



FACULTAD DE  
**CIENCIAS**

UDELAR fcien.edu.uy

# *Curso Biología Celular 2020*



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

## Gametogénesis y fecundación



*María José Arezo Rezza*



# Organismos multicelulares con reproducción sexual

## Células somáticas

Forman el cuerpo del organismo multicelular

## Células germinales

Línea germinal que dará origen a los gametos



# Separación temprana linajes somático/germinal (embrión)



# Separación tardía linajes somático/germinal (adulto)



# Organismos con reproducción sexual

Si hay cromosomas asociados a la determinación del sexo:

**Cariotipo:** número, forma y tamaño de los cromosomas de una especie

**cromosomas autosómicos**

todos los miembros de la especie

**cromosomas sexuales**

diferentes sistemas según las especies

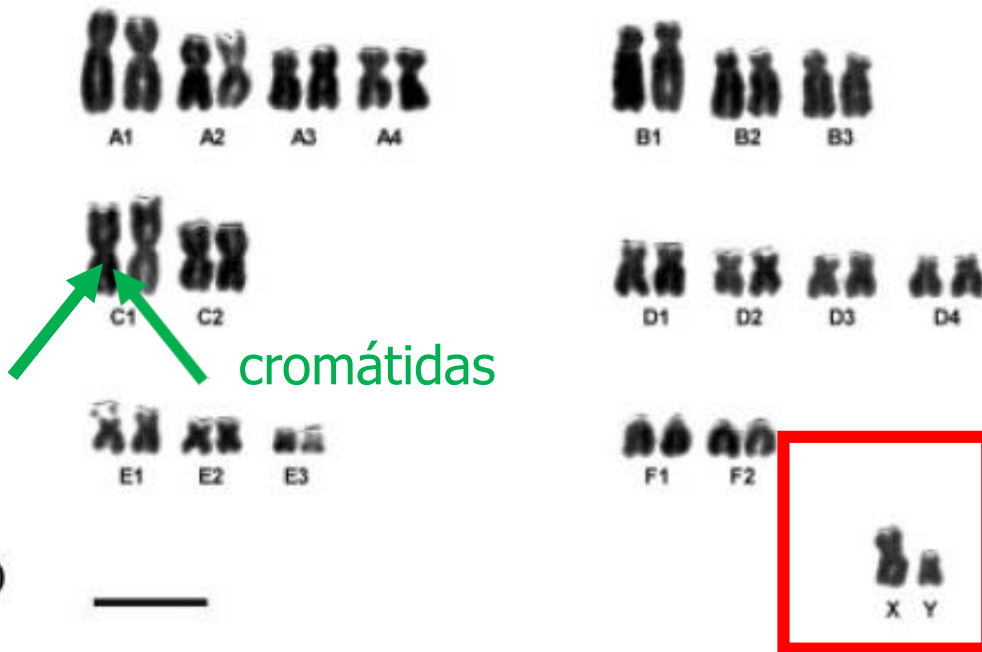
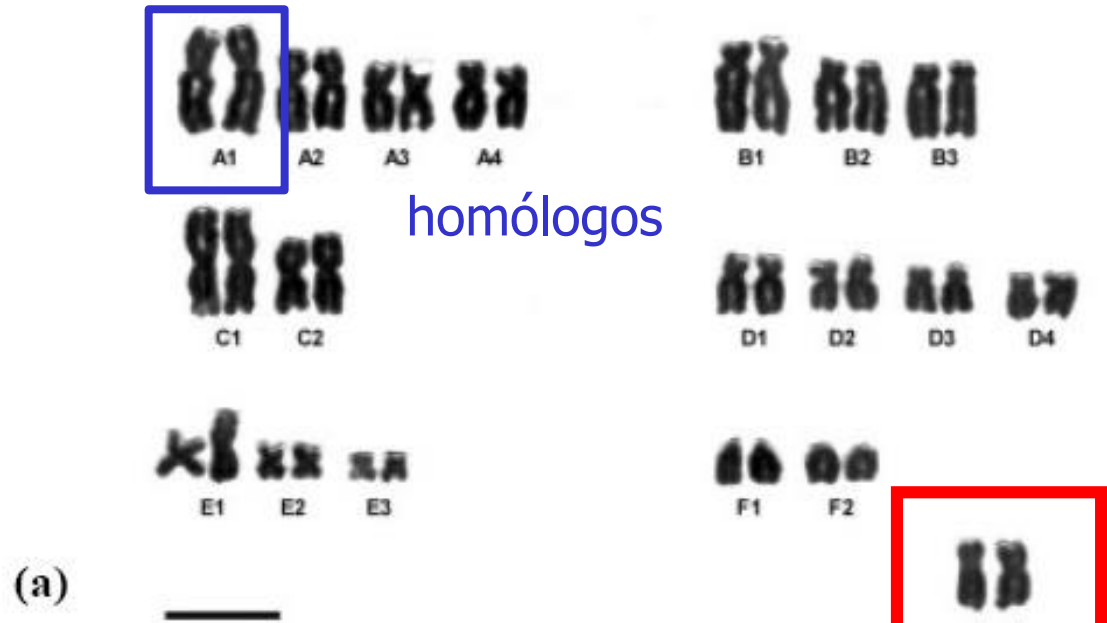


# Idiograma mamífero

Ej.: *Panthera onca*

$$2n = 38 \text{ (XX/XY)}$$

**Homólogos y cromátidas**





No todos los sistemas de determinación del sexo utilizan cromosomas XX/XY



**Sistema ZZ / ZW**

Hembra heterogamética



.... entre otros...

# Gametos:

¿cuál es su función?

¿qué sucede en una especie diploide?

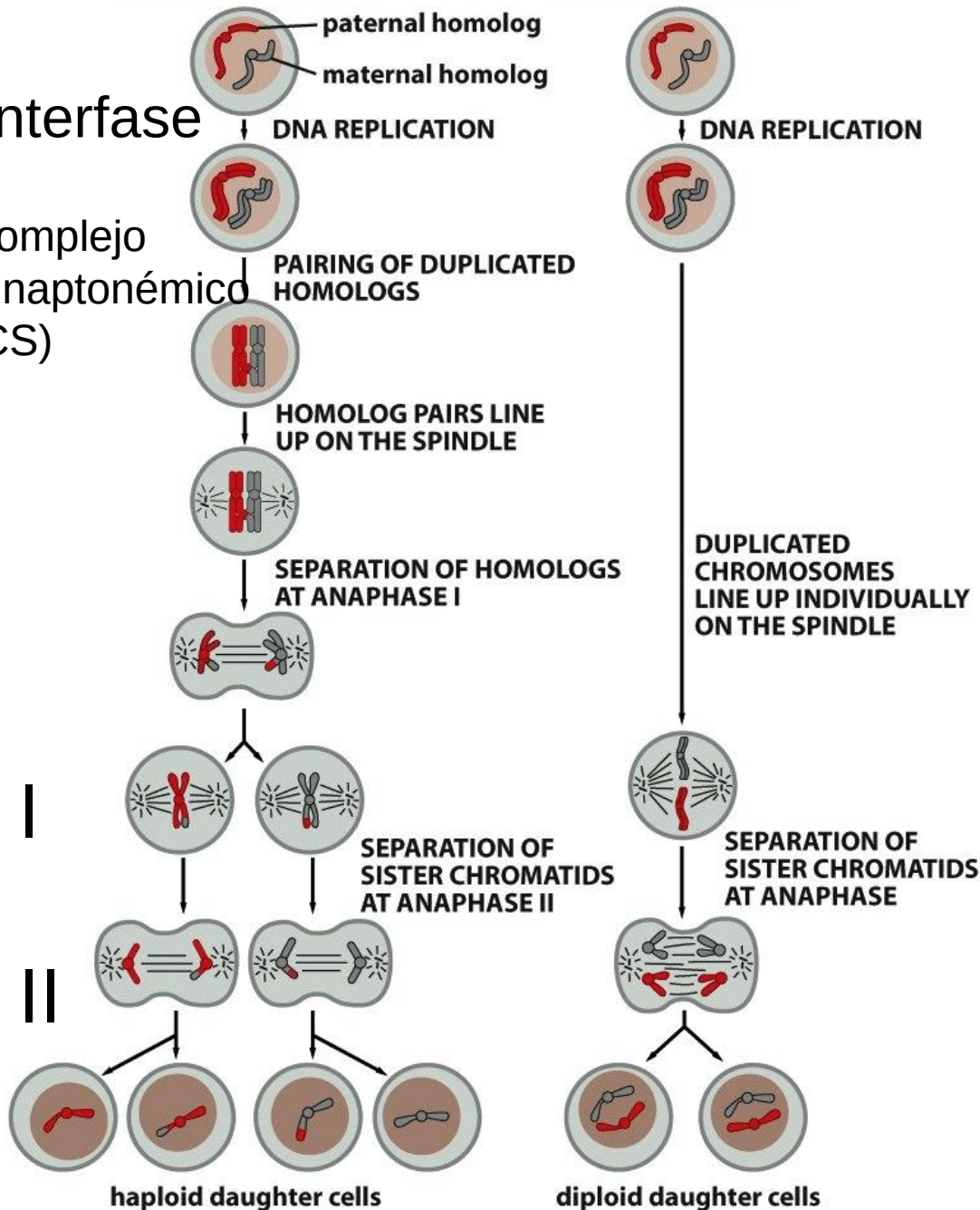


(A) MEIOSIS

(B) MITOSIS

Interfase

Complejo  
Sinaptonémico  
(CS)



# Meiosis

## PRIMERA DIVISIÓN Prolongada

Profase I: leptoteno  
cigoteno (CS)  
paquiteno ®  
diploteno  
diacinesis

Metafase I  
Anafase I  
Telofase I

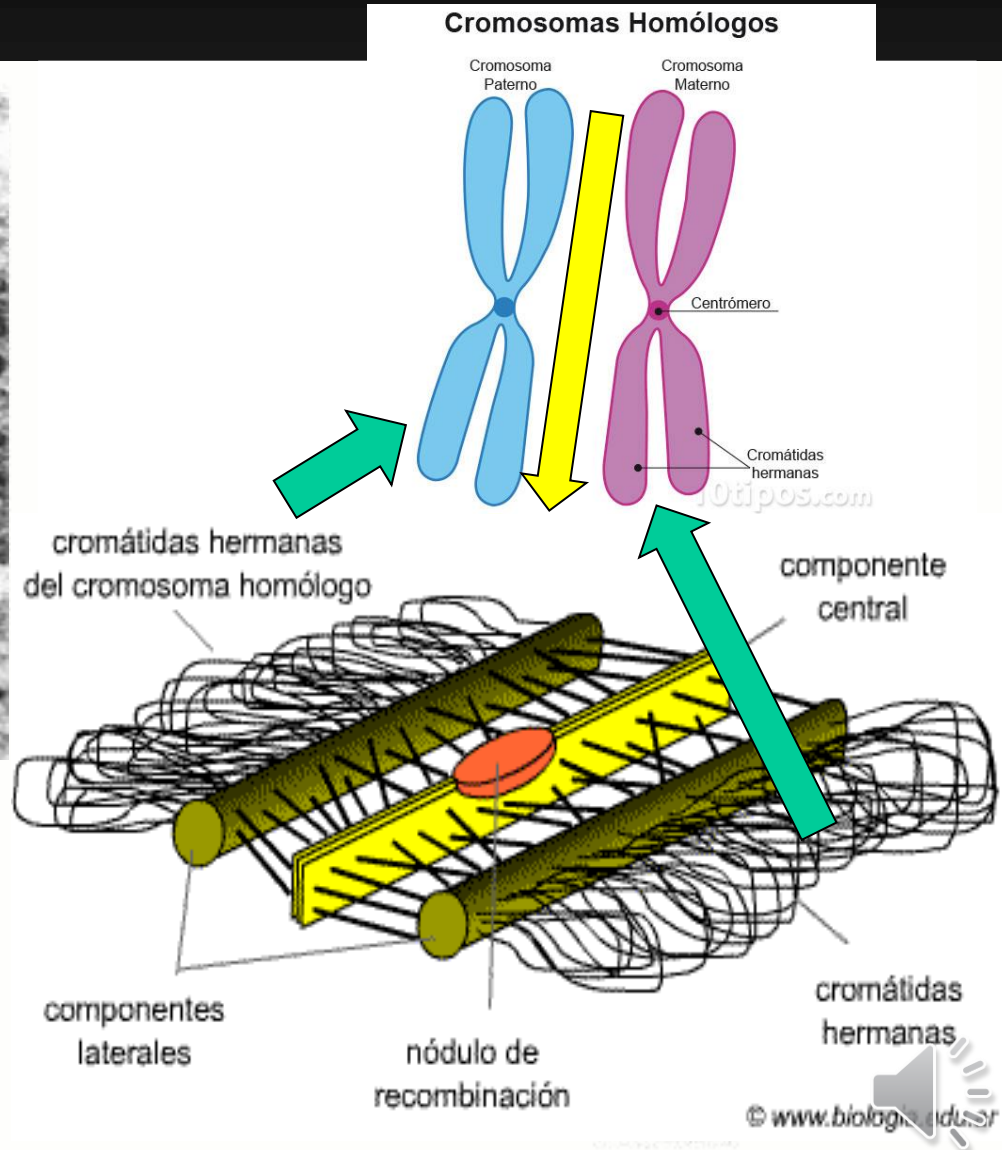
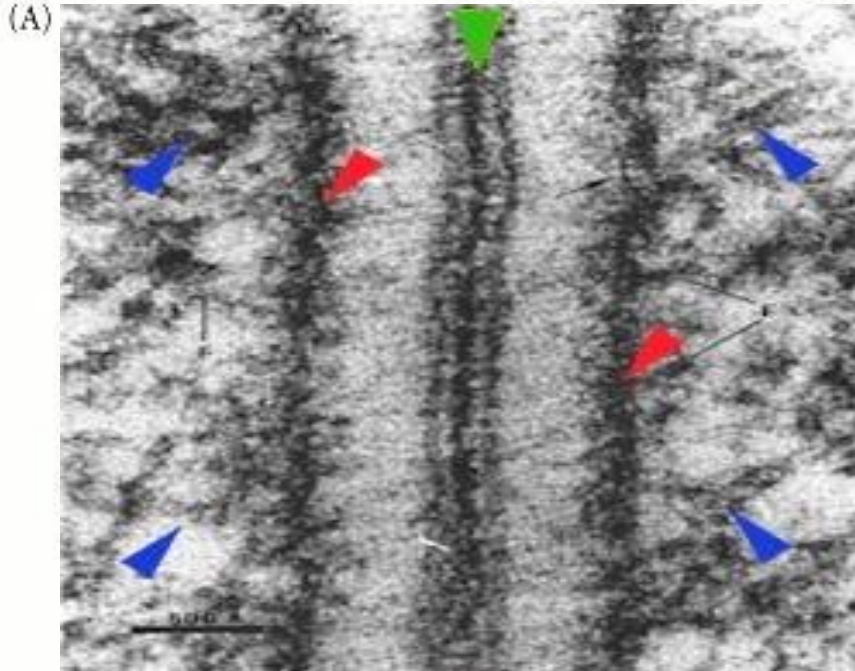
Interfase: breve





# Complejo sinaptonémico

Garantiza el apareamiento correcto de los cromosomas homólogos (proteico)



Cromatina

Elementos laterales

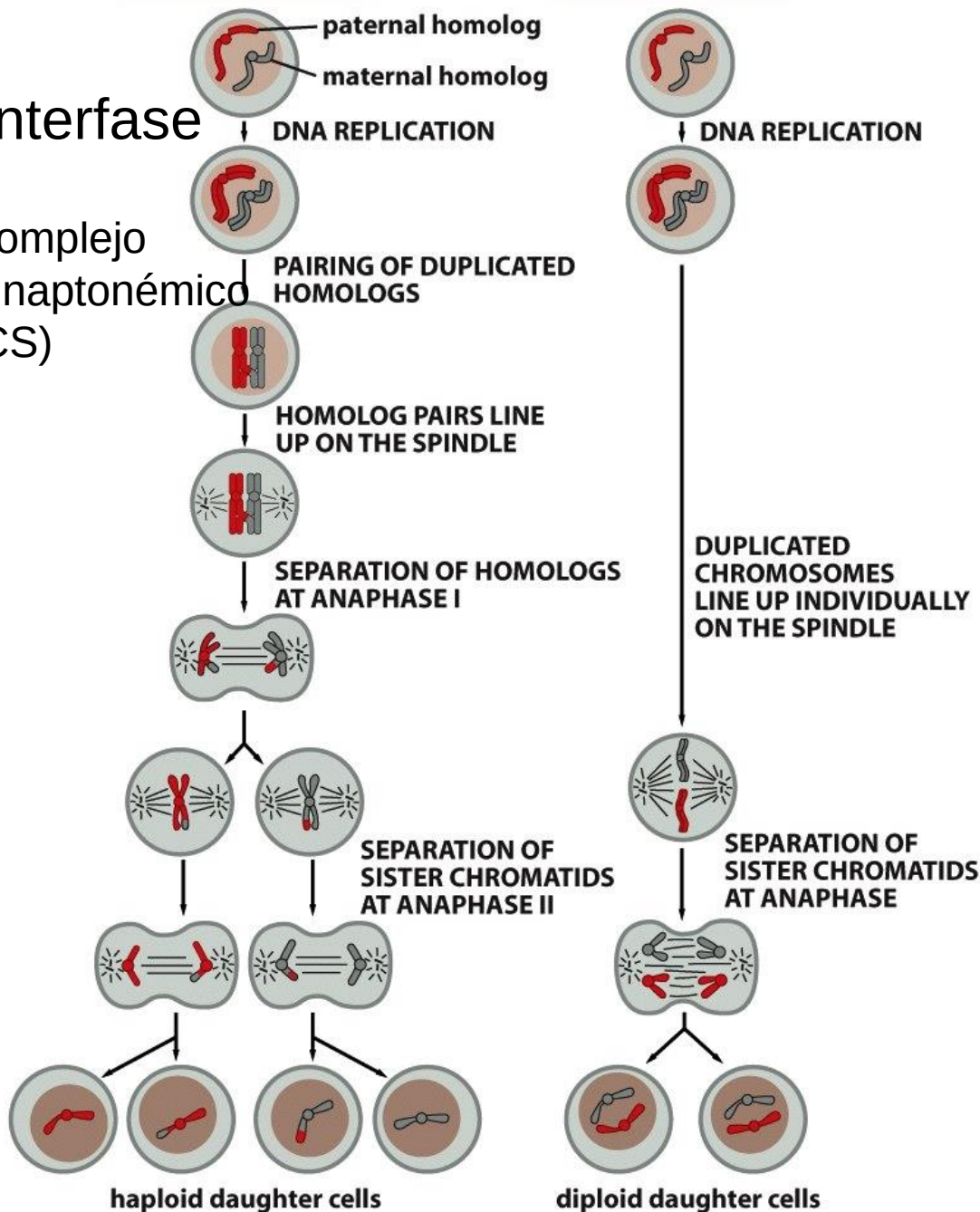
Elemento central

(A) MEIOSIS

(B) MITOSIS

Interfase

Complejo  
Sinaptonémico  
(CS)



# PRIMERA DIVISIÓN

Profase I: leptoteno  
cigoteno (CS)  
paquiteno ®  
diploteno  
diacinesis

Metafase I  
Anafase I  
Telofase I

Interfase: breve (s/r)

# SEGUNDA DIVISIÓN

errores en la meiosis:  
no disyunción

(= plantas, animales,  
machos y hembras)



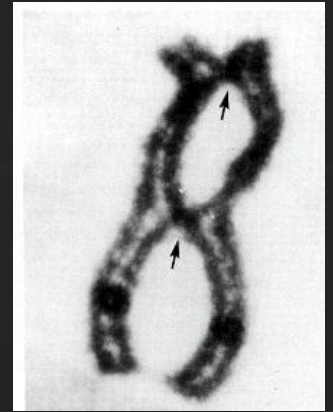
# Beneficios de la reproducción sexual:

Generación de variabilidad genética: 2 niveles

- recombinación genética (2 o 3 eventos c/par)  
(paquitenio)

Quiasmas  
(diploteno)

- distribución de homólogos y cromátidas



Relación: variabilidad genética - entorno cambiante.

Mutaciones perjudiciales – mutaciones ventajosas.



# GAMETOGENÉISIS

La producción de los gametos implica mucho más que la reducción del número cromosómico

## Origen de las células germinales:

Embriones

- células germinales primordiales (precursoras)
- migración hacia gonadas en formación





## Características de las células germinales primordiales :

- similares a lo largo de la escala zoológica: a nivel morfológico, comportamental y molecular (expresión de genes específicos *tipo vasa, nanos, pumilo*, etc.)
- se forman lejos del sitio de desarrollo de la gonada

### A nivel histológico

- Células grandes, núcleo prominente , 1 o 2 nucléolos  
Citoplasma: pobre en organelos





# GAMETOGENÉISIS

## Orígen de las células germinales:

### Embriones

- células germinales primordiales (precursoras)
- migración hacia gonadas en formación

### Gonadas embrionarias

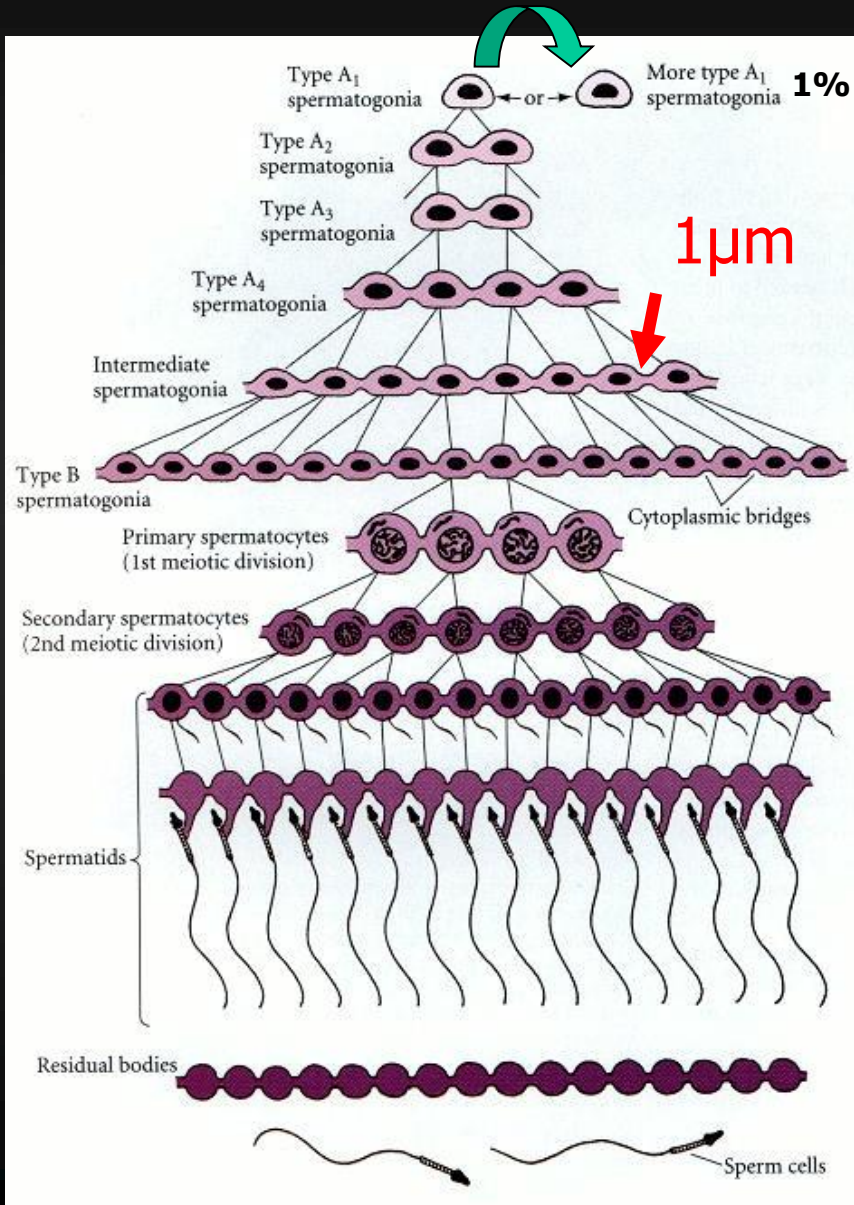
- incorporación (proliferación inicial por mitosis)
- diferenciación (dependiente del sexo)

**Isogamia / Anisogamia**



# Espermatogénesis

**Inicio**  
**Madurez sexual**



(BMP8: nivel crítico - diferenciación)



ratones sin Bmp8: no inician espermatogénesis

**Espermatogonias**

G<sub>0</sub> hasta madurez sexual (inhibidores ciclo cel.)

MITOSIS

**Espermatocitos primarios** (MEI I)

**Espermatocitos secundarios** (MEI II)

**Espermátidas** (haploides)



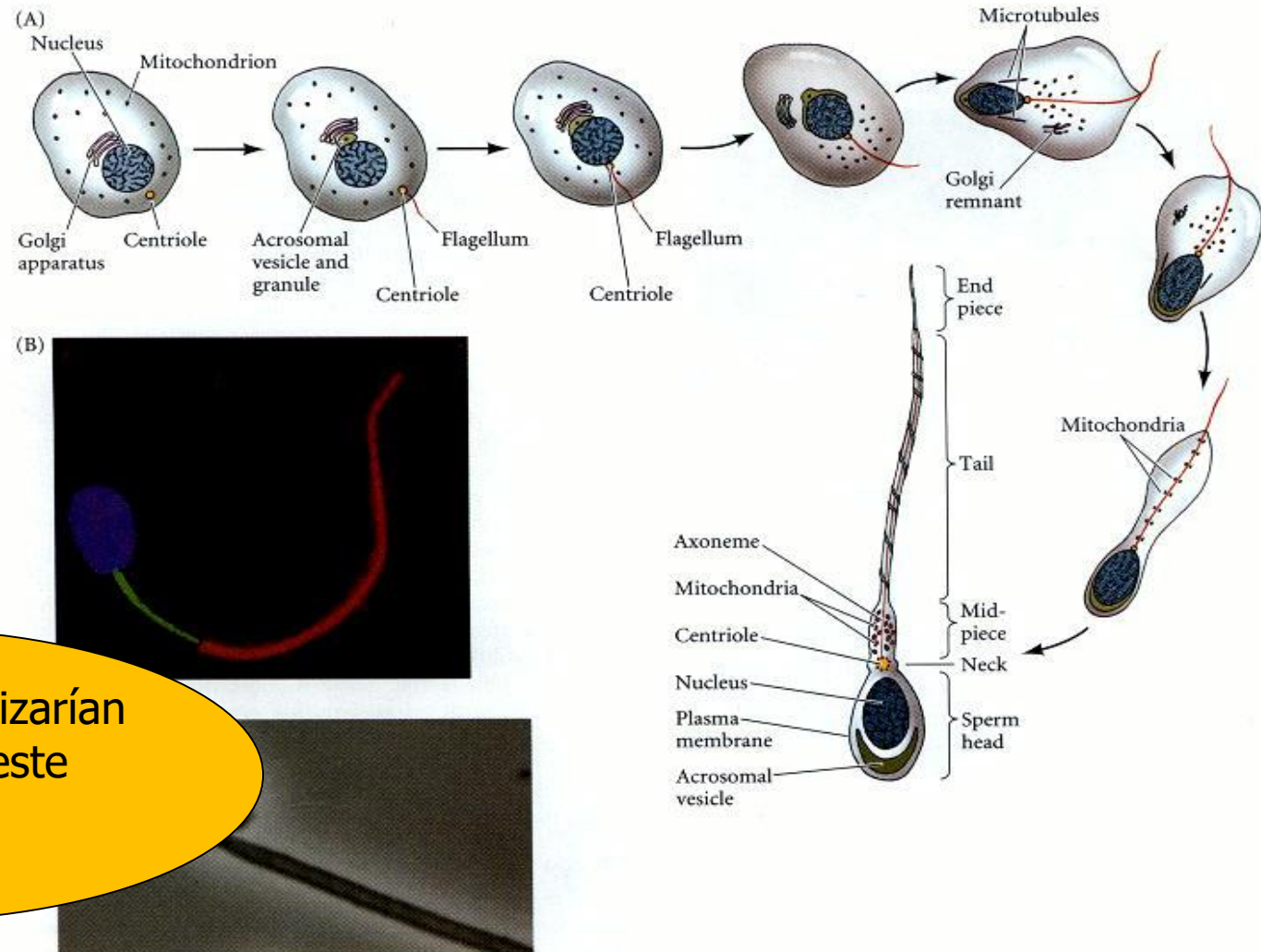
espermioagéneis

**Espermatozoides**



# Espermioogénesis

¿qué abordaje utilizarían para observar este proceso?

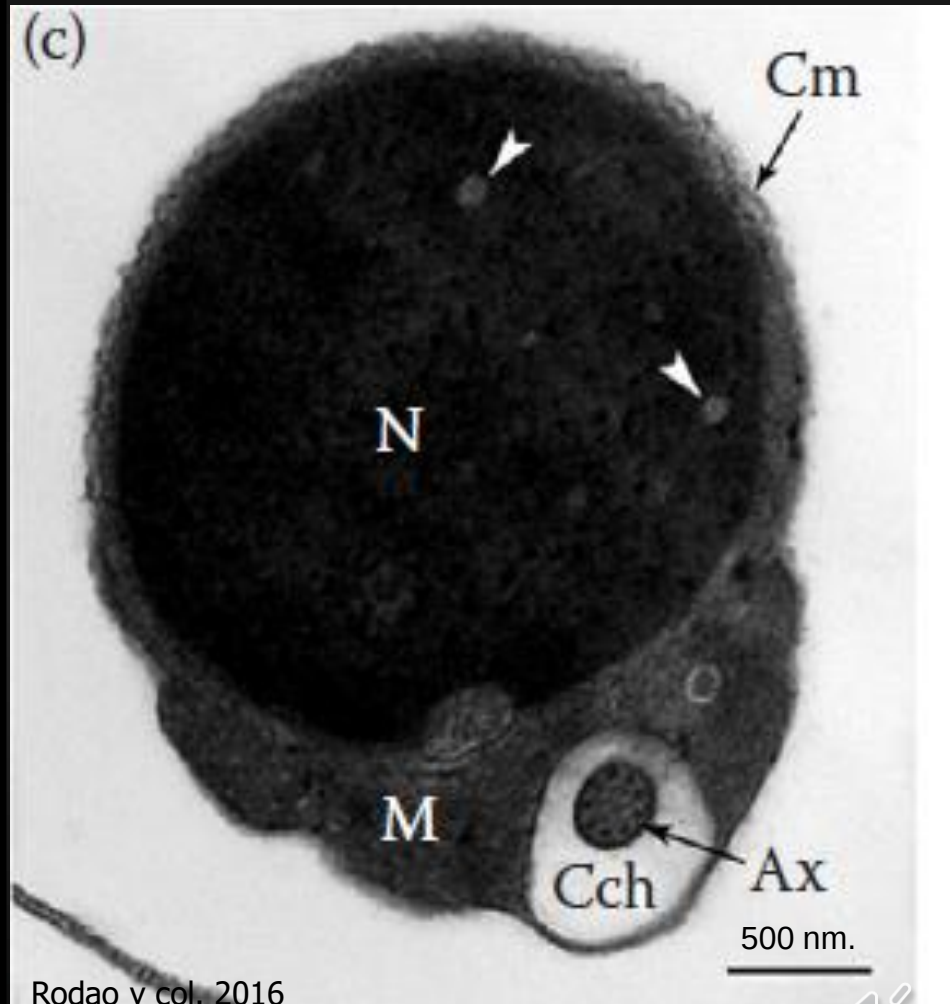


- Formación de vesícula acrosómica (Aparato de Golgi)
- Condensación nuclear (histonas – protaminas) transcripción ↓
- Eliminación citoplasma remanente; flagelo y pieza media (mitoc.)

## Espermátida temprana



## Espermátida avanzada

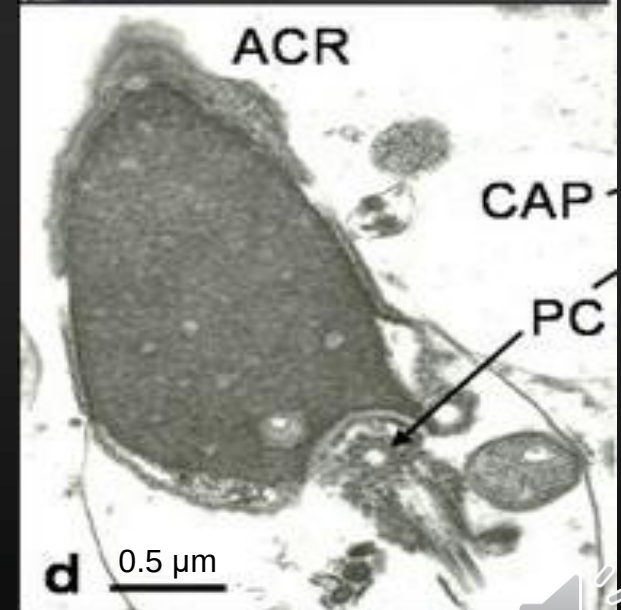
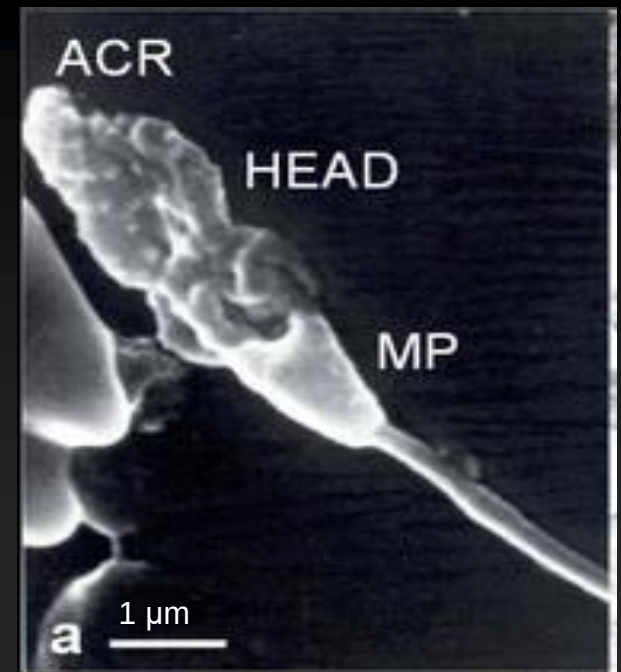


Rodao y col. 2016





# Espermatozoide maduro



Acrosoma: ¿presente en todas la especies?

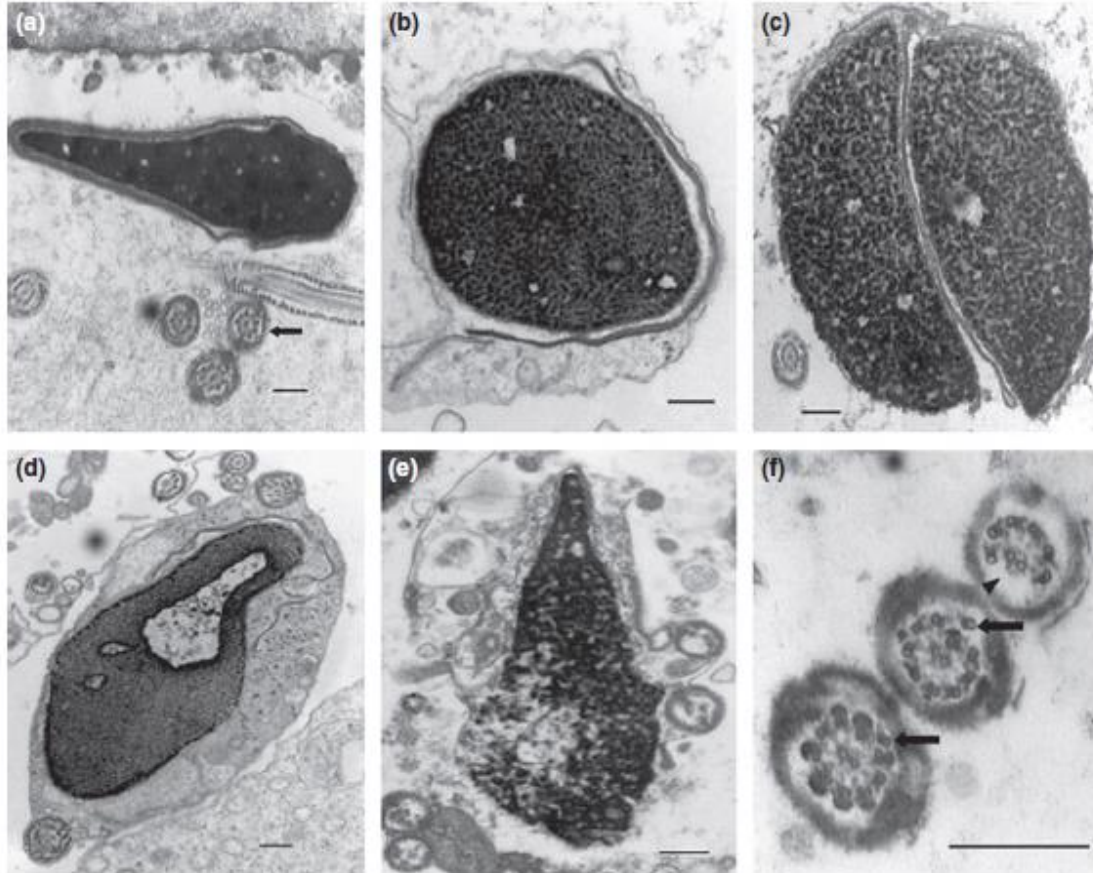






Mag. Gabriela Casanova  
Facultad de Ciencias  
Unidad de Microscopía electrónica

Dra. Rossana Sapiro  
Dpto. de Histología  
y Embriología  
Facultad de Medicina



**Fig. 1** Ultrastructural sperm characteristics. (a) Normal head; mature and well-compacted chromatin, normal shape and position of the acrosome. Normal tail, cytoskeleton complete and well organised. (b and c) Immature heads; b-granular chromatin. Altered acrosome, displaced far from the nucleus. (c) Binucleated head. The chromatin is also immature. (d) Severe lacunar defect of the chromatin (vacuoles) with abundant residual cytoplasm. (e) Signs of lysis; the chromatin appears disaggregated, plasma membrane is swelled and tails completely disorganised. (f) Cross-section of three tails; microtubular translocation (arrows) absence of one or more peripheral microtubules (arrow head). Bars: 500 nm.

Ultraestructura  
espermatozoide:

mejor indicador de  
fertilidad en  
humanos

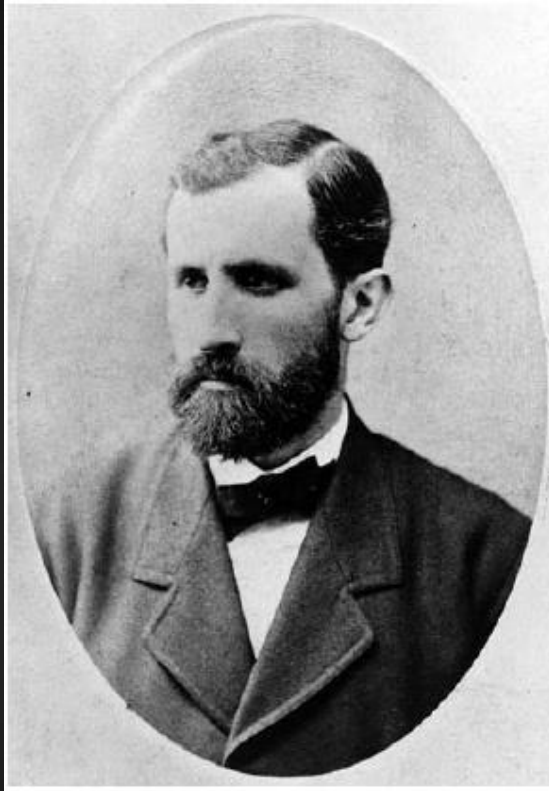
Correlacionada con  
daño en ADN

Naranja de acridina:

ADN doble cadena (250nm)  
ADN simple cadena o ARN  
(650nm)



# Protaminas



**1874 - Friedrich Miescher, MD**

Término protaminas = “ base orgánica”  
asociada al núcleo del espermatozoide  
de salmón





**1896 - Albrecht Kossel, BQ**

Naturaleza proteica de las  
protaminas

 **Nobelprize.org**

The Official Web Site of the Nobel Prize

Fisiol. y Medicina 1920

por sus contribuciones en el  
desciframiento de la  
química de ácidos nucleicos y  
proteínas





# Estructura primaria de protaminas

A

## Protostome protamine (invertebrate)

Mollusk Squid P1 : -----R-----\*-----20-----\*-----40-----\*-----60-----R----- : 57 **75**

## Deuterostome protamine (vertebrate)

Fish Salmon P1 : -----P-----SSSRPI-----PRAS-----GG----- : 32 **66**

Amphibian Newt P1 : AYGR-ARSGRSVR-----GRSPGR-----GRSDNDAP-----RRR----- : 43 **53**

Newt P2 : ARGR--SRSSVFR-----CGSP-----GRSQAGAGGL-----RRR-HRRADQE----- : 48 **50**

Reptile Alligator P1 : ARYERNRSRSR-----GGRYRRRTTRSGRGYQRRHHRGGSRRRRRRRRRRRR-- : 62 **63**

Alligator P2 : ARYERNRSRSR-----GGRYRR--RGRYGRHHRHGSRRRRRRRRRRSRD-- : 56 **70**

Bird Chicken P1 : ARYR-SRGRSRRTTRRRRSRSGRRRSRRRRRRYGSARRSRSSGGVRRRYGSRRRRRRY : 65 **58**

## Mammal

Prototheria Platypus P1 : ARFRRSRSRSLYRRRRRSRR-GGQTRS-KLSR-----GRSRRRKGRSRRSSR----- : 60 **58**

Metatheria Opossum P1 : ARYR-RRSRSRSGRYGRRRRRSRRRRSR-----RRGRFGGYHRRSPHRR----- : 57 **68**

Eutheria Human P1 : ARYRCCRSQS--SY-----Y-QGRS-RRRRRSCQTRRRAMRCOPHYRPRCRRH : 50 **50**

Human P2 : ----RTHGQSQYRRHCSRRRL-----HRIHRRQHRSCRRRKRRSCRHRRRRRGCTRKRTCRRH : 57 **63**

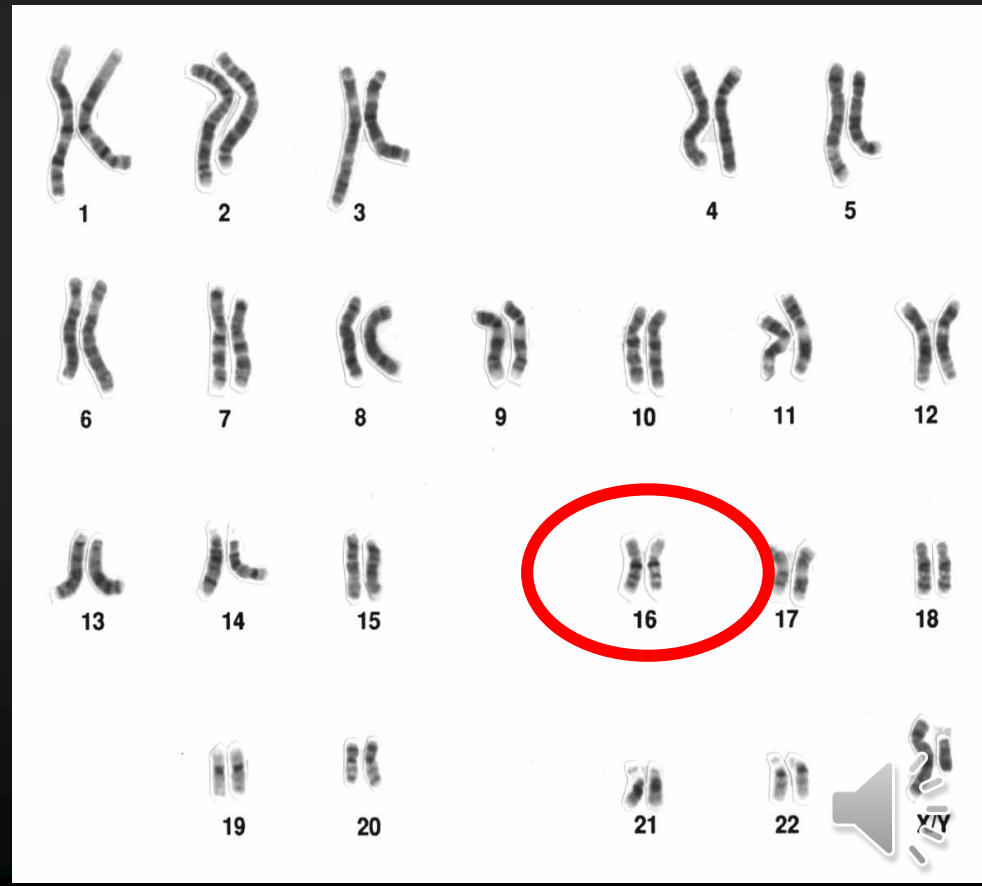
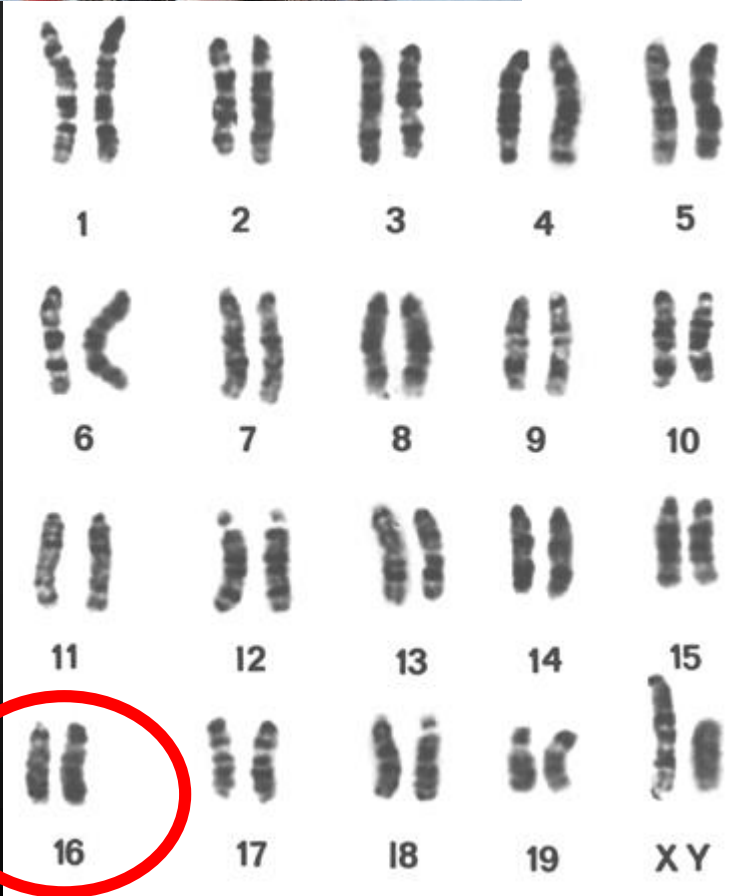
Lewis y col. 2003

% aa básicos

- Proteínas de aprox 50 aa
- Unión con ADN: surco mayor, 15 pb
- Neutralizan carga negativa = máxima compactación (apagado total de la transcripción)
- Alto contenido de arginina, alta heterogeneidad de sec = alta tasa evolutiva
- Alargamiento de la secuencia en la evolución de vertebrados



## Genes ubicados en autosomas







Genes protaminas :  
**sin** intrones



Genes protaminas :  
**con** intrones

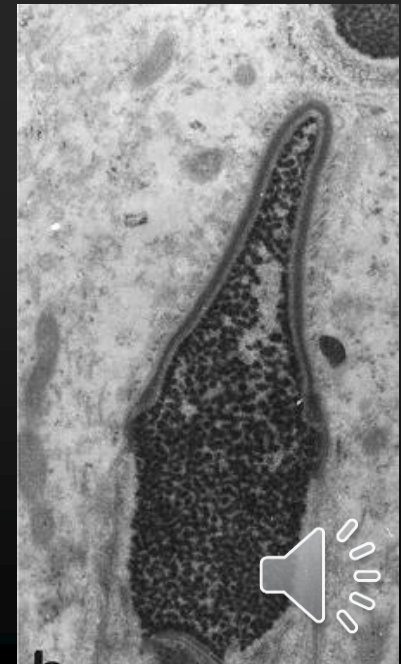




Síntesis  
ARNm



Traducción  
del mensajero



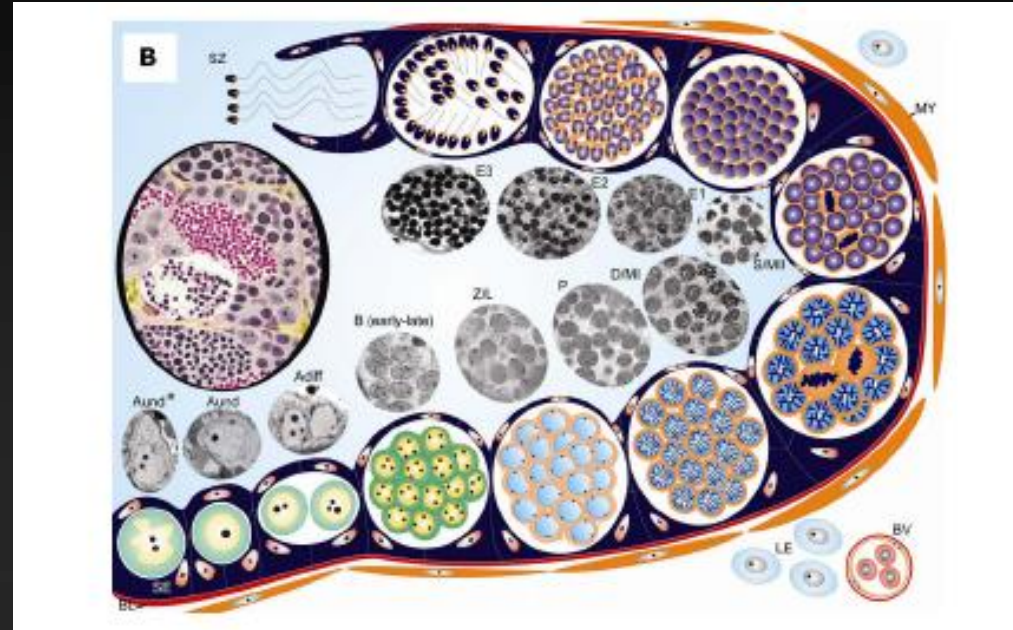


# Espermatogénesis en vertebrados

## Anamniotas = en cistos

Peces, anfibios

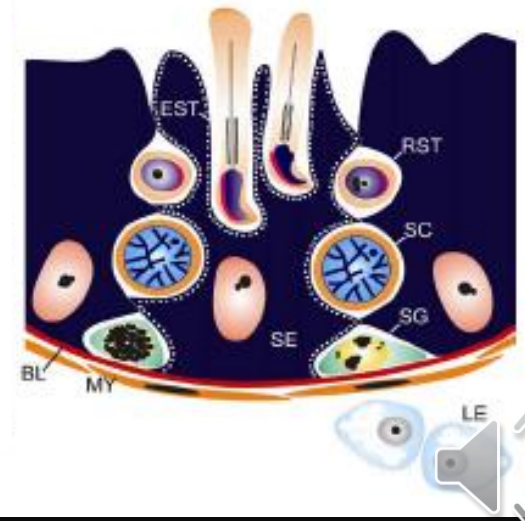
Grupo cél de Sértoli: engloban a un grupo de células germinales en el mismo estadio de diferenciación

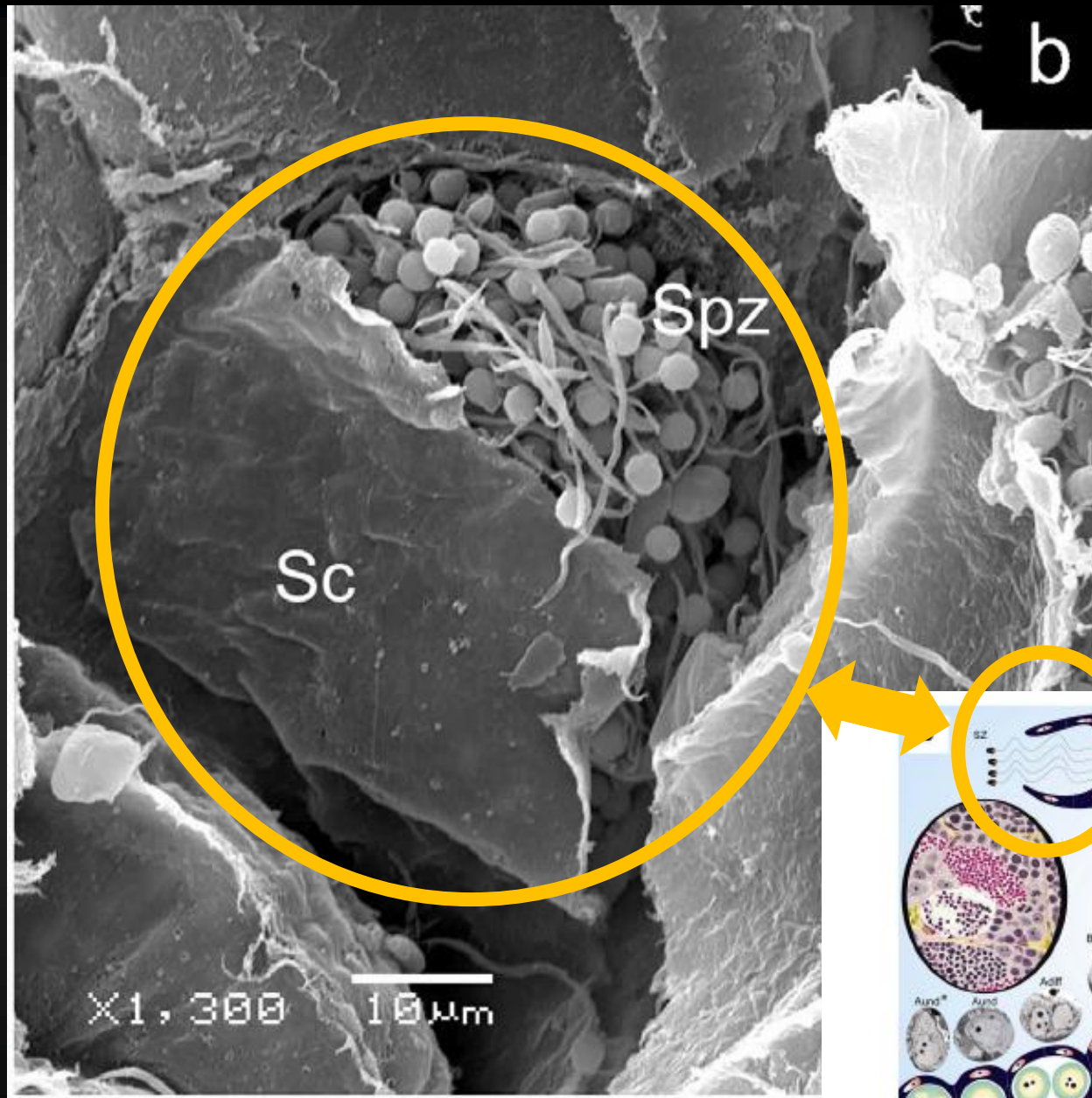


## Amniotas = en onda

Reptiles, Aves y mamíferos

1 cél de Sértoli: varias células germinales en diferentes estadios de maduración



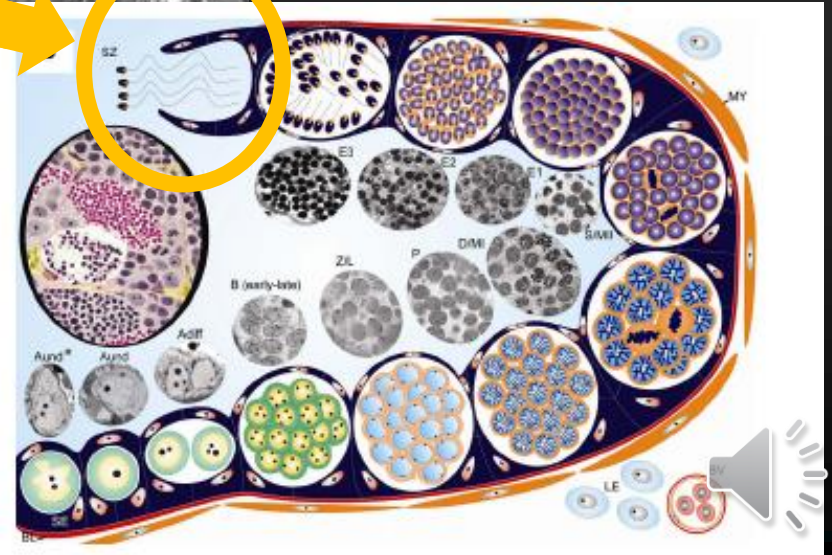


(Arezo y col. 2007)



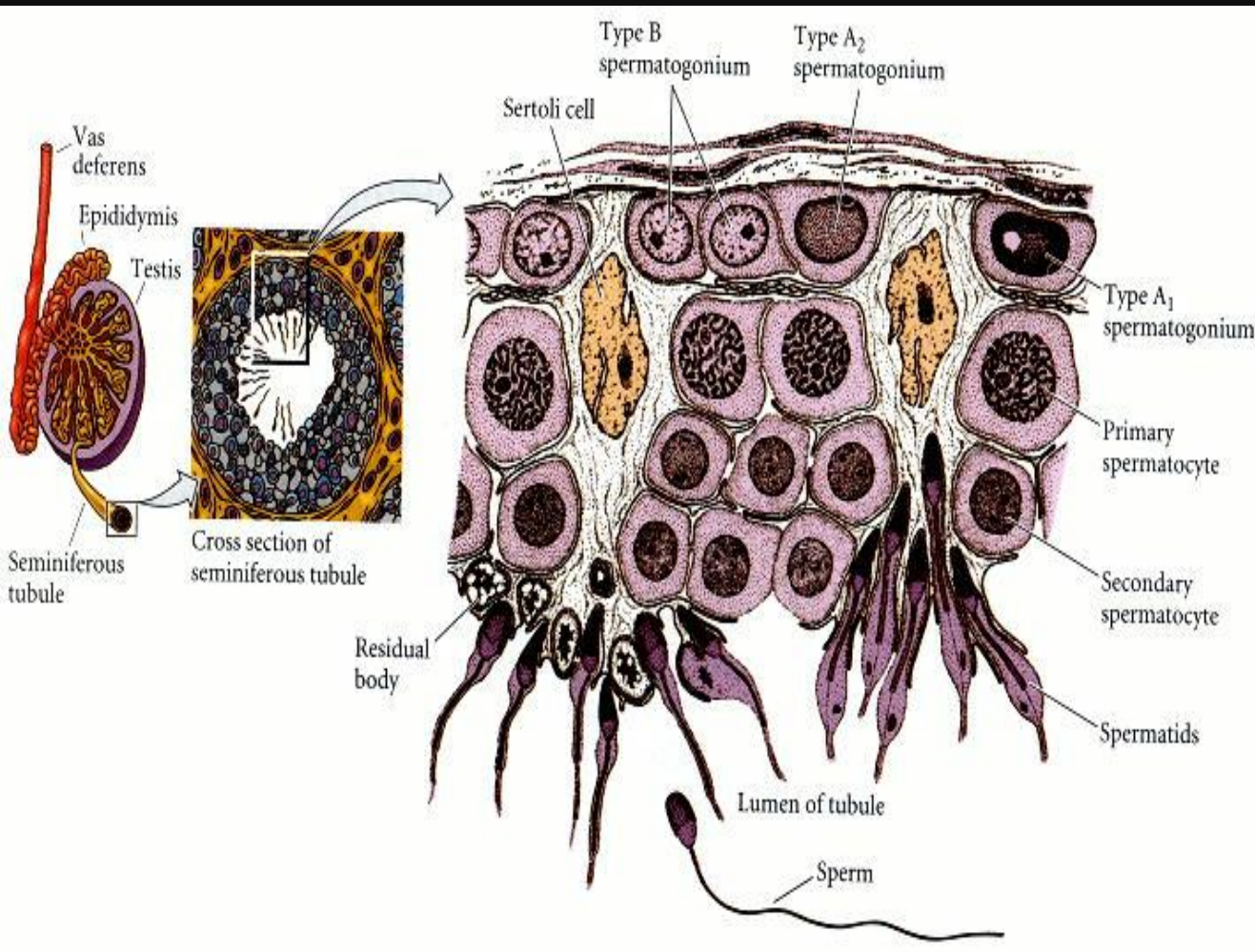
*Austrolebias charrua*

Berois y col. 2016

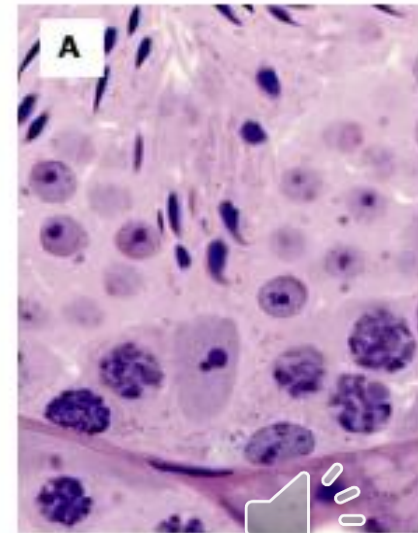




# Epitelio seminífero en mamíferos



Humanos: 65 días  
Ratón: 34,5 días



Espermatogonias: membrana basal  
Espermatozoides: luz del túbulo seminífero



*Rana esculenta*: 41 días

[www.naturfoto.cz](http://www.naturfoto.cz)

*Amphipolis kochii*: 14 días



BIODIDAC © P. Crawford, UPEI



**1678** Anton van Leeuwenhoek

- parásitos que vivían en el semen



**1685** Nicolas Hartsoeker

- embrión preformado



**1824** J.L. Prevost y J.B. Dumas

- existencia de espermatozoides en machos maduros

**1827** Karl Ernst Von Baer

- ovocito folículo canino



**1876** O. Hertwig y H. Fol

- demuestran entrada de espermatozoide al ovocito





## Inicio: desarrollo embrionario

# Ovogonias

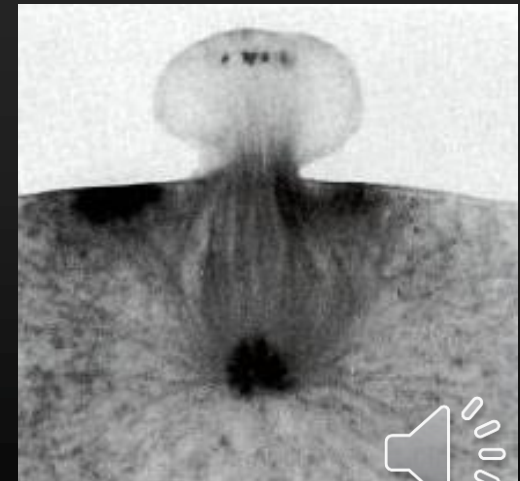
# Ovocito primario

detenido hasta madurez sexual  
(vitelo, cubiertas, gránulos corticales)

## Ovocito secundario

detenido en metafase II  
**ovulación**

(mayoría de los vertebrados)

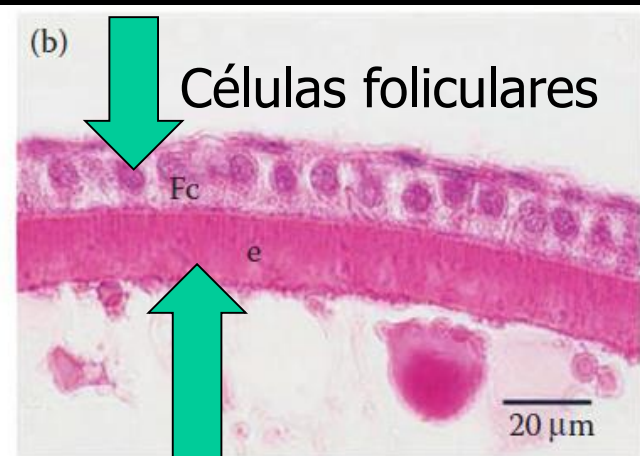
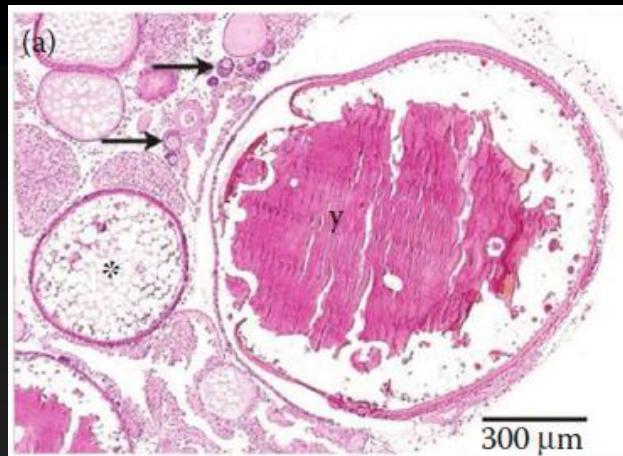


cuerpo polar

Figure 21-23 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

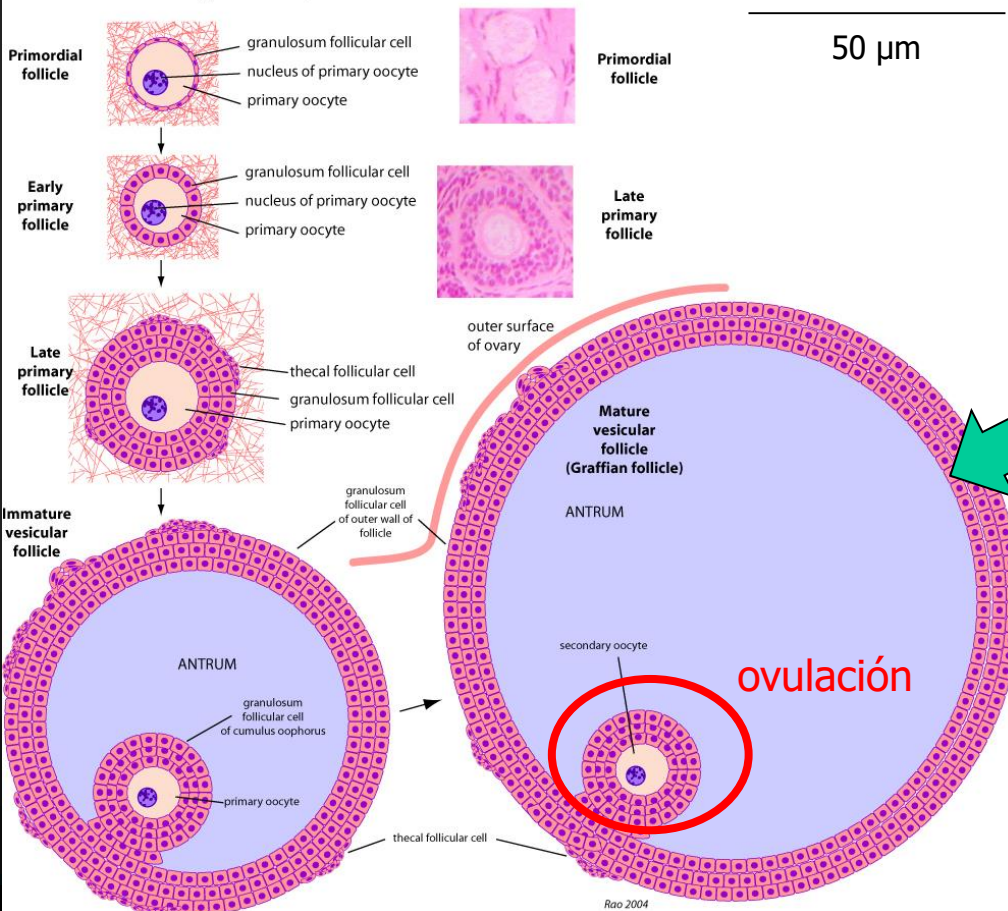


# Peces



Rodao y col. 2016

## Stages and components of ovarian follicles



Envoltura vitelina

Células foliculares

Ovulación:  
ovoito + células foliculares (granulosa)

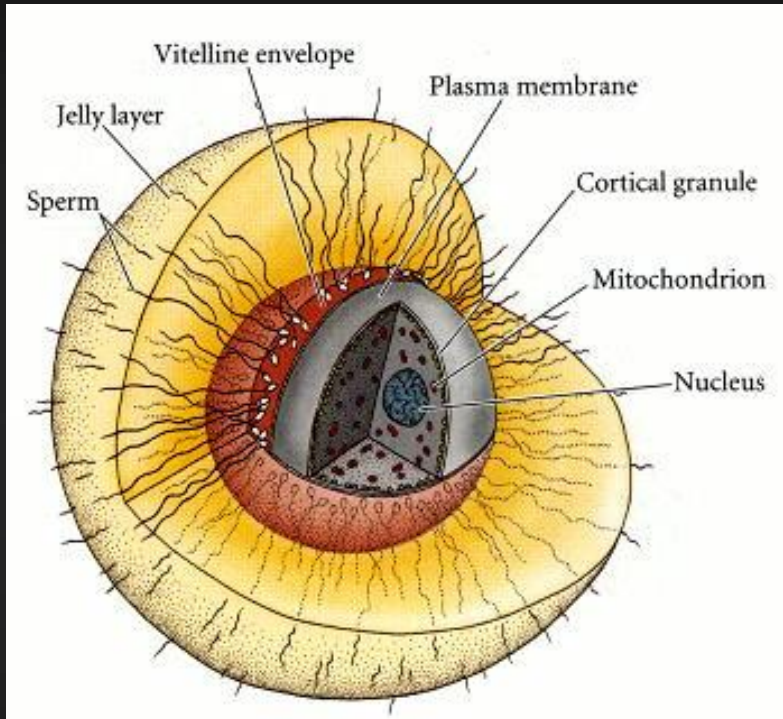
Zona pelúcida entre membrana ovocitaria  
y células foliculares (granulosa)

# Mamíferos



# Inversión en reproducción sexual: Costos/ beneficios

## Ovocito de erizo de mar



### Gran tamaño:

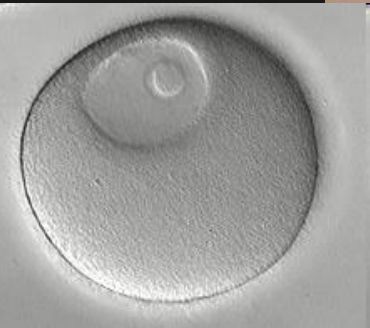
- divisiones asimétricas
- copias génicas extra
- genes ARNr amplificados
- vitelo (células accesorias)

- alto consumo energético
- pasaje del 50% de los genes
- riesgos de predación
- éxito evolutivo: beneficios





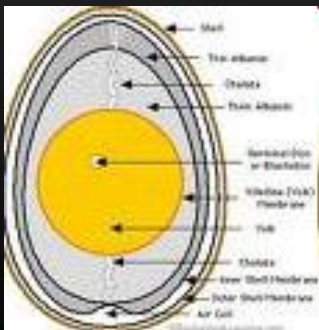
# Ovocito de mamífero: alecito



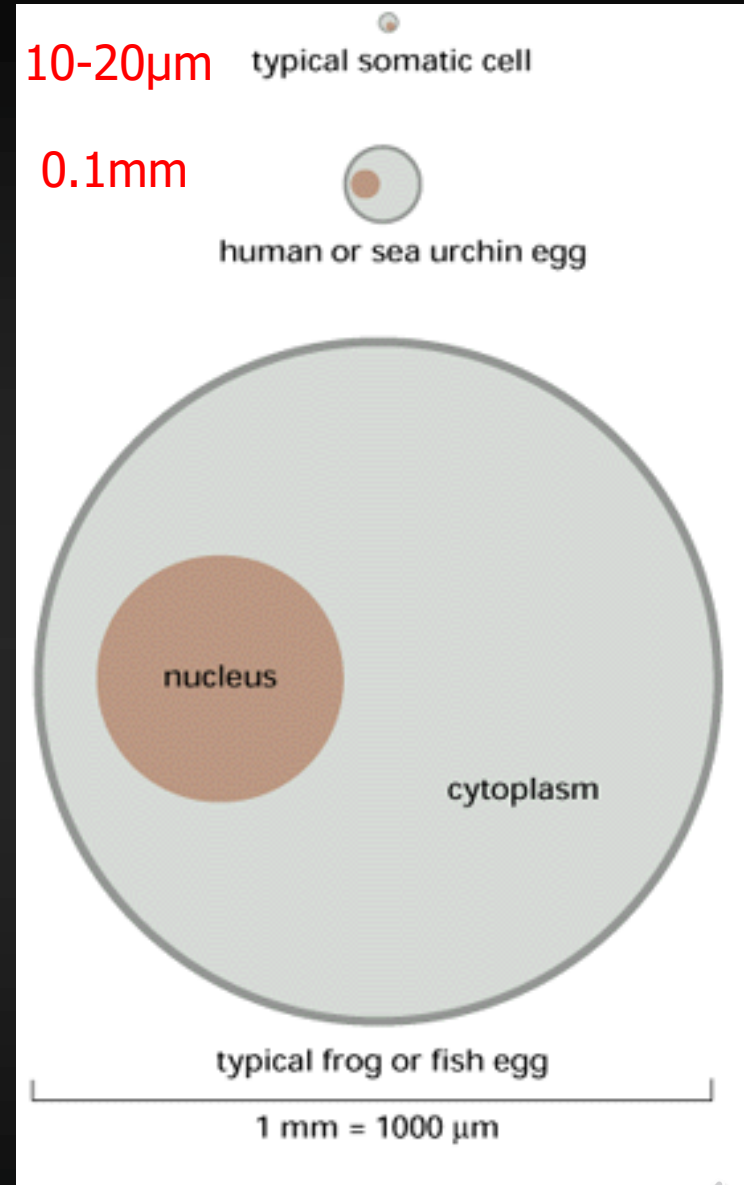
Ovocito de  
equinodermo: oligolecito



Ovocitos  
de anfibio: mesolecito



Ovocito  
de aves:  
telolecito



Dimensiones ovocitarias relativas



# Ovogénesis en mamíferos



**1870 - W. Waldeyer**

**Hipótesis:** ovogénesis cesa poco después del nacimiento

ovogonias =  $n^0$  limitado



**1951 - S. Zuckerman**

Dogma central de la biología reproductiva de mamíferos:



hembras mamíferas pierden la capacidad de producir ovocitos durante el desarrollo embrionario, por lo tanto, nacen con un número limitado de éstos.

\* Disparidad evolutiva = hecho curioso



# Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary

2004

Joshua Johnson\*, Jacqueline Canning\*, Tomoko Kaneko, James K. Pru & Jonathan L. Tilly



**Jonathan L. Tilly**

**Director**

Vincent Center for Reproductive Biology

**Chief**

Division of Research, Vincent Obstetrics & Gynecology Service,  
Massachusetts General Hospital

**Associate Professor**

Department of Obstetrics, Gynecology & Reproductive Biology,  
Harvard Medical School

Debate análogo (década de los 90) campo de la Neurociencia: neurogenesis en adultos

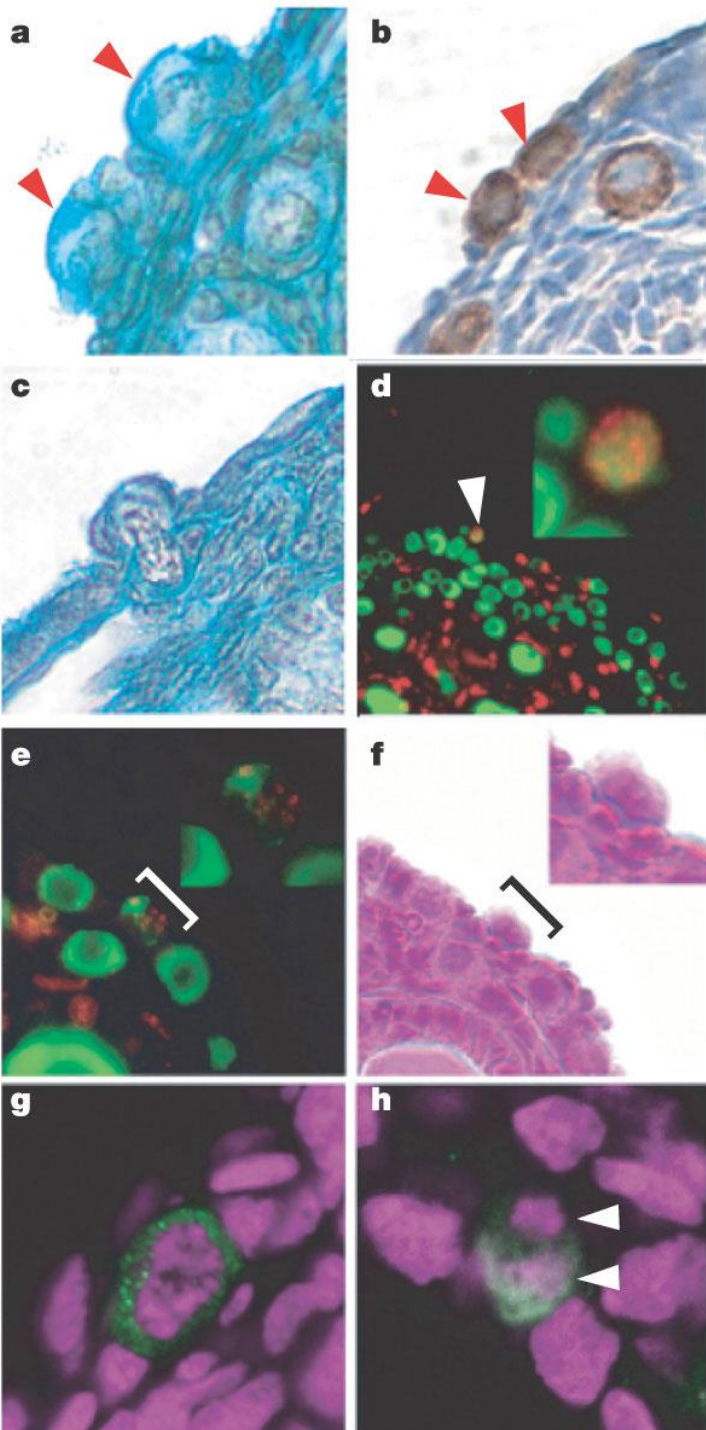
# ¿Células madre germinales en ovarios postnatales?



1. Análisis histológicos (ovarios juveniles y adultos)
2. Análisis de inmunodetección (proteína tipo Vasa)
3. Análisis del potencial proliferativo (inyección con BrdU, doble inmunodetección BrdU Vasa)



- existencia de células germinales presuntivas
- capacidad de proliferación





# Artículos publicados en 2020



## ARTICLE

<https://doi.org/10.1038/s41467-020-14936-3>

OPEN



## Single-cell analysis of human ovarian cortex identifies distinct cell populations but no oogonial stem cells

Magdalena Wagner<sup>1</sup>, Masahito Yoshihara<sup>2</sup>, Iyadh Douagi<sup>3,9</sup>, Anastasios Damdimopoulos<sup>4</sup>, Sarita Panula<sup>1</sup>, Sophie Petropoulos<sup>1,5</sup>, Haojiang Lu<sup>1</sup>, Karin Pettersson<sup>1</sup>, Kerstin Palm<sup>1,6</sup>, Shintaro Katayama<sup>2</sup>, Outi Hovatta<sup>1</sup>, Juha Kere<sup>2,7</sup>, Fredrik Lanner<sup>1,8,10</sup> & Paulina Damdimopoulou<sup>1,10</sup>

The human ovary orchestrates sex hormone production and undergoes monthly structural changes to release mature oocytes. The outer lining of the ovary (cortex) has a key role in defining fertility in women as it harbors the ovarian reserve. It has been postulated that putative oogonial stem cells exist in the ovarian cortex and that these can be captured by DDX4 antibody isolation. Here, we report single-cell transcriptomes and cell surface antigen profiles of over 24,000 cells from high quality ovarian cortex samples from 21 patients. Our data identify transcriptional profiles of six main cell types; oocytes, granulosa cells, immune cells, endothelial cells, perivascular cells, and stromal cells. Cells captured by DDX4 antibody are perivascular cells, not oogonial stem cells. Our data do not support the existence of germline stem cells in adult human ovaries, thereby reinforcing the dogma of a limited ovarian reserve.

## BRIEF COMMUNICATION

Open Access

## Ovary does harbor stem cells - size of the cells matter!

Deepa Bhartiya<sup>\*</sup> and Diksha Sharma



### Abstract

A recent study published in the journal *Nature Communications* from Karolinska Institute, Sweden was unable to detect stem cells in adult human ovarian cortex by single-cell RNAseq and by studying cell surface antigen profiles by flow cytometry studies. Their findings are startling since stem cells have been well characterized in the adult mammalian ovary of several species including mouse, rabbit, monkey, sheep, pig and humans. Ovarian stem cells include pluripotent, very small embryonic-like stem cells (VSELs) and slightly bigger ovarian stem cells (OSCs) which are easily visualized in smears obtained by gently scraping the ovary surface. The potential of ovarian stem cells to differentiate into oocyte-like structures in vitro and also resulting in the birth of mouse pups has been reported. A possible role of ovarian VSELs in initiation of ovarian cancers has also been delineated. The ovarian stem cells can also be collected by enzymatic digestion of ovarian tissue for various studies, taking care to always pellet the cells suspension at 1000 g since this high speed is required to collect the small-sized stem cell populations (VSELs & OSCs) with high nucleo-cytoplasmic ratio. These stem cells invariably get discarded when cells suspension is spun at lower speed. The cells were spun at 300 g for various experiments in the Karolinska study and this is the underlying reason for their negative results. Stem cells were inadvertently and unknowingly discarded and never got analyzed by single-cell RNAseq and flow cytometry experiments. To conclude, stem cells surely exist in adult mammalian ovary and their role during neo-oogenesis and primordial follicle assembly under physiological conditions is currently being investigated.

**Keywords:** Ovary, Stem cells, Very small embryonic-like stem cells (VSELs), Ovarian stem cells (OSCs)

....aún en debate...



# Dimorfismo sexual en la gametogénesis de mamíferos

## *Ovogénesis*

Meiosis iniciada en etapa embrionaria

Un solo gameto funcional

Finalización de la meiosis demora meses o años  
(duración: especie-específica)

Diferenciación gamética ocurre en fase diploide

## *Espermatogénesis*

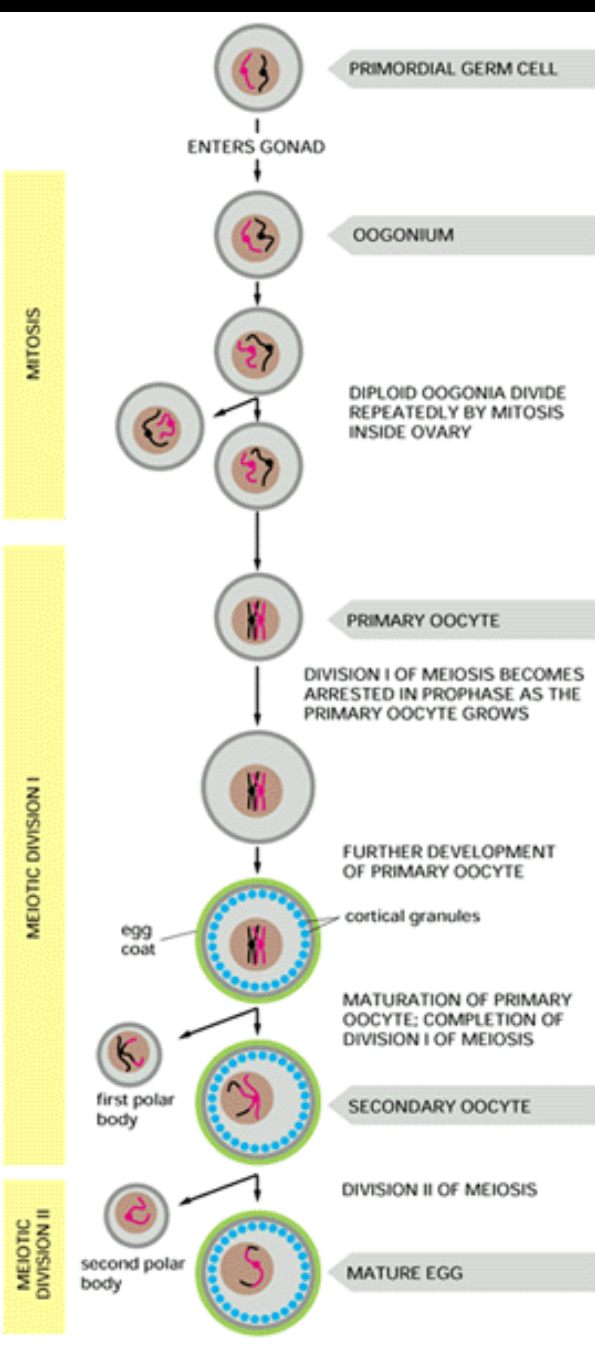
Meiosis iniciada en madurez sexual

Cuatro gametos funcionales

Meiosis completada en días o semanas (duración: especie-específica)

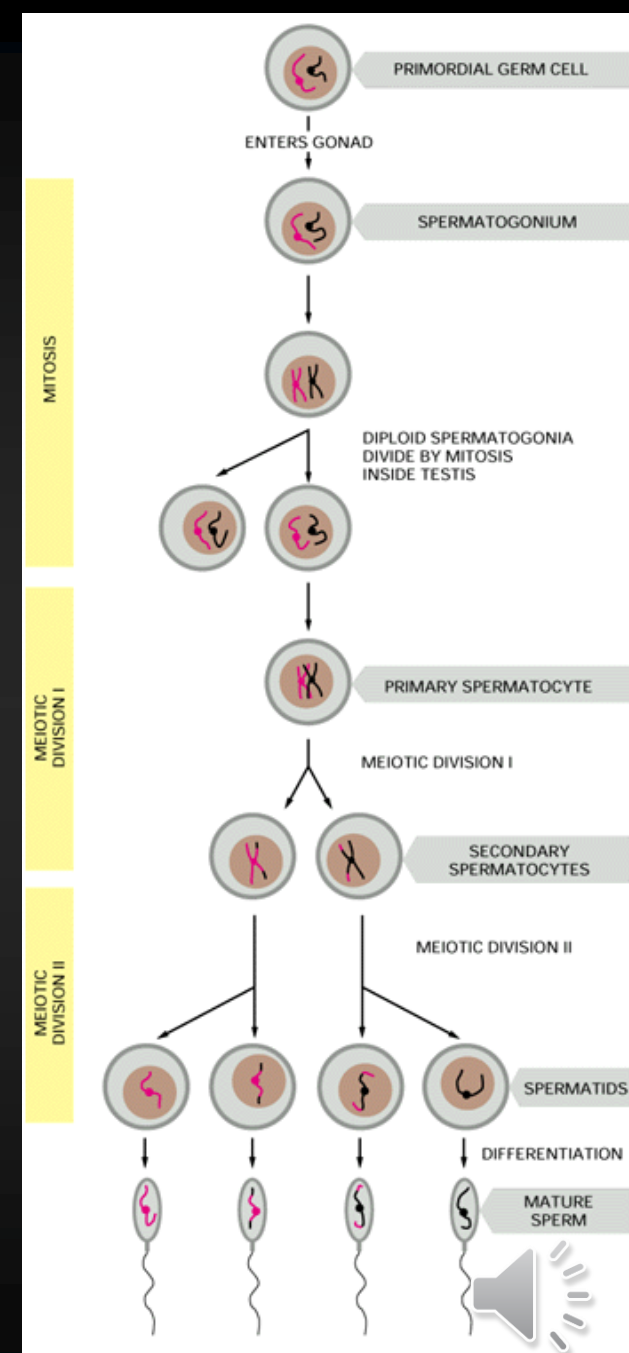
Diferenciación gamética ocurre en fase haploide





# Ovocitos y espermatozoides

altamente especializados  
optimización opuesta





*“Los elementos que se unen son simples células, cada una al borde de la muerte, pero mediante su unión un nuevo individuo se forma, el cual constituye un nexo en el eterno proceso de la vida”*

F.R. Lillie, 1919.



# Fecundación

*unión de gametos*

- 1) reproducción (creación de nuevo organismo)
- 2) combinación de genes maternos y paternos



# Modelos de estudio:



# Etapas

- 1. Reconocimiento espermatozoide-ovocito**
- 2. Regulación de la entrada de los espermatozoides al ovocito**
- 3. Fusión del material genético**
- 4. Activación del metabolismo ovocitario e inicio del desarrollo embrionario**



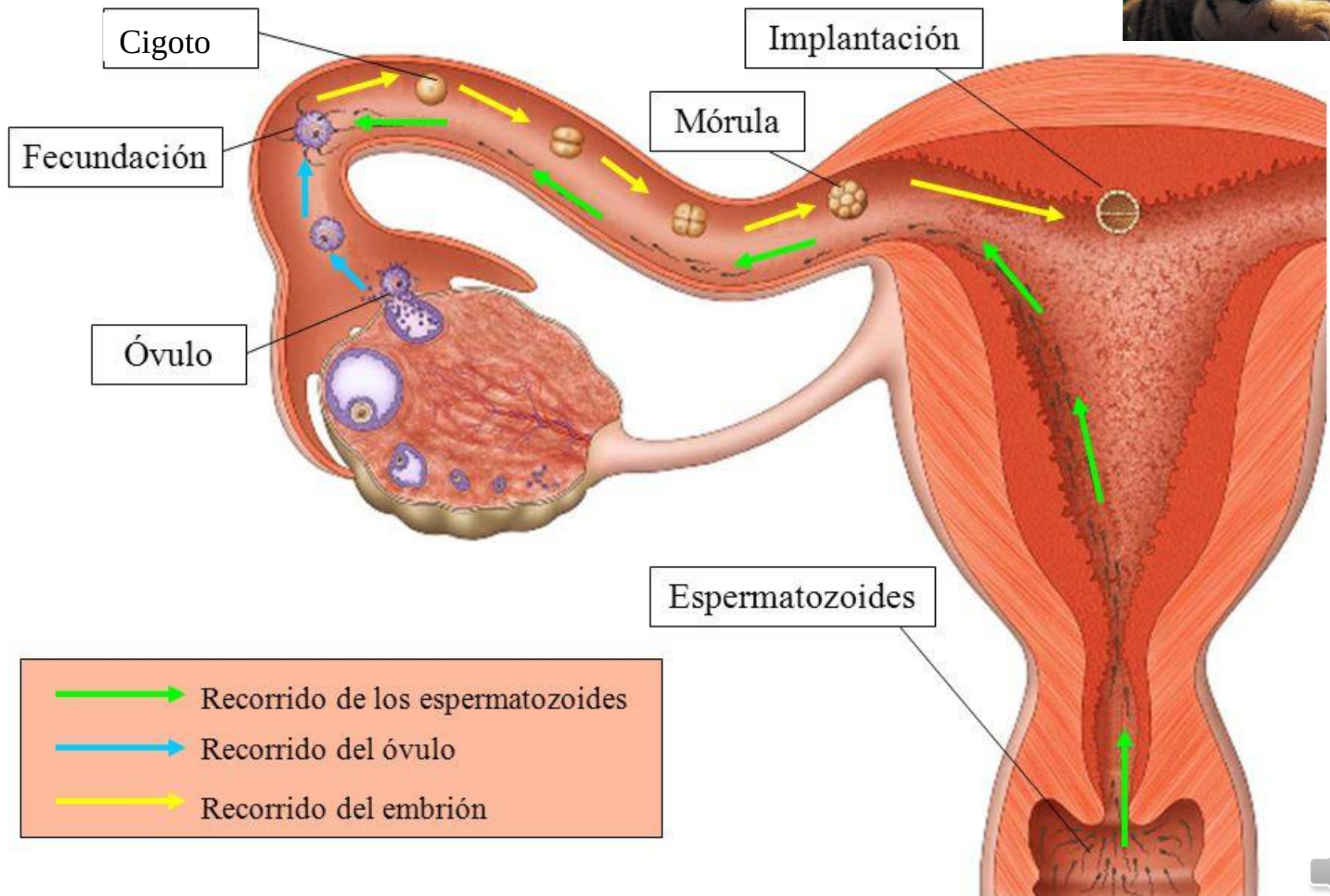


¿Dónde ocurren estas etapas?



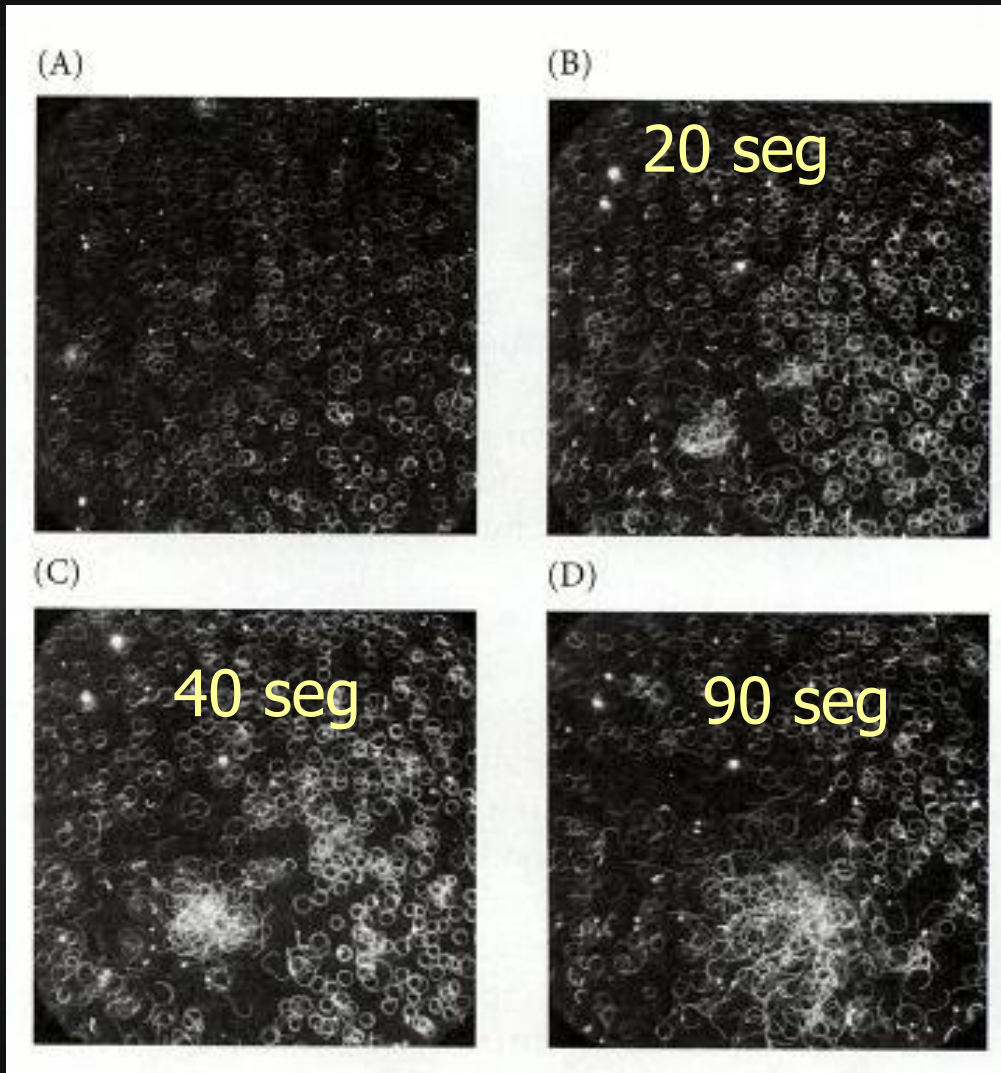


# Fecundación e implantación

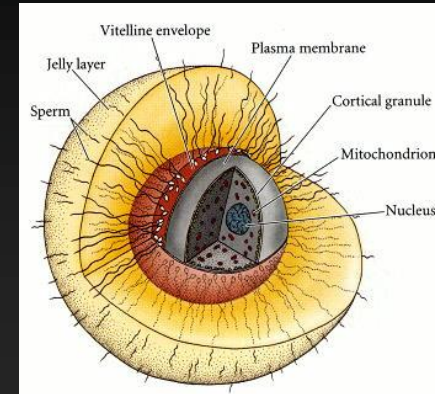




# 1. Reconocimiento espermatozoide-ovocito



1 nl de resact 10 nM



Erizo de mar

- Atracción especie-específica (quimiotaxis)

*Arbacia punctulata*

Resact: cubierta gelatinosa (14 aa)

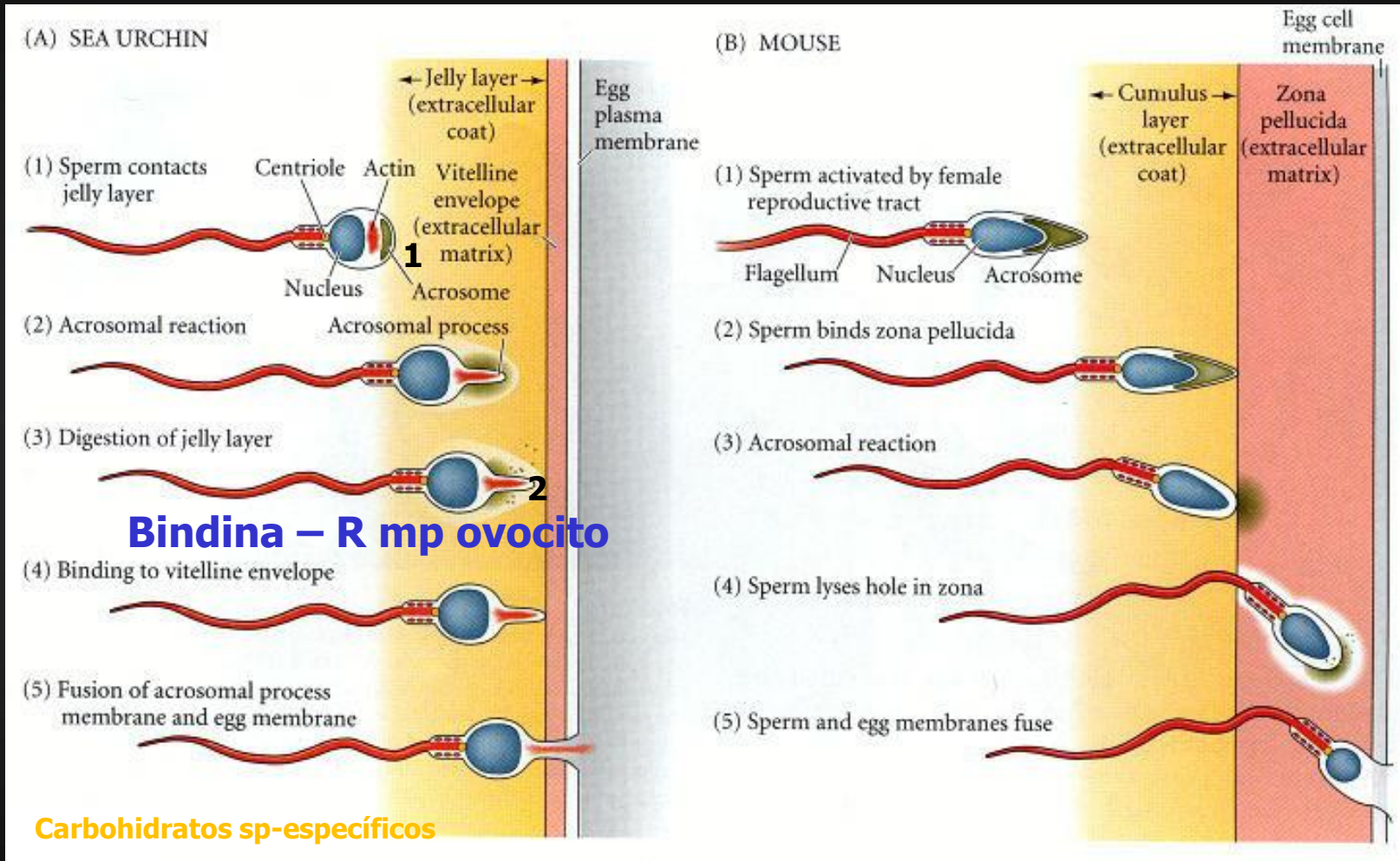
Mamíferos

- Atracción a sitios más cálidos (termotaxis)
- Quimiotaxis: 2da etapa





# Eventos que conducen a la unión de los gametos

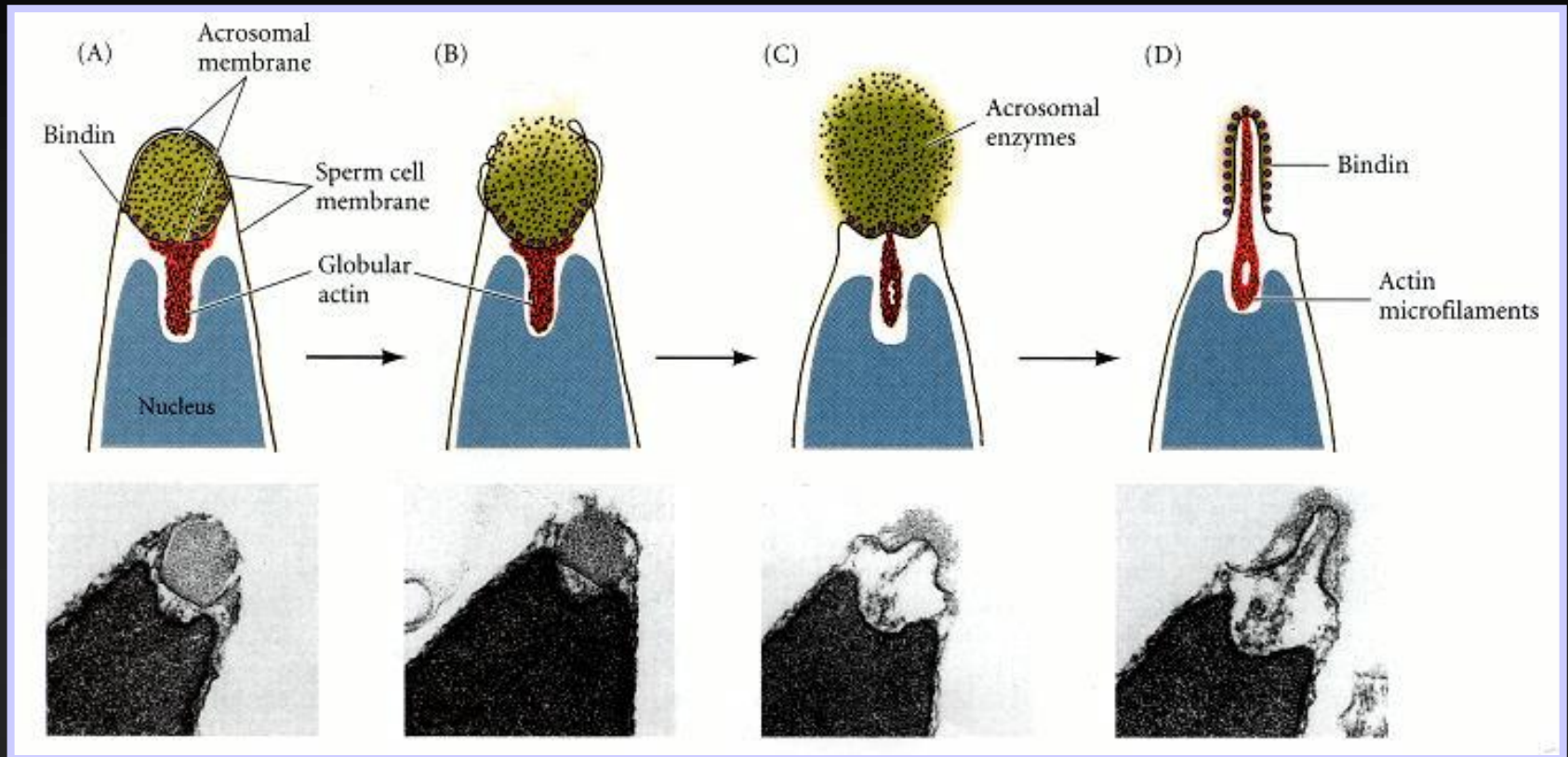


Erizo de mar

Ratón (capacitación)



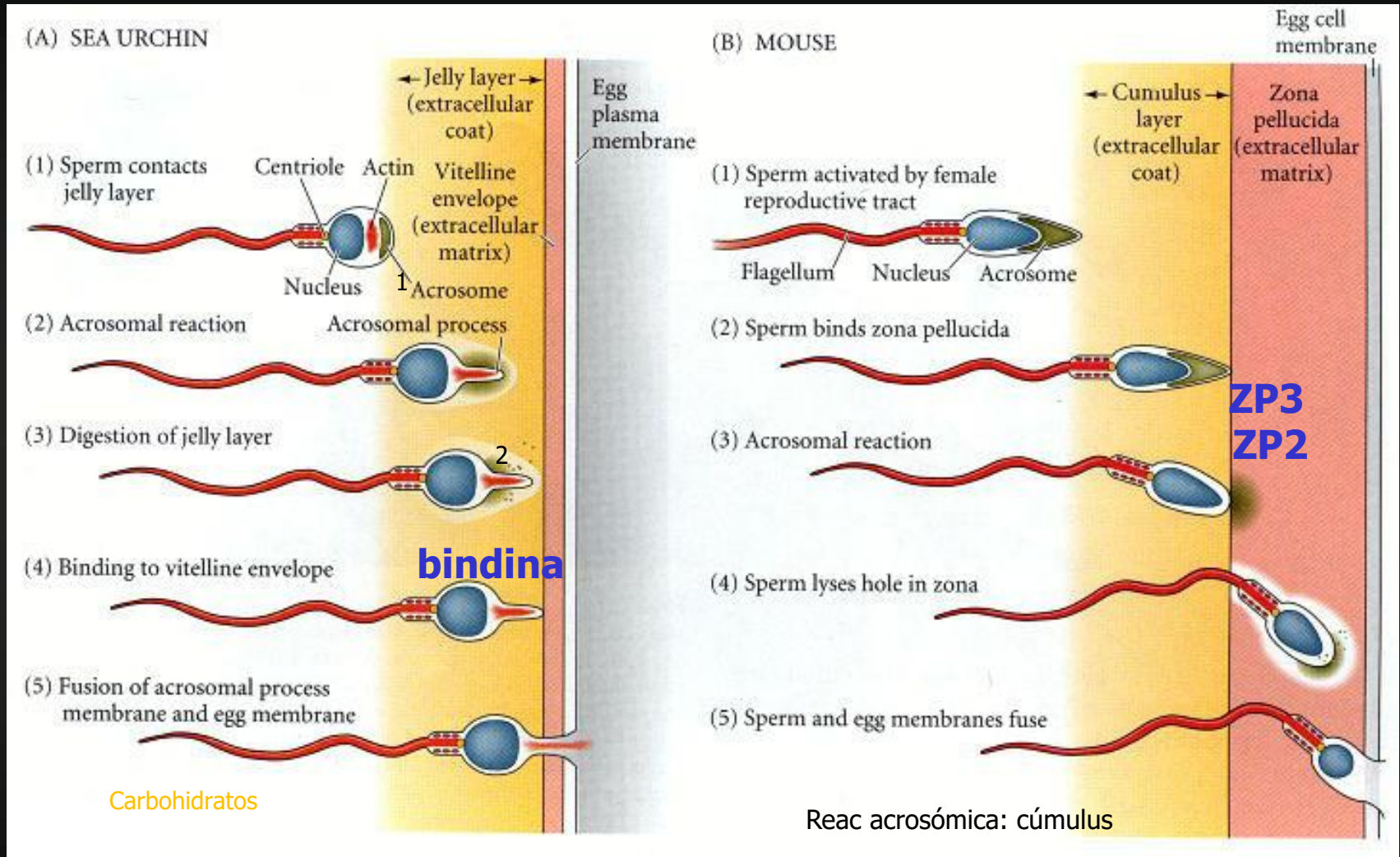
# Reacción acrosómica (erizo de mar)



- Interacción R membrana spz – polisacáridos de cubierta gelatinosa altamente especie-específicos
- Unión a receptor spz activa:
  1. canales de calcio de membrana plasmática (entrada desde exterior)
  2. fosfolipasa C – IP3 – liberación  $\text{Ca}^{2+}$  (acrosoma): exocitosis
- Extensión del proceso acrosómico: polimerización de actina



# Eventos que conducen a la unión de los gametos

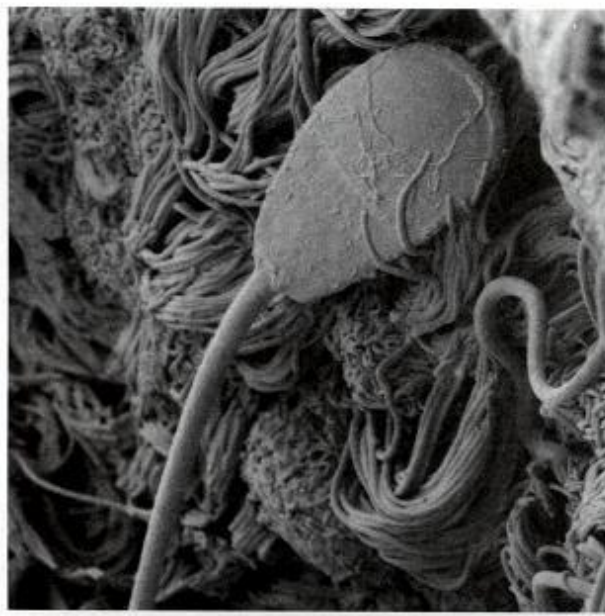


Erizo de mar

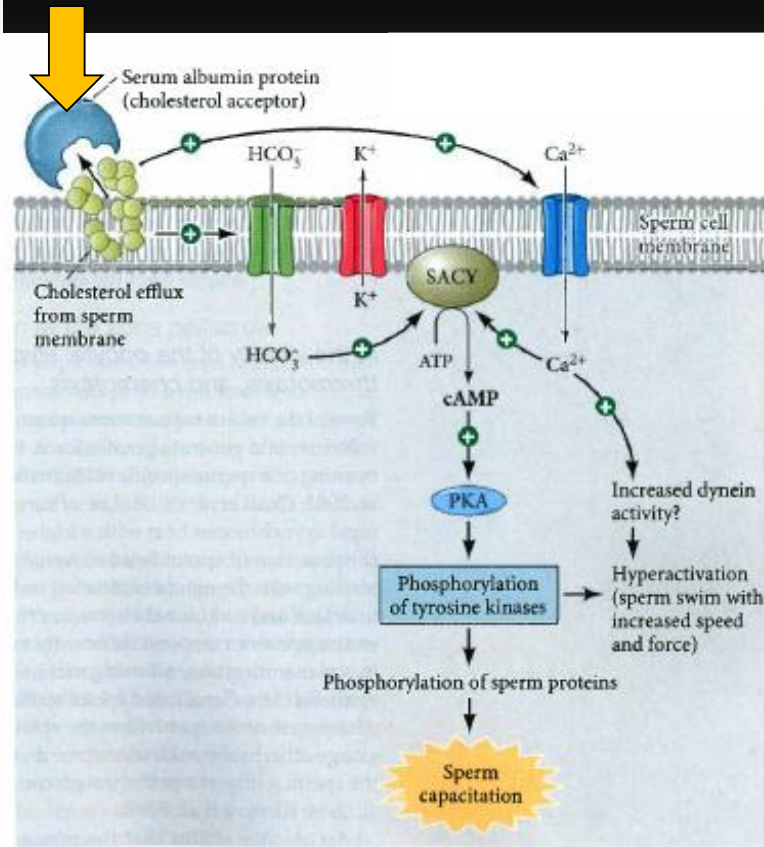
Ratón (capacitación)







# Espermatozoide mamífero en el tracto reproductor femenino



**FIGURE 7.26** Hypothetical model for mammalian sperm capacitation. The pathway is modulated by the removal of cholesterol from the sperm cell membrane, which allows the influx of bicarbonate ions ( $\text{HCO}_3^-$ ) and calcium ions ( $\text{Ca}^{2+}$ ). These ions activate adenylyl cyclase (SACY), thereby elevating cAMP concentrations. The high cAMP levels then activate protein kinase A (PKA). Active PKA phosphorylates several tyrosine kinases, which in turn phosphorylate several sperm proteins, leading to capacitation. Increased intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  also activates the phosphorylation of these proteins, as well as contributing to the hyperactivation of the sperm. (After Visconti et al. 2011.)

Gilbert, 2016

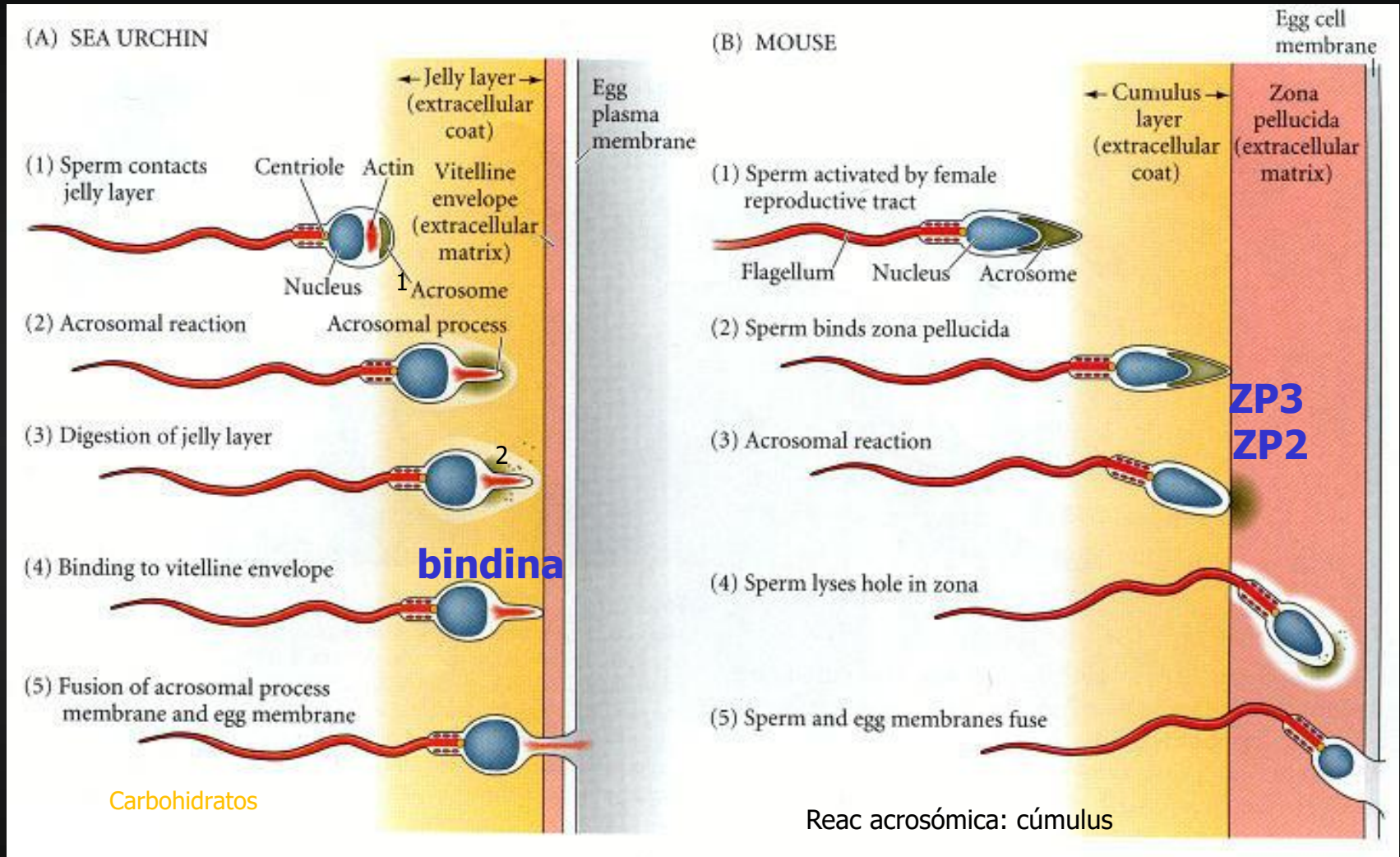
## Capacitación

- remoción de colesterol (relocalización de balsas lipídicas: región anterior)
- reorganización y pérdida de proteínas
- hiperpolarización (pérdida de  $\text{K}^+$  permitiría apertura de canales de calcio)
- fosforilación de proteínas
- membrana acrosoma en contacto con mp





# Eventos que conducen a la unión de los gametos

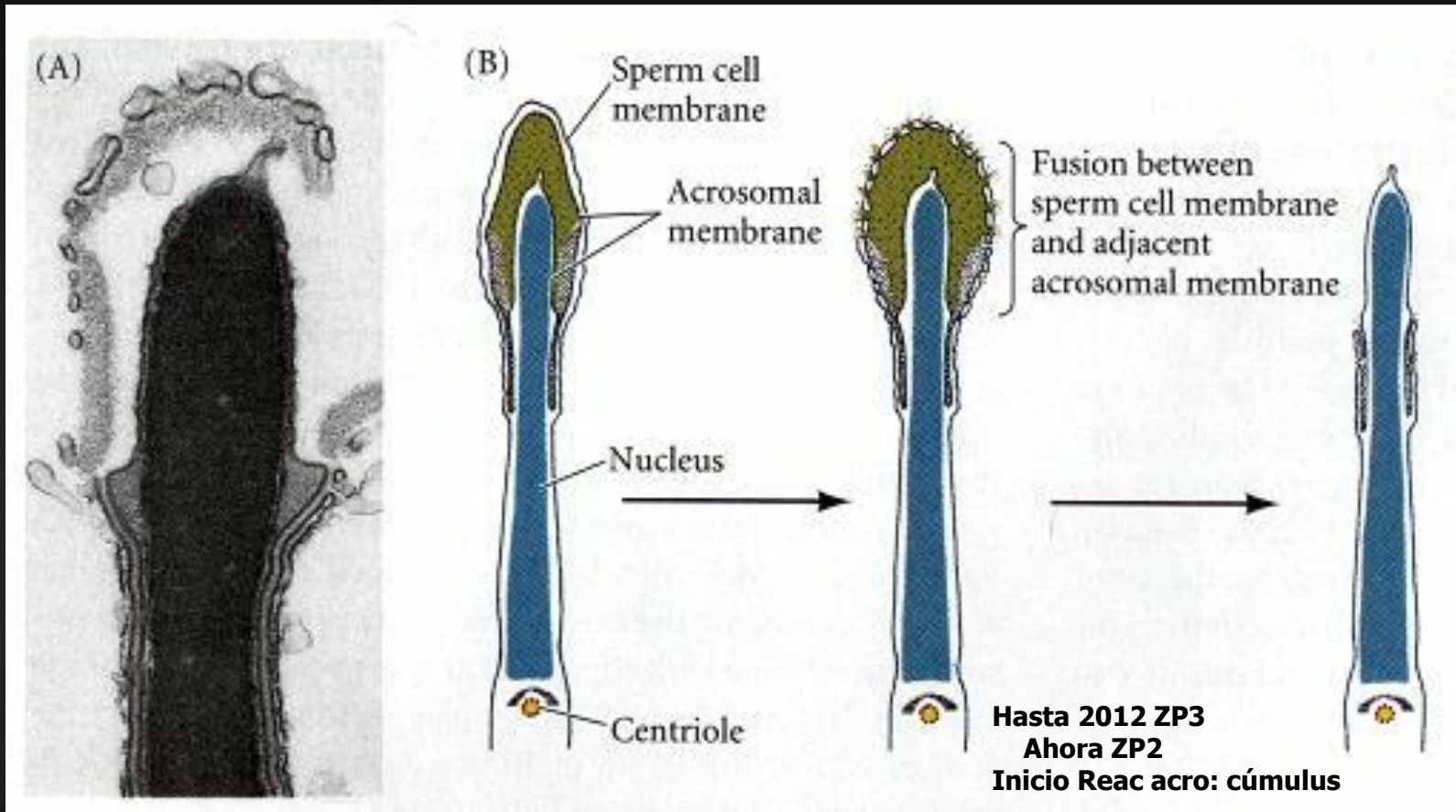


Erizo de mar

Ratón (capacitación)



# Mamíferos

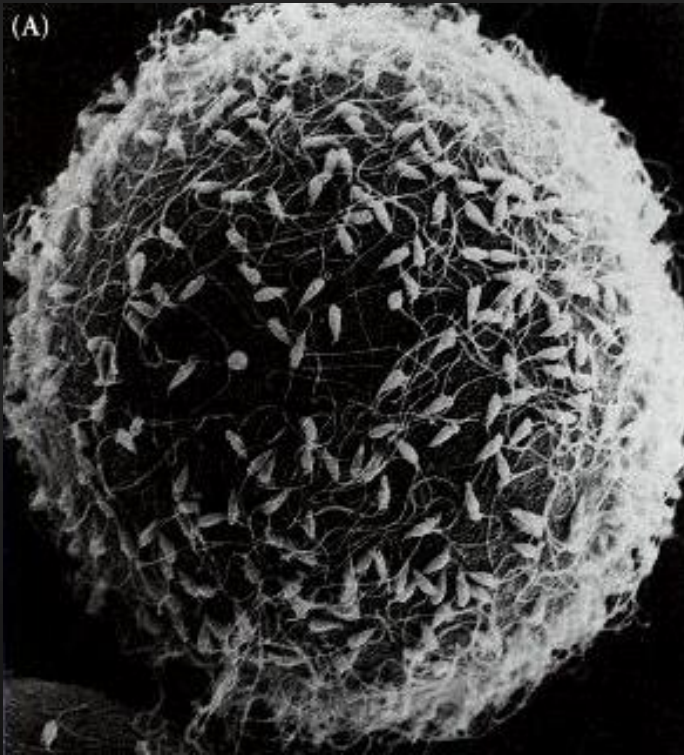


- Receptores para ZP3/ZP2 en spz – unión con ZP3/ZP2 de zona pelúcida:

activación de proteína G en spz: fosfolipasa C / PIP2 – IP3/DAG –  
apertura de canales de calcio (acrosoma): exocitosis de vesícula acrosómica



# ¿En qué sitio del ovocito ingresa el espermatozoide?



Anfibios:  
generalmente por el polo animal

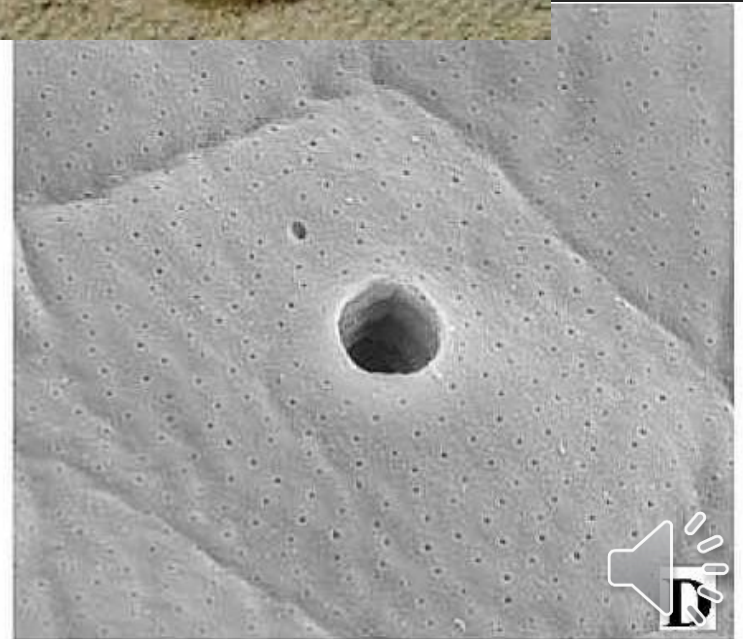
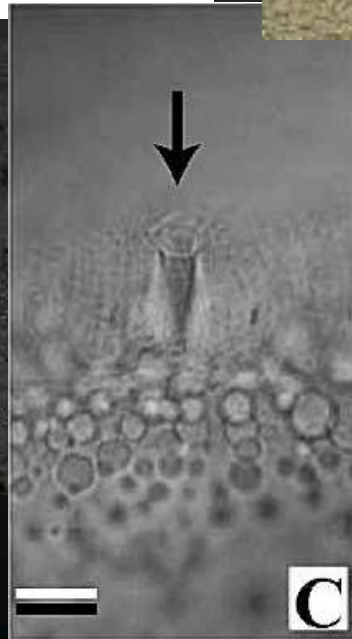
Mayoría de invertebrados y mamíferos  
ingresan por cualquier lugar

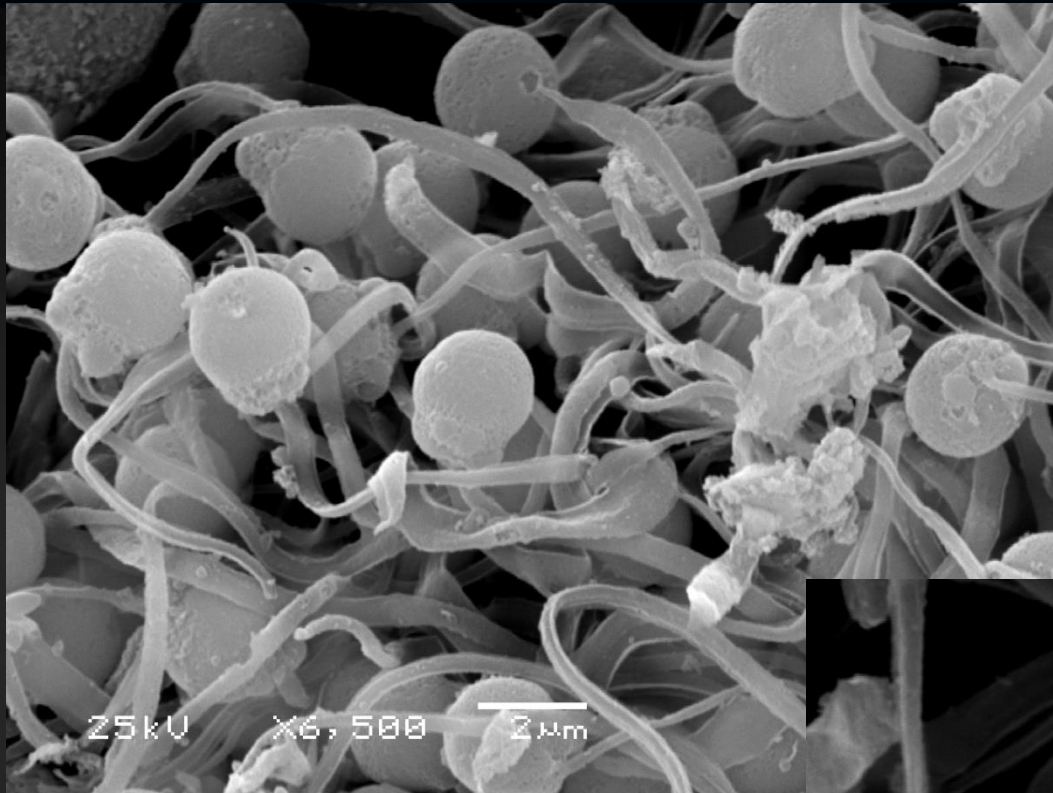




Insectos  
Cefalópodos  
Peces teleósteos.....

**micropilo**

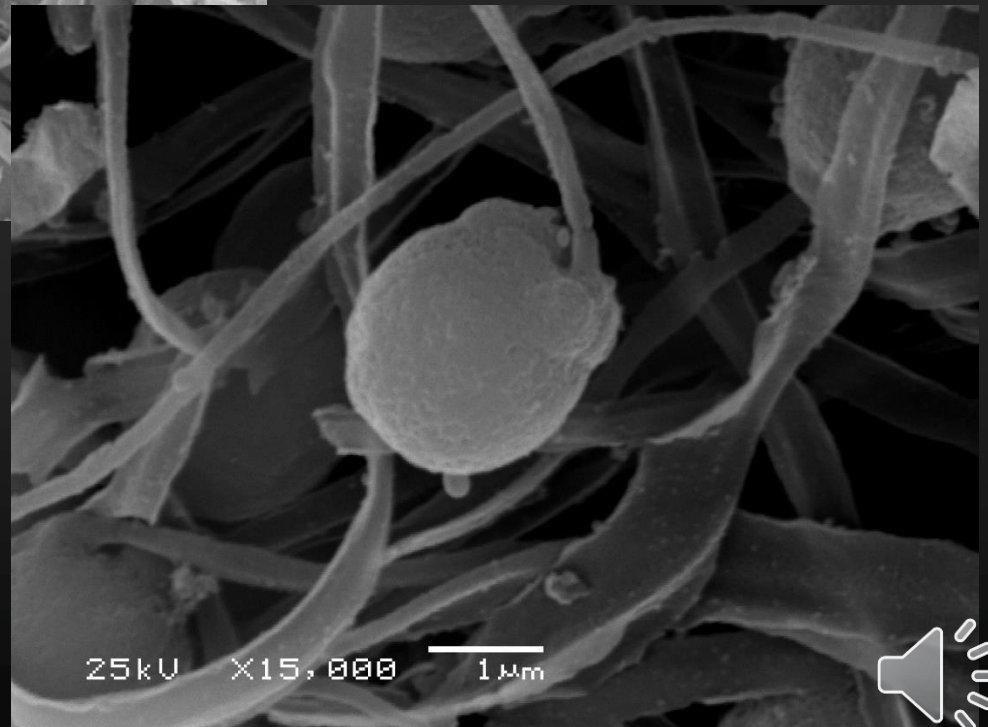




Espermatozoides sin  
acrosoma:

peces teleósteos

*Austrolebias viarius*



## 2. Regulación de la entrada de los espermatozoides al ovocito

**Fusión de gametos** (proceso activo: proteínas fusogénicas)

- erizo de mar: bindina
- mamíferos: CD9 ovocitaria  
izumo espermática  
otras

Importancia...





# Prevención de la poliespermia:

## **bloqueo primario**

despolarización transitoria +20 mV en 1 a 3 segundos: influjo de iones sodio

## **bloqueo secundario**

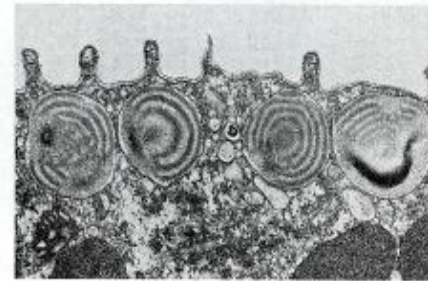
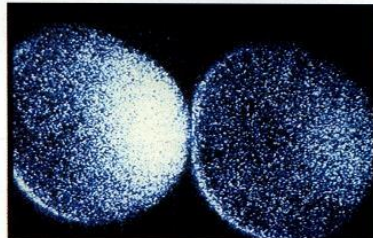
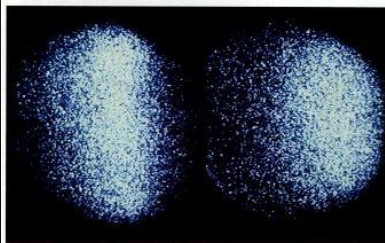
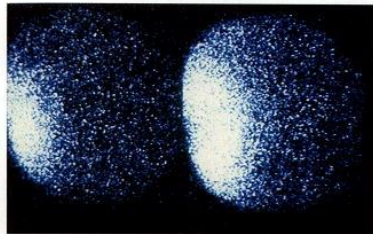
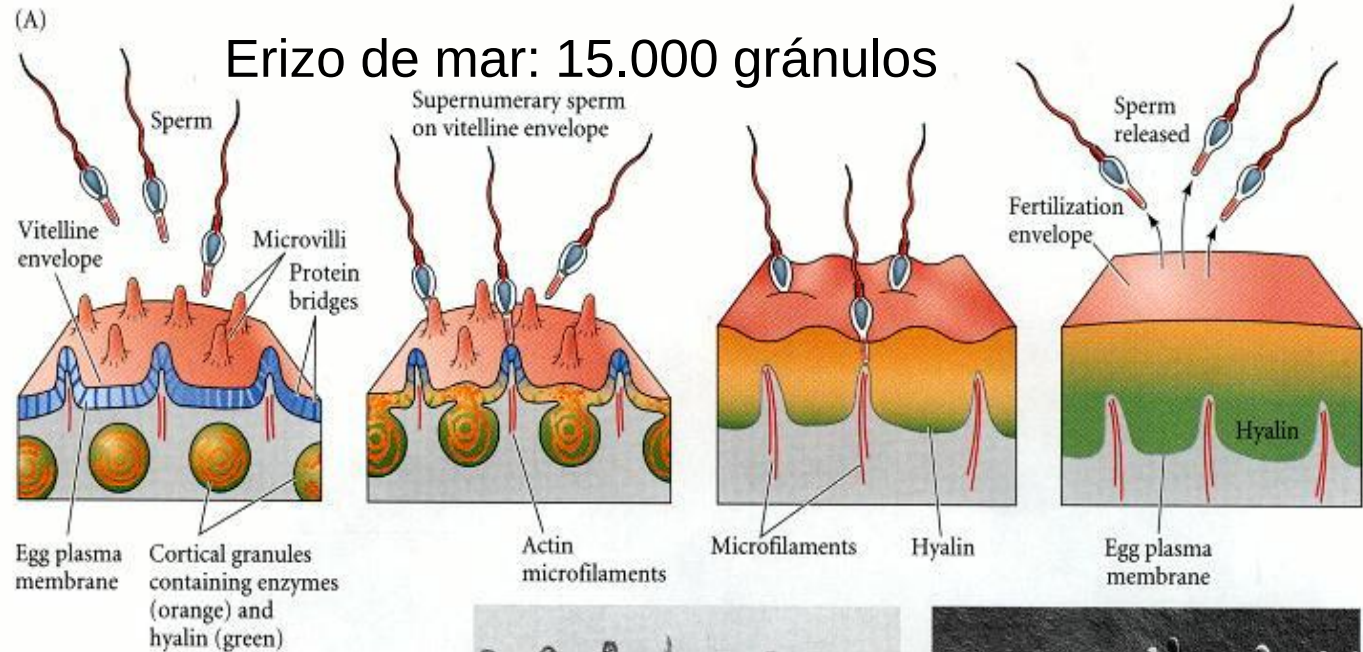
mecánico: en el minuto post-fecundación



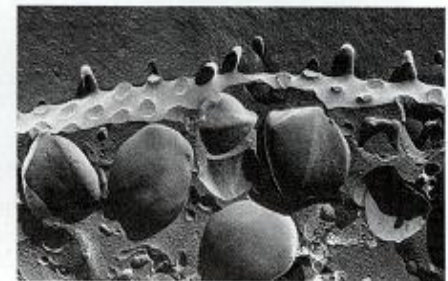
# Exocitosis de gránulos corticales: incremento de calcio i unión espermatozoide – membrana ovocitaria

Proteasas  
Mucopolisacáridos  
peroxidasa

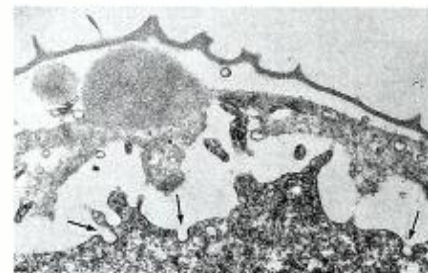
Onda de  
liberación de  
calcio  
30 segundos



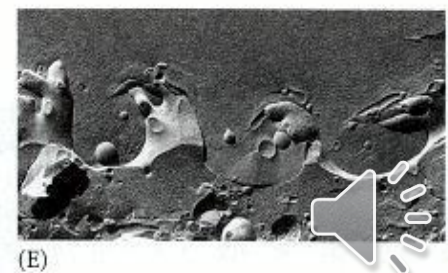
(B)



(C)



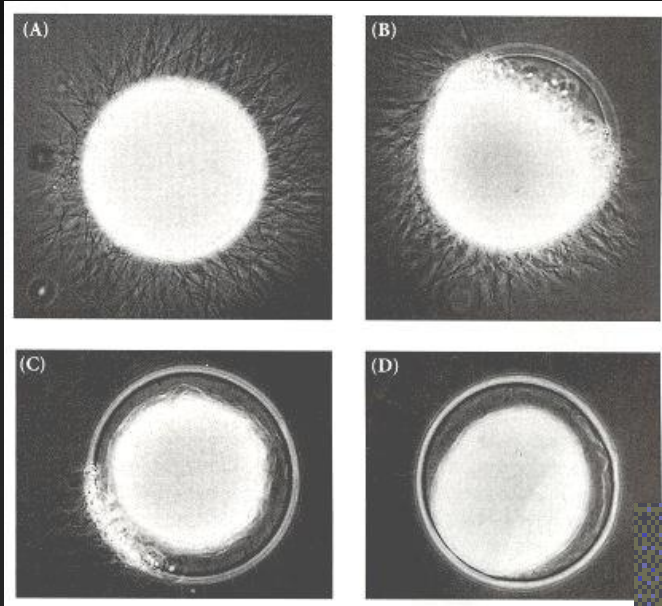
(D)



(E)

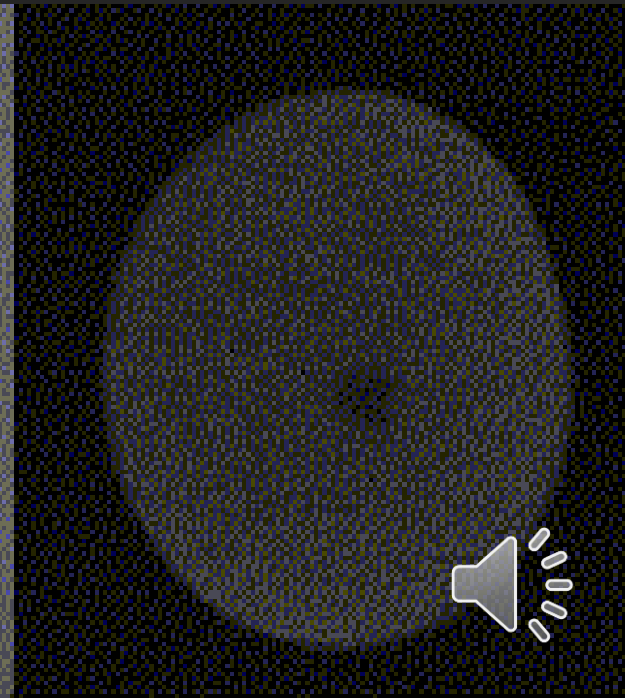
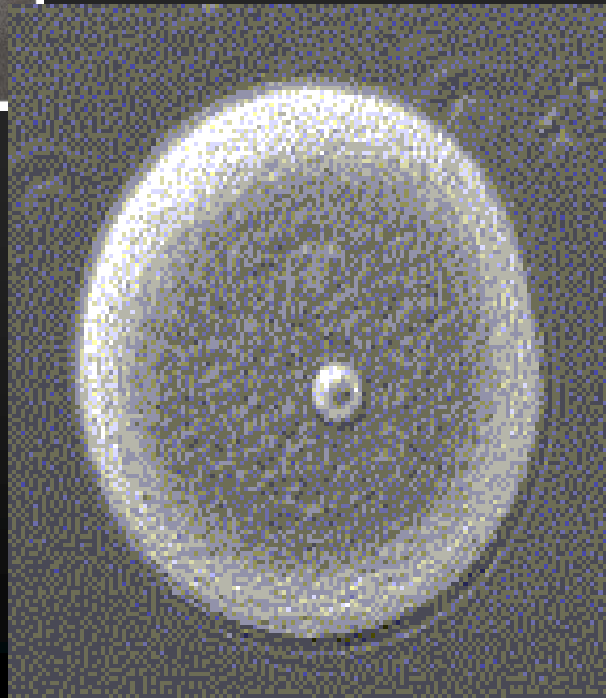


# Formación de la envoltura de fecundación en erizo de mar



Gilbert, 2013

Duración total: 1 minuto





# Mamíferos

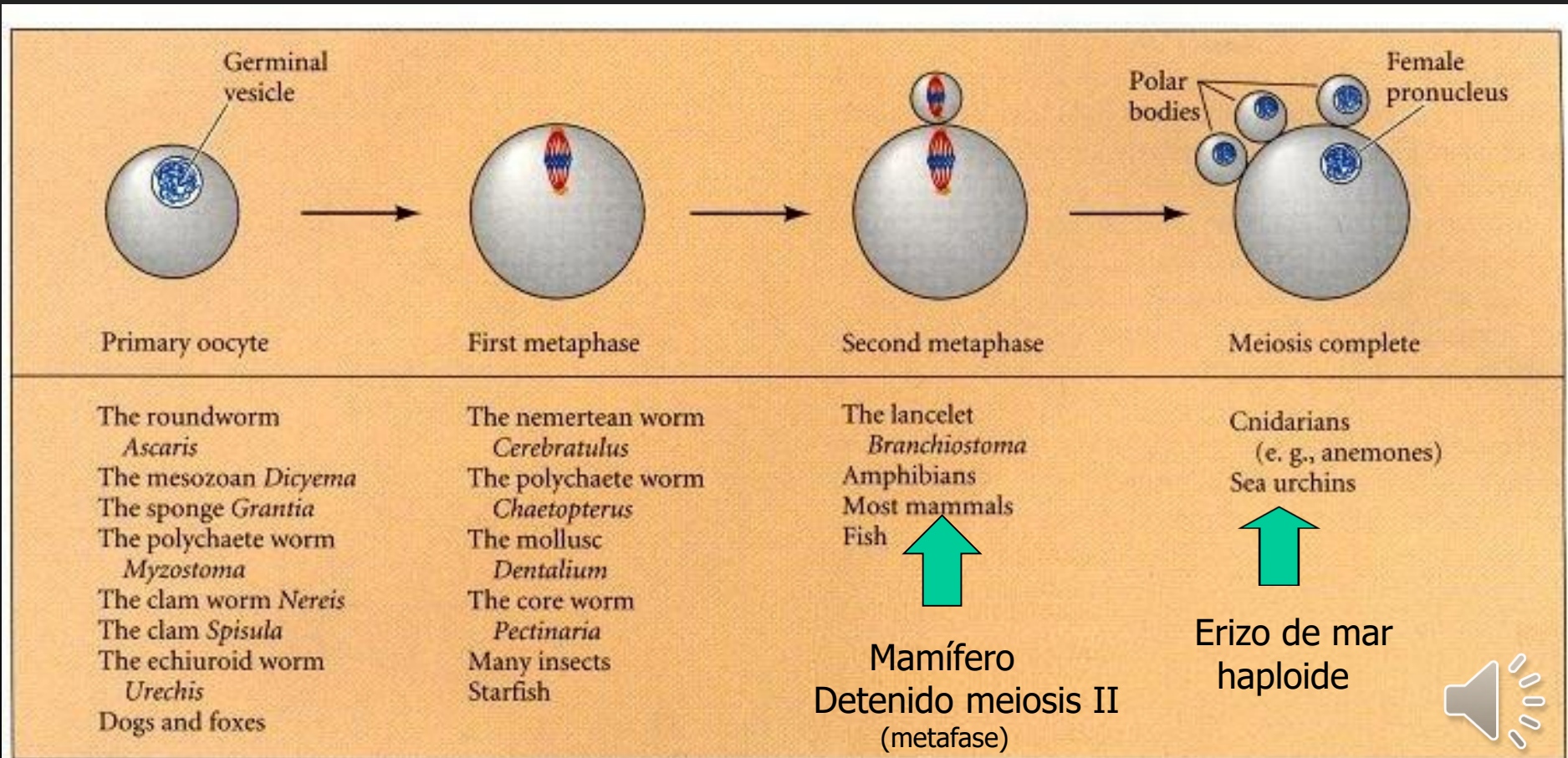


Fertilized oocyte (egg)



# 3. Fusión del material genético

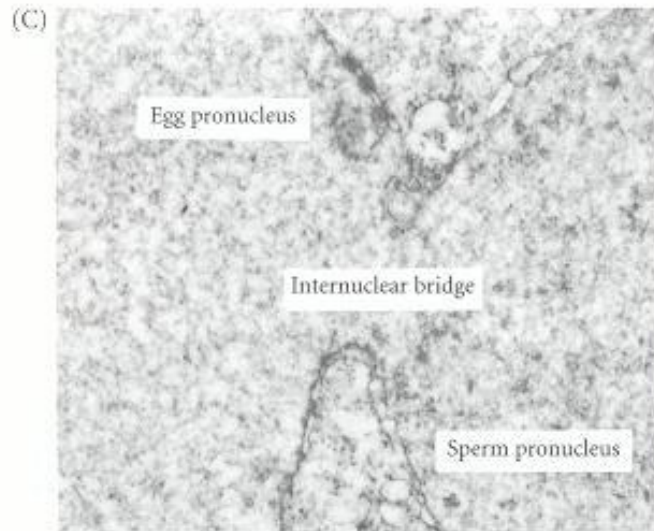
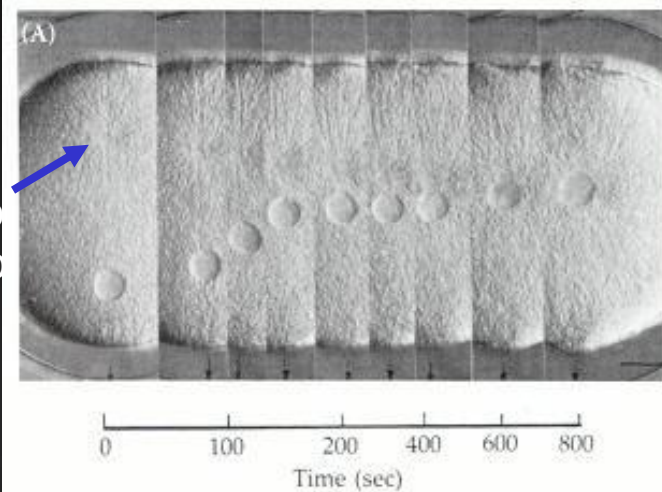
Estadio de maduración ovocitaria en el momento de la fecundación en diferentes especies animales





# Eventos nucleares durante la fecundación

(erizo de mar)



- haploides
- descondensación
- microtúbulos: migración
- fusión: núcleo cigoto





# Pronúcleos

(mayoría de los mamíferos)

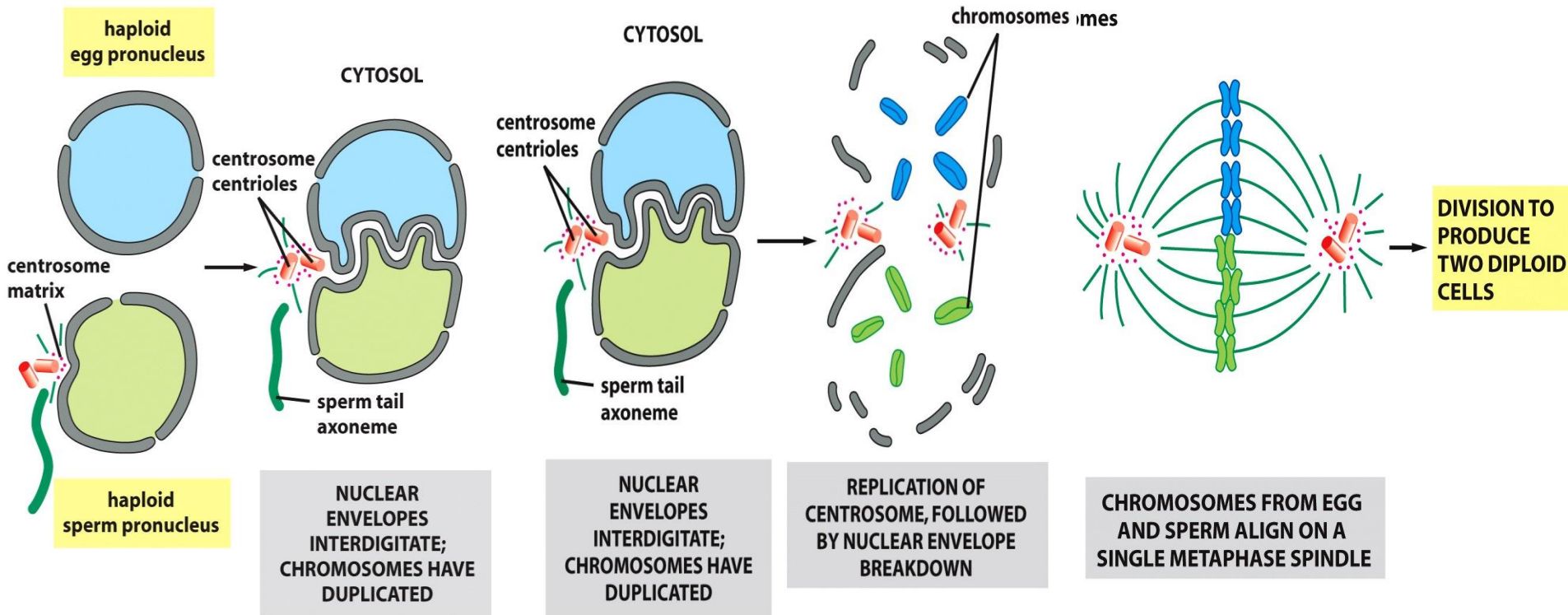


Figure 21-35 part 1 of 3 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Figure 21-35 part 2 of 3 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

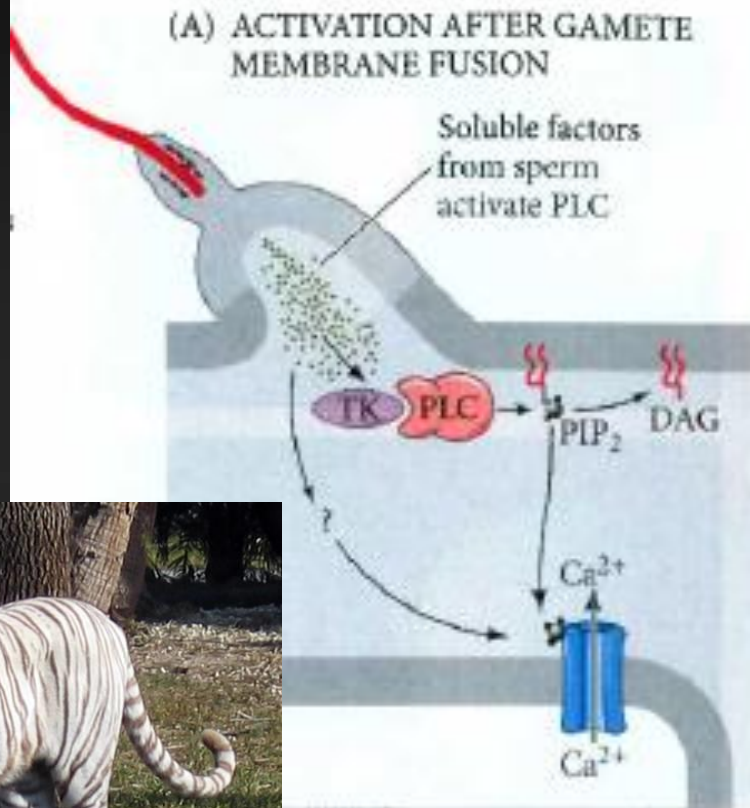
land Science 2008)

- finalización de la meiosis II
- descondensación
- migración (12 horas aprox.)
- el material genético permanece aislado (primera división)

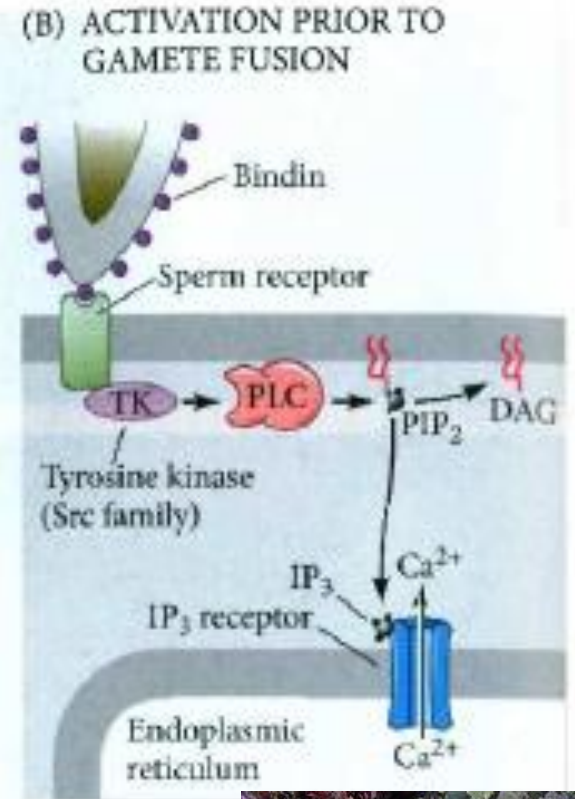


# 4. Activación del metabolismo ovocitario

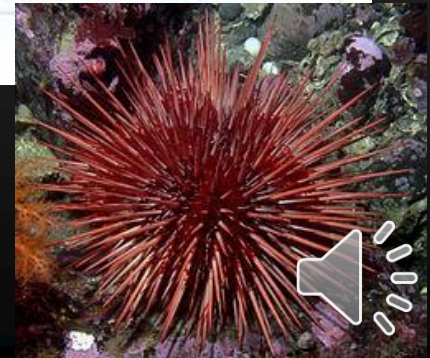
Jacques Loeb, 1899-1902



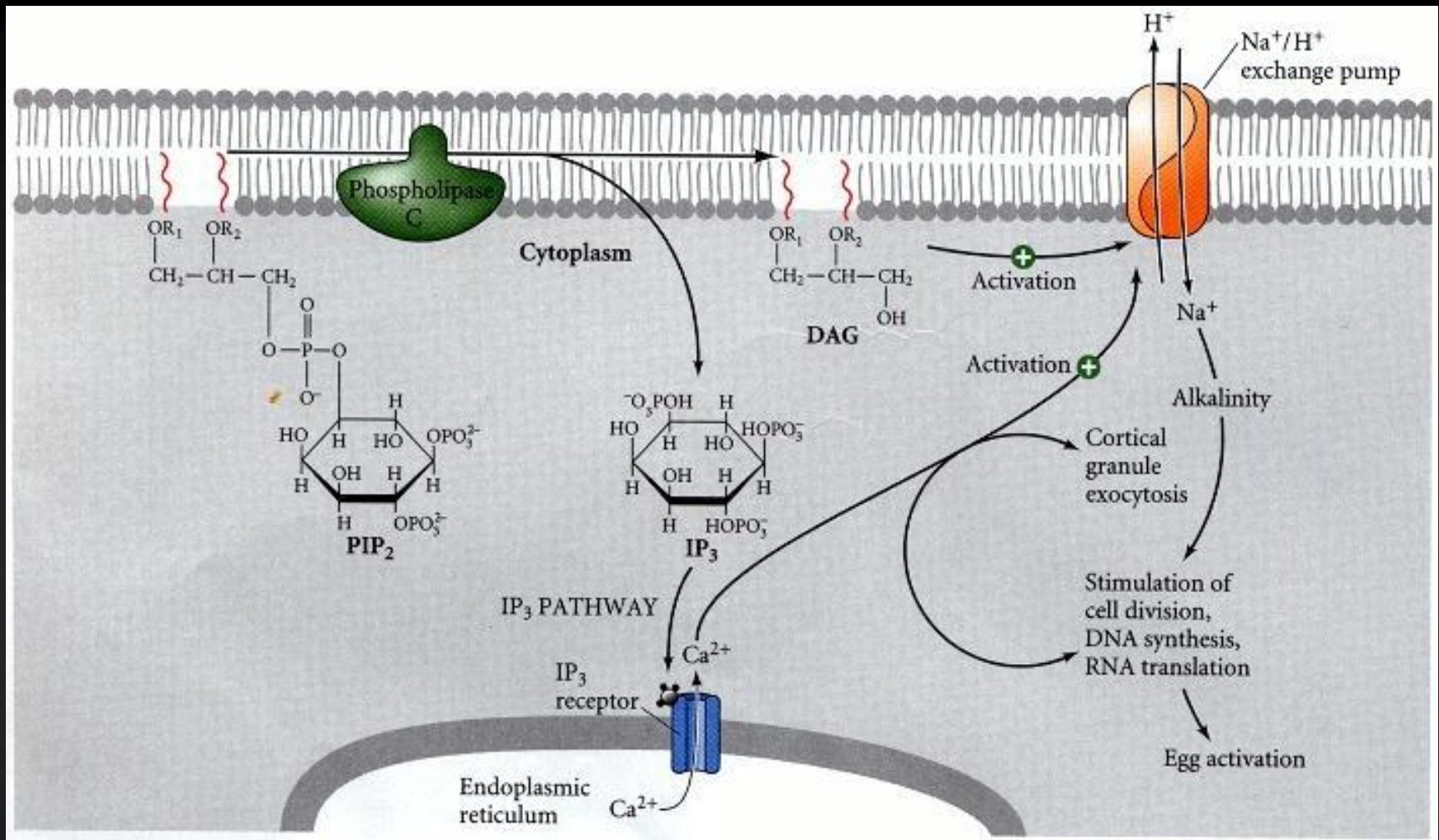
Frank Lillie, 1913



Gilbert, 2016



Posibles mecanismos de activación

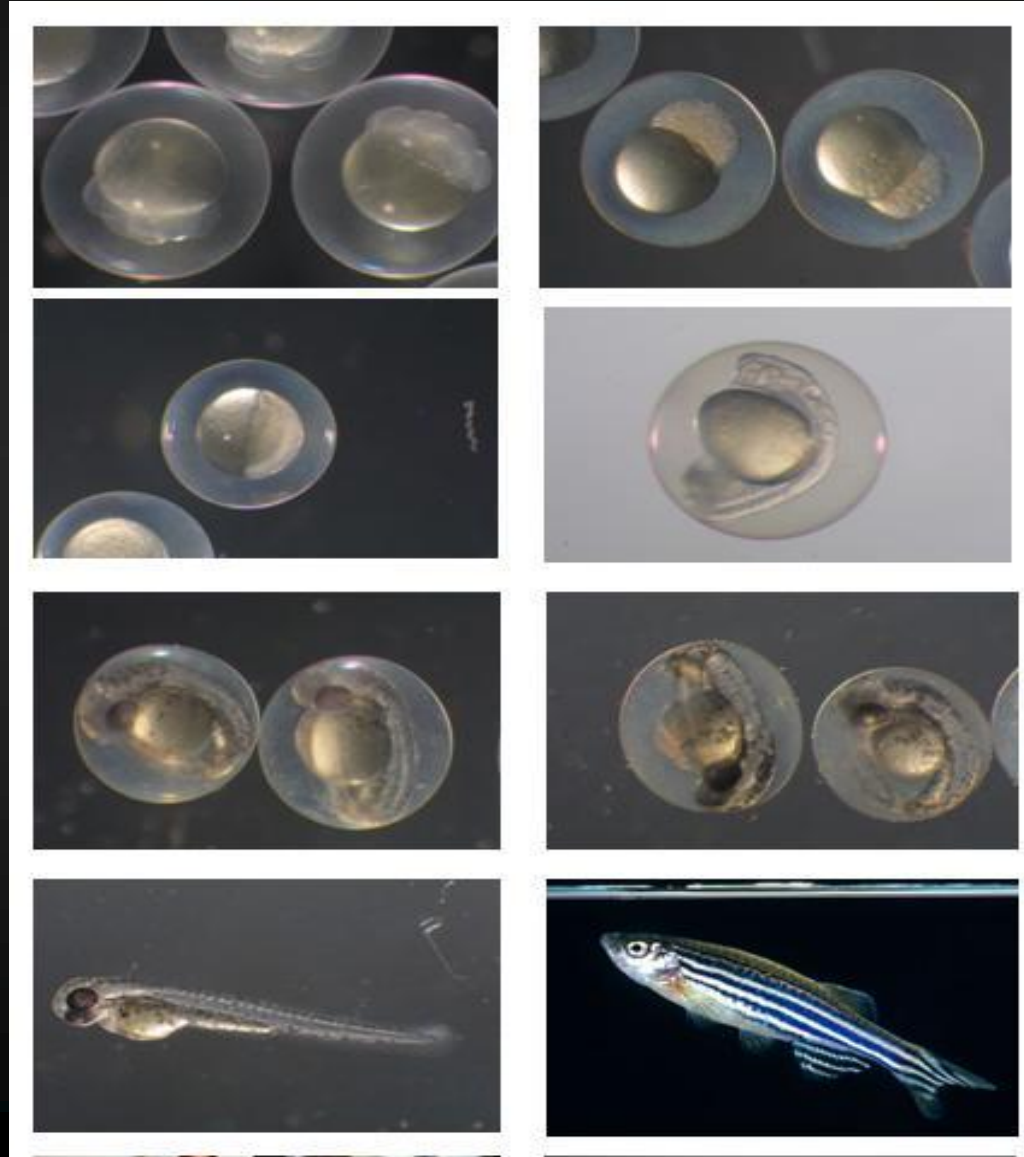


- pronúcleos fusionados
- ADN replicándose
- nuevas proteínas traduciéndose (ARNm maternos)
- movimientos citoplásmicos





# Desarrollo de nuevo organismo



## Preguntas de examen

Los gametos generados por espermatogénesis y ovogénesis están optimizados en sentidos opuestos.

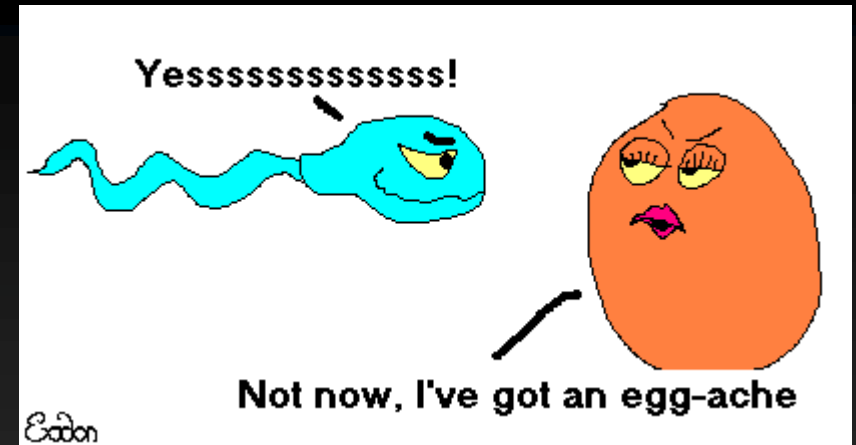
- a) Explique en qué consisten estas diferencias.
- b) ¿Qué aproximación experimental utilizaría para evidenciar alguna de ellas? Fundamente su respuesta.

Durante la fecundación, la mayoría de las especies poseen mecanismos que impiden la entrada de más de un espermatozoide al ovocito.

- a) Describa brevemente en qué consisten y analice la importancia de éstos para esas especies.
- b) Elija uno de los mecanismos: ¿cómo demostraría su importancia experimentalmente?



## En resumen:



- Gametogénesis: espermatogénesis y ovogénesis
- Costos y beneficios de la reproducción sexual
- Fecundación: etapas  
eventos moleculares
- Ejemplos de preguntas de examen

