

---

**RICCARDO TALEVI ■ ROBERTO GUALTIERI**

---

Biologia e Tecnologie della  
**RIPRODUZIONE UMANA**

**PICCIN**

Opera coperta dal diritto d'autore – tutti i diritti sono riservati.

Questo testo contiene materiale, testi ed immagini, coperto da copyright e non può essere copiato, riprodotto, distribuito, trasferito, noleggiato, licenziato o trasmesso in pubblico, venduto, prestato a terzi, in tutto o in parte, o utilizzato in alcun altro modo o altrimenti diffuso, se non previa espressa autorizzazione dell'editore. Qualsiasi distribuzione o fruizione non autorizzata del presente testo, così come l'alterazione delle informazioni elettroniche, costituisce una violazione dei diritti dell'editore e dell'autore e sarà sanzionata civilmente e penalmente secondo quanto previsto dalla L. 633/1941 e ss.mm.

#### Avvertenza

Poiché le scienze mediche sono in continua evoluzione, l'Editore non si assume alcuna responsabilità per qualsiasi lesione e/o danno dovesse venire arrecato a persone o beni per negligenza o altro, oppure uso od operazioni di qualsiasi metodo, prodotto, istruzione o idea contenuti in questo libro. L'Editore raccomanda soprattutto la verifica autonoma delle diagnosi e del dosaggio dei medicinali, attenendosi alle istruzioni per l'uso e controindicazioni contenute nei foglietti illustrativi.

ISBN 978-88-299-2965-8

#### *Immagine di copertina:*

Immagine al microscopio laser confocale di corticale ovarica umana colorata con Hoechst 33342 (blu) e Live-Dead Far red (rosso) in cui si evidenziano follicoli ovarici primari.

Stampato in Italia

*Dedicato ai nostri figli Francesca, Luigi, Riccardo e Stefano  
con l'augurio che possano spendere la loro vita professionale  
con la nostra stessa passione*



## Prefazione

*Nel secolo scorso, una fervente attività di ricerca nell'ambito della Biologia della Riproduzione ha permesso di chiarire molti aspetti dei complessi meccanismi coinvolti nella gametogenesi, fecondazione e sviluppo embrionale in vitro. Quarant'anni fa l'applicazione di tali studi ha consentito a Robert Edwards e Patrick Steptoe di generare e trasferire un embrione umano pre-impianto ottenuto in vitro, permettendo la nascita del primo essere umano concepito mediante fecondazione extracorporea. Nel luglio del 1978 la nascita di Louise Brown non rappresentò solo il coronamento di decenni di ricerca di base, ma diede anche origine a una nuova branca applicativa della Biologia della Riproduzione, la Riproduzione Assistita, la cui applicazione fino ad oggi ha permesso la nascita di più di 8 milioni di bambini in tutto il mondo. Tale successo rivoluzionario, che ha consentito alle coppie infertili di generare figli propri, è stato definitivamente riconosciuto con l'assegnazione del premio Nobel per la Medicina a Robert Edwards nel 2010.*

*Il fermento che si è venuto a creare nei primi anni Ottanta nel settore della Biologia della Riproduzione ci ha immediatamente affascinato, prima da studenti e poi da giovani laureati, indirizzando le nostre attività di ricerca sullo studio dei meccanismi della fecondazione prima in animali modello e successivamente nei mammiferi e nell'uomo. Nel 2001, a completamento della nostra attività didattica nel settore e in un momento in cui nel panorama nazionale non era presente alcun percorso formativo specifico per il biologo che opera nell'ambito dell'Embriologia Clinica, abbiamo ideato e condotto presso l'Università degli Studi di Napoli "Federico II" la prima edizione del Corso di Perfezionamento post-lauream in "Biologia e Tecnologie della Riproduzione Assistita"; giunto oggi alla sua 18<sup>a</sup> edizione consecutiva, tale corso vede coinvolti colleghi universitari ed esperti del mondo della Riproduzione Assistita. Ben presto ci siamo resi conto della necessità di racchiudere i contenuti di base e applicativi della Biologia della Riproduzione e dell'Embriologia Clinica in un volume indirizzato sia agli studenti di Biologia, Biotecnologie e Medicina e Chirurgia, sia agli operatori che, a vario titolo, si occupano di Riproduzione Assistita Umana.*

*L'esperienza acquisita in questi anni sia nella ricerca che nella didattica e nell'attività clinica in questo settore, ci ha spinti a organizzare i contenuti di questo testo in modo da rispecchiare la complessità e la multidisciplinarietà che caratterizza oggi la Biologia della Riproduzione e la nostra visione del bagaglio culturale necessario alla formazione di un Embriologo Clinico. Non saremmo stati in grado di raggiungere tale obiettivo senza la collaborazione di illustri colleghi esperti nel settore, a cui abbiamo affidato la stesura della maggior parte dei capitoli presenti in questo testo e ai quali vanno i nostri sinceri ringraziamenti.*

*L'opera è divisa in due sezioni. Nella prima parte sono descritti e illustrati i meccanismi di base cellulari e molecolari implicati nella fisiologia, lo sviluppo e l'organizzazione degli apparati riproduttivi, la produzione dei gameti, la loro interazione all'interno dell'apparato riproduttivo femminile, lo sviluppo e l'impianto dell'embrione umano. Nella seconda parte vengono ampiamente descritte le biotecnologie della Riproduzione Assistita, sviluppate per superare patologie causa d'infertilità nell'uomo. I singoli capitoli sono collegati fra loro da un filo conduttore che privilegia la riproduzione umana, sia in vivo che in vitro, fornendo inoltre una serie di approfondimenti sugli aspetti emergenti dalla ricerca scientifica condotta in modelli animali o sull'uomo e sulle nuove biotecnologie che potranno essere applicate in futuro alla Riproduzione Assistita.*

*Desideriamo ricordare con profondo affetto e stima professionale la Prof.ssa Loredana Gandini e il Prof. Riccardo Focarelli, amici e colleghi, autori di tre capitoli di questo testo, che sfortunatamente la vita ci ha sottratto troppo presto. A loro va il nostro ringraziamento per il grande contributo apportato, durante la loro vita accademica, allo sviluppo della Biologia della Riproduzione e per la profonda amicizia che abbiamo condiviso.*

*Infine, ringraziamo l'Editore Piccin per la considerazione e la fiducia che ci ha dimostrato incaricandoci di progettare e coordinare quest'opera e la Dott.ssa Carla Criconia e tutto lo staff editoriale per la pazienza, lo scrupolo e l'entusiasmo impegnati nella sua realizzazione.*

# Autori

## **Carlo Alviggi**

*Dipartimento di Neuroscienze,  
Scienze Riproduttive ed Odontostomatologiche  
Università degli Studi di Napoli Federico II*

## **Paolo G. Artini**

*Dipartimento di Medicina Clinica Sperimentale  
Università degli Studi di Pisa*

## **Tiziana A.L. Brevini**

*Dipartimento di Scienze Veterinarie per la Salute,  
la Produzione Animale e la Sicurezza Alimentare  
Università degli Studi di Milano*

## **Cira Buonfantino**

*Dipartimento di Neuroscienze,  
Scienze Riproduttive ed Odontostomatologiche  
Università degli Studi di Napoli Federico II*

## **Giuseppe Campagna**

*Istituto di Clinica Ostetrica e Ginecologica  
Fondazione Policlinico Universitario A. Gemelli  
Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma*

## **Rita Canipari**

*Dipartimento di Scienze Anatomiche, Istologiche,  
Medico Legali e dell'Apparato Locomotore  
Sezione di Istologia ed Embriologia Medica  
Università degli Studi di Roma Sapienza*

## **Alessandro Conforti**

*Dipartimento di Neuroscienze,  
Scienze Riproduttive ed Odontostomatologiche  
Università degli Studi di Napoli Federico II*

## **Settimio D'Andrea**

*Dipartimento di Medicina Clinica,  
Sanità Pubblica, Scienze della Vita e dell'Ambiente  
Università degli Studi dell'Aquila*

## **Massimo De Felici**

*Dipartimento di Biomedicina e Prevenzione  
Facoltà di Medicina e Chirurgia  
Università degli Studi di Roma Tor Vergata*

## **Giuseppe De Placido**

*Dipartimento di Neuroscienze,  
Scienze Riproduttive ed Odontostomatologiche  
Università degli Studi di Napoli Federico II*

## **Pasquale De Rosa**

*Dipartimento di Neuroscienze,  
Scienze Riproduttive ed Odontostomatologiche  
Università degli Studi di Napoli Federico II*

## **Lucia De Santis**

*IRCCS H. San Raffaele  
Università Vita-Salute, Milano*

## **Riccardo Focarelli**

*Dipartimento di Scienza della Vita  
Università degli Studi di Siena*

## **Carlo Foresta**

*Unità di Andrologia e Medicina della Riproduzione  
Azienda Ospedale-Università degli Studi di Padova*

## **Felice Francavilla**

*Dipartimento di Medicina Clinica,  
Sanità Pubblica, Scienze della Vita e dell'Ambiente  
Università degli Studi dell'Aquila*

## **Sandro Francavilla**

*Dipartimento di Medicina Clinica,  
Sanità Pubblica, Scienze della Vita e dell'Ambiente  
Università degli Studi dell'Aquila*

## **Loredana Gandini**

*Dipartimento di Medicina Sperimentale  
Università degli Studi di Roma Sapienza*

## **Fulvio Gandolfi**

*Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali -  
Produzione, Territorio, Agroenergia  
Università degli Studi di Milano*

## **Silvia Garagna**

*Dipartimento di Biologia e  
Biotecnologie Lazzaro Spallanzani  
Università degli Studi di Pavia*

**Andrea Garolla**

Unità di Andrologia e Medicina della Riproduzione  
Azienda Ospedale-Università degli Studi di Padova

**Roberto Gualtieri**

Dipartimento di Biologia  
Università degli Studi di Napoli Federico II

**Csilla Krausz**

Dipartimento di Scienze Biomediche,  
Sperimentali e Cliniche  
Università degli Studi di Firenze

**Antonio Lanzone**

Istituto di Clinica Ostetrica e Ginecologica  
Fondazione Policlinico Universitario A. Gemelli  
Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma

**Andrea Lenzi**

Dipartimento di Medicina Sperimentale  
Università degli Studi di Roma Sapienza

**Antonella Linari**

Dipartimento Materno Infantile e Scienze Urologiche  
Policlinico di genere, AOÙ Policlinico Umberto I  
Università degli Studi di Roma Sapienza

**Francesco Lombardo**

Dipartimento di Medicina Sperimentale  
Università degli Studi di Roma Sapienza

**Giulietta Micara**

Dipartimento Materno Infantile e Scienze Urologiche  
Policlinico di genere, AOÙ Policlinico Umberto I  
Università degli Studi di Roma Sapienza

**Massimo Occhiena**

Dipartimento di Giurisprudenza  
Università degli Studi di Sassari

**Alessio Paffoni**

UOSD P.M.A., Fondazione IRCCS Ca' Granda  
Ospedale Maggiore Policlinico, Milano

**Giovanni Panico**

Istituto di Clinica Ostetrica e Ginecologica  
Fondazione Policlinico Universitario A. Gemelli  
Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma

**Donatella Paoli**

Dipartimento di Medicina Sperimentale  
Università degli Studi di Roma Sapienza

**Silvia Picarelli**

Dipartimento di Neuroscienze,  
Scienze Riproduttive ed Odontostomatologiche  
Università degli Studi di Napoli Federico II

**Paola Piomboni**

Dipartimento di Medicina Molecolare e dello Sviluppo  
Università degli Studi di Siena

**Valerio Pisaturo**

Ospedale Evangelico Internazionale di Genova

**Emmanuele Serra**

Dipartimento di Scienze Biomediche,  
Sperimentali e Cliniche  
Università degli Studi di Firenze

**Antonio Agostino Sinisi**

Dipartimento di Scienze Mediche, Chirurgiche,  
Neurologiche, Metaboliche e dell'Invecchiamento  
UODS di Andrologia  
Azienda Ospedaliera Universitaria  
Università degli Studi della Campania L. Vanvitelli

**Ida Strina**

Dipartimento di Neuroscienze,  
Scienze Riproduttive ed Odontostomatologiche  
Università degli Studi di Napoli Federico II

**Liborio Stuppia**

Dipartimento di Scienze Psicologiche,  
della Salute e del Territorio  
Università degli Studi di Chieti G. d'Annunzio

**Riccardo Talevi**

Dipartimento di Biologia  
Università degli Studi di Napoli Federico II

**Carla Tatone**

Dipartimento di Medicina Clinica,  
Sanità Pubblica, Scienza della Vita e dell'Ambiente  
Università degli Studi dell'Aquila

**Roberta Vallone**

Dipartimento di Neuroscienze,  
Scienze Riproduttive ed Odontostomatologiche  
Università degli Studi di Napoli Federico II

**Maurizio Zuccotti**

Dipartimento di Biologia e  
Biotecnologie Lazzaro Spallanzani  
Università degli Studi di Pavia

# Indice generale

## Parte Prima ■ ■ FISIOLOGIA E PATOLOGIA DELLA RIPRODUZIONE

### Capitolo 1

#### **Determinazione del sesso, sviluppo delle gonadi e differenziamento dell'apparato riproduttivo . . . . . 3**

*M. De Felici*

|   |    |
|---|----|
| La determinazione del sesso . . . . .   | 3  |
| La formazione delle gonadi . . . . .  | 5  |
| Le cellule germinali primordiali . . . . .  | 5  |
| La formazione delle gonadi indifferenti . . . . .   | 5  |
| ■ <i>Box 1.1: La formazione delle cellule germinali primordiali.</i> . . . . .                                | 7  |
| Il differenziamento dei testicoli . . . . .   | 8  |
| ■ <i>Box 1.2: Differenziamento delle cellule germinali e loro ruolo nello sviluppo delle gonadi</i> . . . . . | 9  |
| Il differenziamento delle ovaie . . . . .   | 9  |
| Meccanismi molecolari dello sviluppo delle gonadi. . . . .  | 10 |
| La formazione delle creste gonadiche e degli abbozzi gonadici . . . . .                                       | 10 |
| Il gene SRY e il differenziamento dei testicoli . . . . .   | 11 |
| Geni che controllano il differenziamento delle ovaie . . . . .  | 12 |
| Formazione delle vie genitali. . . . .  | 13 |
| Formazione delle vie genitali maschili e delle ghiandole annesse . . . . .                                    | 15 |
| Formazione delle vie genitali femminili. . . . .  | 15 |
| Formazione dei genitali esterni . . . . .   | 15 |
| ■ <i>Box 1.3: Aspetti clinici: disordini dello sviluppo sessuale.</i> . . . . .                               | 16 |
| Bibliografia . . . . .  | 17 |

### Capitolo 2

#### **Anatomia e fisiologia dell'apparato riproduttivo maschile . . . . . 19**

*C. Foresta, A. Garolla*

|                        |    |
|------------------------|----|
| Introduzione . . . . . | 19 |
| Il testicolo . . . . . | 20 |
| L'epididimo . . . . .  | 21 |

|  |    |
|--|----|
| I dotti deferenti. . . . .   | 22 |
| La prostata. . . . .   | 23 |
| Le vescichette seminali . . . . .  | 23 |
| ■ <i>Box 2.1: Quadri citologici testicolari per lo studio della spermatogenesi</i> . . . . . | 24 |
| Bibliografia . . . . .   | 27 |

### Capitolo 3

#### **Spermatogenesi. . . . . 29**

*C. Krausz, E. Serra*

|   |    |
|---|----|
| La spermatogenesi . . . . .   | 29 |
| Fasi della spermatogenesi. . . . .  | 31 |
| Fase proliferativa . . . . .  | 32 |
| Fase meiotica . . . . .   | 32 |
| Spermiogenesi. . . . .  | 32 |
| Regolazione ormonale della spermatogenesi . . . . .   | 34 |
| Breve sintesi. . . . .  | 34 |
| Induzione della spermatogenesi . . . . .  | 34 |
| Mantenimento della spermatogenesi . . . . .   | 35 |
| Ruolo dell'FSH. . . . .   | 35 |
| Ruolo degli androgeni . . . . .   | 35 |
| Ruolo sinergico di FSH e testosterone . . . . .   | 37 |
| Ruolo degli estrogeni . . . . .   | 37 |
| Ruolo delle cellule di Sertoli. . . . .   | 37 |
| L'apoptosi come meccanismo di regolazione della popolazione spermatica . . . . .  | 39 |
| ■ <i>Box 3.1: La barriera emato-testicolare: descrizione, ruolo e funzioni nell'ambito della spermatogenesi</i> . . . . . | 40 |
| Via intrinseca o mitocondriale. . . . .   | 42 |
| Via estrinseca o recettoriale . . . . .   | 42 |
| Via del reticolo endoplasmatico (RE) o della caspasi 12 . . . . .   | 43 |
| Aspetti genetici ed epigenetici della spermatogenesi. . . . .   | 43 |
| Metilazione del DNA . . . . .   | 43 |
| Protaminazione degli istoni . . . . .   | 44 |
| MicroRNA . . . . .  | 44 |
| Bibliografia . . . . .  | 45 |



## Capitolo 4

### Maturazione epididimale ed eiaculazione . . . 51

R. Focarelli, P. Piomboni

|   |    |
|---|----|
| Una storia evolutiva dei dotti efferenti maschili nei vertebrati . . . . .  | 51 |
| Sviluppo e anatomia dell'epididimo . . . . .  | 52 |
| Anatomia e istologia dell'epididimo . . . . .   | 52 |
| La maturazione degli spermatozoi nell'epididimo . . . . .   | 56 |
| Acquisizione della motilità . . . . .   | 56 |
| Il fluido luminale . . . . .  | 57 |
| Le proteine del fluido epididimale . . . . .  | 57 |
| Le modificazioni della superficie dello spermatozoo durante il transito epididimale . . . . .   | 58 |
| La maturazione epididimale nell'uomo . . . . .  | 60 |
| ■ <i>Box 4.1: Il trasferimento di molecole dal fluido epididimale agli spermatozoi: il ruolo delle vescicole esosomiali . . . . .</i> | 61 |
| L'eiaculazione . . . . .  | 62 |
| Bibliografia . . . . .  | 62 |

## Capitolo 5

### Lo spermatozoo umano: struttura e movimento . . . . . 63

S. Francavilla, S. D'Andrea, F. Francavilla

|  |    |
|--|----|
| La struttura dello spermatozoo . . . . .   | 63 |
| Testa . . . . .  | 64 |
| Acrosoma . . . . .   | 65 |
| Nucleo . . . . .   | 65 |
| ■ <i>Box 5.1: Morfogenesi dell'acrosoma . . . . .</i>                                  | 66 |
| Segmento di connessione . . . . .  | 67 |
| Segmento intermedio . . . . .  | 67 |
| Segmento principale . . . . .  | 69 |
| ■ <i>Box 5.2: Struttura molecolare del rivestimento fibroso . . . . .</i>              | 70 |
| La motilità dello spermatozoo . . . . .  | 71 |
| Generazione del movimento flagellare . . . . .   | 71 |
| Fonte di ATP per la motilità . . . . .   | 72 |
| Ruolo del calcio . . . . .   | 72 |
| ■ <i>Box 5.3: È la glicolisi la principale fonte di ATP per la motilità? . . . . .</i> | 73 |
| Bibliografia . . . . .   | 74 |

## Capitolo 6

### Anatomia e fisiologia dell'apparato riproduttivo femminile . . . . . 75

A. Lanzone, G. Campagna, G. Panico

|                        |    |
|------------------------|----|
| Introduzione . . . . . | 75 |
| Ovaio . . . . .        | 75 |

|  |    |
|--|----|
| Forma, posizione, rapporti . . . . .   | 75 |
| Mezzi di fissazione . . . . .  | 76 |
| ■ <i>Box 6.1: Sistema ipotalamo-ipofisi . . . . .</i>                            | 77 |
| ■ <i>Box 6.2: Il ciclo ovarico . . . . .</i>                                     | 78 |
| Vasi e nervi dell'ovaio . . . . .  | 80 |
| Tube . . . . .   | 80 |
| Mezzi di fissazione . . . . .  | 81 |
| Vasi e nervi della tuba . . . . .  | 81 |
| Utero . . . . .  | 81 |
| Forma, posizione, rapporti . . . . .   | 81 |
| Mezzi di fissità . . . . .   | 83 |
| Peritoneo . . . . .  | 83 |
| Configurazione interna e parete uterina . . . . .                                | 83 |
| Vasi e nervi dell'utero . . . . .  | 84 |
| Vagina . . . . .   | 85 |
| Vasi e nervi . . . . .   | 86 |
| Genitali esterni . . . . .   | 87 |
| Vasi e nervi . . . . .   | 88 |
| ■ <i>Box 6.3: Endometrio, cervice e vagina: modificazioni cicliche . . . . .</i> | 88 |
| Bibliografia . . . . .   | 89 |

## Capitolo 7

### Follicologenesi . . . . . 91

R. Canipari

|  |     |
|--|-----|
| L'ovaio . . . . .  | 91  |
| ■ <i>Box 7.1: Origine delle cellule follicolari . . . . .</i>        | 92  |
| Il follicolo primordiale . . . . .                                   | 93  |
| ■ <i>Box 7.2: Controllo dell'attivazione follicolare . . . . .</i>   | 94  |
| Il follicolo primario . . . . .                                      | 96  |
| ■ <i>Box 7.3: Giunzioni . . . . .</i>                                | 97  |
| Il follicolo secondario . . . . .                                    | 97  |
| La fase antrale . . . . .  | 98  |
| ■ <i>Box 7.4: Interazioni ovocita-cellule del cumulo . . . . .</i>   | 100 |
| La fase ovulatoria . . . . .   | 102 |
| Il corpo luteo . . . . .   | 103 |
| ■ <i>Box 7.5: Follicologenesi in vitro: quale modello? . . . . .</i> | 104 |
| Atresia follicolare . . . . .  | 107 |
| Bibliografia . . . . .   | 108 |

## Capitolo 8

### Acquisizione della competenza allo sviluppo embrionale dell'ovocita di Mammifero: maturazione nucleare . . . . . 109

S. Garagna, M. Zuccotti

|  |     |
|--|-----|
| L'epigenoma dell'ovocita . . . . .         | 110 |
| L'organizzazione della cromatina . . . . . | 110 |

|   |     |
|---|-----|
| Modificazioni epigenetiche del DNA e degli istoni ..... | 112 |
| Regolazione e accumulo degli RNA materni .....          | 114 |
| Bibliografia .....                                      | 115 |

## Capitolo 9

### Risalita degli spermatozoi nel tratto riproduttivo femminile, fecondazione e attivazione oocitaria .....

117

*R. Gualtieri, R. Talevi*

|   |     |
|---|-----|
| Eiaculazione, formazione del coagulo e attraversamento del canale cervicale .....                                 | 117 |
| Migrazione degli spermatozoi attraverso l'utero e l'ovidutto .....  | 118 |
| ■ <i>Box 9.1: Muco cervicale: significato fisiologico e clinico</i> .....   | 119 |
| Capacitazione .....   | 123 |
| Molecole coinvolte nell'interazione spermatozoo-ovocita .....   | 125 |
| Recettori spermatici candidati all'interazione con la zona pellucida .....  | 126 |
| I recettori candidati sulla superficie dello spermatozoo dopo la AR .....   | 127 |
| ■ <i>Box 9.2: Interazione spermatozoo-ZP: quale modello?</i> .....  | 128 |
| ■ <i>Box 9.3: Quando e dove avviene la reazione acrosomiale?</i> .....  | 130 |
| Lo spermatozoo oltre la zona pellucida .....  | 131 |
| Come lo spermatozoo attiva l'ovocita e inizia lo sviluppo embrionale .....  | 133 |
| ■ <i>Box 9.4: Esiste un'associazione tra infertilità maschile e deficienze della PLC<math>\zeta</math>?</i> ..... | 137 |
| Ringraziamenti .....  | 137 |
| Bibliografia .....  | 138 |

## Capitolo 10

### Lo sviluppo embrionale pre-impianto .....

141

*C. Tatone, P.G. Artini*

|   |     |
|---|-----|
| Lo zigote e il primo ciclo cellulare dell'embrione .....  | 141 |
| La segmentazione .....  | 143 |
| La compattazione .....  | 143 |
| ■ <i>Box 10.1: L'osservazione dello sviluppo pre-impianto: un aiuto dalla tecnologia time-lapse</i> ..... | 144 |
| ■ <i>Box 10.2: Il metabolismo energetico degli embrioni e i terreni di coltura</i> .....                  | 145 |
| La formazione della blastocisti .....   | 145 |
| La riprogrammazione epigenetica nell'embrionogenesi pre-impianto .....                                    | 146 |
| ■ <i>Box 10.3: Gli embrioni pre-impianto: una sorgente di cellule staminali</i> .....                     | 147 |

|   |     |
|---|-----|
| L'instabilità cromosomica .....         | 148 |
| Attivazione del genoma embrionale ..... | 149 |
| Bibliografia .....                      | 149 |

## Capitolo 11

### Impianto embrionale .....

151

*R. Focarelli, P. Piomboni*

|   |     |
|---|-----|
| L'endometrio .....  | 151 |
| La finestra d'impianto .....  | 155 |
| La blastocisti .....  | 156 |
| L'impianto embrionale .....   | 157 |
| Marcatori biochimici dell'impianto embrionale .....                   | 157 |
| ■ <i>Box 11.1: La glicodelina: una molecola multifunzionale</i> ..... | 159 |
| ■ <i>Box 11.2: Glicobiologia dell'impianto embrionale</i> .....       | 162 |
| Bibliografia .....  | 164 |

## Capitolo 12

### Infertilità maschile .....

167

*A.A. Sinisi*

|  |     |
|--|-----|
| Definizione, epidemiologia dell'infertilità maschile .....                             | 167 |
| ■ <i>Box 12.1: Calo secolare della fertilità maschile</i> .....                        | 168 |
| Eziologia .....  | 170 |
| Alterazioni pretesticolari, deficit gonadotropo (ipogonadismo ipogonadotropo) .....    | 171 |
| Alterazioni testicolari primarie .....   | 172 |
| ■ <i>Box 12.2: Infezioni delle ghiandole sessuali accessorie maschili (MAGI)</i> ..... | 175 |
| Alterazioni post-testicolari .....   | 176 |
| Oligoastenoteratozoospermia idiopatica .....   | 179 |
| Aspetti diagnostici .....  | 182 |
| Bibliografia .....   | 182 |

## Capitolo 13

### Infertilità femminile .....

185

*C. Alviggi, R. Vallone, A. Conforti, C. Buonfantino, P. De Rosa, I. Strina, G. De Placido*

|  |     |
|--|-----|
| Introduzione .....                           | 185 |
| Epidemiologia .....                          | 185 |
| Cause d'infertilità .....                    | 186 |
| Fattore ovulatorio .....                     | 186 |
| Sindrome dell'ovaio policistico (PCOs) ..... | 186 |
| Distiroidismi .....                          | 188 |
| Iperprolattinemia .....                      | 190 |
| Endometriosi .....                           | 192 |

|   |     |  |     |
|---|-----|--|-----|
| Fattore uterino . . . . .                             | 192 | Studio della cavità uterina e delle tube. . . . .                  | 194 |
| Fattore cervicale . . . . .                           | 193 | Tecniche di riproduzione assistita: cenni. . . . .                 | 195 |
| Iter diagnostico dell'infertilità femminile . . . . . | 193 | Inseminazione intrauterina (IUI). . . . .                          | 195 |
| Anamnesi . . . . .                                    | 193 | Fecondazione in vitro (IVF) . . . . .                              | 195 |
| Visita ginecologica . . . . .                         | 193 | Iniezione intracitoplasmatica<br>dello spermatozoo (ICSI). . . . . | 196 |
| Diagnostica ultrasonografica . . . . .                | 193 | Bibliografia . . . . .   | 196 |
| Indagini di laboratorio. . . . .                      | 193 |  |     |

## Parte Seconda ■ ■ BIOTECNOLOGIE DELLA RIPRODUZIONE ASSISTITA

### Capitolo 14

#### Origine, evoluzione e stato dell'arte delle biotecnologie della riproduzione assistita. . . . . 199

*L. De Santis, V. Pisaturo*

|   |     |
|---|-----|
| Introduzione. . . . .   | 199 |
| Le tecniche di riproduzione assistita:<br>una storia avvincente . . . . .                             | 200 |
| ■ <i>Box 14.1: Ruolo della crioconservazione<br/>nelle biotecnologie della riproduzione</i> . . . . . | 202 |
| ■ <i>Box 14.2: Tecniche di diagnosi<br/>e screening pre-impianto</i> . . . . .                        | 204 |
| ■ <i>Box 14.3: Videomicroscopia:<br/>time-lapse imaging.</i> . . . . .                                | 206 |
| Conclusioni . . . . .   | 207 |
| ■ <i>Box 14.4: Sistemi di coltura e<br/>robotizzazione delle procedure</i> . . . . .                  | 208 |
| Ringraziamenti . . . . .  | 210 |
| Bibliografia . . . . .  | 210 |

### Capitolo 15

#### Esame del liquido seminale . . . . . 211

*L. Gandini, D. Paoli, A. Lenzi*

|   |     |
|---|-----|
| Introduzione . . . . .                                  | 211 |
| Fase pre-analitica . . . . .                            | 212 |
| Norme per la raccolta del campione<br>seminale. . . . . | 212 |
| Giorni di astinenza. . . . .                            | 212 |
| Modalità e sede di raccolta . . . . .                   | 212 |
| Tipo di contenitore . . . . .                           | 213 |
| Modalità di trasporto e consegna . . . . .              | 213 |
| Fase analitica. . . . .                                 | 213 |
| Valutazione macroscopica. . . . .                       | 213 |
| Volume . . . . .  | 213 |
| pH . . . . .  | 213 |
| Aspetto . . . . .                                       | 213 |
| Fluidificazione. . . . .                                | 213 |
| Viscosità . . . . .                                     | 214 |
| Valutazione microscopica . . . . .                      | 214 |

|  |     |
|--|-----|
| Componente cellulare gametica . . . . .  | 214 |
| Numero di spermatozoi. . . . .   | 214 |
| Motilità spermatica. . . . .   | 214 |
| ■ <i>Box 15.1: Cinetica spermatica mediante<br/>    sistemi di analisi di immagine</i> . . . . . | 215 |
| Morfologia . . . . .   | 216 |
| Valutazione degli altri elementi<br>cellulari. . . . .   | 218 |
| Fase post-analitica . . . . .  | 219 |
| Conclusioni . . . . .  | 221 |
| Selezione degli spermatozoi. . . . .   | 221 |
| Metodiche di migrazione . . . . .  | 221 |
| Swim up da strato fisico . . . . .   | 221 |
| Swim up da pellet. . . . .   | 222 |
| Metodiche di separazione<br>su gradiente di densità . . . . .                                    | 222 |
| Conclusioni . . . . .  | 223 |
| Applicazione e ricerca di nuovi metodi<br>di selezione degli spermatozoi. . . . .                | 224 |
| Birifrangenza . . . . .  | 224 |
| Magnetic-Activated Cell Sorting (MACS) . . . . .   | 225 |
| Motile Sperm Organelle Morphology<br>Examination (MSOME). . . . .                                | 226 |
| Acido ialuronico . . . . .   | 227 |
| Microfluidica. . . . .   | 228 |
| Bibliografia . . . . .   | 229 |

### Capitolo 16

#### Induzione della crescita follicolare multipla e ovulazione . . . . . 233

*C. Alviggi, A. Conforti, C. Buonfantino, R. Vallone,  
S. Picarelli, P. De Rosa, I. Strina, G. De Placido*

|   |     |
|---|-----|
| Introduzione . . . . .                          | 233 |
| Farmaci ad azione follicolo-stimolante. . . . . | 233 |
| Follitropina alfa . . . . .                     | 233 |
| Follitropina beta . . . . .                     | 235 |
| Corifollitropina alfa . . . . .                 | 235 |
| Lutropina alfa . . . . .                        | 235 |
| Menotropina . . . . .                           | 236 |
| Urofollitropina . . . . .                       | 237 |

|   |     |
|---|-----|
| Farmaci inibitori dell'ovulazione:  |     |
| analoghi del GnRH . . . . .   | 237 |
| Agonisti del GnRH. . . . .  | 237 |
| Antagonisti del GnRH. . . . .   | 238 |
| Farmaci per l'induzione dell'ovulazione . . . . .   | 238 |
| Gonadotropina corionica umana. . . . .  | 238 |
| Agonisti del GnRH. . . . .  | 238 |
| Protocolli di stimolazione con analoghi del GnRH. . . . .   | 238 |
| Protocollo lungo . . . . .  | 238 |
| Protocollo ultra-lungo . . . . .  | 239 |
| Protocolli corto e ultra-corto. . . . .   | 239 |
| Protocollo con antagonisti. . . . .   | 239 |
| Personalizzazione del trattamento . . . . .   | 240 |
| Valutazione della risposta ovarica alla stimolazione . . . . .  | 241 |
| Biomarkers ormonali . . . . .   | 241 |
| ■ <i>Box 16.1: Criteri per l'identificazione delle pazienti a scarsa risposta ovarica e iper-risposta ovarica</i> . . . . . | 242 |
| Biomarkers funzionali. . . . .  | 243 |
| Biomarkers genetici . . . . .   | 243 |
| Bibliografia . . . . .  | 244 |

## Capitolo 17

### Allestimento e organizzazione di un laboratorio di riproduzione assistita. . . . . 245

*G. Micara, A. Linari*

|   |     |
|---|-----|
| Requisiti strutturali . . . . .   | 245 |
| ■ <i>Box 17.1: Normative PMA</i> . . . . .  | 246 |
| Requisiti tecnologici . . . . .   | 248 |
| Incubatori. . . . .   | 248 |
| Cappe . . . . .   | 249 |
| Stereomicroscopi . . . . .  | 249 |
| Stazione per microiniezione . . . . .   | 250 |
| Microscopio ottico a contrasto di fase e centrifuga . . . . .                           | 250 |
| Incubatore a secco . . . . .  | 250 |
| Frigorifero/congelatore . . . . .   | 250 |
| Termometro e analizzatore di gas . . . . .  | 250 |
| Termoblock . . . . .  | 250 |
| Contenitori criogenici . . . . .  | 250 |
| Manutenzione e taratura delle apparecchiature . . . . .                                 | 251 |
| Requisiti organizzativi e gestionali. . . . .   | 251 |
| Personale . . . . .   | 251 |
| ■ <i>Box 17.2: La tracciabilità nel laboratorio di riproduzione assistita</i> . . . . . | 252 |
| Sistema di gestione qualità . . . . .   | 253 |
| Bibliografia . . . . .  | 253 |

## Capitolo 18

### Tecniche di riproduzione assistita: micromanipolazione, coltura e trasferimento embrionale. . . . . 255

*R. Talevi, R. Gualtieri*

|   |     |
|---|-----|
| Inseminazione intrauterina . . . . .  | 255 |
| Le tecniche di riproduzione assistita di secondo livello . . . . .                                    | 256 |
| Pick-up ovocitario . . . . .  | 257 |
| La FIVET . . . . .  | 258 |
| L'ICSI . . . . .  | 259 |
| Il controllo della fecondazione e dello sviluppo embrionale . . . . .                                 | 263 |
| ■ <i>Box 18.1: Recupero degli spermatozoi testicolari</i> . . . . .                                   | 264 |
| ■ <i>Box 18.2: IMSI</i> . . . . .   | 265 |
| Controllo della segmentazione . . . . .   | 267 |
| ■ <i>Box 18.3: Sviluppo in vitro fino allo stadio di blastocisti: strategie a confronto</i> . . . . . | 268 |
| Trasferimento embrionale. . . . .   | 269 |
| ■ <i>Box 18.4: La biopsia embrionale</i> . . . . .  | 270 |
| ■ <i>Box 18.5: La schiusa fisiologica e "assistita" della blastocisti</i> . . . . .                   | 271 |
| Ringraziamenti . . . . .  | 272 |
| Bibliografia . . . . .  | 273 |

## Capitolo 19

### Crioconservazione di gameti ed embrioni e preservazione della fertilità. . . . . 275

*R. Gualtieri, R. Talevi*

|  |     |
|--|-----|
| Aspetti storici . . . . .  | 275 |
| Strategie di crioconservazione . . . . .   | 276 |
| Congelamento lento. . . . .  | 277 |
| Vitrificazione . . . . .   | 278 |
| La crioconservazione dell'ovocita: una storia a parte . . . . .  | 279 |
| Crioconservazione di tessuti riproduttivi . . . . .  | 279 |
| ■ <i>Box 19.1: I danni indotti dalla crioconservazione</i> . . . . .   | 281 |
| ■ <i>Box 19.2: Strategie avanzate di vitrificazione</i> . . . . .  | 283 |
| ■ <i>Box 19.3: Il rischio di contaminazione nelle procedure di crioconservazione</i> . . . . .               | 284 |
| ■ <i>Box 19.4: Un punto chiave nelle procedure di vitrificazione: la velocità di riscaldamento</i> . . . . . | 285 |
| Effetti della crioconservazione di gameti ed embrioni sulla salute dei nati . . . . .                        | 285 |
| Bibliografia . . . . .   | 286 |

## Capitolo 20

### Diagnosi genetica pre-impianto..... 289

*L. Stuppia*

|  |     |
|--|-----|
| Introduzione.....  | 289 |
| ■ <i>Box 20.1: La legge 194/1978</i> .....   | 290 |
| Diagnosi genetica pre-impianto (PGD).....  | 291 |
| La PGD in coppie portatrici di malattie a trasmissione mendeliana.....                         | 291 |
| ■ <i>Box 20.2: La legge 40/2004 e la PDG</i> .....   | 292 |
| La PGD nella coppie portatrici di traslocazioni o altre anomalie cromosomiche strutturali..... | 293 |
| Preimplantation Genetic Screening (PGS).....   | 294 |
| ■ <i>Box 20.3: PGS: utile, inutile o dannosa?</i> .....  | 295 |
| Altre applicazioni della PGD.....  | 295 |
| Tecniche utilizzate per il prelievo cellulare nella PGD.....                                   | 295 |
| ■ <i>Box 20.4: La PDG per la selezione di embrioni HLA compatibili.</i> .....                  | 296 |
| Tecniche utilizzate per l'analisi genetica nella PGD.....                                      | 297 |
| ■ <i>Box 20.5: NGS e PDG.</i> .....  | 299 |
| Rischi associati all'esecuzione della PGD.....   | 300 |
| La consulenza genetica nella PGD.....  | 302 |
| Bibliografia.....  | 302 |

## Capitolo 21

### Risultati delle tecniche di riproduzione assistita..... 303

*P.G. Artini, C. Tatone*

|   |     |
|---|-----|
| I report nel mondo.....   | 303 |
| I report in Europa.....   | 304 |
| ■ <i>Box 21.1: Cos'è la percentuale cumulativa di gravidanza?</i> ..... | 305 |
| I report in Italia.....   | 306 |
| ■ <i>Box 21.2: Il fattore età nella procreazione assistita</i> .....    | 308 |
| Bibliografia.....   | 309 |

## Capitolo 22

### Effetti della riproduzione assistita sulla salute dei nati.....311

*A. Paffoni, T.A.L. Brevini, F. Gandolfi*

|   |     |
|---|-----|
| Introduzione.....   | 311 |
| Lo stato di salute dei bambini nati da riproduzione assistita.....  | 311 |
| Come e quando viene valutato.....   | 311 |
| I primi dati disponibili.....   | 312 |
| ■ <i>Box 22.1: Il ruolo dell'ossigeno nello sviluppo embrionale: che cosa ci insegnano i modelli animali?</i> ..... | 313 |

|   |     |
|---|-----|
| I principali rischi perinatali per il bambino nato da tecniche di riproduzione assistita.....                           | 315 |
| Gemellarità, parto pre-termine, basso peso alla nascita.....  | 315 |
| Anomalie congenite neonatali.....   | 316 |
| Disordini dell'imprinting e malattie epigenetiche.....  | 316 |
| Sviluppo e salute cardiovascolare.....  | 317 |
| ■ <i>Box 22.2: Le modificazioni epigenetiche che sono alla base delle conseguenze a lungo termine</i> .....             | 318 |
| Problemi oncologici.....  | 320 |
| L'infertilità coniugale come fattore di rischio.....  | 320 |
| Gli aspetti più dibattuti.....  | 320 |
| Crioconservazione.....  | 321 |
| Effetti sull'integrità del materiale genetico.....  | 321 |
| Tipo di medium di coltura.....  | 322 |
| La coltura in vitro.....  | 322 |
| ■ <i>Box 22.3: Come l'embrione cambia durante la coltura in vitro ed è sensibile all'ambiente che lo circonda</i> ..... | 323 |
| Conclusioni.....  | 325 |
| Bibliografia.....   | 325 |

## Capitolo 23

### Gameti artificiali: il futuro della riproduzione assistita?..... 327

*M. De Felici*

|  |     |
|--|-----|
| Introduzione.....  | 327 |
| Le cellule staminali.....  | 327 |
| Cellule staminali della linea germinale.....   | 328 |
| Cellule staminali somatiche.....   | 328 |
| Cellule staminali prodotte artificialmente.....  | 329 |
| Considerazioni generali sulla gametogenesi.....  | 330 |
| Tempi e processi della spermatogenesi e dell'ovogenesi nel topo e nell'uomo.....               | 331 |
| Topo.....  | 331 |
| Uomo.....  | 333 |
| Strategie per la produzione di gameti artificiali.....   | 334 |
| Percorsi di formazione di gameti artificiali.....  | 335 |
| Gameti da cellule staminali della linea germinale.....   | 335 |
| ■ <i>Box 23.1: La metodologia del trapianto di SSC nei tubuli seminiferi di Brinster</i> ..... | 337 |
| ■ <i>Box 23.2: L'esperimento di Ohinata e coll.</i> .....                                      | 338 |
| ■ <i>Box 23.3: L'esperimento di Zhang e coll.</i> .....  | 339 |
| Gameti da cellule staminali somatiche fetali o adulte.....                                     | 340 |
| Gameti da cellule staminali artificiali.....   | 342 |



|   |     |
|---|-----|
| Possibili applicazioni dei gameti artificiali . . . . | 343 |
| Conclusioni . . . . .                                 | 344 |
| Bibliografia . . . . .                                | 345 |

## Capitolo 24

### Aspetti etici della riproduzione assistita . . 347

*F. Lombardo*

|   |     |
|---|-----|
| Introduzione . . . . .  | 347 |
| Problematiche etiche legate<br>alla fecondazione assistita . . . . .                | 349 |
| Scissione dell'atto unitivo e procreativo . . . . .                                 | 349 |
| Lo statuto dell'embrione . . . . .  | 350 |
| Le altre religioni . . . . .  | 350 |
| Il concetto di famiglia e di genitorialità<br>e la fecondazione eterologa . . . . . | 351 |
| La legge 40 . . . . .   | 352 |
| Conclusioni . . . . .   | 353 |
| Bibliografia . . . . .  | 353 |

## Capitolo 25

### La disciplina in materia di procreazione medicalmente assistita . . . . . 355

*M. Occhiena*

|                                |     |
|--------------------------------|-----|
| Cenni storici . . . . .        | 355 |
| La legge 40 del 2004 . . . . . | 357 |

|   |     |
|---|-----|
| ■ <i>Box 25.1: Legge 19 febbraio 2004 n. 40 -<br/>Norme in materia di procreazione<br/>medicalmente assistita . . . . .</i> | 358 |
|---|-----|

|  |     |
|--|-----|
| ■ <i>Box 25.2: Il referendum abrogativo<br/>del 2005 . . . . .</i> | 362 |
|--|-----|

|  |     |
|--|-----|
| Limiti all'applicazione delle tecniche<br>sugli embrioni . . . . . | 363 |
|--|-----|

|   |     |
|---|-----|
| Il superamento del divieto di fecondazione<br>eterologa . . . . . | 364 |
|---|-----|

|   |     |
|---|-----|
| ■ <i>Box 25.3: Garante per la protezione<br/>dei dati personali . . . . .</i> | 366 |
|---|-----|

|   |     |
|---|-----|
| ■ <i>Box 25.4: Registro nazionale dei<br/>donatori di cellule riproduttive<br/>a scopi di PMA di tipo eterologo . . . . .</i> | 369 |
|---|-----|

|   |     |
|---|-----|
| Fecondazione assistita e diagnosi<br>pre-impianto per coppie fertili portatrici<br>di malattia genetica . . . . . | 369 |
|---|-----|

|   |     |
|---|-----|
| ■ <i>Box 25.5: Documento sulle problematiche<br/>relative alla fecondazione eterologa . . . . .</i> | 370 |
|---|-----|

|   |     |
|---|-----|
| ■ <i>Box 25.6: La legge 40 del 2004 al vaglio<br/>della Corte europea dei diritti dell'uomo . . . . .</i> | 372 |
|---|-----|

|   |     |
|---|-----|
| La "nuova" legge 40 del 2004 e il diritto<br>all'obiezione di coscienza . . . . . | 373 |
|---|-----|

|  |     |
|--|-----|
| La procreazione medicalmente assistita<br>nei principali Stati europei . . . . . | 373 |
|--|-----|

|   |     |
|---|-----|
| ■ <i>Box 25.7: Obiezione di coscienza<br/>del biologo . . . . .</i> | 374 |
|---|-----|

|                        |     |
|------------------------|-----|
| Bibliografia . . . . . | 375 |
|------------------------|-----|

|                                   |            |
|-----------------------------------|------------|
| <b>Indice analitico . . . . .</b> | <b>377</b> |
|-----------------------------------|------------|