

Figure 22-1

Molecular Cell Biology, Sixth Edition

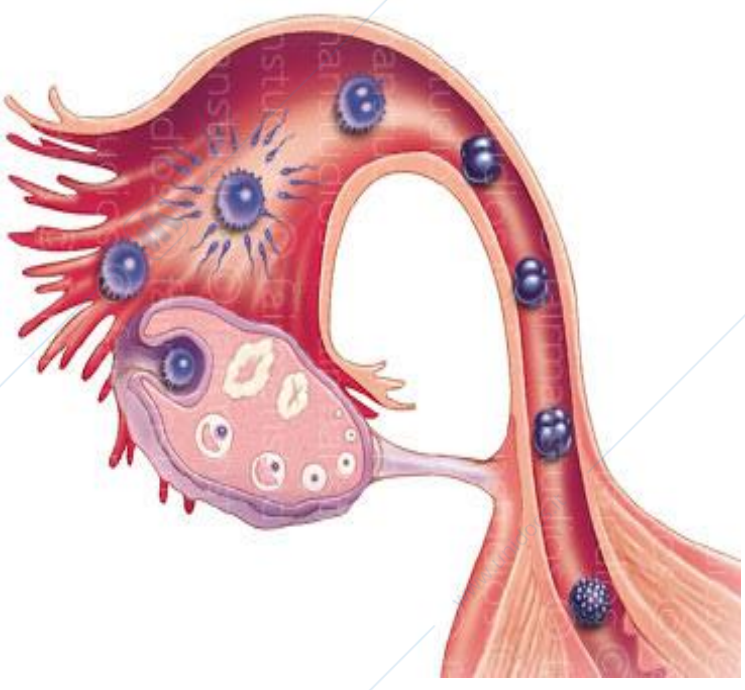
© 2008 W. H. Freeman and Company

# FECONDAZIONE

**Spermatozoo + cellula uovo =**

**zigote**

- 1- Trasporto gameti**
- 2- Capacitazione spermatozoi**
- 3- Riconoscimento e interazione tra gameti**
- 4- Reazione corticale ed attivazione dell'uovo**
- 5- Fusione dei pronuclei aploidi maschile e femminile**



# Capacitazione

Gli spermatozoi, nelle vie genitali femminili:

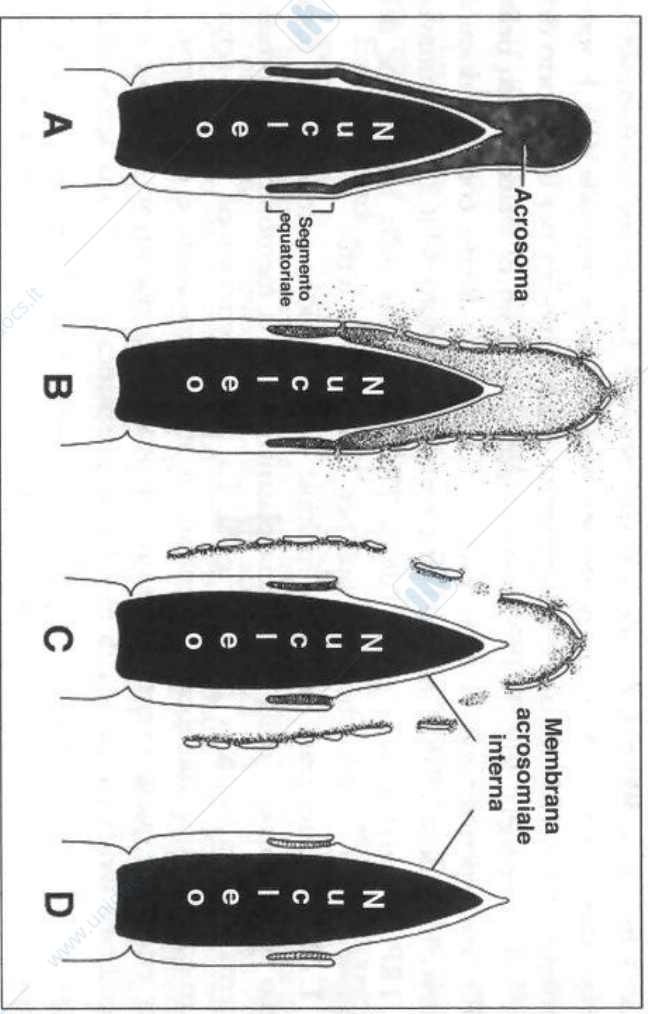
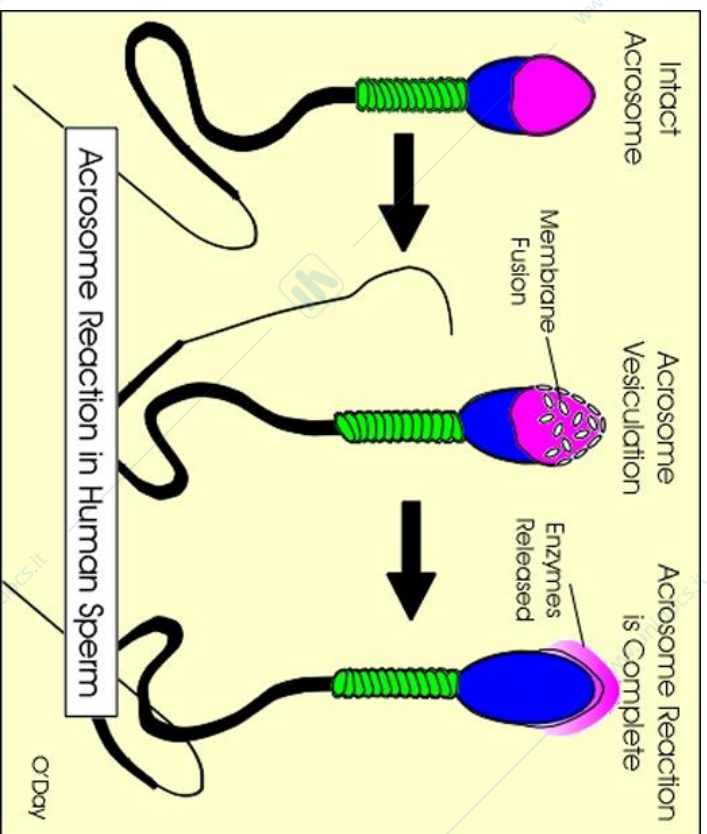
- 1- **motilità molto più attiva**
- 2- cambiamenti metabolici che consentono un accesso più agevole all'oocita

# Capacitazione

- Attivazione protein chinasi PKC, PKA
- Rimozione colesterolo
- Rimozione molecole periferiche di membrana (fattori decapacitanti)
- Accumulo nella regione tra la membrana plasmatica e la membrana acrosomiale esterna di ioni  $Ca^{++}$
- Attivazione motilità

# Reazione acrosomiale

- I **luronidasi** ed altri **enzimi** digeriscono la **matrice glicoproteica** dell'ovocita
- **Acrosina** digerisce la **zona pellucida**

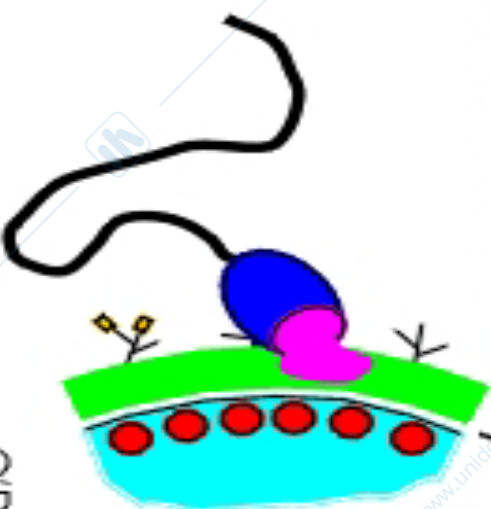
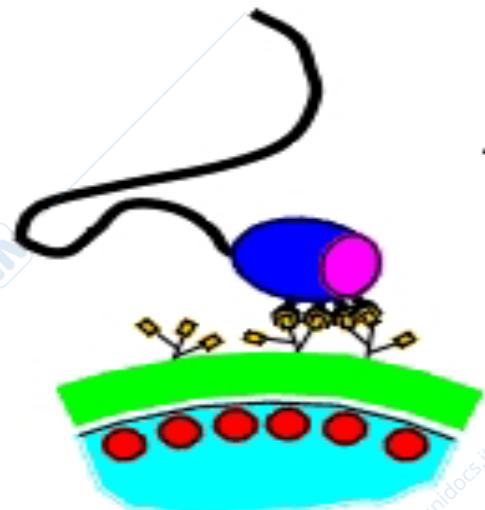
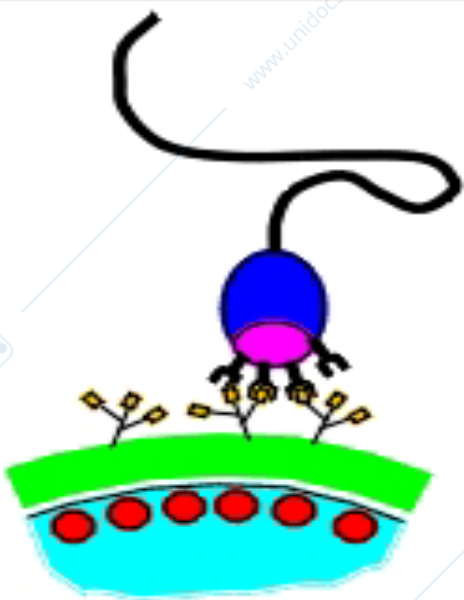


# ZP3 & the Acrosome Reaction

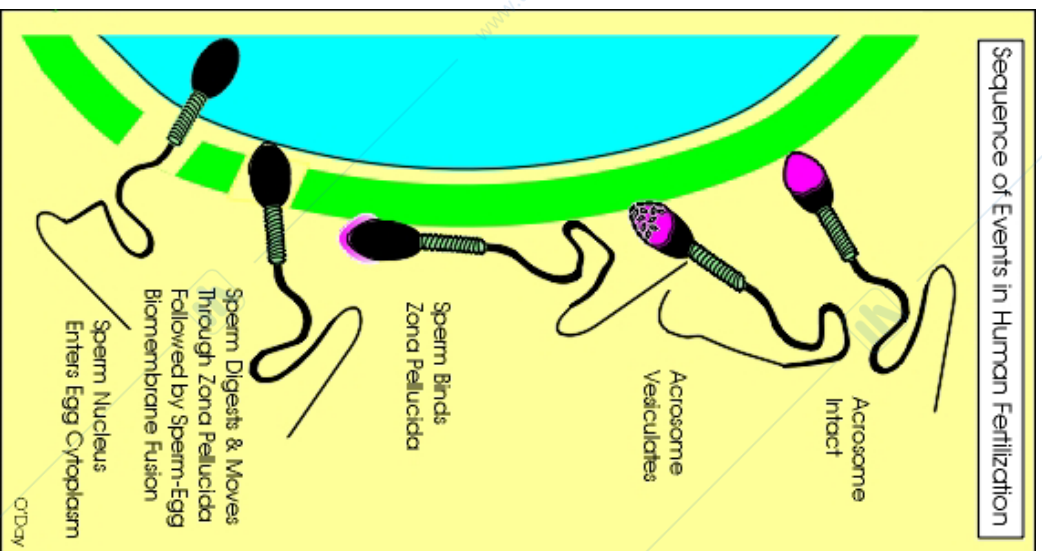
Sperm-Egg Binding

Receptor Clustering

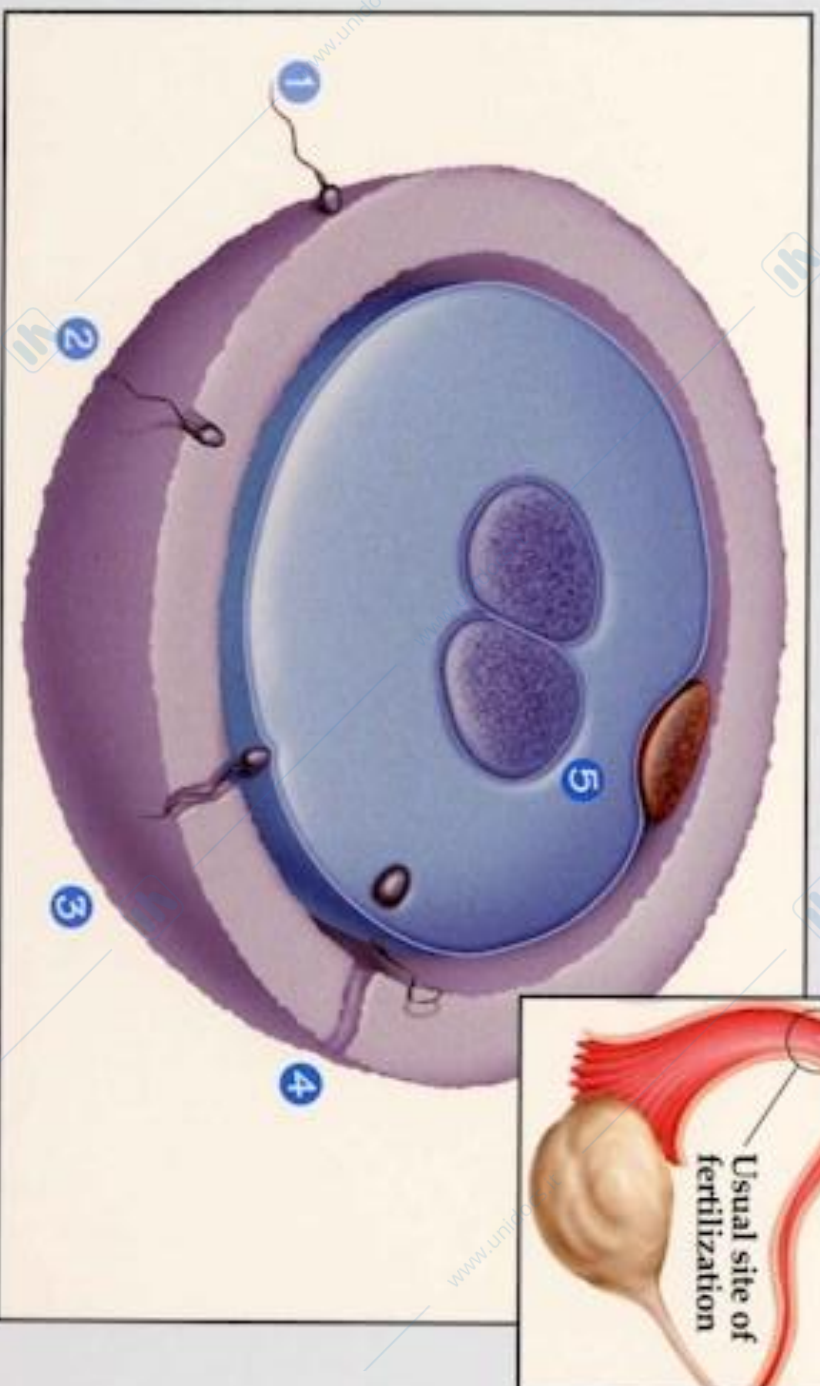
Acrosome Exocytosis



O'Day



## Fertilization Process



After the sperm enters the uterus, they swim into the fallopian tube. When they encounter an egg that has been released from the ovary, one sperm may enter the egg. The union of a sperm and egg forms a zygote.

- 1 Sperm binds to egg
- 2 Sperm begins to penetrate egg
- 3 Sperm penetration continues
- 4 Sperm enters egg
- 5 Chromosomes from sperm and egg unite to form pronuclei

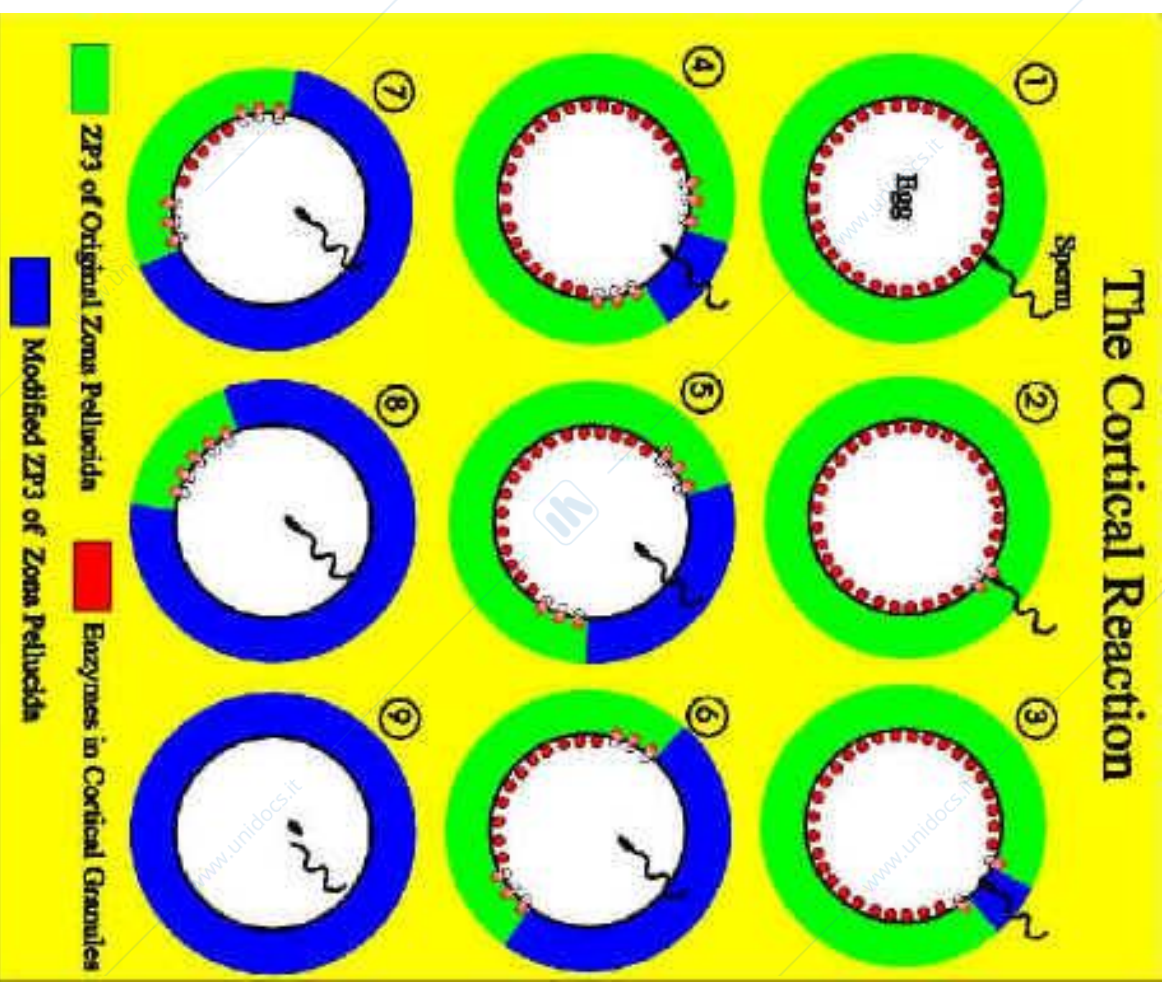
# Reazione corticale ed attivazione dell'uovo

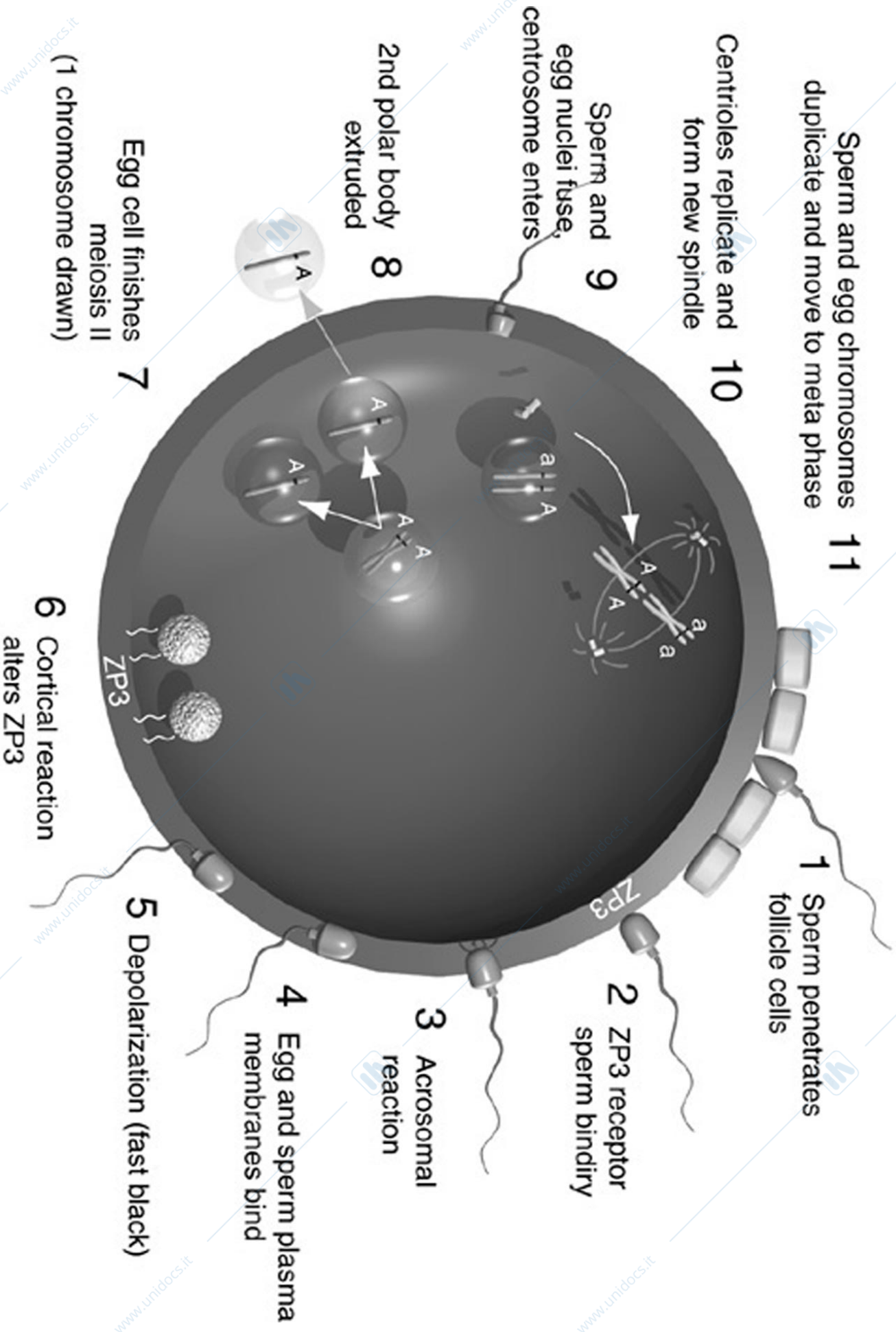
Dopo l'ingresso dello spermio, nella cellula uovo si ha

1- rapido cambiamento del potenziale di membrana

2-una serie di eventi chimici più lenti, tra cui l'esocitosi dei granuli corticali (mediata da  $Ca^{++}$ )

Tutto ciò impedisce l'entrata di altri spermatozoi





# Ovocita termina la meiosi

L'incremento di  $Ca^{++}$

(ingresso dello

spermatozoo):

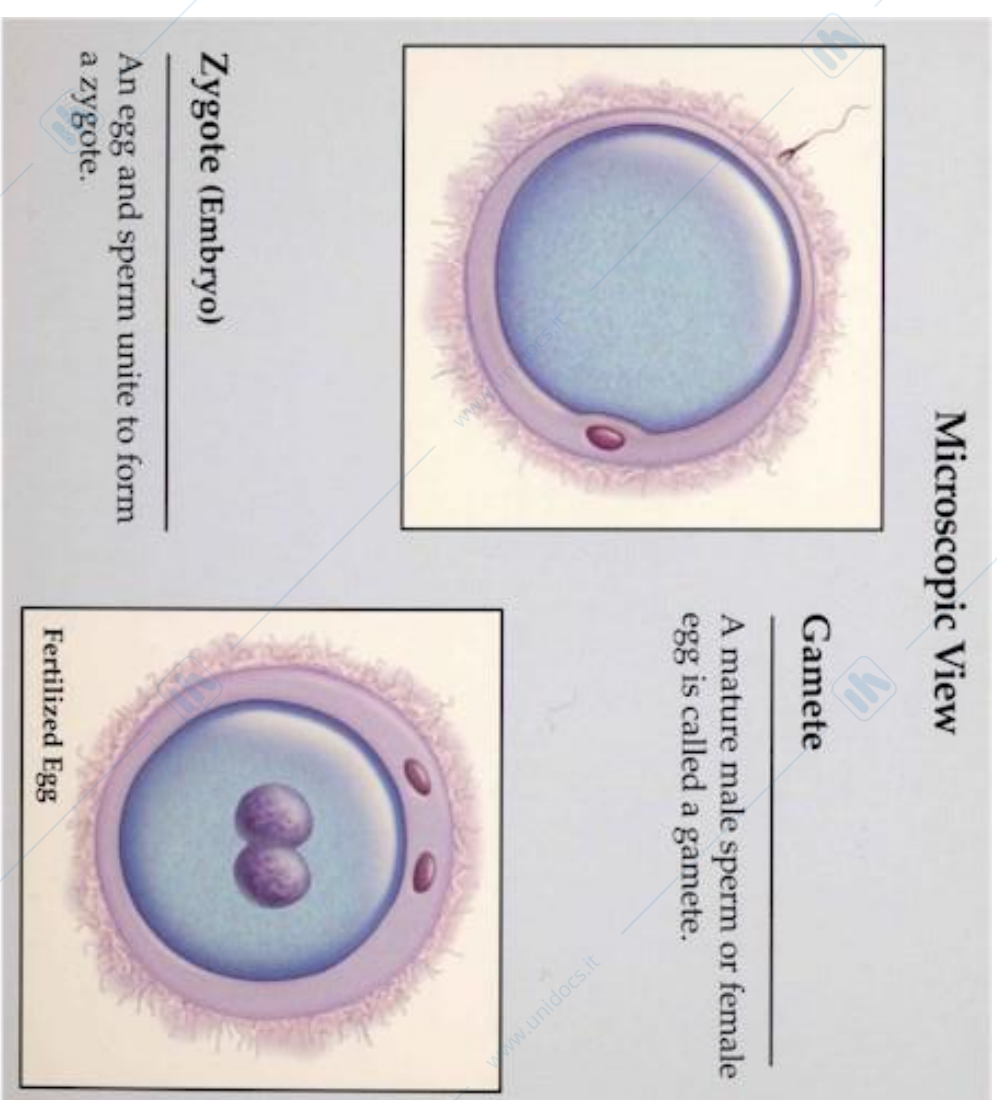
1- demolisce un fattore che

inibisce la degradazione di

ciclinaB/Cdk1

2- attiva APC per passare

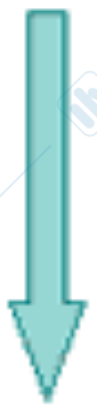
all'anafase



# TAVOLA 1

**INIZIO RICERCA FIGLI  
2 ANNI**

**Gravidanza:  
Popolazione "fertile"**



**Non gravidanza:  
Popolazione "infertile"**

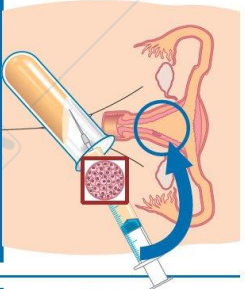
**Sterilità:**  
impossibilità di concepire spontaneamente.

- Sterilità maschile
- Sterilità femminile

**Subfertilità:**  
ridotta possibilità di concepire spontaneamente.

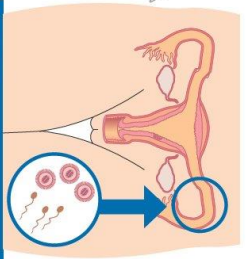
- Di coppia

**Infertilità Idiopatica:  
senza causa apparente**



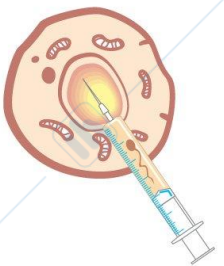
### FIVET

(Fecondazione in vitro e trasferimento dell'embrione): **la fecondazione avviene in provetta**, nella quale gli spermatozoi vengono a contatto con l'ovocita, l'embrione così ottenuto viene trasferito nell'utero. È la tecnica più diffusa, utilizzata in circa 6 centri su 10



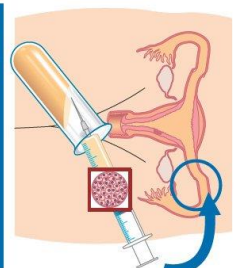
### GIFT

(Gamete Intrafallopian Transfer): nata nel 1984, questa tecnica consiste **nel trasferire almeno tre ovociti e una piccola quantità di seme maschile nelle tube**, dove avviene la fecondazione. La tecnica è utilizzata in 2 centri su 10



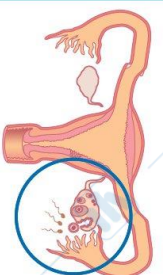
### ICSI

(Iniezione intracitoplasmatica dello spermatozoo). Si **introduce lo spermatozoo direttamente all'interno dell'ovocita**. La tecnica, utilizzata per la prima volta nel 1992, è adatta per le coppie con infertilità dovuta ad un fattore maschile medio/severo



### ZIFT

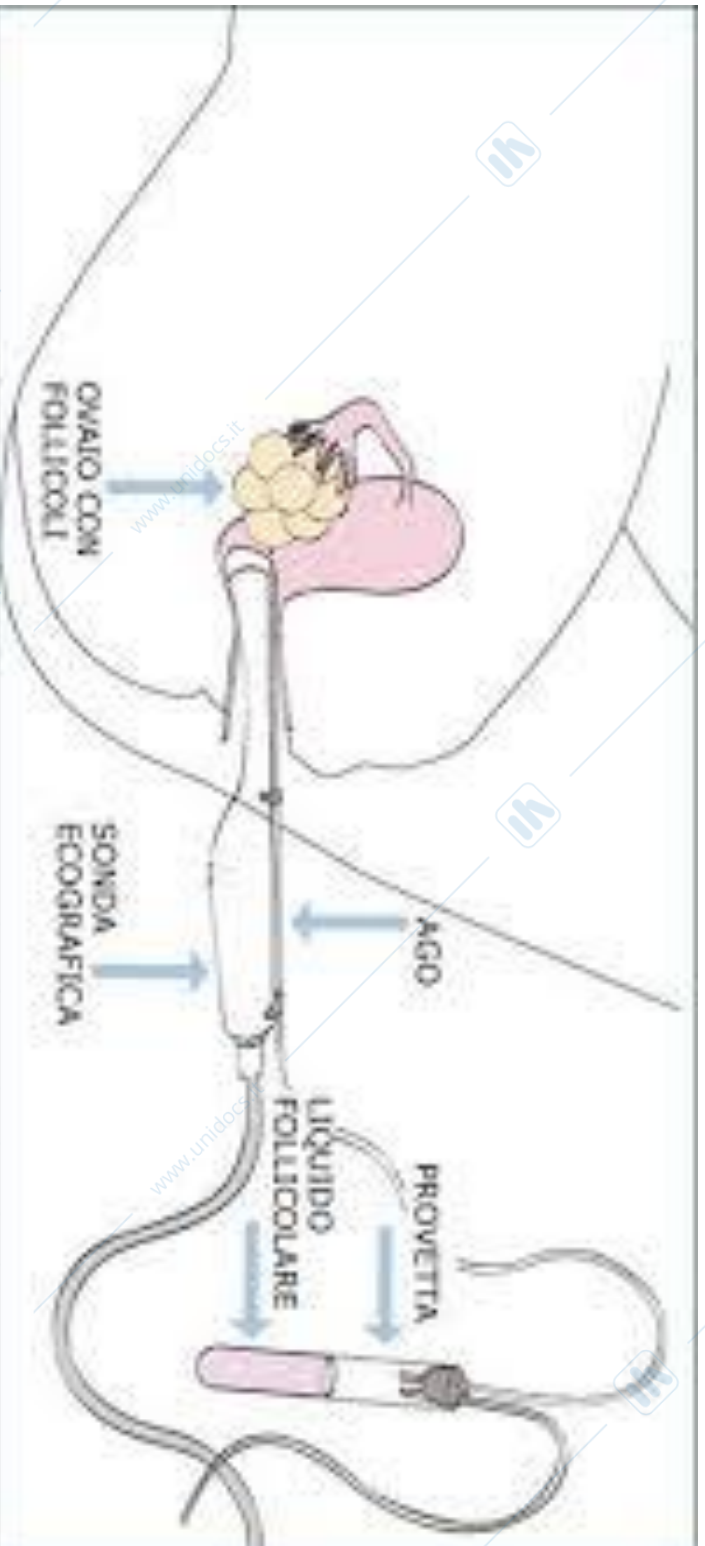
(Zigote Intra-Fallopian Transfer): è stata messa a punto nel 1986. **La fusione tra spermatozoo e ovulo avviene in provetta** e l'embrione ai primissimi stadi di sviluppo viene trasferito **nelle tube**



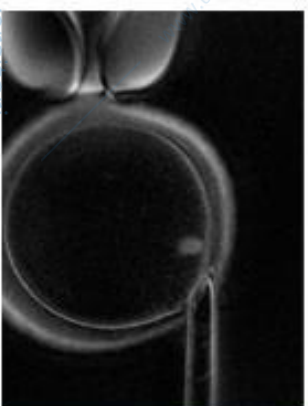
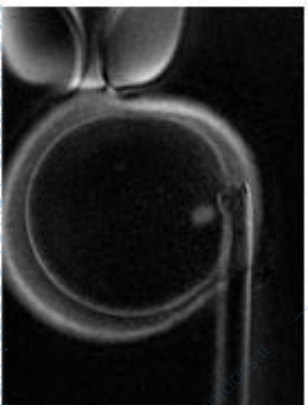
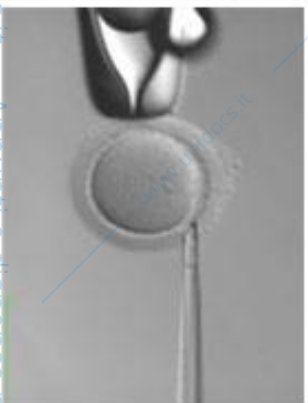
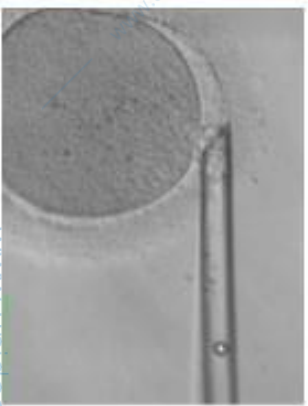
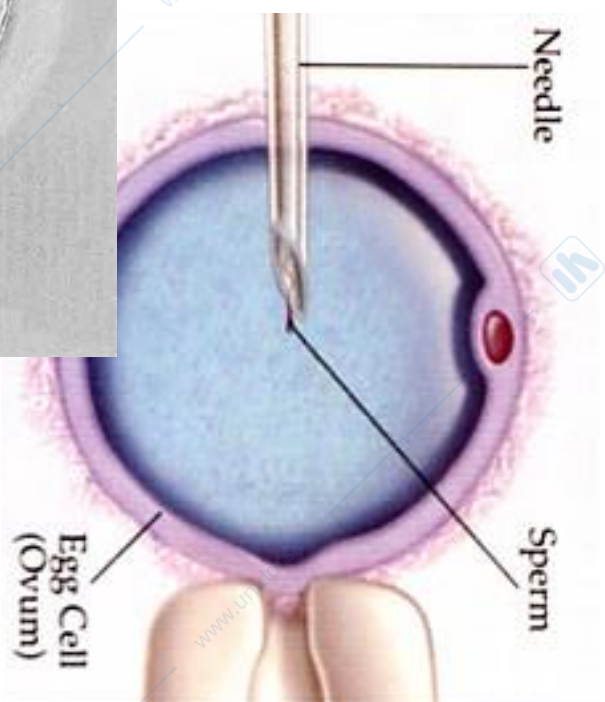
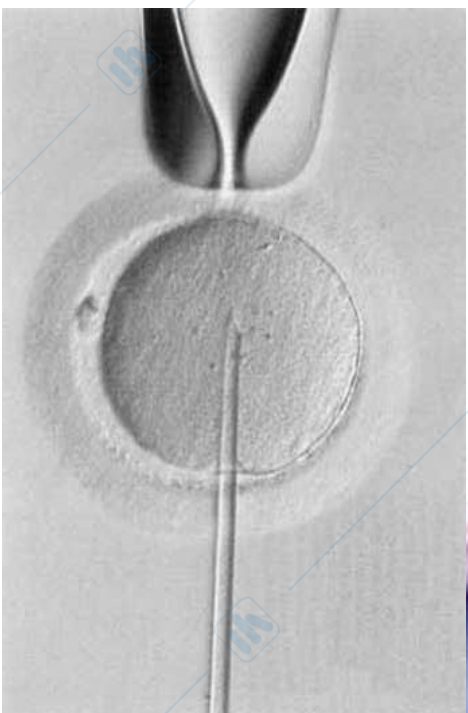
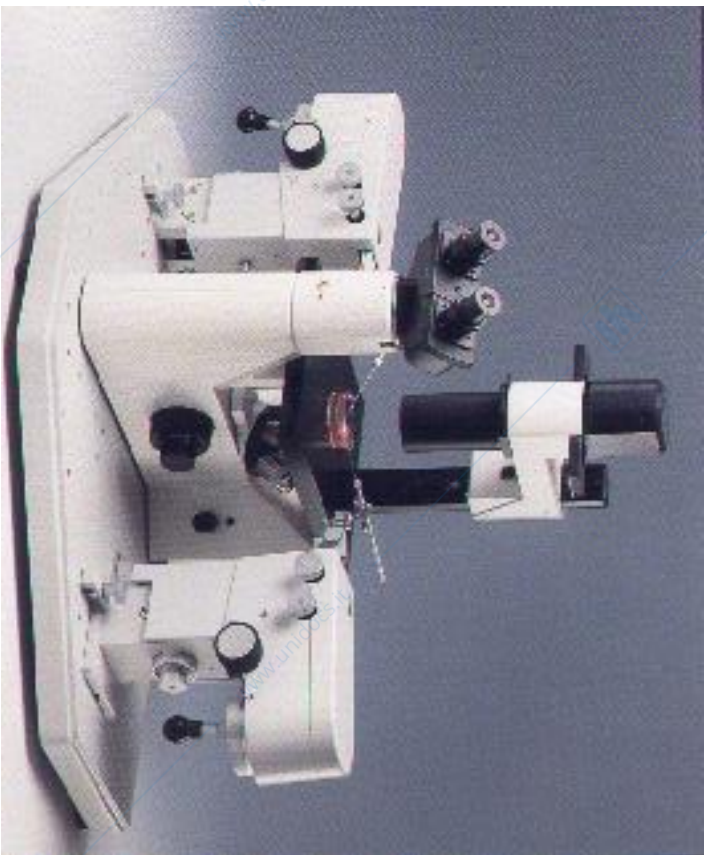
### IPS

(Intra Peritoneal Fertilisation): tecnica nata nel 1986. **Gli spermatozoi vengono introdotti nella cavità peritoneale** nel giorno successivo all'inizio dell'ovulazione

ANSA centimetri

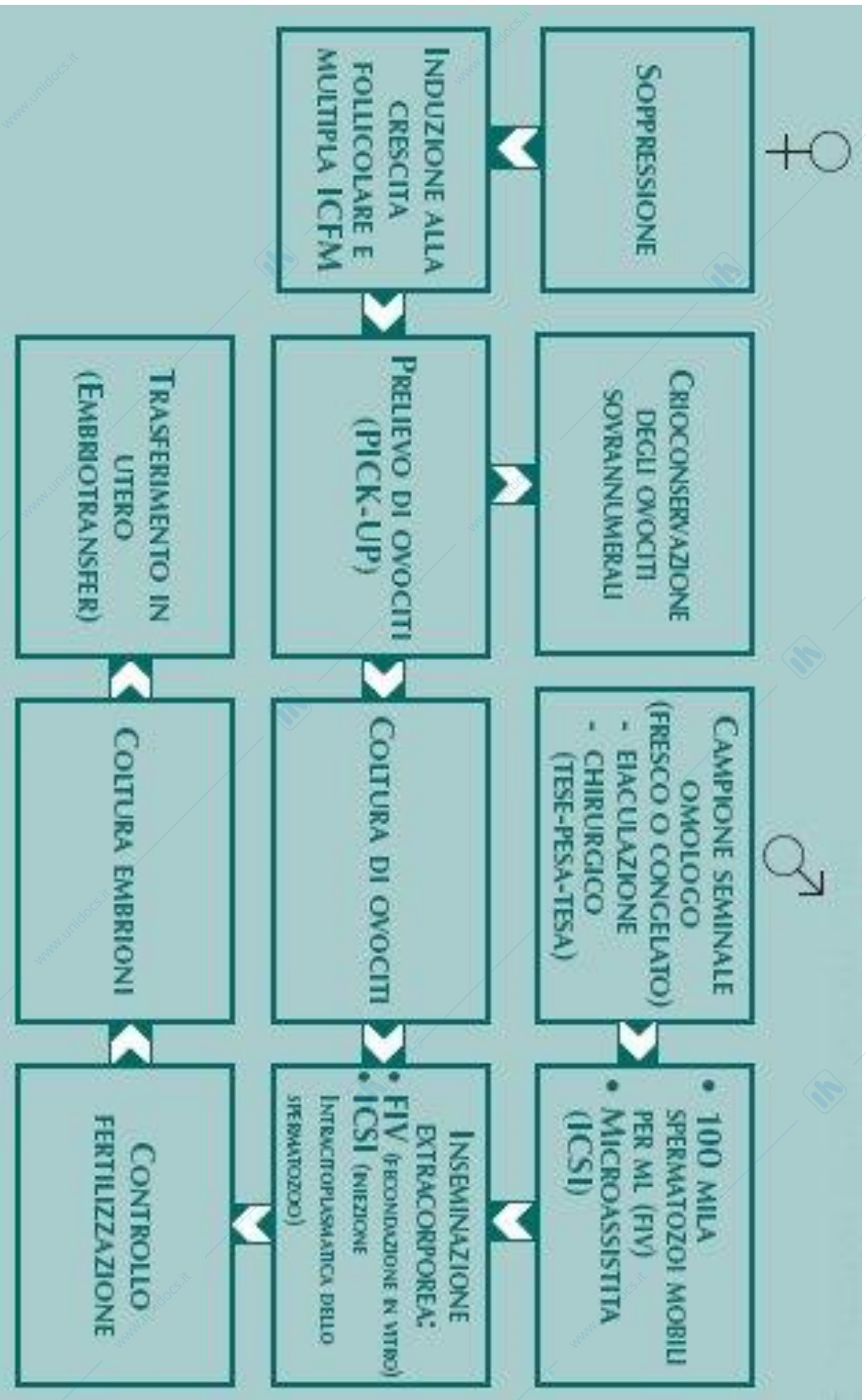


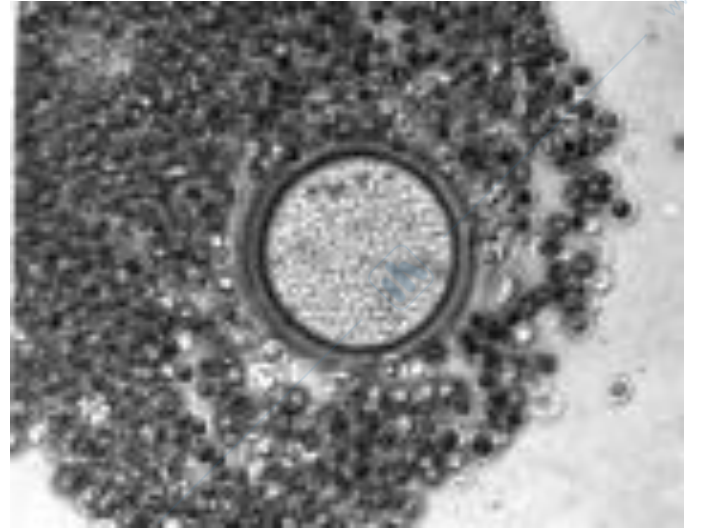
# Procreazione medicalmente assistita



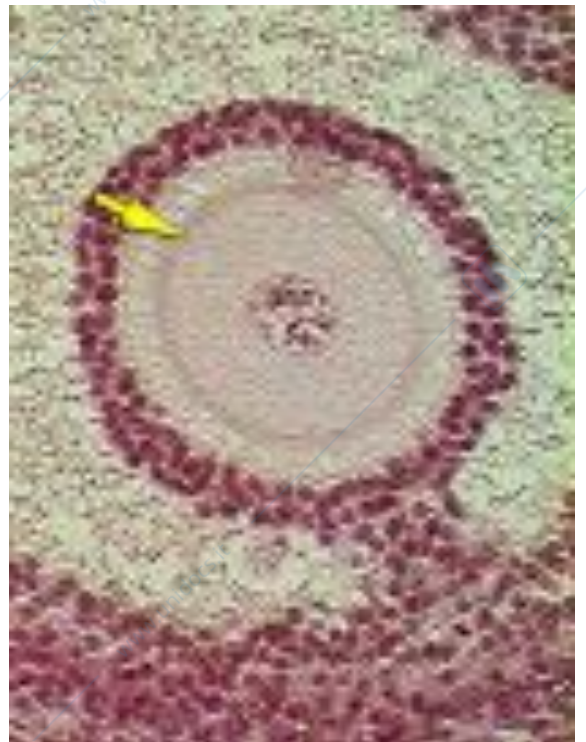
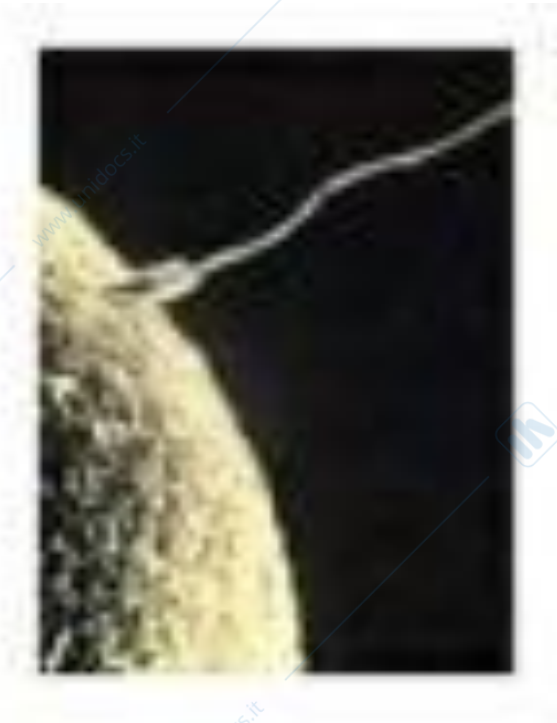
# La legge 40/2004

- La legge assicura all'art. 1 la tutela di tutti i soggetti coinvolti "compreso il concepito" e dispone che i bambini che nasceranno dall'applicazione di queste tecniche saranno figli legittimi della coppia o acquisiranno lo status di figli riconosciuti della madre o della coppia stessa.
- Previsto il consenso informato per la coppia
- Divieto di fecondazione eterologa
- Divieto di ogni tipo di sperimentazione
- Divieto di congelamento dell'embrione
- Divieto di diagnosi pre-impianto
- Limite massimo di ovuli fecondati: 3
- Obbligo di trasferimento in vivo di tutti gli ovuli fecondati

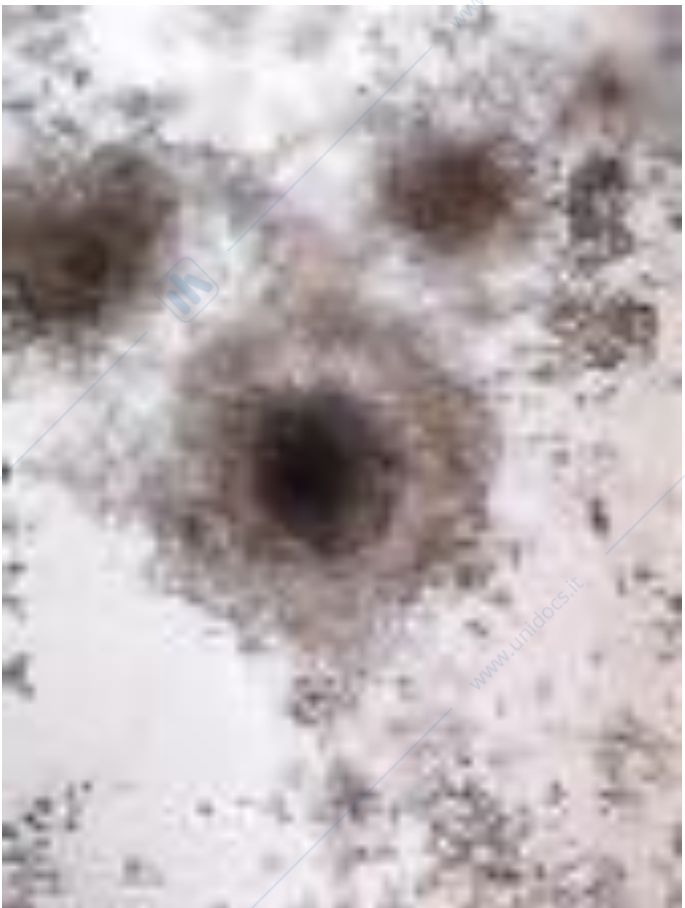


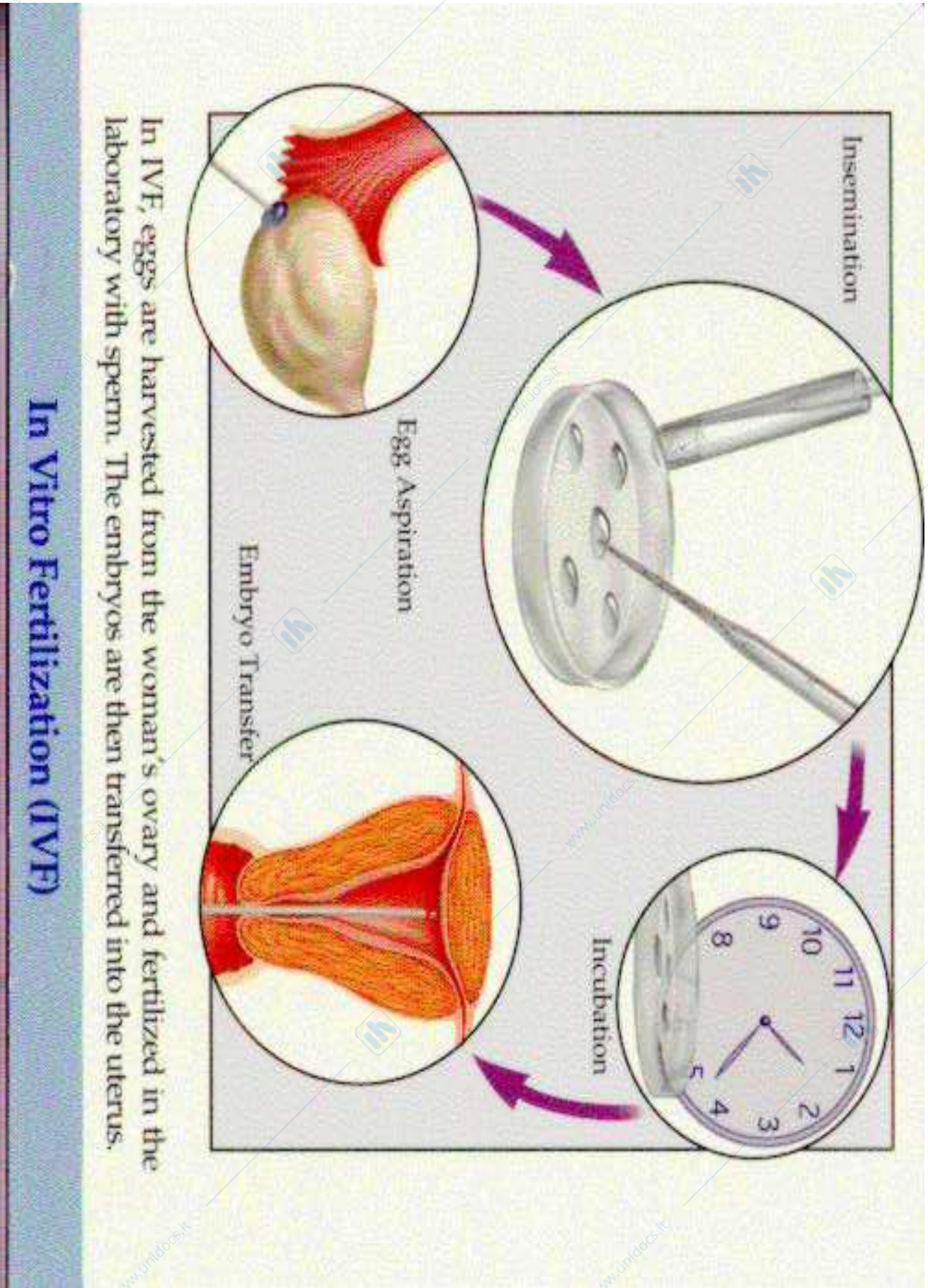


# Ovociti!



# In vitro fertilization – Embryo transfer (IVF-ET o FIVET)





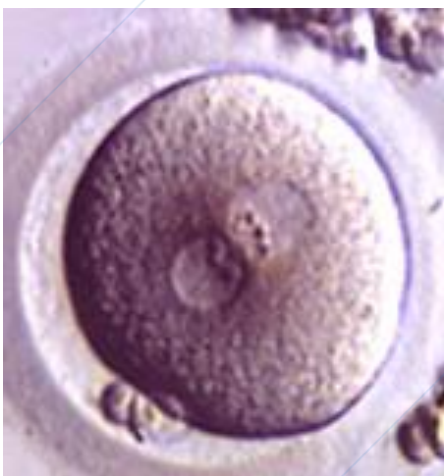
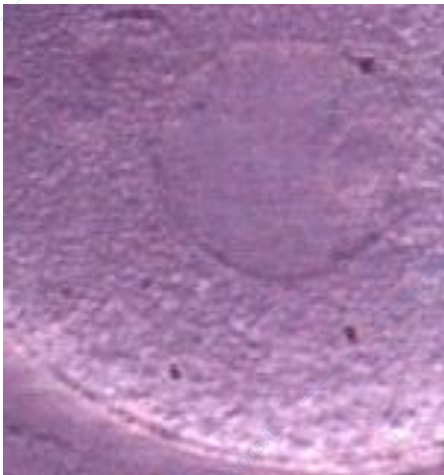
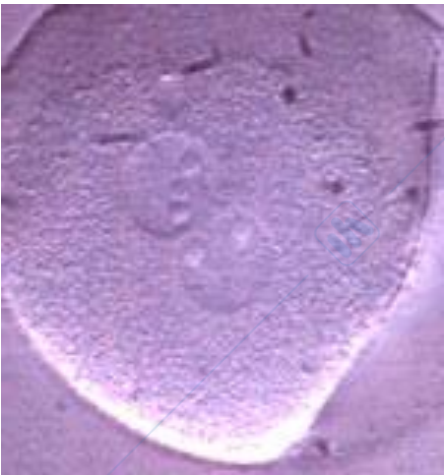
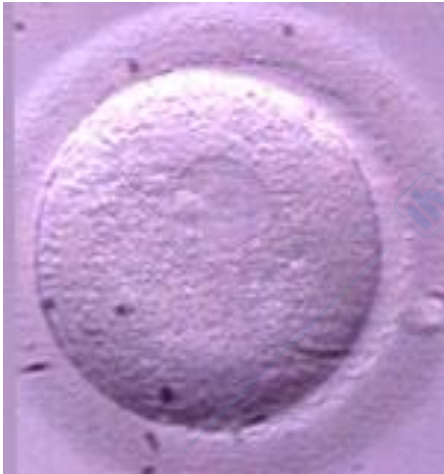
In IVF, eggs are harvested from the woman's ovary and fertilized in the laboratory with sperm. The embryos are then transferred into the uterus.

## In Vitro Fertilization (IVF)

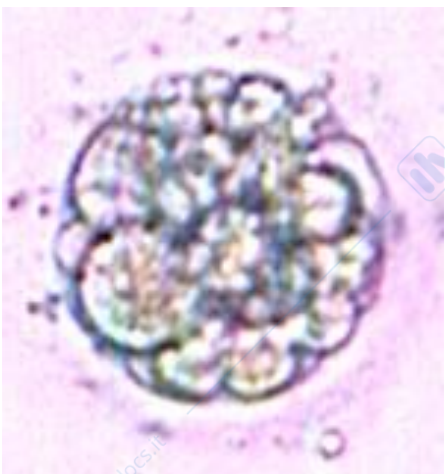
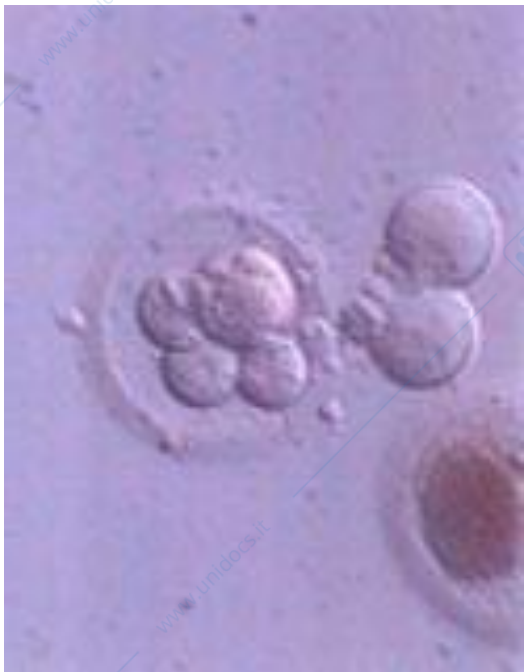
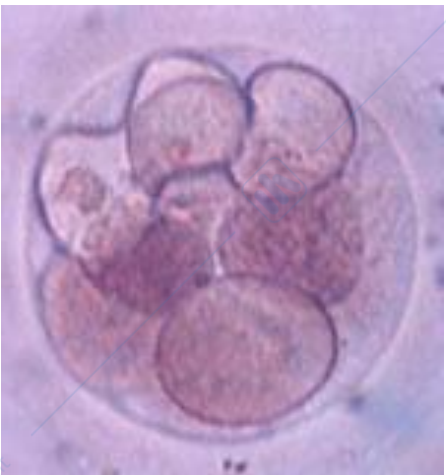
# Intra-Cytoplasmic Sperm Injection (ICSI)



# Lo stadio di ZIGOTE



# La segmentazione dei blastomeri



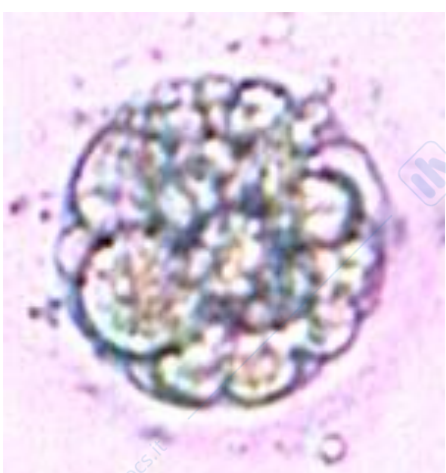
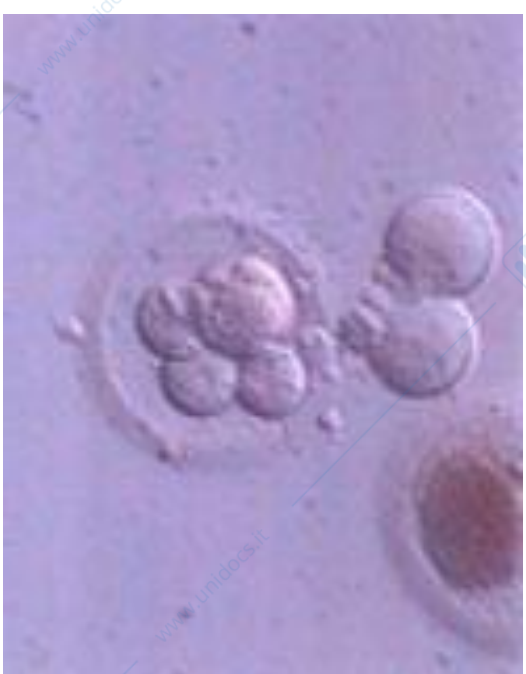
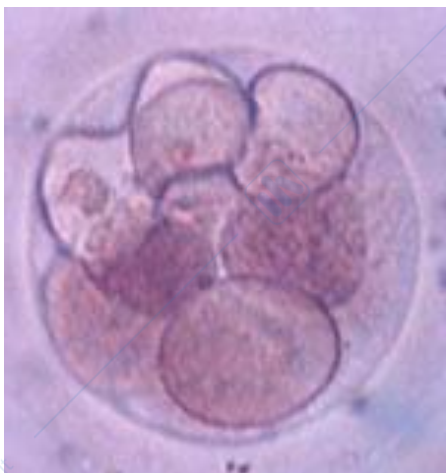
# Crioconservazione dei gameti

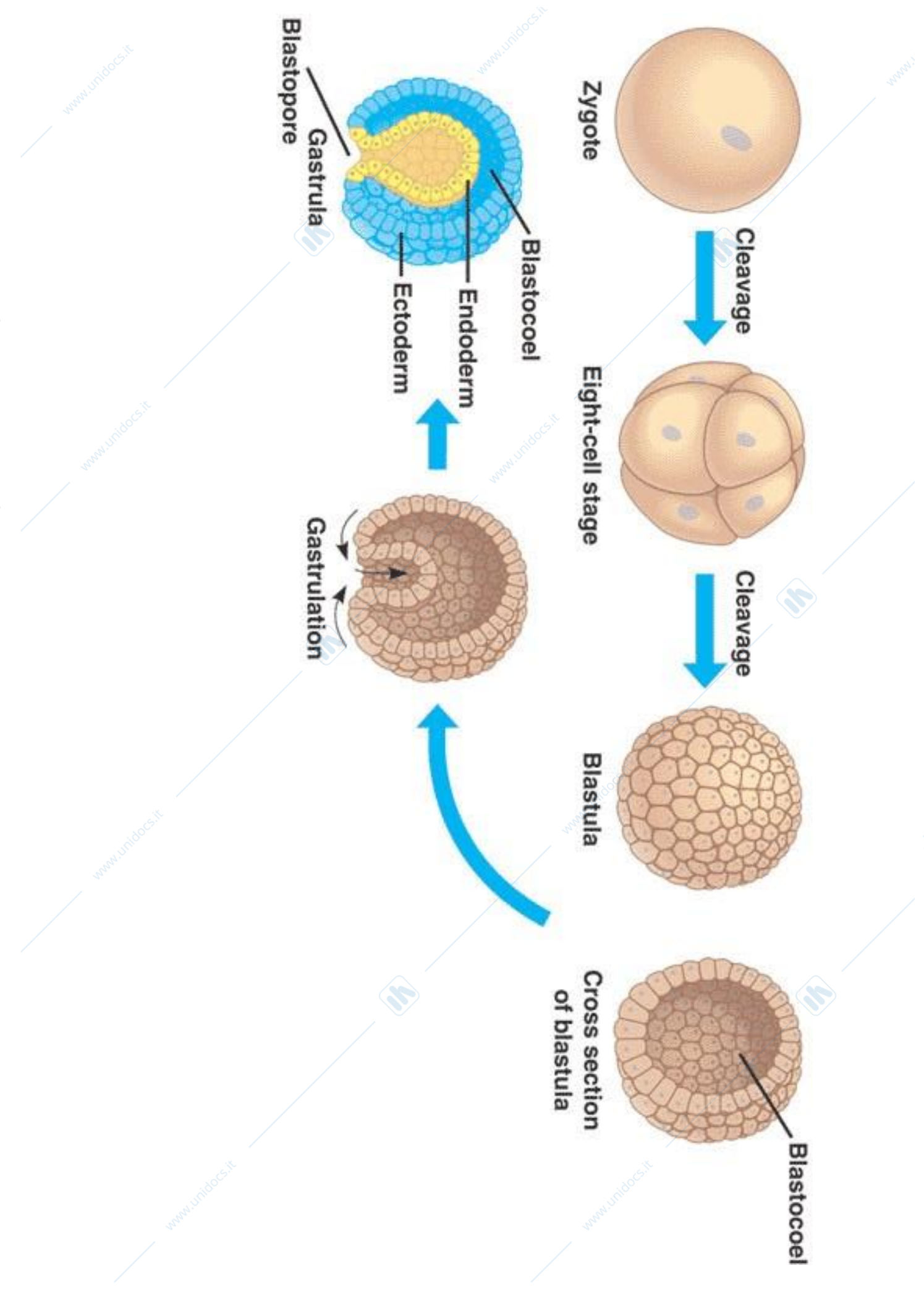


(CNN)



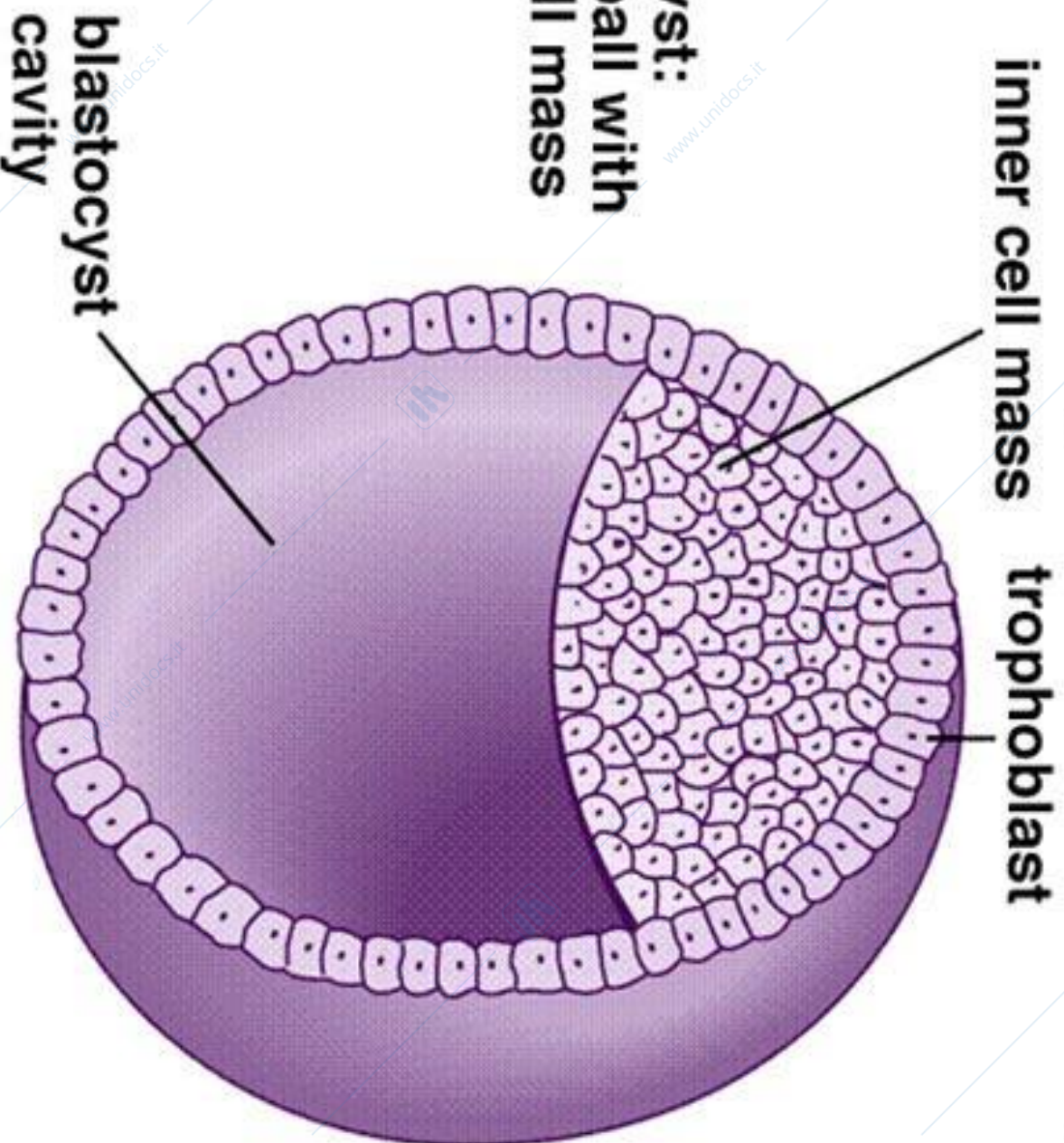
# Cleavage

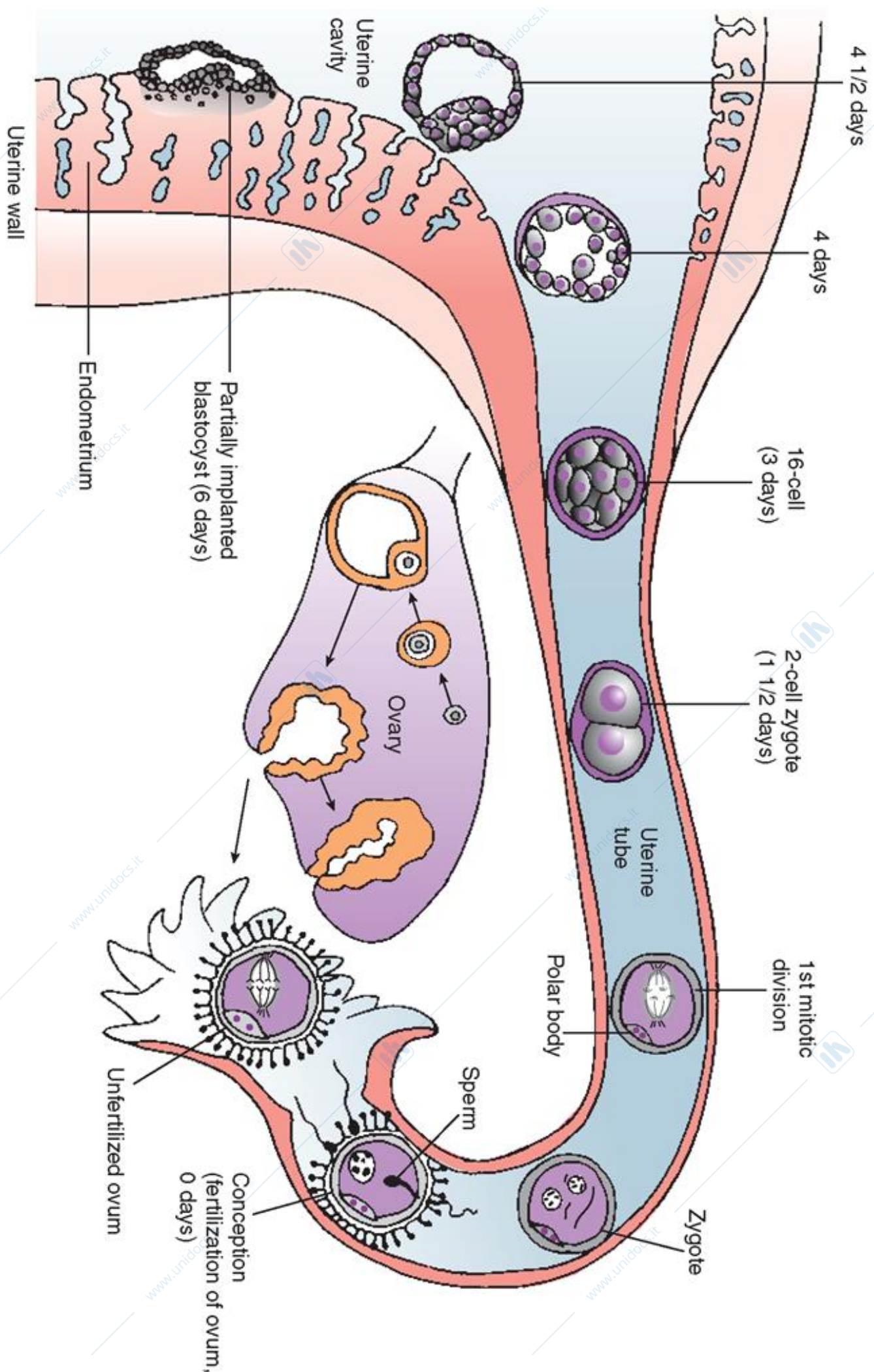


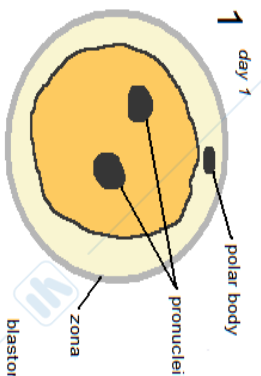


# Embryonic Development — Blastocyst

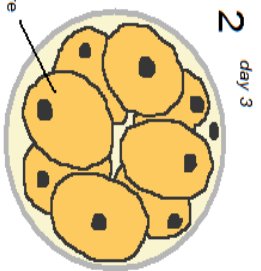
**Blastocyst:**  
hollow ball with  
inner cell mass



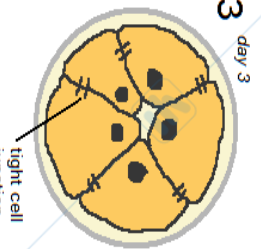




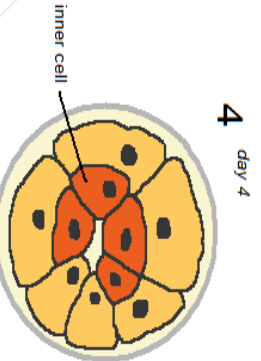
1 day 1 polar body pronuclei zona



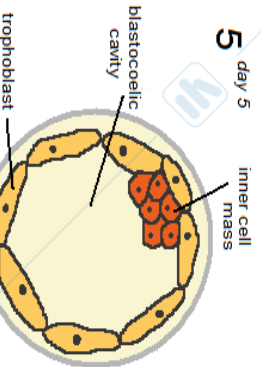
2 day 3 blastomere



3 day 3 tight cell junction inner cell



4 day 4 inner cell



5 day 5 inner cell mass blastocoelic cavity trophoblast

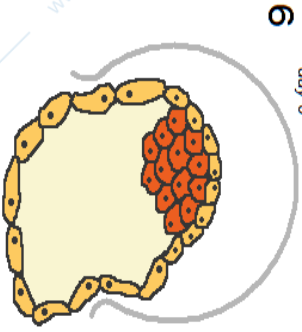
**fertilised egg**

**8-cell zygote**

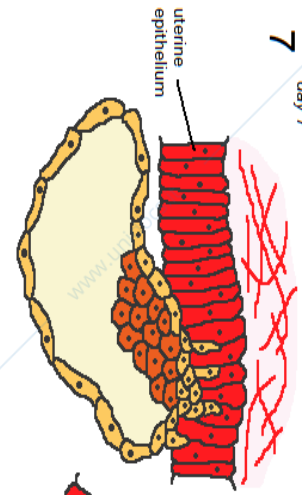
**cell adhesion**

**16-cell morula**

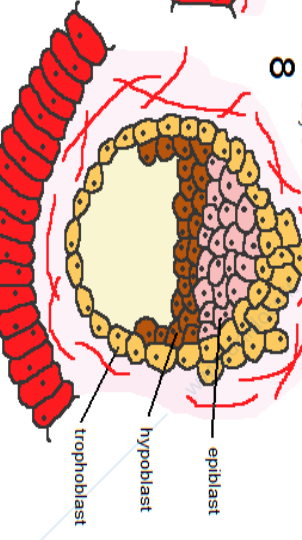
**blastocyst**



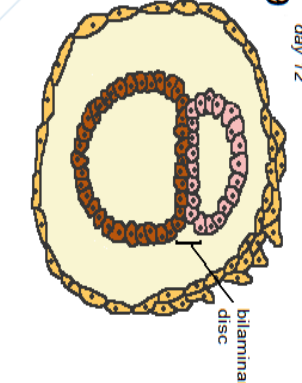
6 day 6



7 day 7 uterine epithelium



8 day 9 epiblast hypoblast trophoblast



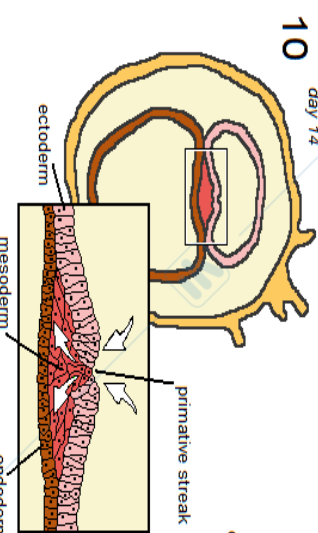
9 day 12 bilaminar disc

**zona hatching**

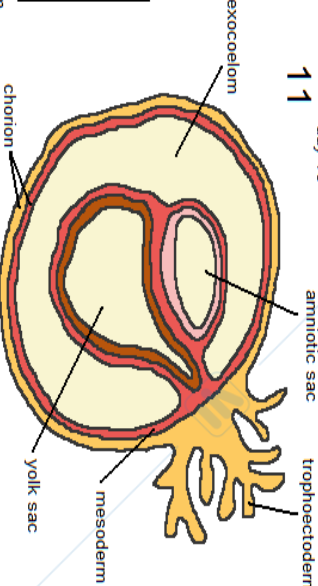
**invades uterine wall**

**cell mass differentiates**

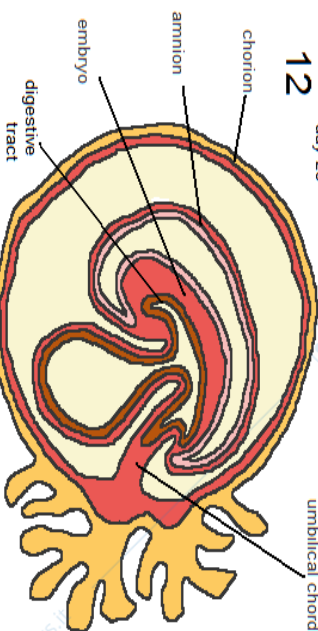
**bilaminar disc forms**



10 day 14



11 day 18 exocoelom amniotic sac trophoectoderm yolk sac



12 day 23 embryo amnion chorion umbilical chord

**mesoderm forms**

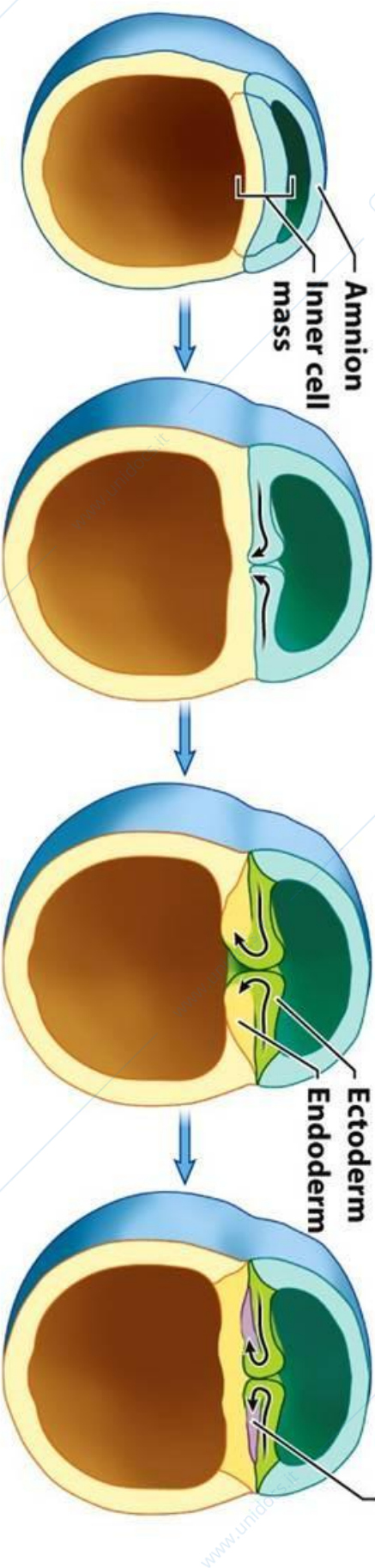
**mesoderm spreads**

**amniotic sac grows**



# GASTRULATION

The second phase of development is gastrulation, a migration of blastocyst cells inward, leading to multiple distinct layers of tissue called germ layers.



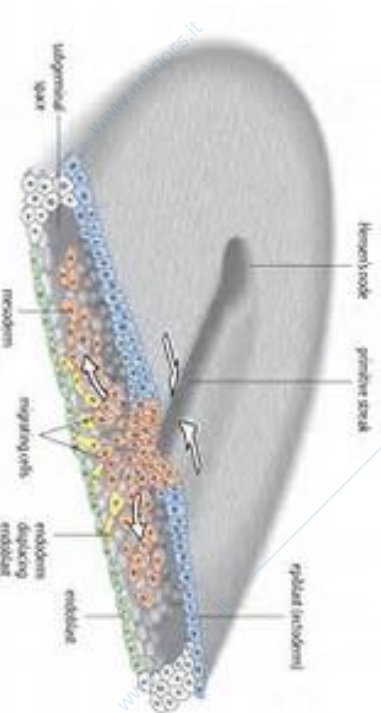
Cells of the inner cell mass begin to differentiate as the amnion forms

A gastrula develops when cells begin to migrate inward, forming an indentation.

The cells continue to push inward, forming the endoderm. Cells that remain on the outer surface of the gastrula are called ectoderm.

The mesoderm is formed, as additional cells migrate inward between the endoderm and ectoderm.

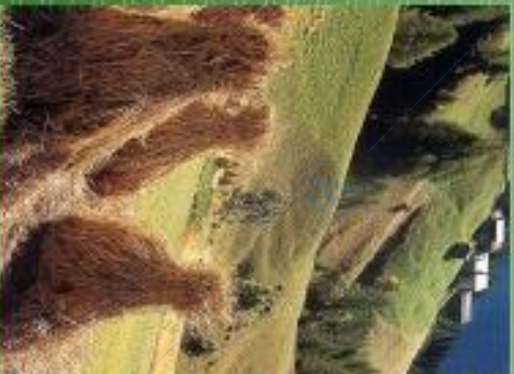
- Ectoderm** Outer layer of skin, hair, lining of the nose and mouth, and the nervous system
- Endoderm** Digestive tract, respiratory tract, liver, and pancreas
- Mesoderm** Muscles and skeleton



# BIOTECNOLOGIE

Le **biotecnologie** sono tutte quelle tecnologie che usano organismi viventi, o parti di essi allo scopo di produrre quantità commerciali di prodotti utili all'uomo, di migliorare piante ed animali o sviluppare microrganismi utili per usi specifici.

Molte persone pensano che le biotecnologie sono nate solo negli ultimi tempi, ma in realtà esistono da migliaia di anni...



**tradizionali**

Infatti le biotecnologie  
si possono *dividere*  
in due tipi:



**innovative**

# Le biotecnologie tradizionali

Le biotecnologie tradizionali sono tecnologie produttive utilizzate da millenni, quali l'agricoltura, la zootecnica e lo sfruttamento delle attività fermentative dei microrganismi. I campi di azione principali sono:

**Bibite e cibi fermentati**

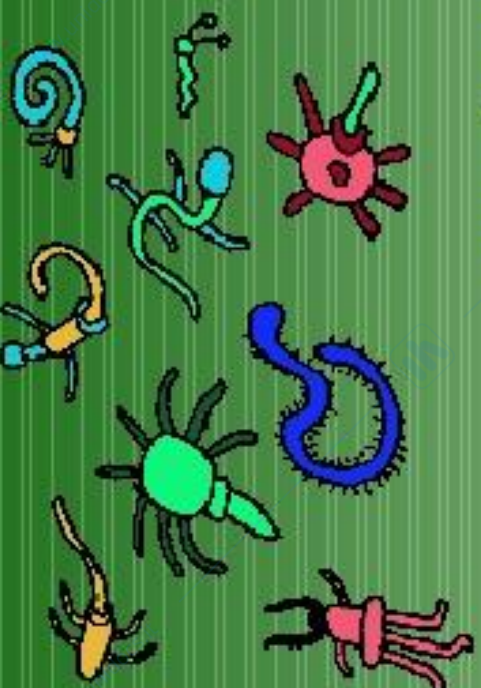
**Biotecnologie tradizionali nell'agricoltura**



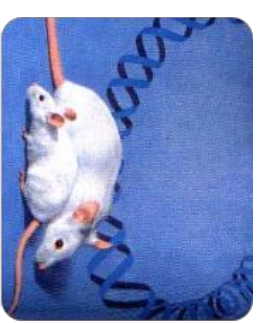
# Le biotecnologie innovative

Lo sviluppo delle biotecnologie innovative è molto veloce... Infatti, in solo 1-2 secoli si è arrivati ad un livello di conoscenza molto elevato rispetto a quello che è stato ottenuto in precedenza, in più di 7000 anni. I campi di azione principali sono:

**La scoperta dei microrganismi: nascita delle biotecnologie innovative**  
**La scoperta degli antibiotici**  
**Nascita dell'ingegneria genetica**



# Campi di applicazione delle biotecnologie



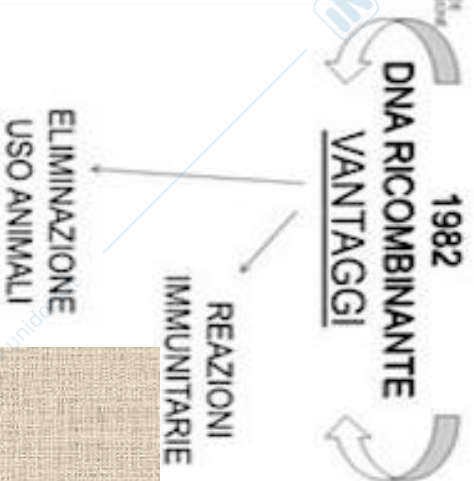
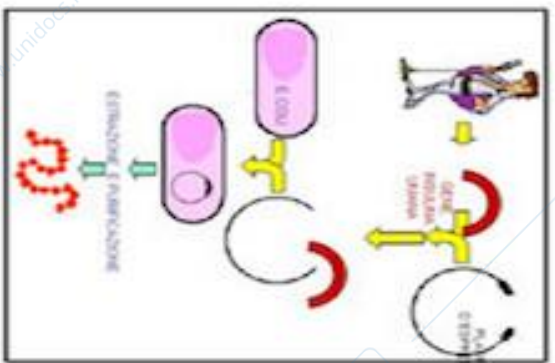
Attraverso l'uso di sistemi biologici, le biotecnologie consentono di **ottenere prodotti o sviluppare processi utili** nei seguenti campi:

- **tutela della salute** (diagnostici, farmaci e vaccini, organi artificiali, cellule staminali, vettori per terapia genica)

- **produzione alimentare** (piante, animali e microrganismi selezionati e/o geneticamente modificati)

- **produzione di composti da utilizzare in settori industriali diversi** (chimica, agro-alimentare, cosmetica)

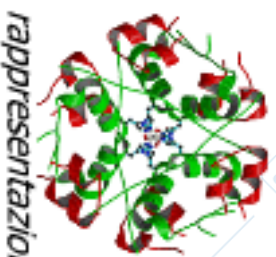
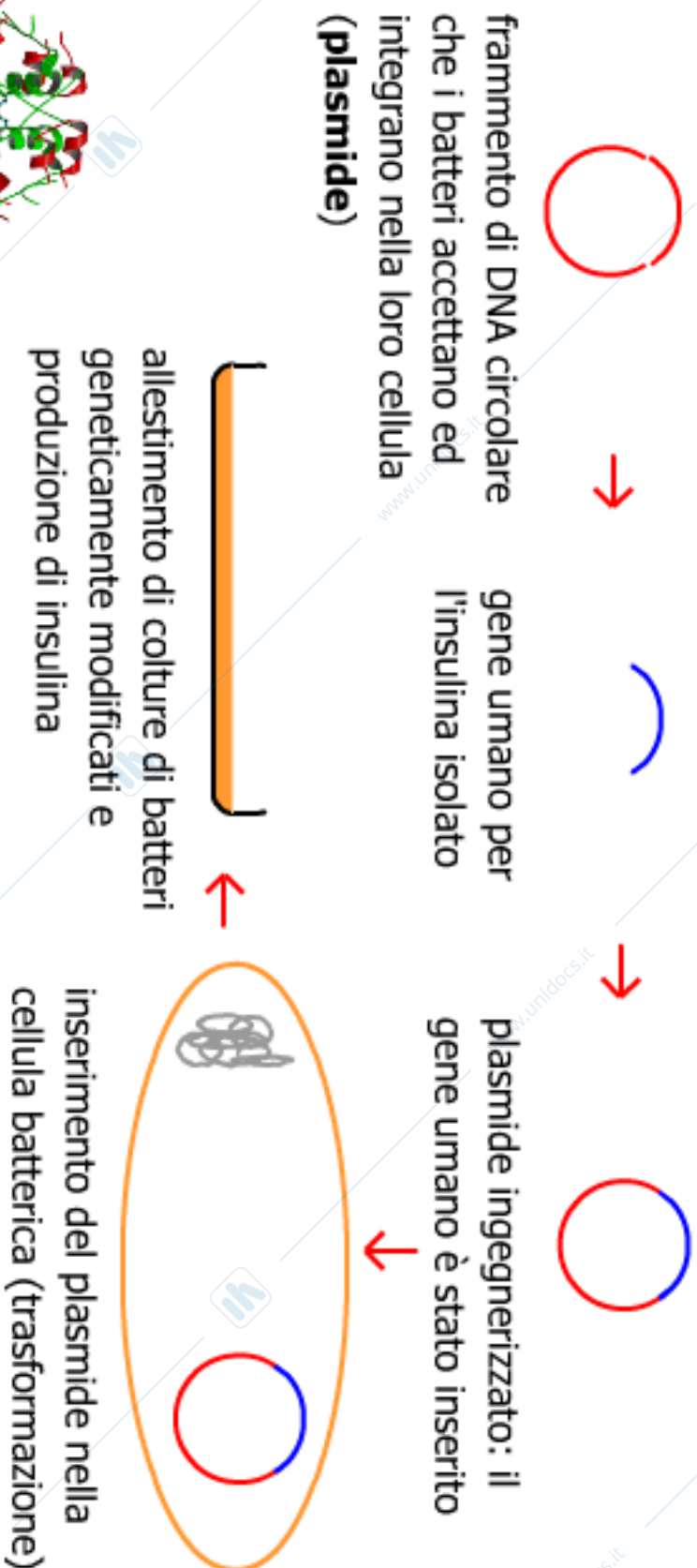
## PRODUZIONE DI INSULINA



## Possibili applicazioni delle biotecnologie

- **In agricoltura:**
  - Migliorare le proprietà alimentari
  - Rendere le piante più resistenti ai parassiti o agli erbicidi
- **In medicina:**
  - Produzione in vitro di ormoni e antibiotici
  - Creazione di animali GM i cui organi siano compatibili con l'uomo
- **In campo ambientale:**
  - Utilizzo di microrganismi GM per "ripulire" zone inquinate
  - Creazione di biosensori che rilevano sostanze chimiche tossiche illuminandosi

# Tecnologia DNA ricombinate e sviluppo nuovi farmaci



*racpresentazione della molecola di insulina*

Produzione di **insulina**: diabete

Prima l'insulina era **isolata dal pancreas di bue o di maiale**. La quantità prodotta da un animale in una settimana era sufficiente ad ottenere una dose giornaliera per un paziente....

**E' stato possibile introdurre il gene umano per l'insulina nel genoma del batterio**

***Escherichia coli* e produrre insulina umana in quantità illimitate**

Altri farmaci prodotti con tecnologia del DNA ricombinante:

**ormone della crescita** (sommministrato a bambini affetti da un difetto nella crescita)

**interferone** (utilizzato nel trattamento dell'epatite virale di tipo B ed in alcune forme di tumore)

**eritropoietina** (utilizzata per stimolare la produzione di globuli rossi in pazienti dializzati)

**Nel settore vegetale l'applicazione di tecniche del DNA ricombinante ha contribuito a creare prodotti con specifiche caratteristiche utili (es. produzione di metaboliti secondari utili, resistenza a insetti, erbicidi, virus, alterato contenuto in specifiche sostanze ecc)**

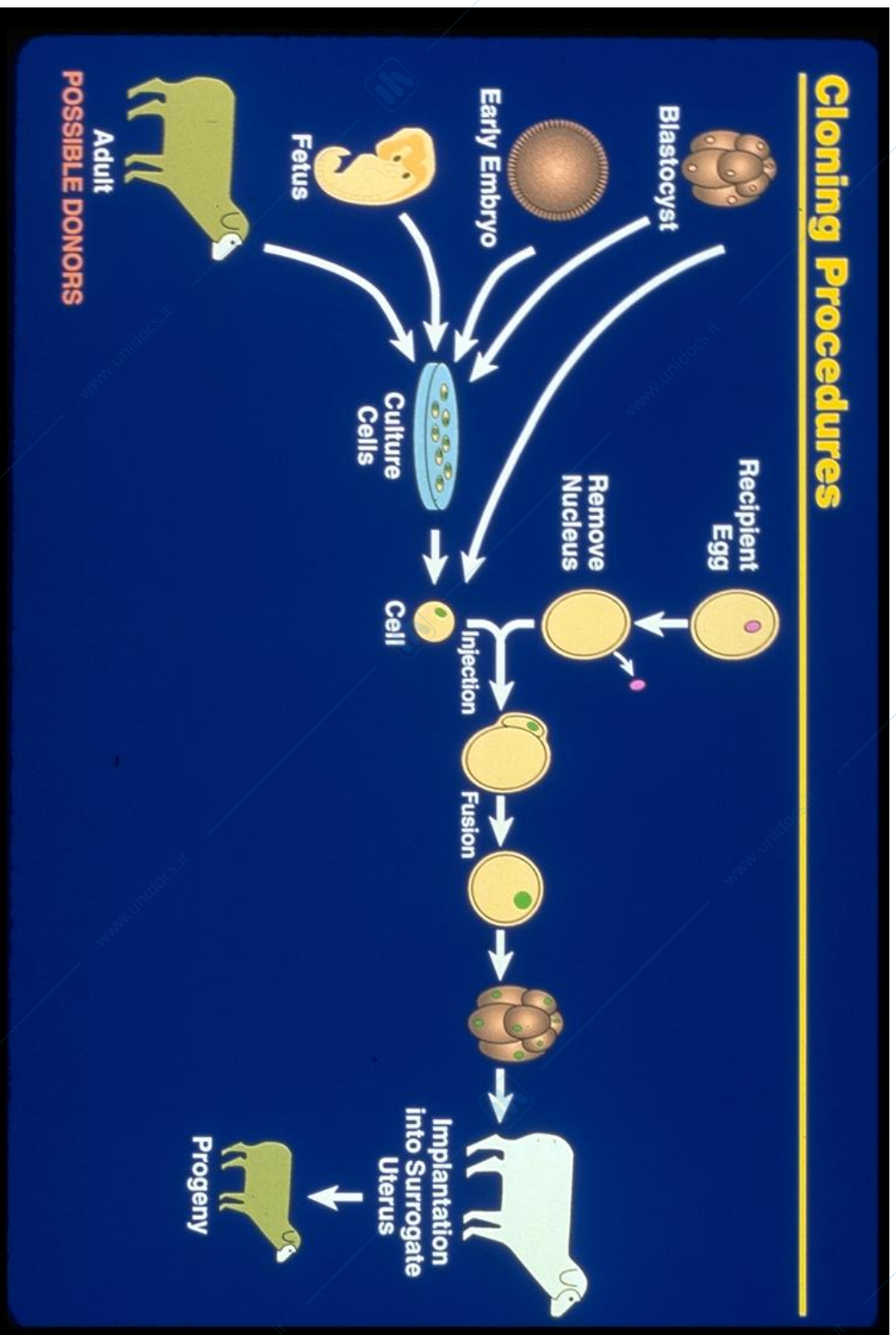
# IN AGRICOLTURA

Le biotecnologie permettono di ottenere molto velocemente in una specie vegetale l'espressione di geni utili a differenza dei lenti metodi tradizionali usati in agricoltura. La prima pianta transgenica posta in vendita nel 1994 in America fu il Flavor Savour, un pomodoro che non marcisce perché modificato per rallentare il processo di decomposizione grazie all'introduzione di un gene in grado di neutralizzare la poligalatturonidasi che provocando la degradazione della pectina (un costituente della parete cellulare dei vegetali) è responsabile del rammollimento fino alla marcescenza.

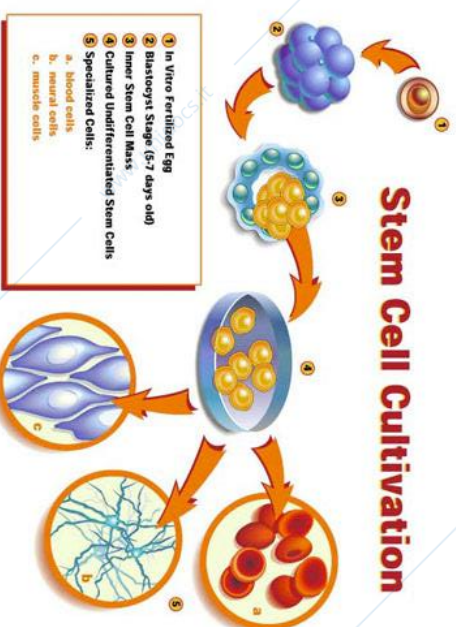
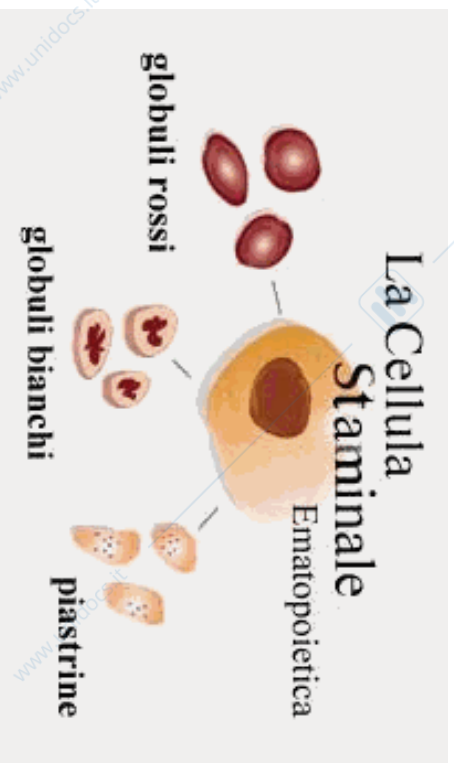
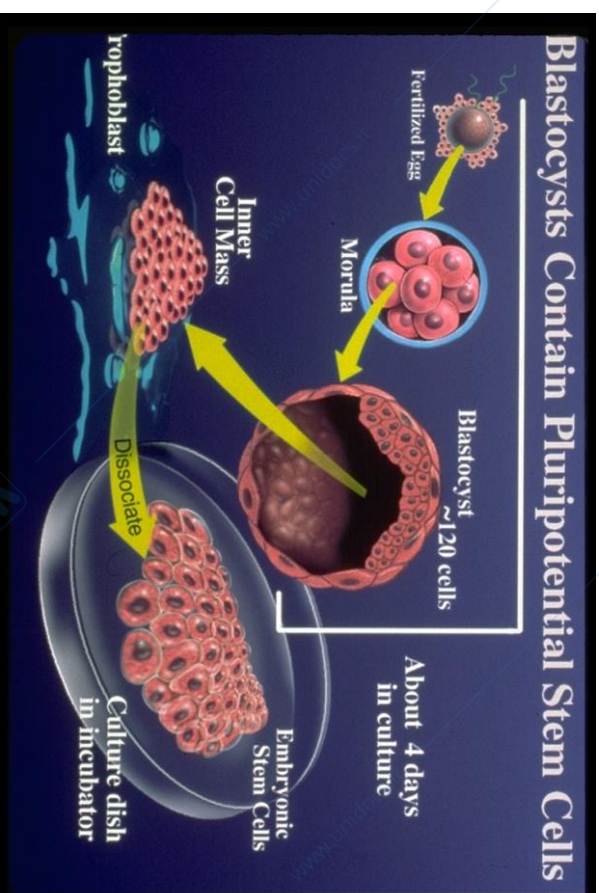
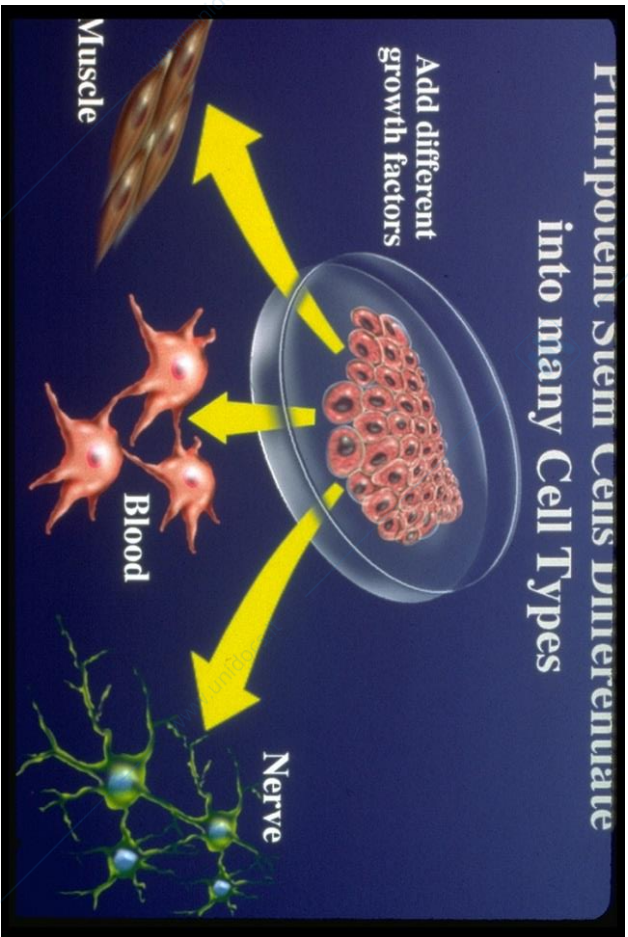


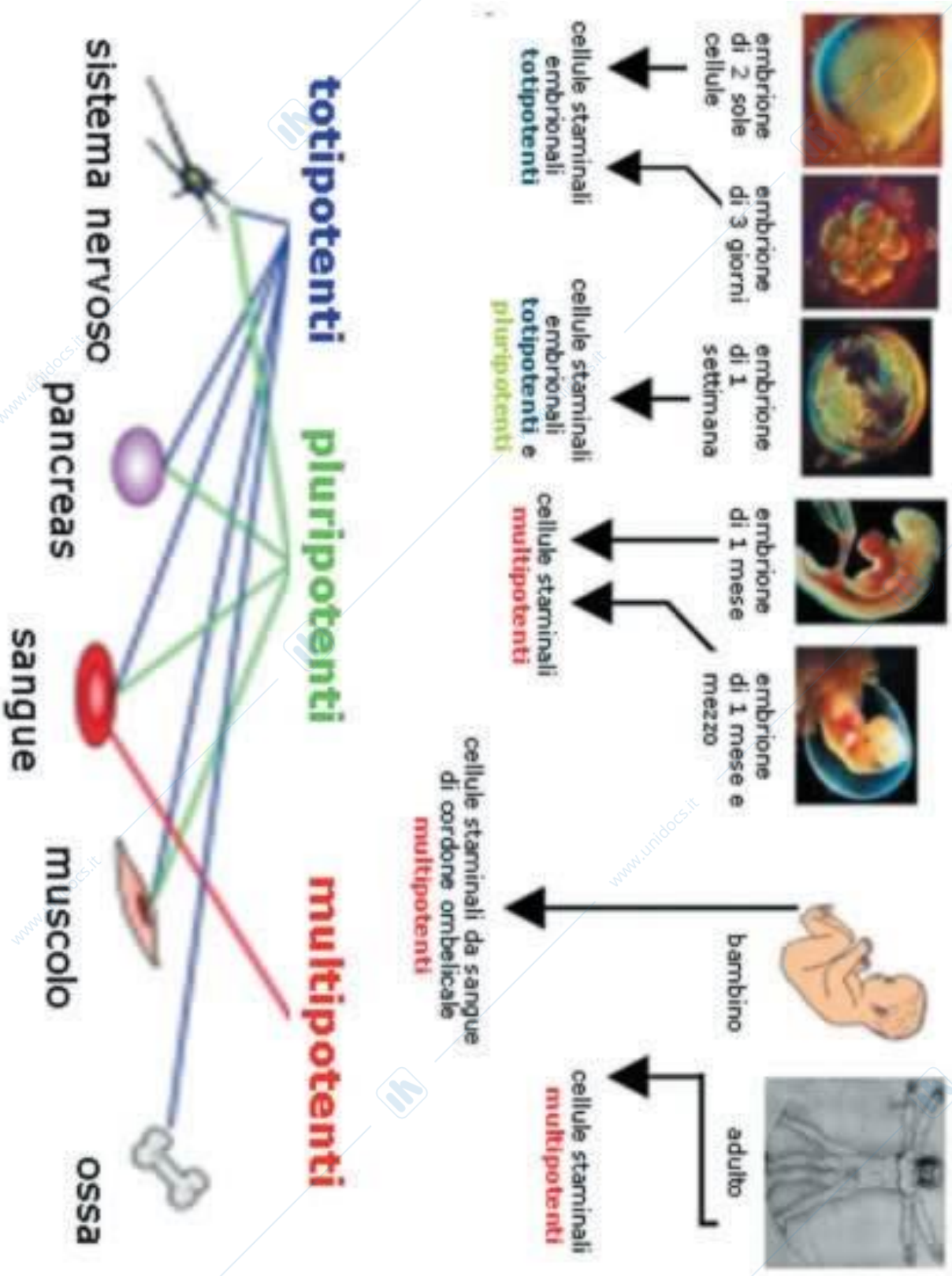
# Dolly

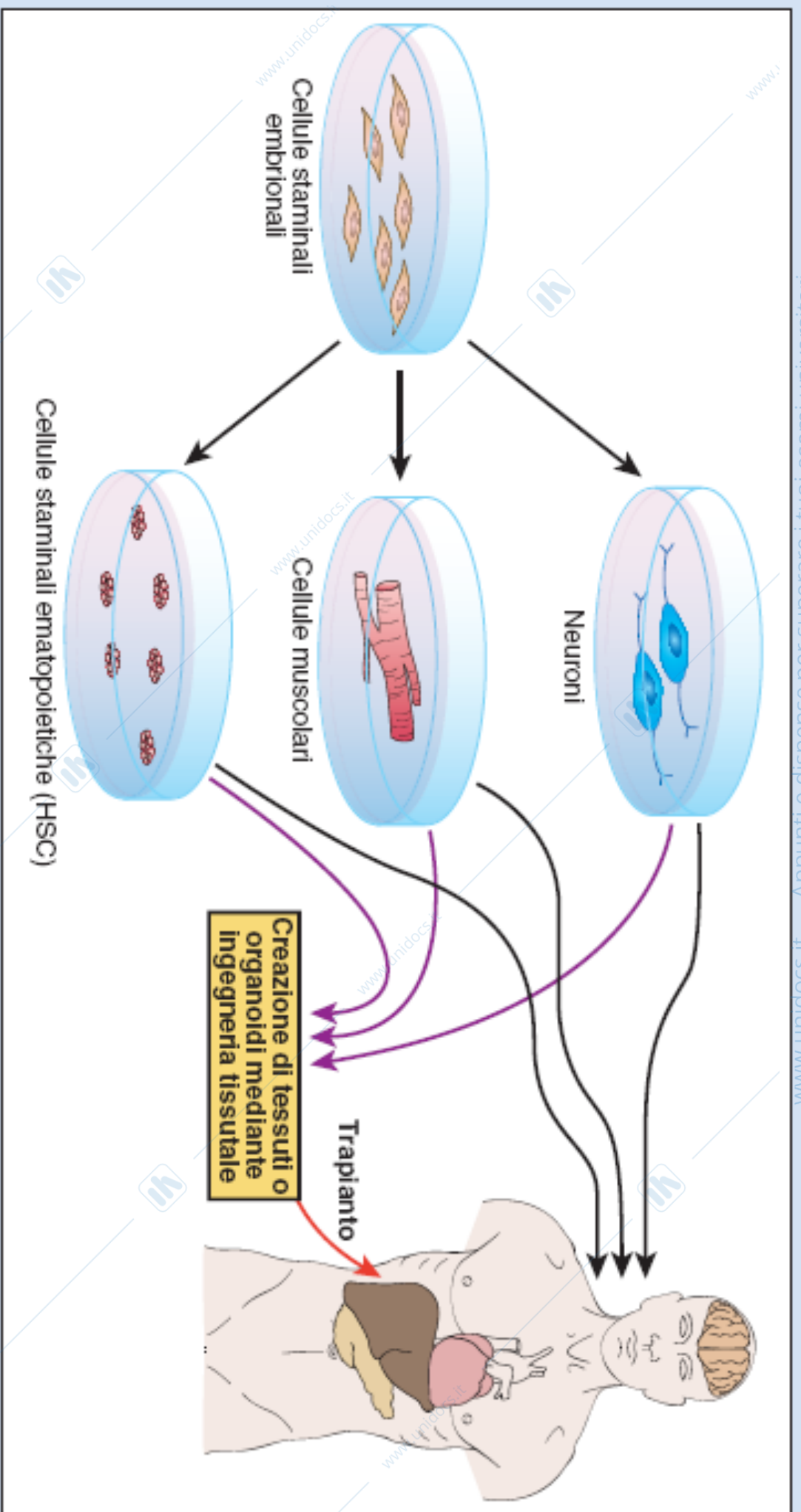
**Trasferimento nucleare:** permette di valutare le caratteristiche del soggetto che si vuole clonare



# Staminali





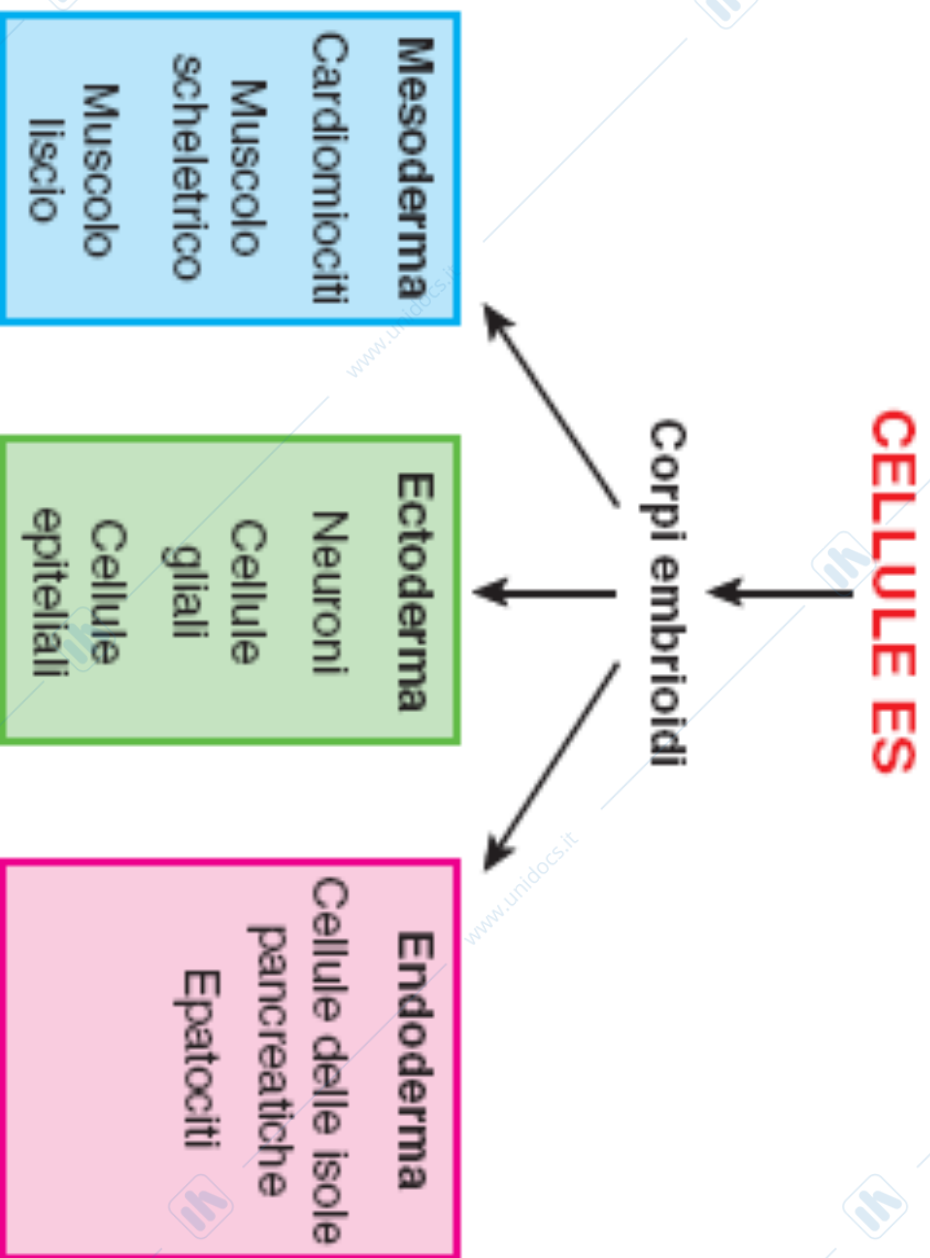


◆ **FIGURA 16.20**

**Le cellule staminali embrionali (ES) si differenziano in vitro in molti tipi cellulari che, in futuro, potrebbero essere utilizzati per terapie cellulari.**

## ◆ **TABELLA 18.1** **Proprietà delle cellule staminali embrionali**

<b>Origine tissutale</b>	Massa interna della blastocisti.
<b>Autorinnovamento a lungo termine</b>	Capaci di compiere un illimitato numero di divisioni simmetriche senza differenziare. Le cellule ES esprimono il fattore trascrizionale OCT-4, che le mantiene in uno stato di proliferazione continua senza differenziazione.
<b>Carlotipo</b>	Normale, diploide, stabile.
<b>Capacità differenziativa</b>	Sono pluripotenti: possono originare tipi cellulari differenziati che derivano dai 3 foglietti embrionali (endoderma, mesoderma ed ectoderma). Possono essere integrate all'interno del tessuto fetale durante lo sviluppo. Le cellule ES murine mantenute in coltura per periodi anche lunghi possono ancora generare ogni tessuto se introdotte in un embrione per produrre un animale chimerico.
<b>Clonogenicità</b>	Una singola ES cell può generare una colonia di cellule geneticamente identiche (clonone), che hanno le stesse proprietà della cellula originale.
<b>Ciclo cellulare</b>	Mancano del checkpoint del G1. Hanno una fase S molto attiva: a differenza delle cellule somatiche, non richiedono stimoli esterni per iniziare la replicazione del DNA.



◆ **FIGURA 18.4**

**Le potenzialità differenzialive delle cellule ES.** Le cellule ES differenziano *in vitro* attraverso la formazione di corpi embrionoidi in cellule dei tre foglietti embrionali.

### ◆ **TABELLA 18.3** **Proprietà delle cellule staminali dell'adulto**

<b>Origine tissutale</b>	Presenti in molti tessuti.
<b>Autorinnovamento a lungo termine</b>	Capaci di mantenere l'omeostasi del compartimento staminale per l'intera vita dell'organismo.
<b>Carlotipo</b>	Normale, diploide, stabile.
<b>Capacità differenziativa</b>	La maggioranza non sono pluripotenti come le cellule ES, poiché hanno una capacità differenziativa limitata. Possono essere multipotenti, come le cellule staminali emopoietiche, oppure unipotenti, come le cellule staminali della pelle. Le uniche eccezioni sono le cellule staminali mesenchimali, che possono originare cellule differenziate di tutti e tre i foglietti embrionali.
<b>Clonogenicità</b>	Una singola cellula staminale dell'adulto, <i>in vitro</i> , può generare una colonia di cellule differenziate, che hanno perso le proprietà della cellula originale.
<b>Ciclo cellulare</b>	La maggioranza sono quiescenti. Richiedono uno stimolo da parte del microambiente (nicchia) per entrare in ciclo e iniziare la sintesi di DNA.
<b>Plasticità</b>	Hanno la capacità di generare cellule specializzate di altri tessuti.

# VACCINI DI NUOVA GENERAZIONE



**PROTEINE INATTIVATE**

**VACCINI VIVI DELEZIONATI**

**VACCINI VIVI RICOMBINATI GENETICAMENTE**

**VACCINI DI DNA**

# ANIMALI TRANSGENICI

- Per **animali transgenici** si intendono quegli animali ottenuti attraverso una manipolazione del genoma, inserendo uno o più geni, appartenenti alla stessa specie, o più spesso ad altre specie.

# Animali Transgenici

Utilizzando le stesse tecniche di manipolazione di geni che vengono impiegate per i vegetali, si è scoperto che era possibile intervenire anche sul DNA di organismi più complessi, cominciando dai batteri fino ai mammiferi superiori. Trasferendo geni estranei di qualunque provenienza (microbica, vegetale, animale) nella cellula uovo fecondata di un animale, sono stati prodotti animali transgenici, dotati cioè di caratteri nuovi che mai avrebbero potuto acquisire con tecniche naturali. Per produrre animali transgenici e cioè poter inserire un gene "nuovo" in un animale, in modo da farlo esprimere anche ai suoi discendenti, è necessario inserirlo quando l'individuo è costituito da poche cellule o addirittura dall'ovulo appena fecondato (zigote).

