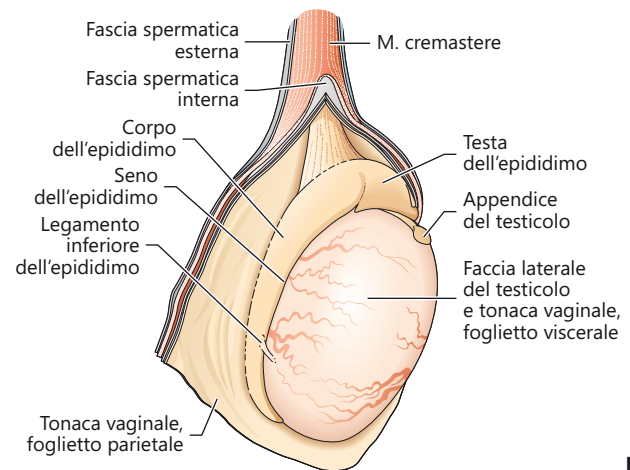


Figura 1.2 Sistema genitale maschile in una sezione sagittale. Si osservino i rapporti dei vari organi.



a

Figura 1.3 Testicolo: morfologia. a, Sezione trasversale del sacco scrotale e del suo contenuto. Si apprezzano la struttura lobulare del testicolo e i rapporti della gonade con l'epididimo e il canale deferente. Sono anche indicate le varie tonache che costituiscono gli involucri del testicolo e la parete del sacco scrotale. b, Testicolo destro visto in proiezione laterale.



b

Nella specie umana il sistema genitale maschile consta di:

- due **testicoli**, che sono le gonadi maschili;
- **vie spermatiche**, che fanno seguito a ciascun testicolo e che hanno il compito di elaborare una parte del liquido seminale;
- **funicolo spermatico**, che sostiene il testicolo e accoglie le vie spermatiche;
- **uretra maschile**, che reca, oltre all'urina, il liquido seminale all'esterno;
- **ghiandole annesse**, il cui secreto completa la composizione del liquido seminale;
- **pene**, che è l'organo della copula.

Nel contesto del sistema, sono elaborati **ormoni**, come il testosterone, che concorrono alla funzione riproduttiva e conferiscono i caratteri sessuali secondari maschili.

TESTICOLI

I **testicoli** sono posti sotto il perineo, fra le due cosce, dietro al pene, accolti nello scroto (cfr. Fig. 1.2). I testicoli si collocano in tale posizione nello scroto solo poco prima della nascita, essendosi formati nella cavità addominale, dalla quale successivamente discendono.

Lo **scroto** (Fig. 1.3) è un sacco cutaneo muscolare, al cui interno ciascun testicolo è appeso mediante il **funicolo spermatico**; è fissato al fondo da un legamento fibroso, detto **legamento scrotale**. I due testicoli sono separati tra loro dal **setto scrotale**, un sepimento che divide la cavità in due metà simmetriche, destra e sinistra.

Morfologia esterna e involucri

Il testicolo (cfr. Fig. 1.3) ha la forma di un ovoide, appiattito trasversalmente, dalle dimensioni medie di $42 \times 25 \times 38$ mm; pesa circa 15-20 g e ha una consistenza duro-elastica.

Il polo superiore e il margine posteriore del testicolo sono sormontati dall'epididimo, formazione allungata che si adatta al testicolo e fa parte delle vie spermatiche. Lungo il margine posteriore del testicolo si trova l'**ilo del testicolo**, in corrispondenza del quale escono dal testicolo medesimo i condottini efferenti e passano i vasi e i nervi.

Il testicolo è avvolto dalla **tonaca albuginea**, spessa lamina fibrosa, di colore ceruleo, che circonda direttamente il parenchima dell'organo.

Esternamente alla tonaca albuginea, il testicolo è avvolto dal **foglietto viscerale della tonaca vaginale**: questa corrisponde alla porzione del peritoneo che ha accompagnato il testicolo nella sua discesa dalla cavità addominale nello scroto e che poi si è fatta indipendente dal peritoneo.

Infine, all'esterno del foglietto viscerale, il **foglietto parietale della tonaca vaginale** avvolge il testicolo e il funicolo spermatico.

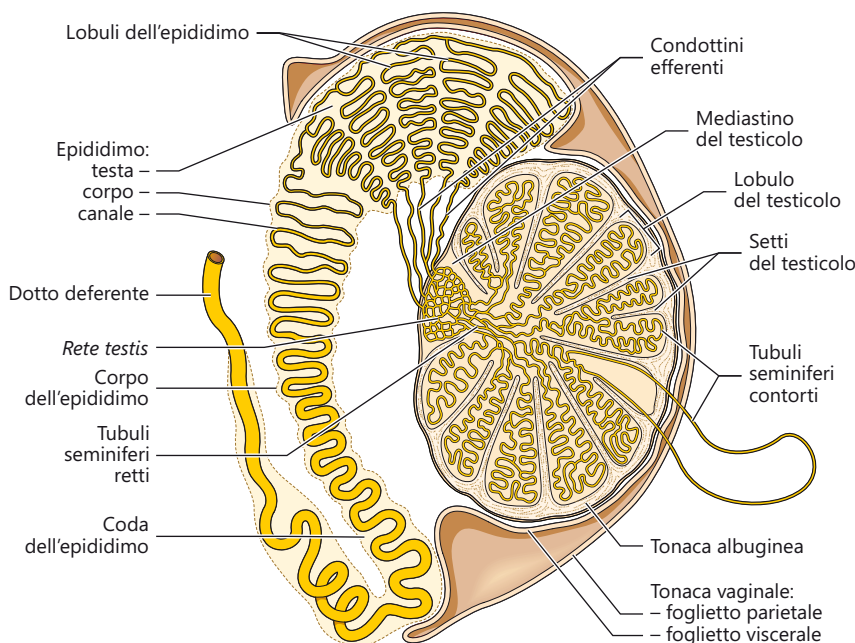


Figura 1.4 Testicolo e prime vie spermatiche: morfologia interna.

Morfologia interna

Sezioni trasversali o longitudinali del testicolo (Fig. 1.4; cfr. Fig. 1.3 a) mostrano che la tonaca albuginea si ispessisce e si affonda in corrispondenza del margine posteriore del testicolo stesso, formando un ammasso connettivale, che è detto **mediastino del testicolo** (o *corpo di Highmore*). Da questo si dipartono i **setti del testicolo**, che irradiano verso la superficie dell'organo per unirsi alla faccia profonda della tonaca albuginea. Tali setti suddividono il parenchima del testicolo in 200-300 **lobuli del testicolo**, ciascuno dei quali ha forma piramidale, con la base rivolta verso la superficie e l'apice verso il mediastino.

All'interno di ciascun lobulo, sono presenti ammassi di delicati filamenti, i **tubuli seminiferi contorti**. Entro ciascun lobulo del testicolo, i tubuli seminiferi contorti sono due o tre. Essi hanno una lunghezza che varia da 30 a 100 cm, con un diametro che va da 15 a 250 μm , e sono ripetutamente avvolti su sé stessi, ramificati e anche anastomizzati fra loro. Il loro sviluppo complessivo può raggiungere una lunghezza di 300 m. Iniziano a fondo cieco, in prossimità della tonaca albuginea, e si dirigono in modo tortuoso verso il mediastino; qui giunti, i tratti terminali si fanno rettilinei (*tubuli seminiferi retti*) e sboccano nella *rete testis* del mediastino, che rappresenta la parte iniziale delle vie spermatiche (cfr. Fig. 1.4).

Morfologia microscopica

I tubuli seminiferi contorti sono deputati alla formazione degli spermatozoi. Essi sono caratterizzati dall'**epitelio germinativo**, o *spermatogenico*, dove si distinguono

le **cellule germinali** e cellule somatiche note come **cellule di sostegno dell'epitelio spermatogenico** o di *Sertoli* (Fig. 1.5). Entrambe le popolazioni cellulari sono delimitate perifericamente da una lamina propria (**lamina peritubulare**) costituita da più strati di fibre collagene in cui abbondano filamenti contrattili, le **cellule mioidi**. Esse sono responsabili delle contrazioni ritmiche peritubulari necessarie per la progressione degli spermatozoi, non ancora dotati di motilità propria, verso il mediastino del testicolo.

I tubuli sono immersi a loro volta nel tessuto interstiziale, costituito dalle **cellule interstiziali** o di *Leydig*. Queste componenti danno vita al processo della gametogenesi maschile, ossia la **spermatogenesi** (➔ **Approfondimento** *Fattori che influenzano la spermatogenesi* e **Capp. 3** e **5**).

Cellule germinali

Il fenomeno della spermatogenesi inizia alla pubertà e consiste nella maturazione di cellule staminali primordiali che, attraverso una serie di divisioni cellulari e di profonde modificazioni strutturali, porta alla formazione dello spermatozoo. Tale processo inizia con una serie di particolari divisioni mitotiche che danno luogo agli **spermatogoni**. Questi ultimi danno origine agli **spermatociti primari**, con i quali inizia la fase meiotica della spermatogenesi, che termina con due **spermatociti secondari**, dopo la prima divisione, e quattro **spermatidi** aploidi, dopo la seconda divisione. Lo spermatidio va poi incontro a una complessa maturazione che risulta nella trasformazione di una cellula rotondeggiante in una cellula altamente specializzata, lo **spermatozoo** (processo denominato **spermiogenesi**) (➔ **Cap. 3**).

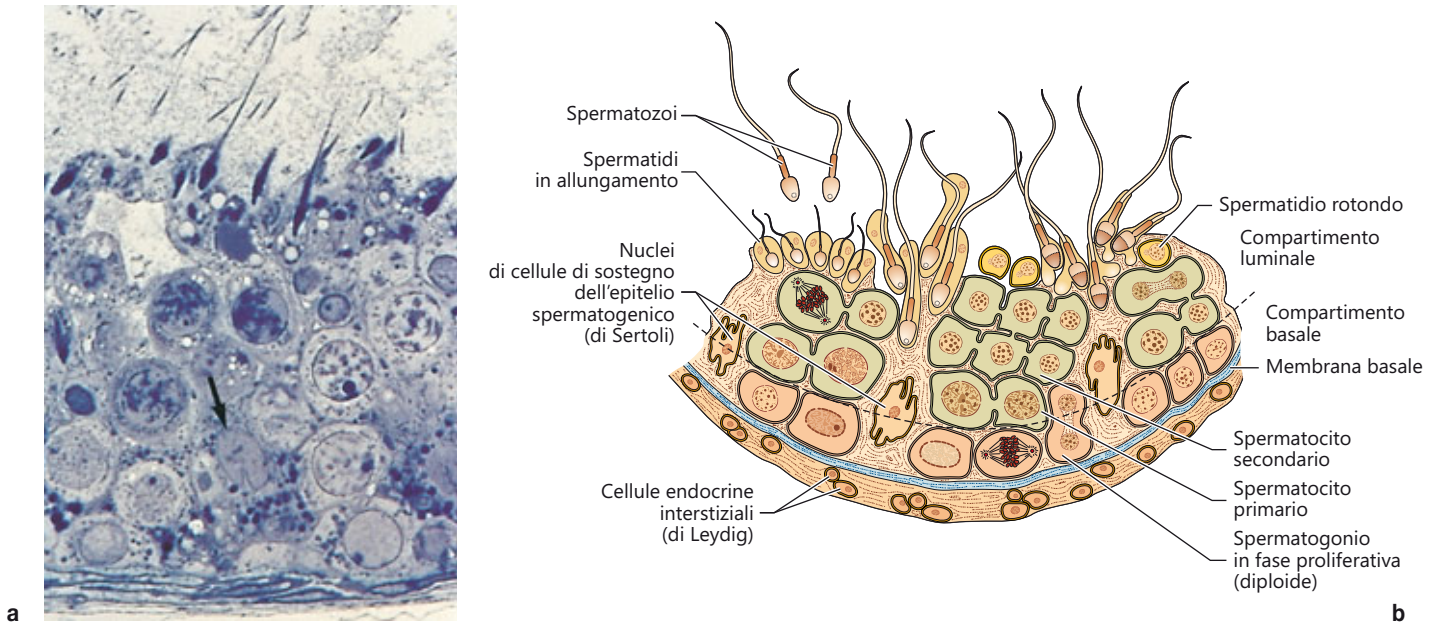


Figura 1.5 Tubulo seminifero: morfologia microscopica. **a**, In seno all'epitelio germinativo sono presenti, oltre alle cellule di Sertoli delle quali si osserva un caratteristico nucleo (**freccia**), le cellule germinali in varie fasi di differenziazione. Verso il lume sono visibili gli spermatozoi. Al di sotto dell'epitelio è presente la lamina propria. **b**, Cellule che compongono il tubulo seminifero. All'interno dello stesso tubulo si trovano tutti gli stadi della spermatogenesi, da spermatogoni a spermatozoi.

Cellule di sostegno dell'epitelio spermatogenico o di Sertoli

Le cellule di Sertoli (cfr. Fig. 1.5) sono grandi cellule, alte quanto tutto lo spessore dell'epitelio germinativo. La loro base, che appoggia sulla membrana basale, è larga e prende contatto con la base di cellule di Sertoli contigue; la loro estremità apicale è sfrangiata, in quanto presenta molteplici insenature, cui si adattano spermatidi e spermatozoi, che vengono poi rilasciati nel lume. Le superfici laterali delle cellule presentano indentature in cui sono accolte le cellule germinali agli stadi intermedi della spermatogenesi.

Una fondamentale caratteristica delle cellule di Sertoli è rappresentata dalla formazione della cosiddetta **barriera ematotesticolare** (→ Cap. 3). Infatti, in prossimità della regione basale le cellule di Sertoli adiacenti sono strettamente connesse da giunzioni cellulari che sigillano le membrane in modo tale da suddividere nettamente due microambienti: il **compartimento basale**, con gli spermatogoni e gli spermatociti primari in premeiosi, e il **compartimento luminale**, con gli spermatociti in meiosi e le cellule postmeiotiche, spermatidi e spermatozoi. La barriera ostacola qualsiasi diffusione di fluidi e quindi, mentre il compartimento basale è accessibile al liquido interstiziale che origina dai capillari, nel compartimento luminale la meiosi procede in uno specifico microambiente rifornito dalle cellule di Sertoli. Grazie alla barriera, le proteine del plasma non possono aver accesso al compartimento luminale, isolando le cellule aploidi da antigeni estranei all'organismo e prevenendo, quindi, una risposta immunitaria specifica.

Le cellule di Sertoli, ben lungi dallo svolgere una semplice azione di sostegno strutturale, sono altresì responsabili di molte altre funzioni che svolgono un ruolo cruciale nella spermatogenesi (→ Cap. 3).

Cellule interstiziali o di Leydig

I tubuli seminiferi sono immersi in un tessuto interstiziale, formato da sepimenti di tessuto connettivo lasso in cui si trovano vasi linfatici, capillari, macrofagi, linfociti e cellule di Leydig. Queste sono riunite in gruppi situati negli spazi compresi fra i tubuli seminiferi e sono spesso associate a vasi sanguigni, nei quali immettono direttamente il loro prodotto di secrezione, il testosterone. Nel loro insieme le cellule di Leydig, per la loro capacità di sintetizzare ormoni androgeni come testosterone e androstenedione, sono anche designate come *ghiandola interstiziale del testicolo*.

Il testosterone è fondamentale nel mantenere la spermatogenesi e, insieme agli altri ormoni androgeni prodotti dalle cellule di Leydig, è responsabile della determinazione e del mantenimento dei caratteri sessuali secondari maschili, quali la peculiare distribuzione dei peli pubici, la barba, il timbro della voce eccetera, e della regolazione dell'attività sessuale. Questi ormoni, inoltre, agiscono sulle cartilagini di coniugazione delle ossa lunghe, determinandone lo sviluppo e l'ossificazione, oltre ad avere un effetto anabolizzante che si manifesta con un incremento della sintesi delle proteine. Il testosterone è implicato nelle attività delle ghiandole annessa al sistema genitale maschile, le vescicole seminali, la prostata e le ghiandole bulbouretrali.



FATTORI CHE INFLUENZANO LA SPERMATOGENESI

Numerosi fattori influenzano la funzione del testicolo.

TEMPERATURA

Le cellule germinali sono particolarmente sensibili a temperature superiori a quella dello scroto, che nell'uomo è di 1,5-2,5 gradi inferiore a quella della cavità addominale (circa 34 °C):

- quando i testicoli di animali adulti vengono riportati nell'addome con un intervento chirurgico, l'epitelio germinativo degenera;
- è noto come la febbre induca una sterilità temporanea; anche le frequenti immersioni in bagni caldi o gli indumenti molto stretti e aderenti possono portare a una diminuzione del numero di spermatozoi nell'eiaculato.

FATTORI NUTRIZIONALI

Il rapporto diretto nell'uomo fra alcuni aminoacidi, come l'arginina, o alcune vitamine, come A, C ed E, e la funzione spermatogenetica è ancora oggetto di studi. Poiché, però, negli animali tale rapporto è stato dimostrato, nella pratica si usa somministrare tali sostanze nei casi di infertilità.

VASCULARIZZAZIONE

Una torsione del funicolo spermatico può causare un'ischemia che, se breve, distrugge gli spermatidi; se l'ischemia si prolunga per un'ora, le cellule della linea germinale sono compromesse irreversibilmente.

CRIPTORCHIDISMO

Il 10% dei neonati di sesso maschile ha testicoli che non sono completamente discesi nello scroto: questa condizione viene indicata come *criptorchidismo*. Nella maggior parte dei casi, i testicoli discendono poi spontaneamente, ma, se questo non avviene, in genere intorno ai cinque anni di età o anche prima, si ricorre a un intervento chirurgico. Oltre i cinque anni vi sono prove della comparsa di modificazioni irreversibili.

RADIAZIONI

Le popolazioni cellulari che si dividono sono estremamente sensibili alle radiazioni. Dosi crescenti di radiazioni ionizzanti somministrate direttamente sul testicolo umano provocano risposte biologiche crescenti in modo corrispondente, rappresentate da diminuzione del numero degli spermatozoi e riduzione progressiva, fino alla scomparsa, dell'epitelio germinativo. In generale, più il dosaggio è basso, meno drammatica è la perdita di cellule e più rapido il ritorno alla normalità.

FARMACI E SOSTANZE TOSSICHE

Alcuni farmaci utilizzati nelle terapie antitumorali o immunodepressive, come gli antimetaboliti e gli antimitotici, provocano alterazioni nella spermatogenesi spesso irreversibili.

Alcuni prodotti utilizzati nell'agricoltura, come erbicidi e pesticidi, sono potenzialmente dannosi per la spermatogenesi. Anche il piombo e la maggior parte dei metalli pesanti possono causare danni alla spermatogenesi.

MALATTIE

Quando la parotite (orecchioni) si accompagna a infiammazione testicolare (orchite), si possono avere, specie nella pubertà, danni importanti alla spermatogenesi. Un'infezione testicolare può portare alla chiusura della barriera ematotesticolare con conseguente arresto della spermatogenesi.

ETÀ

Dopo i 55 anni di età, la spermatogenesi si riduce molto gradualmente, mentre le cellule di Sertoli e quelle di Leydig appaiono inalterate. Aumenta, inoltre, nell'eiaculato il numero degli spermatozoi atipici e non vitali. Tuttavia, uomini sugli 80 e anche 90 anni possono ancora avere una spermatogenesi adeguata con un numero di spermatozoi che rientra nei valori normali.

La funzione endocrina delle cellule di Leydig è mantenuta dall'ormone luteinizzante (*Luteinizing Hormone*, LH), una gonadotropina ipofisaria meglio denominata qui come ormone stimolante le cellule interstiziali (*Interstitial Cell-Stimulating Hormone*, ICSH). In mancanza di LH, le cellule interstiziali vanno incontro a una grave atrofia e cessano di produrre testosterone. Per il mantenimento della spermatogenesi nell'adulto è necessaria una concentrazione molto elevata di testosterone nelle adiacenze dei tubuli seminiferi, mentre livelli periferici più bassi dell'ormone sono in grado di mantenere i caratteri sessuali secondari e la libido nel maschio.

VIE SPERMATICHE

Le **vie spermatiche** sono rappresentate da una serie di formazioni cave che fanno seguito ai tubuli seminiferi contorti del testicolo e raggiungono l'uretra. In esse gli spermatozoi completano la loro maturazione e viene elaborata la componente liquida dello sperma.

Le componenti che si succedono lungo le vie spermatiche sono: i *tubuli seminiferi retti*, la *rete testis*, i *condottini efferenti*, l'*epididimo*, il *dotto deferente* e il *dotto eiaculatore* (cfr. Fig. 1.4).

Tubuli seminiferi retti

I **tubuli seminiferi retti** (cfr. Fig. 1.4) sono collocati all'apice di ciascun lobulo del testicolo e sono in numero corrispondente a quello dei lobuli. Ogni tubulo seminifero retto è, infatti, la prosecuzione del singolo tubulo seminifero contorto contenuto in un lobulo del testicolo o di più tubuli seminiferi contorti del lobulo medesimo che sono confluiti fra di loro. I tubuli seminiferi retti sono lunghi circa 1-2 mm e hanno un diametro che è circa la metà di quello dei tubuli seminiferi contorti. Essi decorrono rettilinei e confluiscono nella *rete testis*.

La caratteristica principale dei tubuli seminiferi retti è la scomparsa delle cellule germinali; la loro parete è costituita, infatti, dalle sole cellule di Sertoli.

Rete testis e condottini efferenti

La **rete testis** (cfr. Fig. 1.4) si trova entro il mediastino del testicolo. Essa è formata da un intreccio di piccoli canalicoli ampiamente anastomizzati tra loro e immersi nel tessuto connettivo fibroso che forma il mediastino stesso. Dalla **rete testis** originano una quindicina di **condottini efferenti** (cfr. Fig. 1.4), che emergono dalla superficie posterosuperiore del testicolo e formano la testa dell'epididimo. Qui ciascuno di essi si fa convoluto, descrivendo delle anse strettamente aggrovigliate che danno luogo a una formazione detta **cono vascoloso**. Nel loro interno, i condottini efferenti posseggono cellule secernenti e cellule ciliate, che servono per la progressione degli spermatozoi (non ancora mobili).

I tratti finora descritti rappresentano l'insieme delle **vie spermatiche intratesticolari**. Queste hanno un ruolo preminentemente di vie vettrici, anche se studi recenti tendono ad attribuire loro anche ruoli di rimaneggiamento del liquido seminale.

Epididimo

L'**epididimo** (cfr. Fig. 1.4) è una formazione allungata, a forma di grossa virgola, lunga circa 5 cm, che si adatta al polo superiore e al margine posteriore del testicolo. In esso si distinguono, dall'alto verso il basso:

- la **testa**, in continuità con il testicolo tramite i condottini efferenti;
- il **corpo**, che si adatta al margine posteriore del testicolo;
- la **coda**, che ne rappresenta l'estremità inferiore e si ripiega verso l'alto per continuare nel dotto deferente.

Mentre la testa è costituita da più condotti, il corpo e la coda dell'epididimo sono costituiti dal solo **canale dell'epididimo**, ripetutamente avvolto su se stesso, dal calibro di 0,5 mm e una lunghezza di 6-7 m. L'epitelio che tappezza la parete del canale dell'epididimo presenta, fra le altre, le **cellule a pennacchio** (Fig. 1.6), che posseggono, alla loro estremità apicale, lunghi microvilli; sembra abbiano il compito di assorbire acqua e proteine. La tonaca muscolare è formata da fascetti di cellule muscolari lisce che provvedono a fare procedere gli spermatozoi. All'estremità della coda, il canale dell'epididimo prosegue nel dotto deferente.

La diversa organizzazione istologica nelle varie regioni dell'epididimo riflette le differenti funzioni svolte. Infatti, nella testa si ha l'assorbimento di circa il 90% del liquido seminale e la conseguente notevole concentrazione degli spermatozoi; nella testa e nel corpo sono secrete varie sostanze, come SEP (*Specific Epididymal Protein*), sialoproteine, glicerofosforilcolina (GPC), inositolo e lattato, mentre la carnitina viene prelevata dai liquidi tissutali e concentrata; la coda funziona come riserva di spermatozoi, dove costituiscono una sorta di magma molto concentrato nell'intervallo tra un'eiaculazione e l'altra. La coda si può contrarre energeticamente in seguito a un'appropriata stimolazione nervosa.

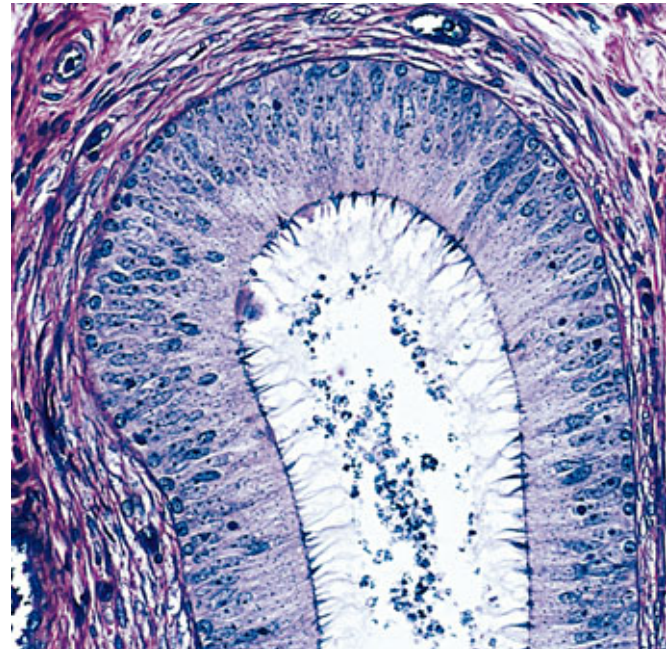


Figura 1.6 Epididimo: morfologia microscopica. Micrografia di sezione trasversale del canale dell'epididimo: verso il lume si notano i lunghi ciuffi di microvilli delle cellule a pennacchio.

Nell'epididimo gli spermatozoi completano la maturazione e soggiornano in attesa di essere espulsi al momento dell'eiaculazione. Infatti, gli spermatozoi che lasciano il testicolo presentano un debole movimento circolare e sono incapaci di fecondare l'uovo, mentre quelli prelevati dalla coda dell'epididimo hanno un'accentuata motilità unidirezionale e sono in grado di fecondare l'uovo. È, quindi, chiaro che l'ambiente dell'epididimo è necessario per la maturazione degli spermatozoi. Il meccanismo con cui l'epididimo induce la maturazione funzionale degli spermatozoi è ancora oggetto di numerose indagini (➔ Cap. 3).

Dotto deferente

Il **dotto deferente** (cfr. Figg. 1.2, 1.4) è un cordone bianco e consistente, lungo circa 40 cm e dal diametro di 2 mm, che parte dalla coda dell'epididimo e si porta in alto, fino a terminare, nella cavità pelvica, nel seno eiaculatore, che è il segmento iniziale, dilatato, del dotto eiaculatore. Il dotto deferente si suddivide in varie regioni:

- **parte scrotale**: contenuta nel sacco scrotale, in cui decorre ondulata a ridosso della coda e del corpo dell'epididimo;
- **parte funicolare**: sale rettilinea entro il funicolo spermatico, affiancata dai vasi e nervi del testicolo immersi in una matrice connettivale;
- **parte inguinale**: percorre il canale inguinale;
- **parte pelvica**: discende nella cavità pelvica fino a portarsi dietro alla base della vescica, dove si rigonfia un poco, quindi incrocia l'uretere, si affianca alla vescicola semi-

nale e si accosta a mano a mano a quello dell'altro lato, dirigendosi verso la base della prostata;

- **ampolla del dotto deferente**: è la parte terminale, dilatata, del dotto deferente. Possiede diverticoli ghiandolari ad attività secretoria che si approfondano nel circostante strato muscolare, presentando molte somiglianze con la vescicola seminale.

L'epitelio di rivestimento che tappezza la tonaca mucosa del dotto deferente si solleva in pieghe longitudinali ed è molto simile a quello dell'epididimo, con cellule a pennacchio ad attività secretoria. La parete del dotto deferente è dotata di una serie di fibre muscolari molto sviluppata ed è rinforzata da una robusta trama elastica.

Dal punto di vista funzionale, il dotto deferente rappresenta un veicolo di spermatozoi al momento dell'ejaculazione: il loro rapido trasporto è assicurato dalle contrazioni di tipo peristaltico della potente muscolatura della parete. L'ampolla del dotto deferente, a livello della base della prostata, riceve il dotto della vescicola seminale e dà origine al dotto eiaculatore.

Dotto eiaculatore

Il **dotto eiaculatore** (cfr. Fig. 1.2), di circa 2 cm di lunghezza, deriva dall'unione del dotto deferente con il dotto della vescicola seminale corrispondente; si addentra, poi, nello spessore della prostata, dove, decorrendo dall'alto in basso e dall'indietro in avanti, raggiunge l'uretra prostatica in corrispondenza di una porzione ispessita della tonaca mucosa uretrale, detta collicolo seminale (cfr. Fig. 1.9). I due

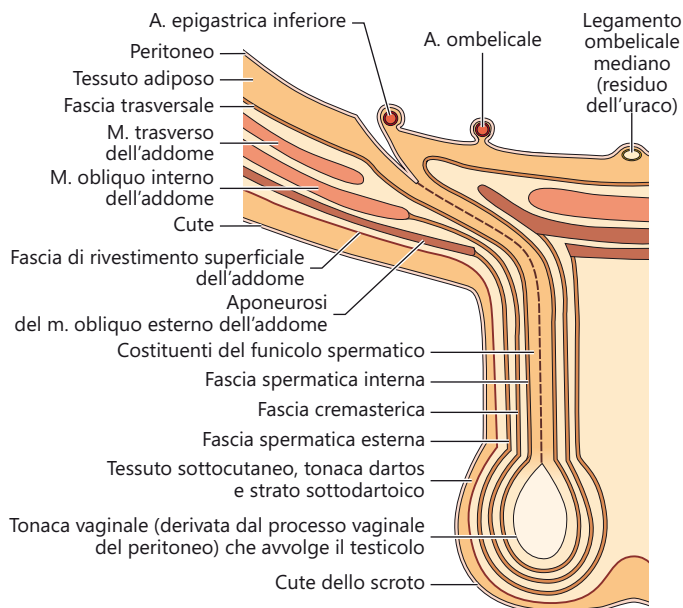


Figura 1.7 Funicolo spermatico. Si noti la continuità di alcune tonache del testicolo con gli involucri del funicolo spermatico. In questa sezione trasversale lo scroto è stato sollevato in posizione orizzontale.

dotto sono quindi contenuti interamente nella prostata, dove decorrono molto vicini tra di loro.

FUNICOLO SPERMATICO

Il **funicolo spermatico** (o *cordone spermatico*) (Fig. 1.7) è la formazione che tiene sospeso il testicolo entro lo scroto. La sua parete è costituita principalmente dal muscolo cremastere, mentre il contenuto è dato da dotto deferente, arterie e vene testicolari, vasi linfatici e nervi del testicolo.

URETRA MASCHILE

L'**uretra maschile** (Fig. 1.8) è un lungo canale a decorso sinuoso, comune ai sistemi urinario e genitale, in quanto convoglia l'urina durante la minzione oppure lo sperma durante l'ejaculazione. Essa ha inizio in corrispondenza della vescica urinaria con l'**orifizio** (o *meato*) **uretrale interno** e termina

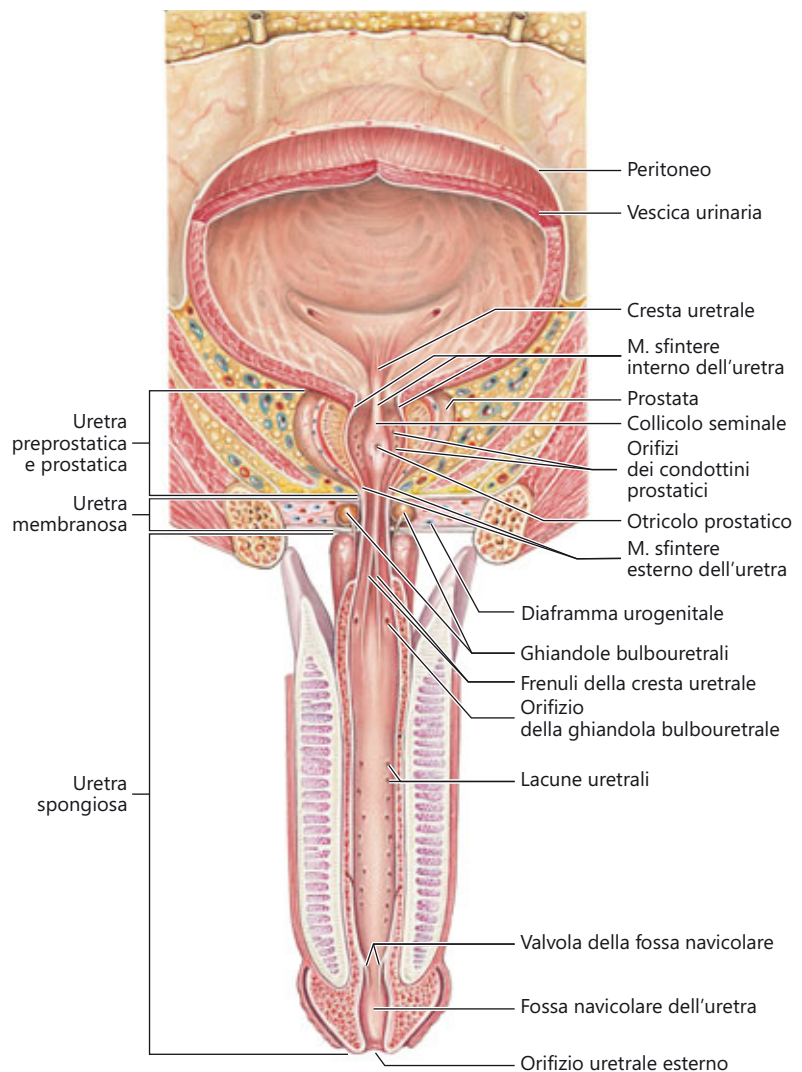


Figura 1.8 Uretra maschile: decorso in una sezione frontale.