

Corso di Biologia cellulare

Lo sviluppo embrionale

***< Le cellule vanno incontro a differenziamento
progressivo >***

LA GASTRULAZIONE

Vengono modellate le caratteristiche interne ed esterne dell'embrione attraverso la trasformazione della blastula.

Si attiva una serie di movimenti cellulari: i blastomeri assumono nuove posizioni e stabiliscono nuovi rapporti con le altre cellule.

Si stabilisce un nuovo piano strutturale dell'embrione, mediante la formazione di tre foglietti embrionali: *ectoderma* (esterno), *endoderma* (interno) e *mesoderma* (interposto fra ectoderma e endoderma).

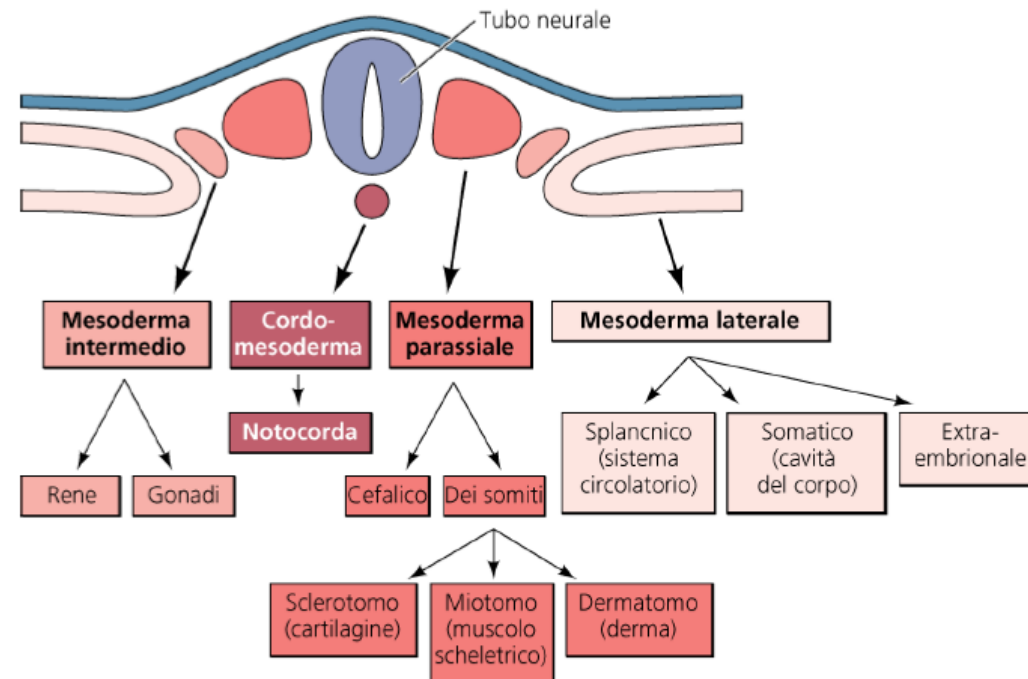
Si dà l'avvio all'organogenesi. Nei Vertebrati, la formazione e estensione della notocorda definiscono i principali assi corporei: antero-posteriore e dorsale-ventrale.

Il mesoderma ai lati della notocorda si trasforma in:

mesoderma para-assiale: i somiti e il mesoderma cefalico

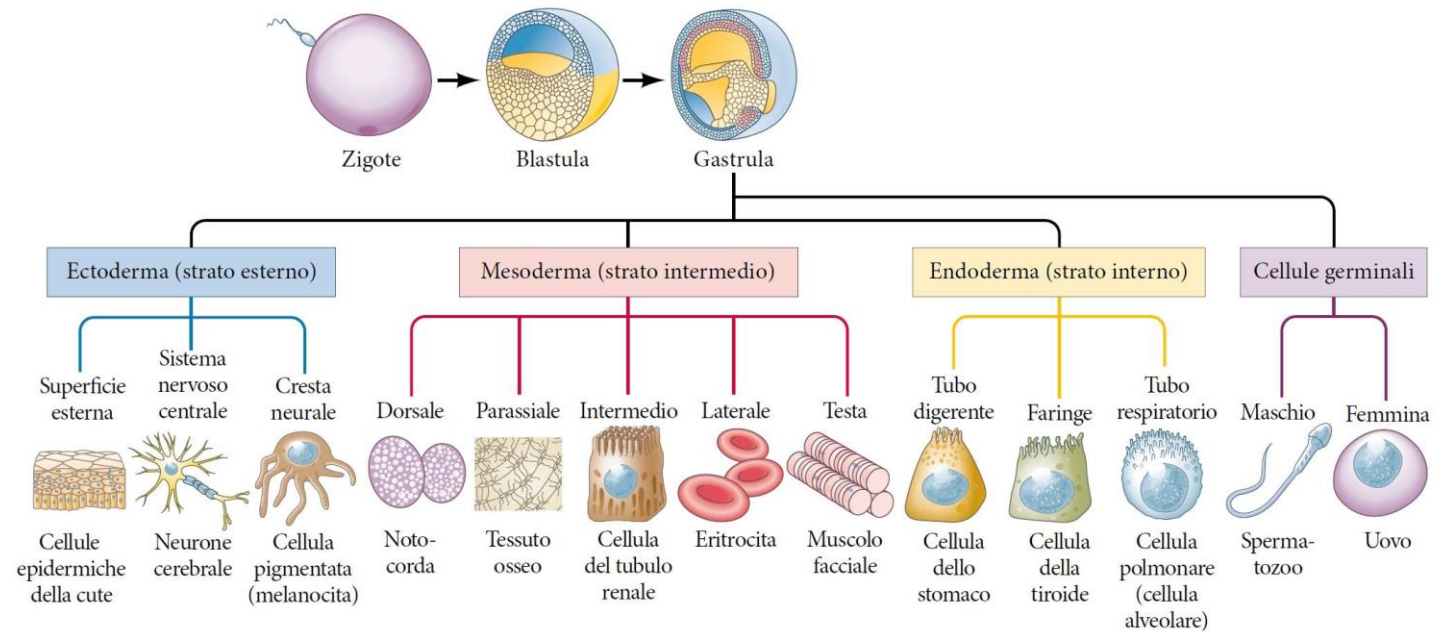
mesoderma intermedio: peduncolo del somite

mesoderma laterale: delaminandosi dà origine ad una lamina somatica, che unendosi all'ectoderma costituisce la somatopleura, e ad una lamina viscerale (splancnica), che unendosi all'endoderma, costituisce la splancnopleura. Tra le lamine somatica e viscerale si forma il celoma.

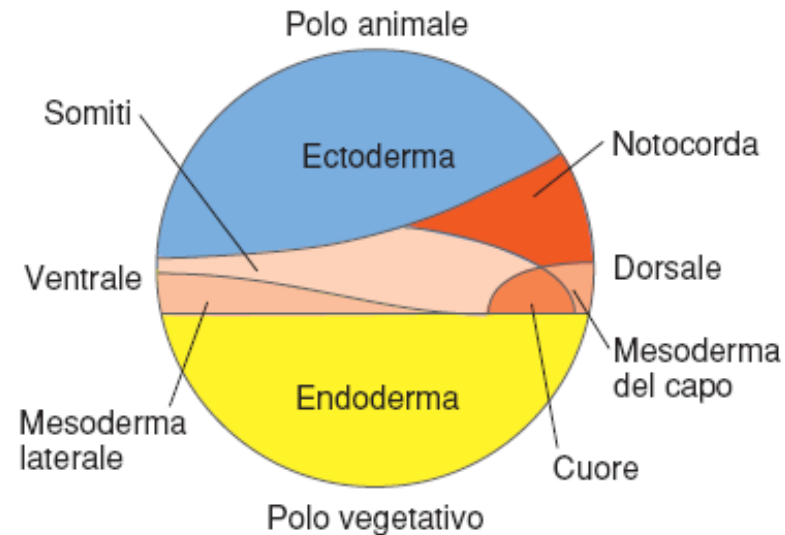


Il somite si differenzia in sclerotomo, miotomo e dermatomo.

Obiettivo chiave:
comprendere il destino prospettico delle cellule dei foglietti embrionali



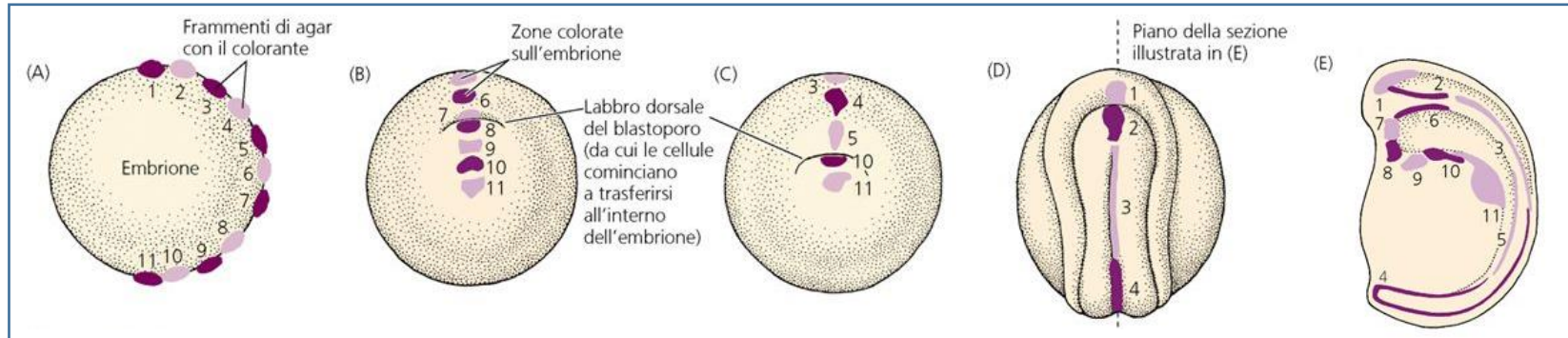
MAPPE DEI TERRITORI PRESUNTIVI (tracciare linee di discendenza cellulare)



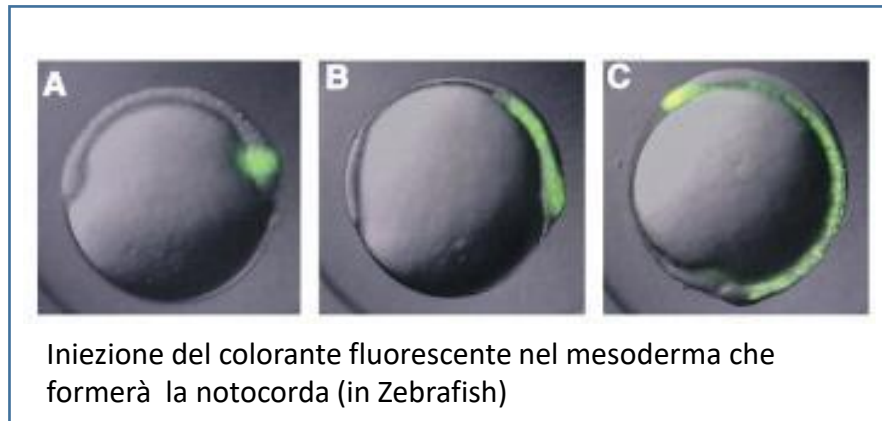
Tecniche di marcatura delle cellule (coloranti vitali non diffusibili, proteine fluorescenti, animali chimerici) hanno permesso di seguire nel tempo il destino di specifiche cellule, mappando la struttura dell'embrione per comprendere la derivazione delle regioni della larva o del giovane.

Le mappe dei territori presuntivi sono divenute nel tempo sempre più dettagliate.

Marcatura con coloranti vitali (Vogt, 1929)

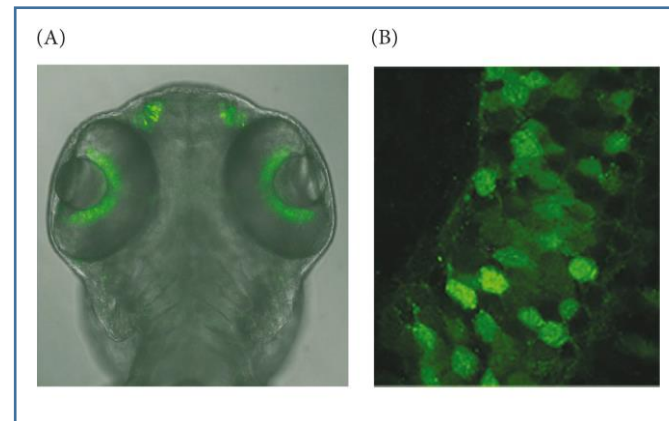


Marcatura con composti fluorescenti



Vengono microiniettati nella cellula d'interesse per marcarne la discendenza. In alternativa, il colorante inattivo (*caged*) viene microiniettato in stadi di sviluppo molto precoci per diffonderlo nell'embrione intero. Successivamente, il laser può attivare l'emissione di fluorescenza solo in cellule bersaglio d'interesse.

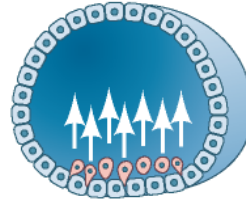
Organismi chimerici o transgenici



Marcatura di specifiche cellule sensoriali mediante GFP in zebrafish transgenico.

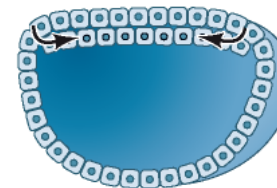
I MOVIMENTI DELLE CELLULE NELLA GASTRULAZIONE

TRANSIZIONI EPITELIO-MESENCHIMA



Ingressione

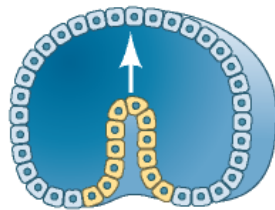
Migrazione di singole cellule entro l'embrione
(es. mesoderma riccio di mare, gastrulazione Amnioti)



Delaminazione

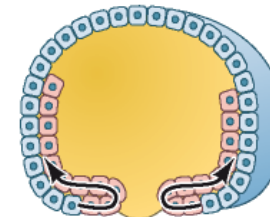
Divisione di una lamina cellulare o sua migrazione a formare due lamine
(es. formazione ipoblasto negli Amnioti)

EPITELIALI



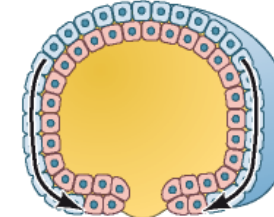
Invaginazione

Ripiegamento di una lamina cellulare entro l'embrione
(es. endoderma riccio di mare)



Involuzione

Introflessione di una lamina cellulare sulla superficie basale di uno strato esterno
(es. mesoderma Anfibi)



Epibolia

Espansione di una lamina cellulare sopra altre cellule
(es. formazione ectoderma)
Mitosi, intercalazione, estensione convergente.

NB: In fase avanzata della gastrulazione possono avvenire anche movimenti di *traslocazione* (migrazione di cellule singole o gruppi lungo un substrato).

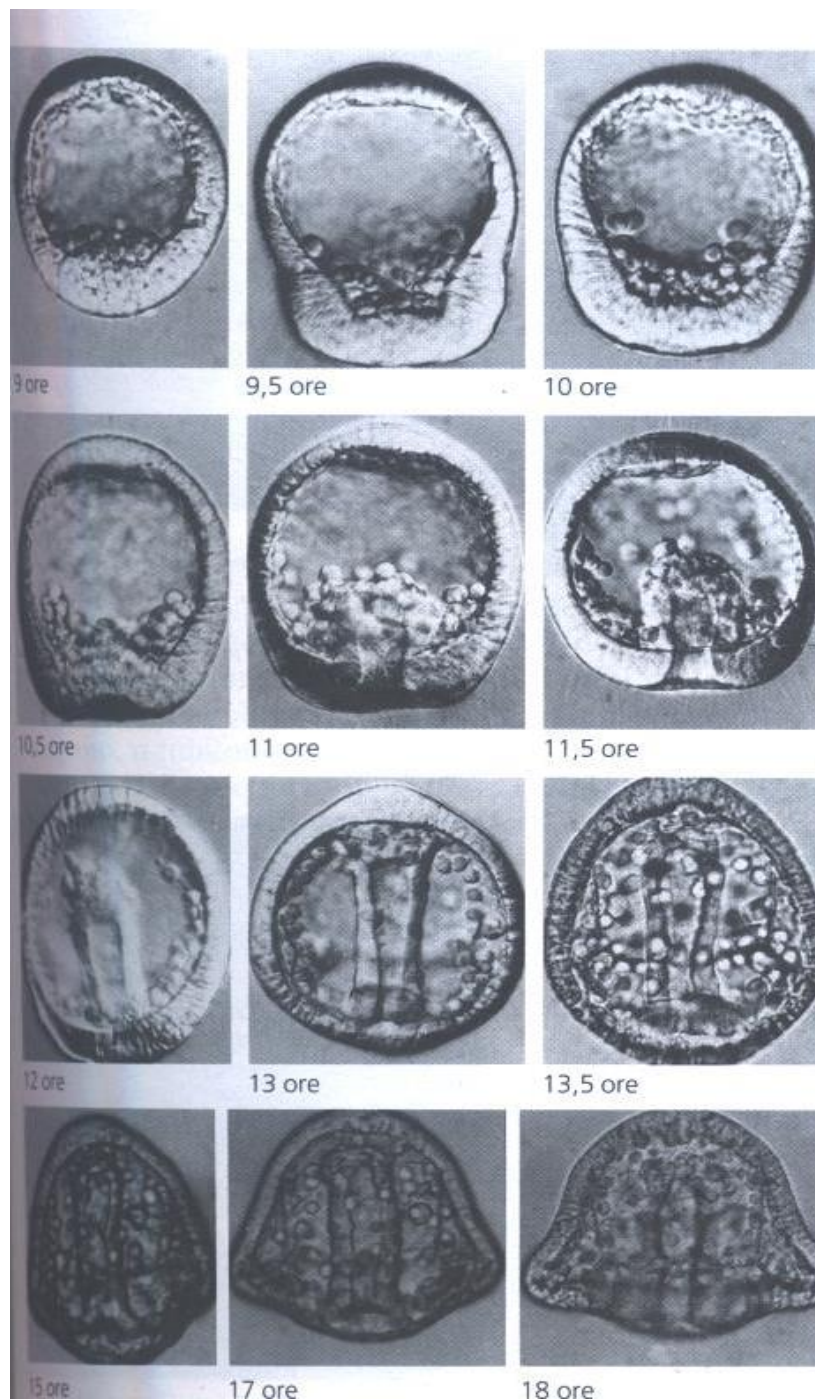


GASTRULAZIONE NEGLI ANIMALI TRIBLASTICI

I blastomeri formano 3 foglietti embrionali
(*ectoderma, mesoderma, endoderma*)

DIFFERENTI TIPI DI GASTRULAZIONE

Mediante *transizioni epitelio-mesenchimatiche*
dei blastomeri
(es. Riccio di mare)



Riccio di mare
Blastula iniziale
 ~ 64-128 cellule
Blastula avanzata
 ~ 1000 cellule

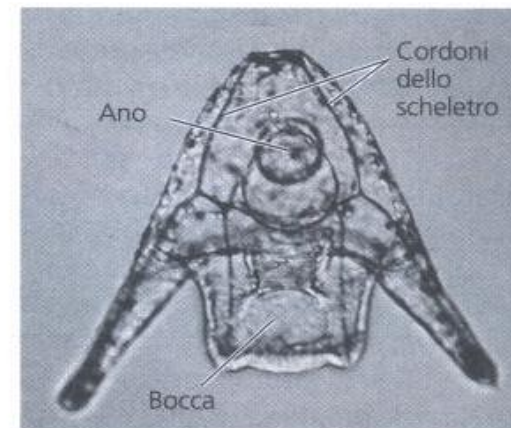


Figura 8.16

Intera sequenza della gastrulazione in *Lytechinus variegatus*. Le ore indicano la durata dello sviluppo a 25 °C. (Fotografie per gentile concessione di J. Morrill; larva pluteo per gentile concessione di G. Watchmaker.)



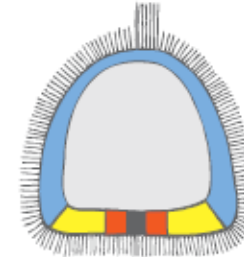
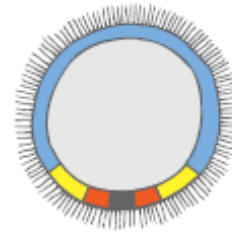
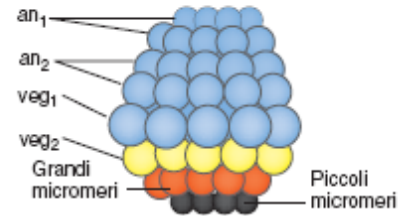
STADIO

iniziale

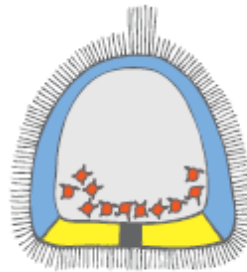
intermedio

finale

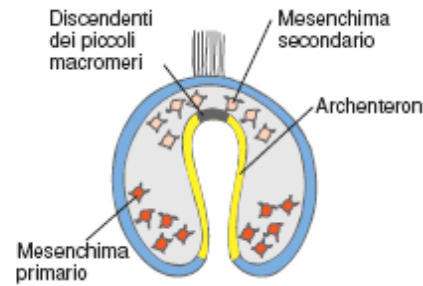
BLASTULA



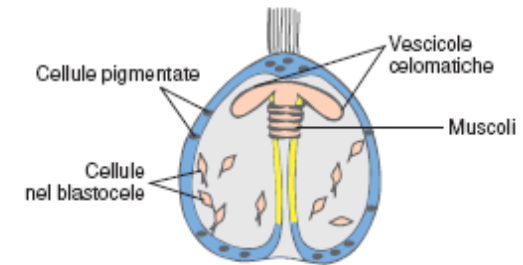
GASTRULA



Formazione del mesenchima primario

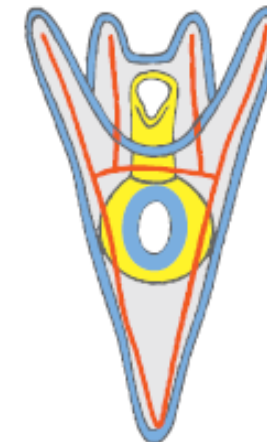
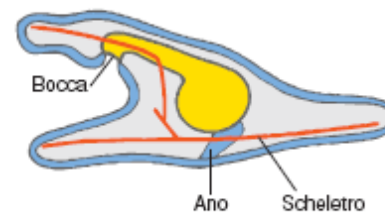
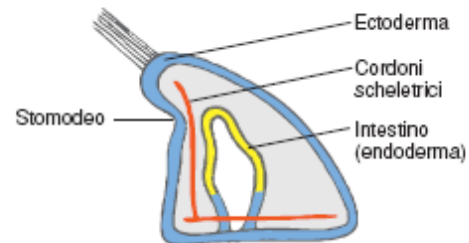


Allungamento dell'archenteron e formazione del mesenchima secondario



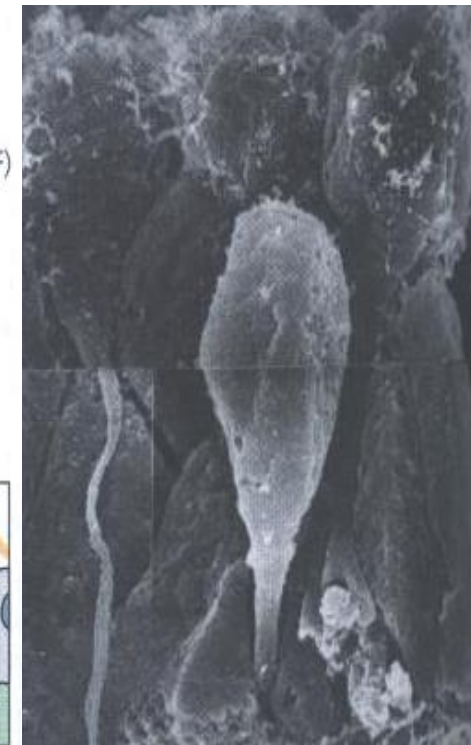
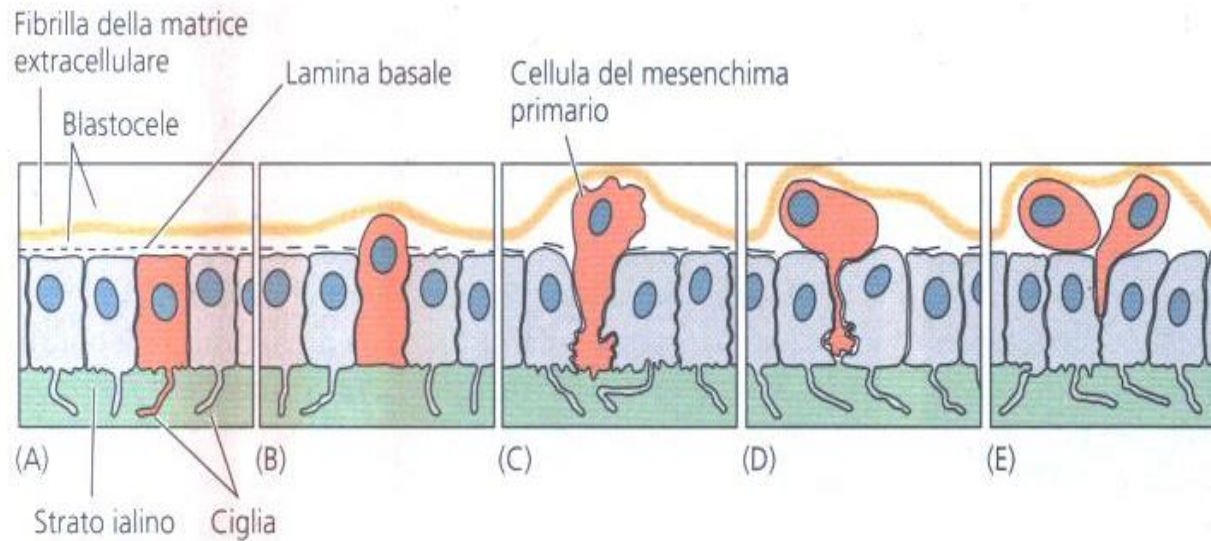
Organogenesi larvale

LARVA

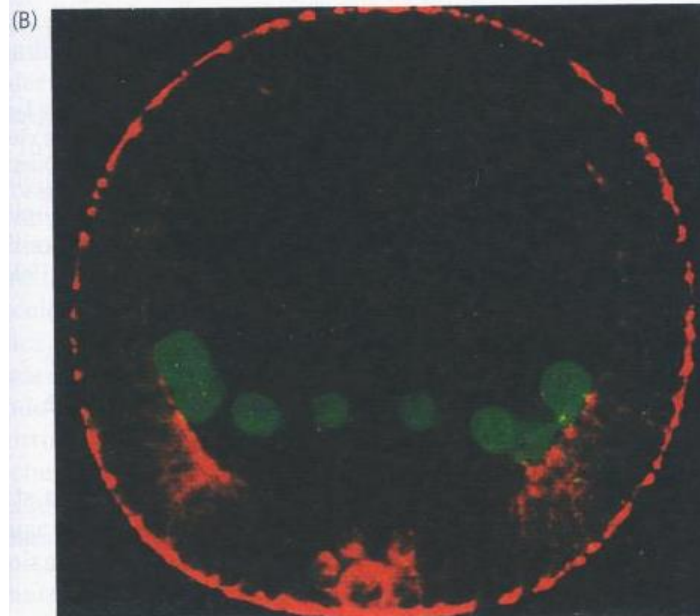
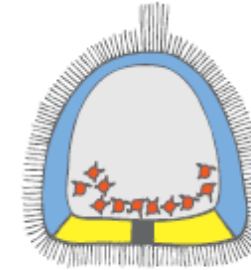


Transizione epitelio-mesenchima del mesenchima primario

Trasferimento all'interno delle cellule del mesenchima primario. (A-E) Schemi interpretativi che illustrano le variazioni delle affinità di adesione delle cellule del mesenchima primario presuntivo (rosa). Queste cellule perdono le loro affinità per lo strato ialino e per i blastomeri vicini, mentre acquistano affinità per le proteine della lamina basale. I blastomeri non mesenchimali conservano la loro iniziale elevata affinità per lo strato ialino e per le cellule vicine. (F) Montaggio di immagini SEM che illustra il trasferimento all'interno delle cellule del mesenchima primitivo in *Lytechinus variegatus*. (F, per gentile concessione di J.B. Morrill e D. Flaherty.)



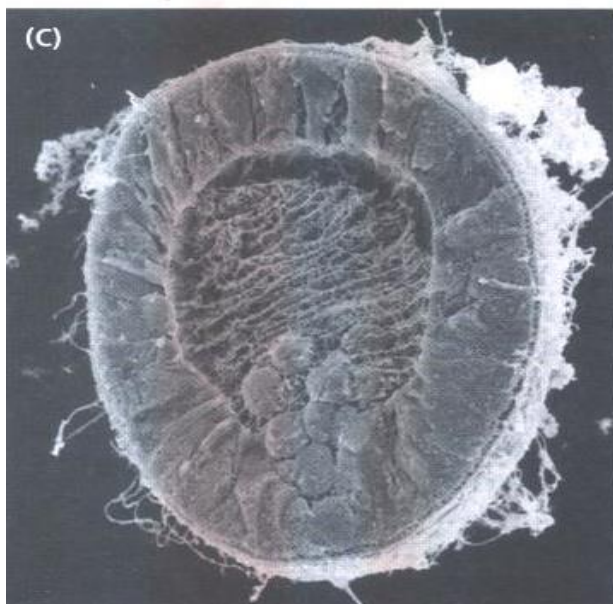
Ingressione del mesenchima primario



Localizzazione delle cellule del mesenchima primario. (A) Immagine ripresa in videomicroscopia interferenziale di Nomarski, che mostra un lungo, sottile filopodio emesso da una cellula del mesenchima primario verso la parete ectodermica della gastrula e un filopodio più corto che protrude dall'ectoderma verso l'interno. I filopodi delle cellule del mesenchima si estendono attraverso la matrice extracellulare e prendono direttamente contatto con la membrana cellulare delle cellule dell'ectoderma. (B) La localizzazione dei micromeri per formare lo scheletro di carbonato di calcio è determinata dalle cellule ectodermiche. Le cellule del mesenchima primario sono colorate in verde, mentre la β -catenina è colorata in rosso. Le cellule del mesenchima primario si accumulano nelle regioni caratterizzate da elevata concentrazione di β -catenina. (A, da Miller et al. 1995; fotografie per gentile concessione di J.R. Miller e D. McClay.)

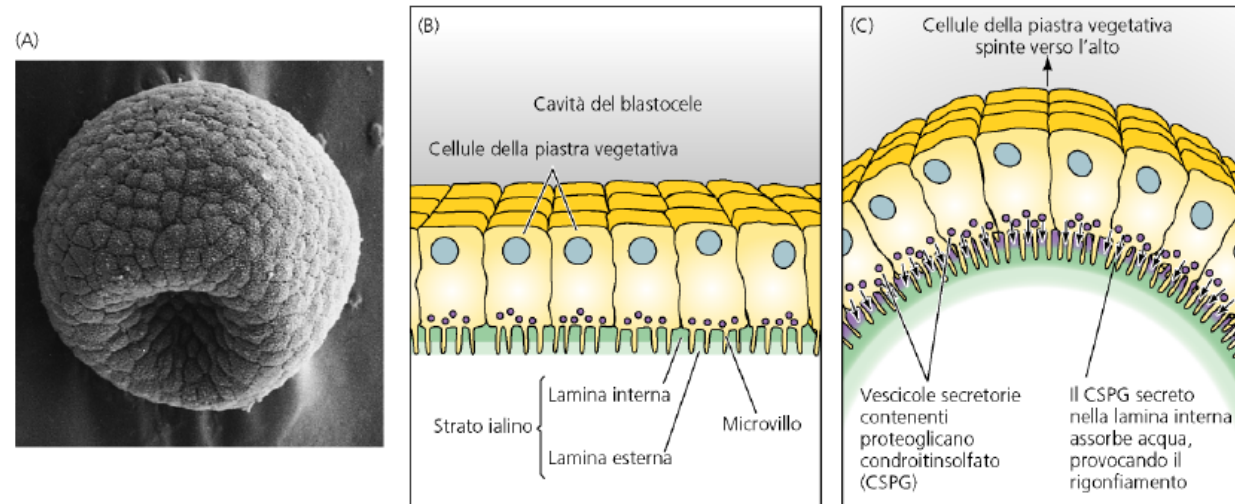
La migrazione è guidata da segnali ectodermici
(VEGF e FGF)





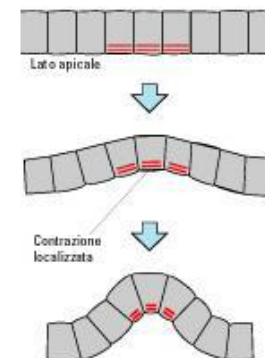
Formazione di cordoni sinciziali da parte delle cellule del mesenchima primario nel riccio di mare. (A) Nella gastrula in stadio iniziale le cellule del mesenchima primario si allineano e si fondono, formando la matrice delle spicole di carbonato di calcio (freccette). (B) Immagine al microscopio elettronico a scansione (SEM) di spicole formate dalla fusione di cellule del mesenchima primario in cordoni sinciziali. (C) Immagine SEM di cellule del mesenchima primario incluse nella matrice extracellulare della gastrula iniziale di *Strongylocentrotus*. (D) Migrazione delle cellule mesenchimali allo stadio di gastrula. Le fibrille della matrice extracellulare del blastocelesono parallele all'asse polo animale-polo vegetativo e sono strettamente associate alle cellule del mesenchima primario. (A, da Etten

Invaginazione della piastra vegetativa

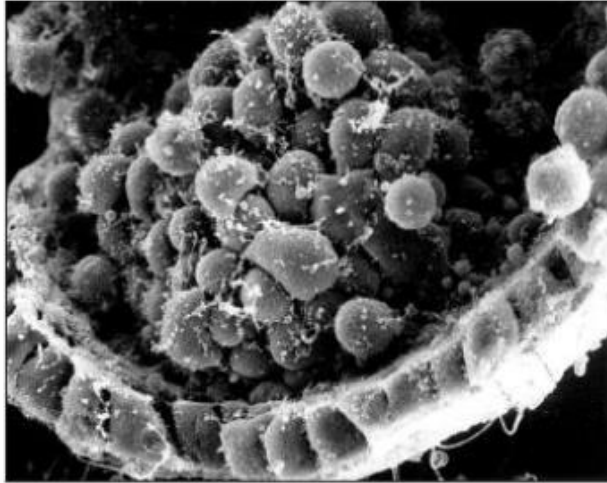


- A) Immagine SEM della gastrula iniziale di *Lytechinus variegatus*. E' evidente il blastoporo.
- B) Lo strato ialino è costituito da una lamina interna e una lamina esterna. Dalle cellule della piastra vegetativa protrudono microvilli che si estendono per tutto lo strato ialino e il citoplasma di queste cellule contiene vescicole secretorie in cui è accumulato un proteoglicano condroitinsolfato (CSPG).
- C) Il CSPG viene secreto nella lamina interna dello strato ialino. Il CSPG assorbe acqua e fa rigonfiare la lamina interna, mentre la lamina esterna, cui è attaccata la lamina interna, non si rigonfia. Ciò provoca che lo strato ialino e l'epitelio ad esso attaccato si incurvino verso l'interno dell'embrione.

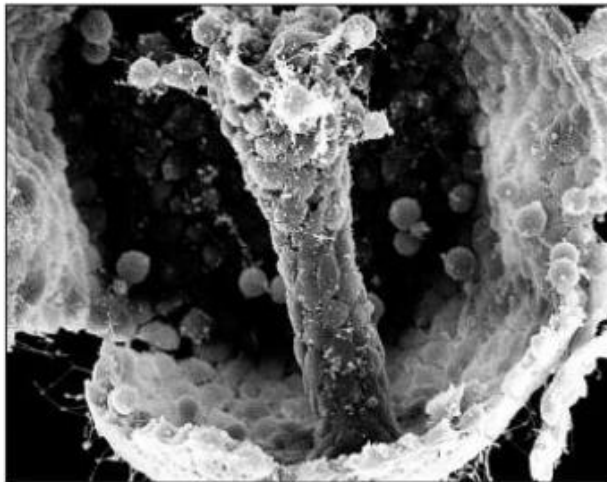
Le cellule, inizialmente cuboidali, assumono forma allungata a cuneo, per la contrazione degli elementi citoscheletrici



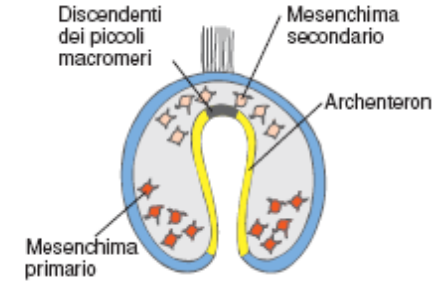
Allungamento dell'archenteron



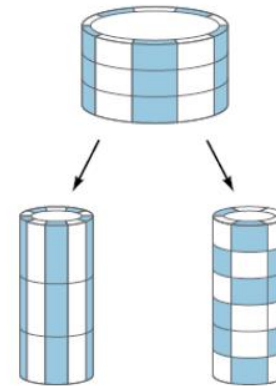
(a)



(b)



Fenomeni di cambiamento di forma e intercalazione delle cellule contribuiscono all'*estensione convergente*, che allunga l'archenteron verso il polo animale.



Le foto SEM mostrano l'interno dell'embrione di *Lytechinus variegatus* dopo la rimozione dell'ectoderma dell'emisfero animale. In (a) gastrula intermedia, in (b) gastrula finale.

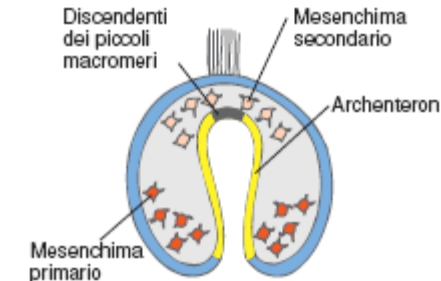


Formazione del mesenchima secondario

Cellule che derivano da veg_2 migrano entro il blastocele;

emettono lunghi filopodi, con cui contattano la superficie interna del blastocele;

il successivo accorciamento dei filopodi che hanno stabilito il contatto con la superficie del blastocele permette l'ulteriore allungamento dell'archenteron.



- a) emissione di filopodi da parte di cellule del mesenchima, dal fondo dell'archenteron;
- b) cordoni di filopodi che uniscono la parete del blastocele al fondo dell'archenteron. Si osservano i cordoni in tensione dove essi tirano la parete del blastocele nel loro punto di attacco (da Ettensohn).

Foto di gastrula media di *Lytechinus pictus*

Mediante formazione del *blastoporo*
(es. Anfibi)

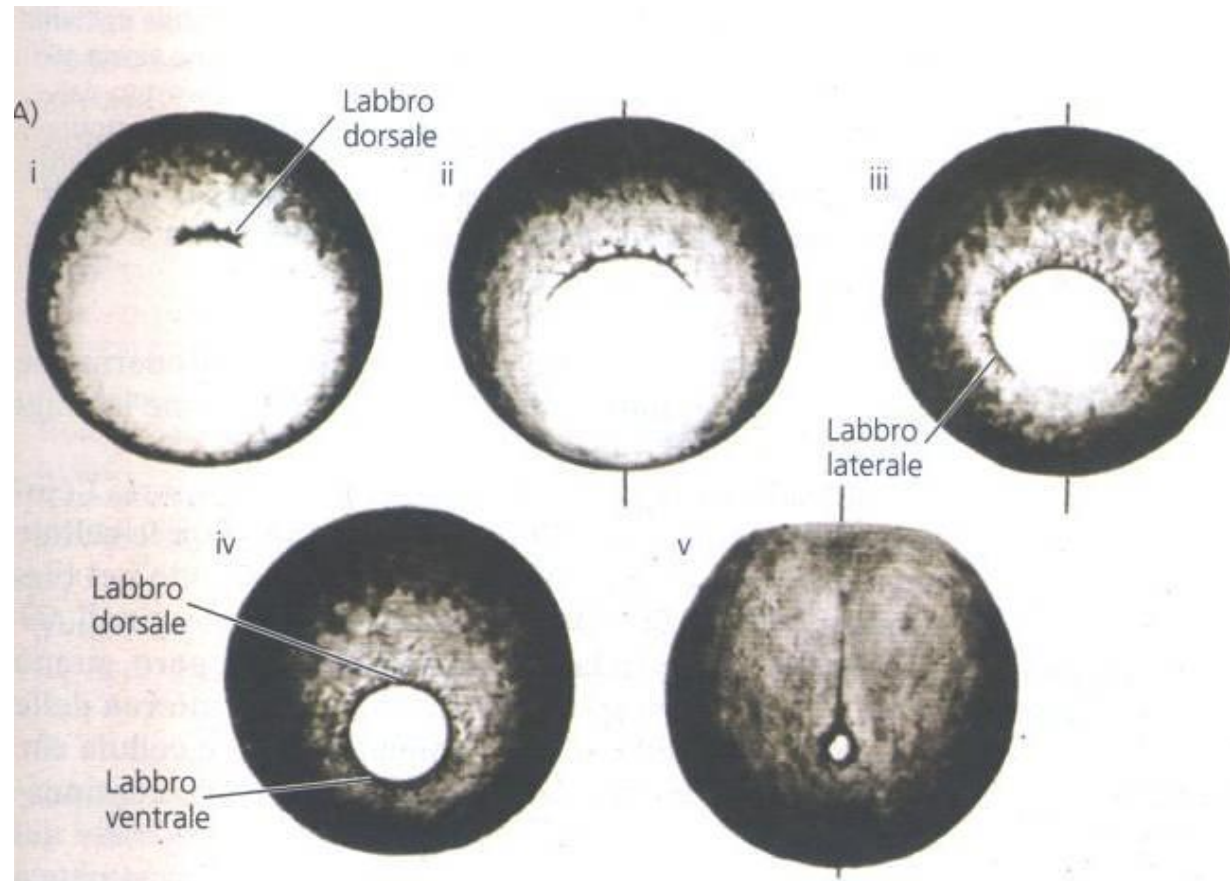
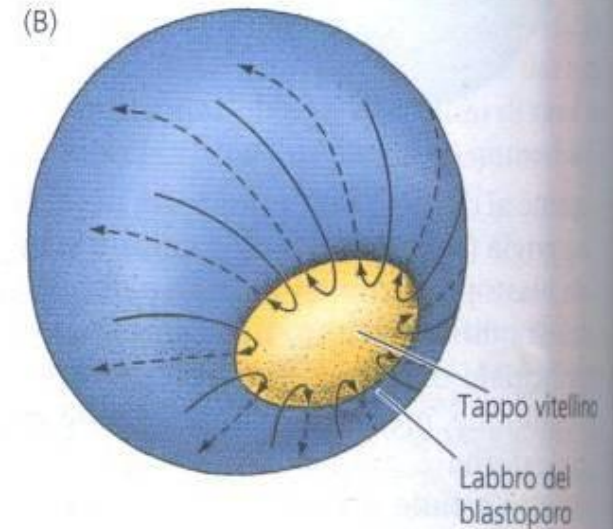


Figura 10.9

Epibolia dell'ectoderma. (A) Modificazioni della regione circostante il blastoporo, quando si formano in successione il labbro dorsale, i labbri laterali, il labbro ventrale. Quando il labbro ventrale completa l'anello, l'endo-

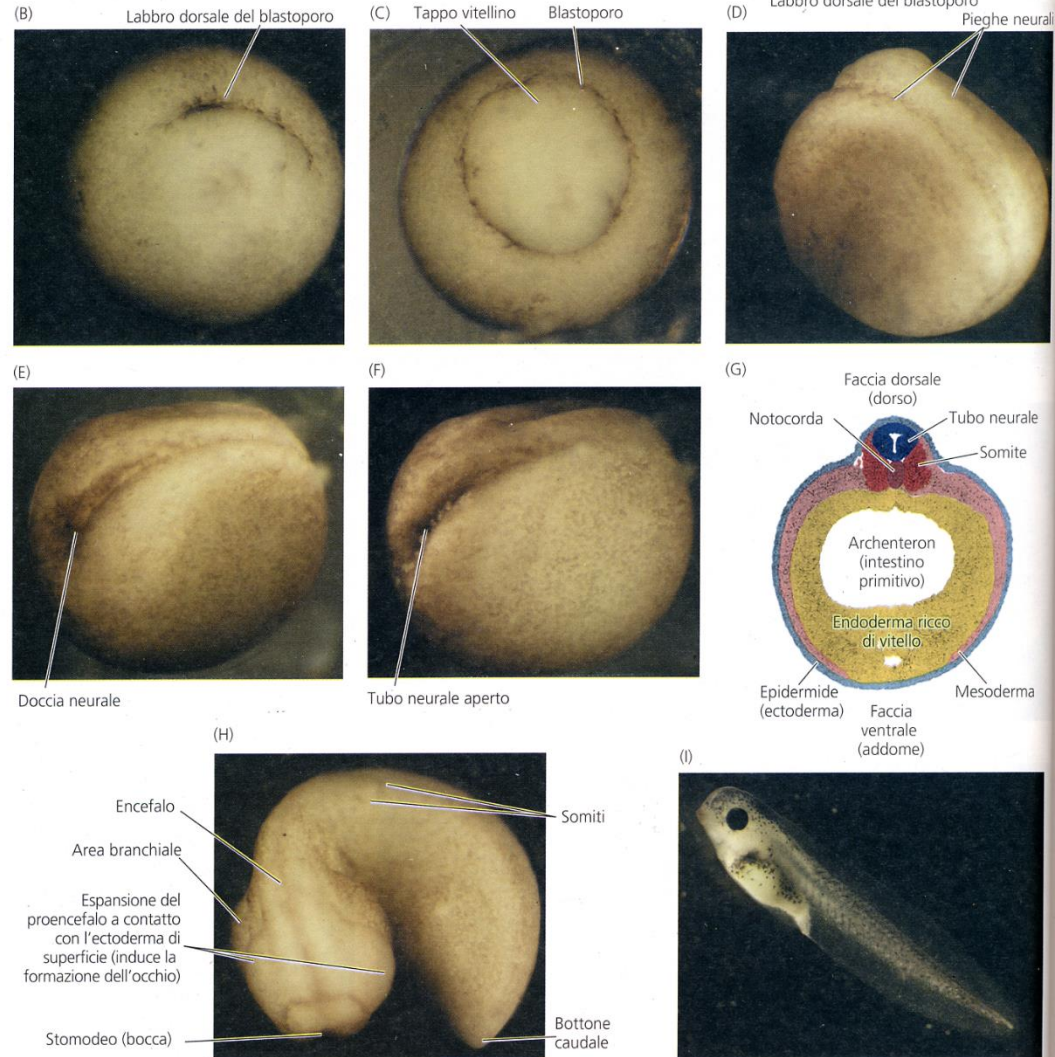
derma viene progressivamente portato all'interno. I numeri ii-v corrispondono, rispettivamente, alle Figure 10.7B-E. (B) Riassunto dell'epibolia dell'ectoderma e dell'embolia delle cellule mesodermiche che migrano nel blastoporo e poi al di sotto della superficie. L'en-



doderma sottostante al labbro del blastoporo (il tappo vitellino) non si muove e viene racchiuso per mezzo di questi movimenti. (A, da Balinsky 1975; fotografie per gentile concessione di B.I. Balinsky.)

Figura 2.3

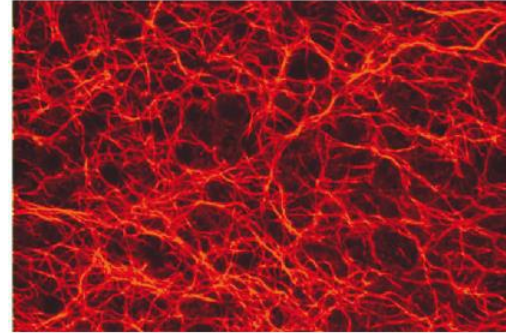
Continuazione dello sviluppo di *Xenopus laevis*. (A) La gastrulazione inizia con una invaginazione in forma di incisura nella futura faccia dorsale (quella in alto) dell'embrione. (B) Incisura e labbro dorsale del blastoporo visti dalla faccia ventrale (quella in basso) dell'embrione. (C) L'incisura diventa un solco circolare; il blastoporo. Le cellule del futuro mesoderma migrano all'interno dell'embrione attraverso i margini del blastoporo, e l'ectoderma (che darà origine all'epidermide e al sistema nervoso) si estende verso il basso sulla superficie dell'embrione. La parte restante, l'endoderma ricco di vitello, viene infine racchiusa. (D) Nella faccia dorsale cominciano a formarsi le pieghe neurali. (E) Si può osservare una doccia laddove si troverà il pavimento del tubo neurale. (F) Le pieghe neurali si uniscono dorsalmente sulla linea mediana formando un tubo neurale. (G) Sezione trasversale dell'embrione di *Xenopus* allo stadio di neurula. (H) Girino prima della schiusa, allorché le protrusioni del proencefalo cominciano a indurre la formazione dell'occhio. (I) Girino maturo, che è sgusciato fuori dalla massa gelatinosa dell'uovo e si nutre in modo indipendente. (Fotografie per gentile concessione di Michael Danilchik e Kimberly Ray.)



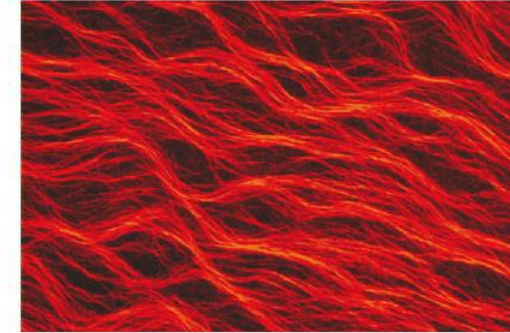
LA GASTRULAZIONE DEGLI ANFIBI

La fecondazione causa la riorganizzazione dei microtubuli dell'uovo.

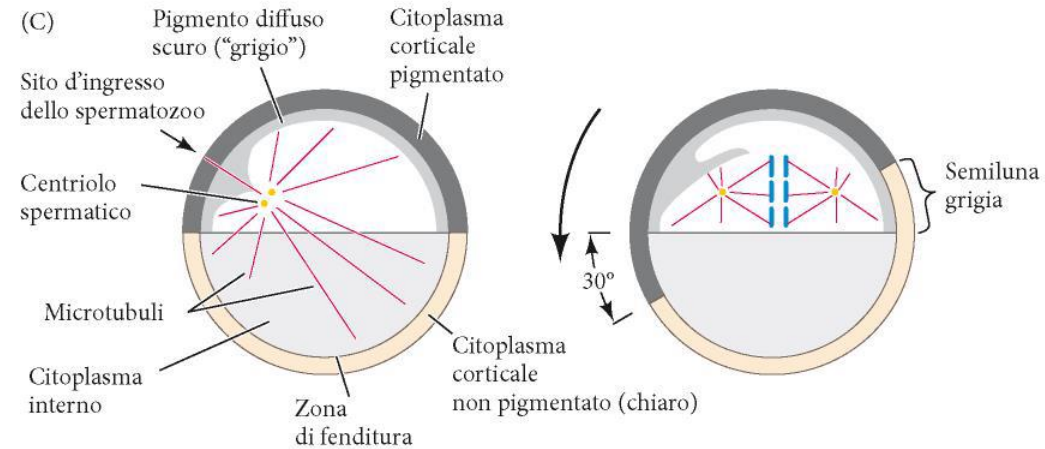
(A) 0,50



(B) 0,70

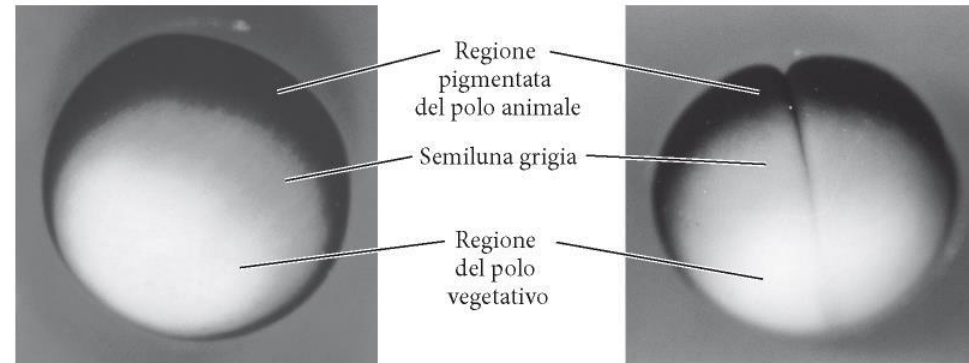


I centrioli dello spermatozoo dirigono questa riorganizzazione lungo l'asse dorso-ventrale. Il citoplasma corticale dell'uovo attua uno spostamento di 30°.



In conseguenza della rotazione del citoplasma più corticale, si forma la semiluna grigia, che espone la pigmentazione meno intensa del citoplasma più interno (con granuli diffusi).

(D)



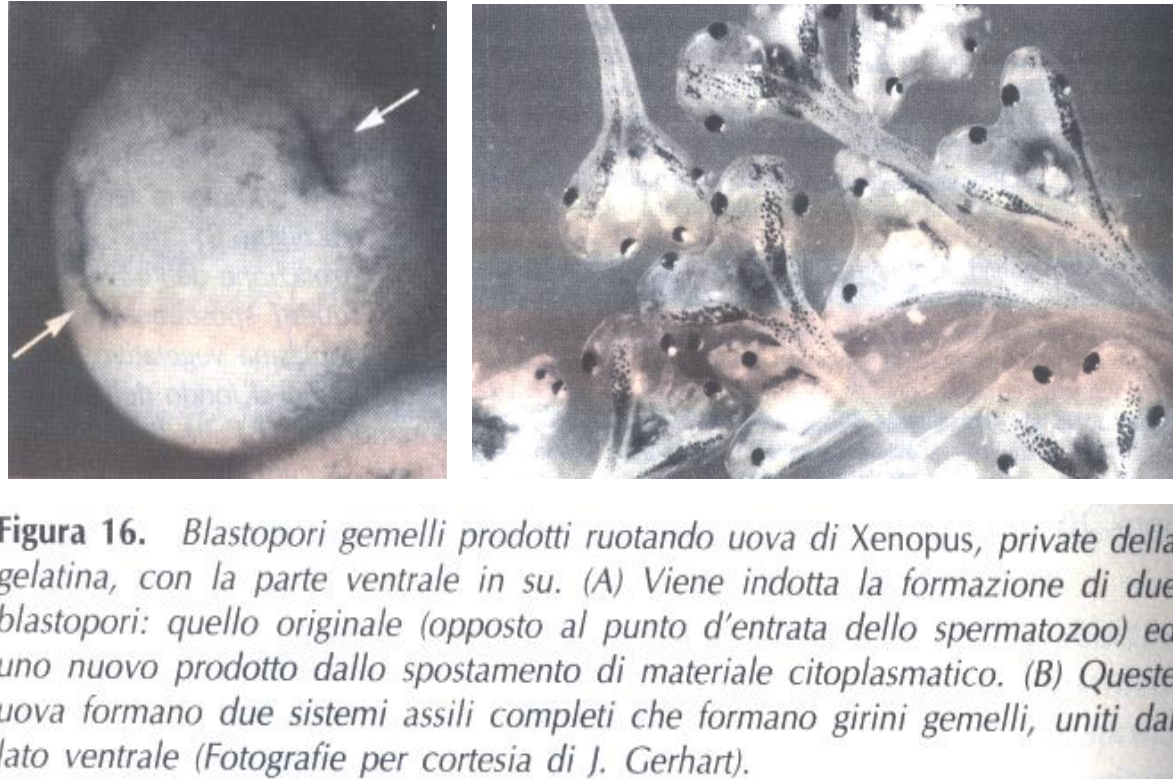
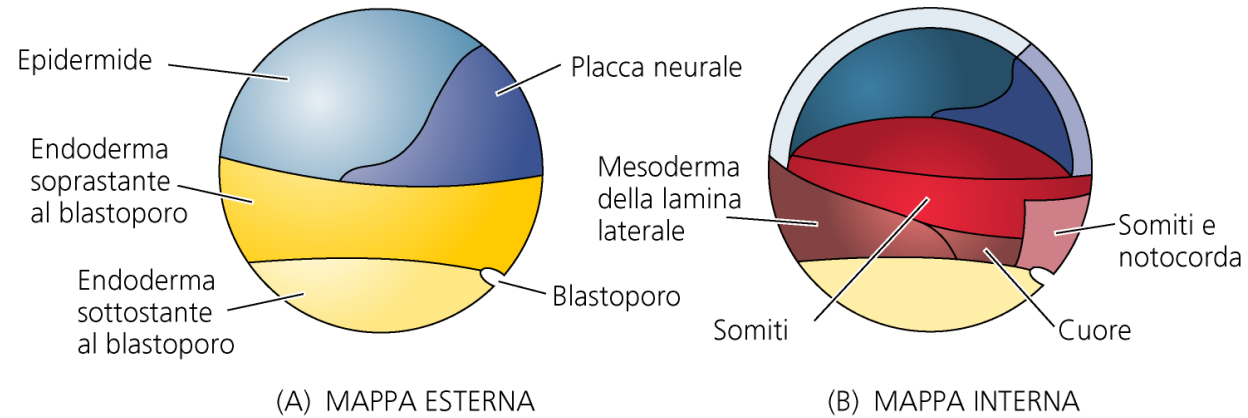


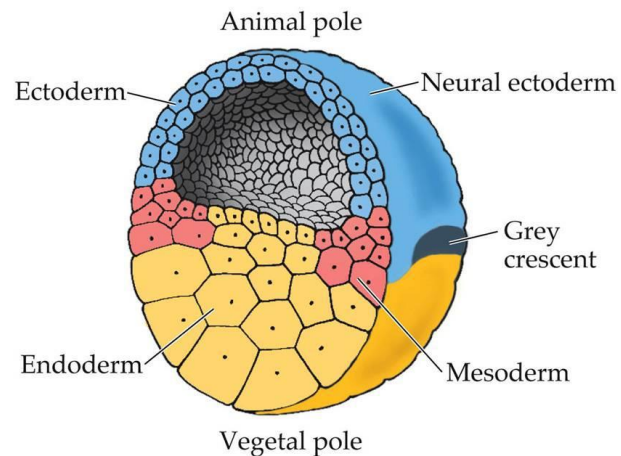
Figura 16. Blastopori gemelli prodotti ruotando uova di *Xenopus*, private della gelatina, con la parte ventrale in su. (A) Viene indotta la formazione di due blastopori: quello originale (opposto al punto d'entrata dello spermatozoo) ed uno nuovo prodotto dallo spostamento di materiale citoplasmatico. (B) Queste uova formano due sistemi assili completi che formano girini gemelli, uniti dal lato ventrale (Fotografie per cortesia di J. Gerhart).

Mappe presuntive della blastula di *Xenopus laevis*.

La maggior parte dei derivati del mesoderma si forma dalle cellule interne.



La gastrulazione inizia nel futuro lato dorsale dell'embrione, nella zona marginale (sotto l'equatore della blastula, al confine fra semiluna grigia e la regione ricca di vitello).



Alcune cellule con destino endodermico (futuro endoderma faringeo) cambiano forma, diventando simili ad un fiasco (o una bottiglia).

Le cellule a bottiglia si invaginano e andranno a posizionarsi al termine dell'archenteron.

Con l'invaginazione, si forma il blastoporo (futura apertura anale)

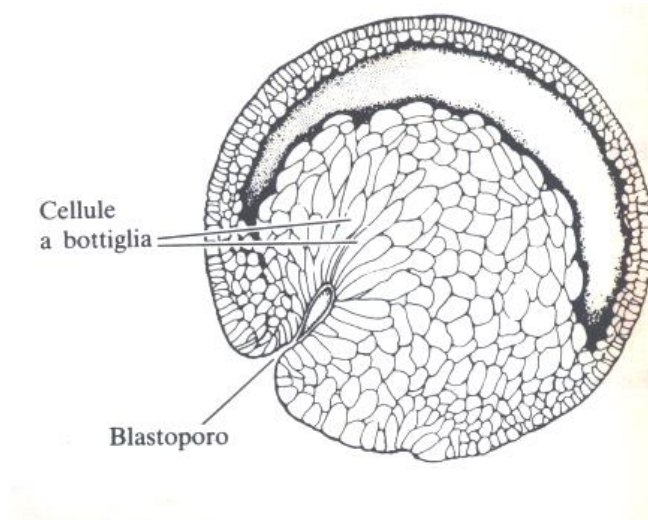
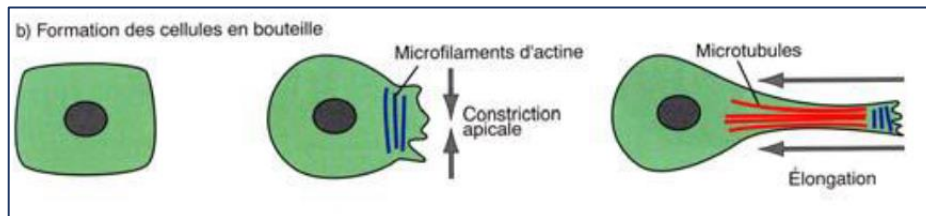
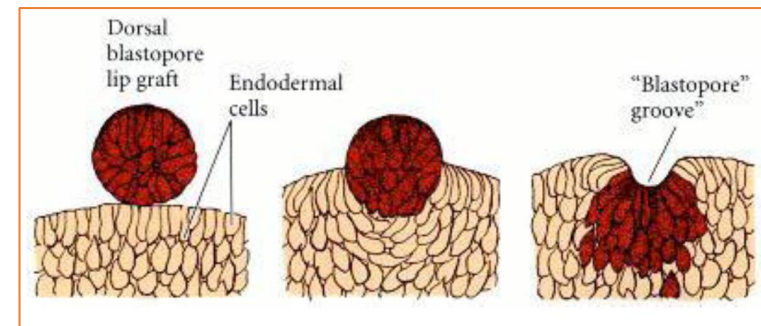


Figura 13. Disegno schematico delle cellule in una sezione di embrione di Anfibio in gastrulazione con le cellule a bottiglia che si estendono dal blastoporo all'interno (Da Holtfreter, 1943).



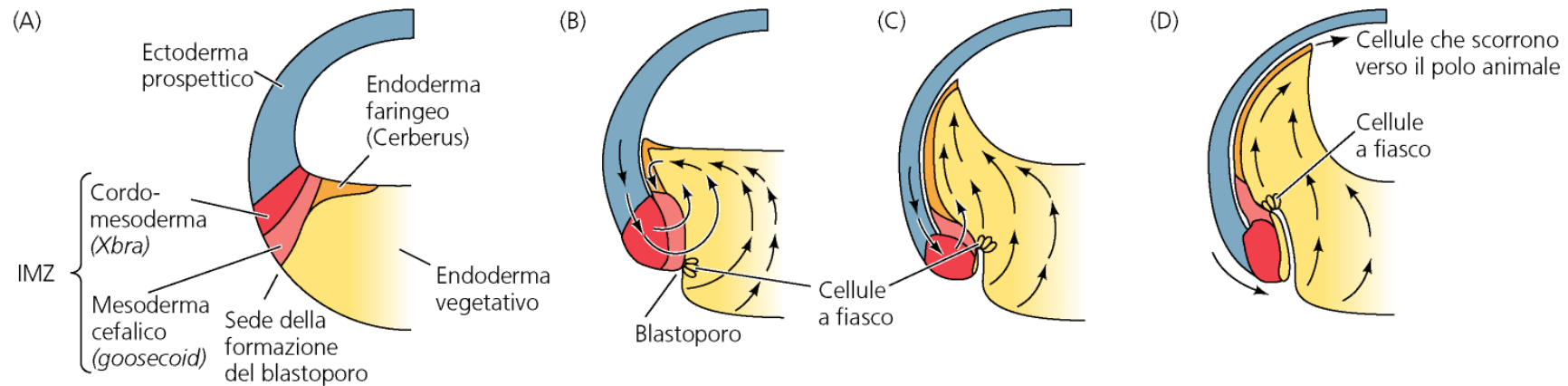
Cambio di forma: ruolo del citoscheletro



Trapianto di cellule della zona marginale dorsale di un embrione di salamandra in uno strato di endoderma. Si forma una doccia simile ad un blastoporo (da Holtfreter, 1944).



Il processo di invaginazione è sospinto da movimenti rotazionali dell'endoderma vegetativo, che porta l'endoderma faringeo prospettico a contatto con l'ectoderma.



Una volta formato il blastoporo, la rimozione delle cellule a bottiglia non blocca l'invaginazione. La forza trainante è data dalle cellule profonde della zona marginale che attuano l'invaginazione.

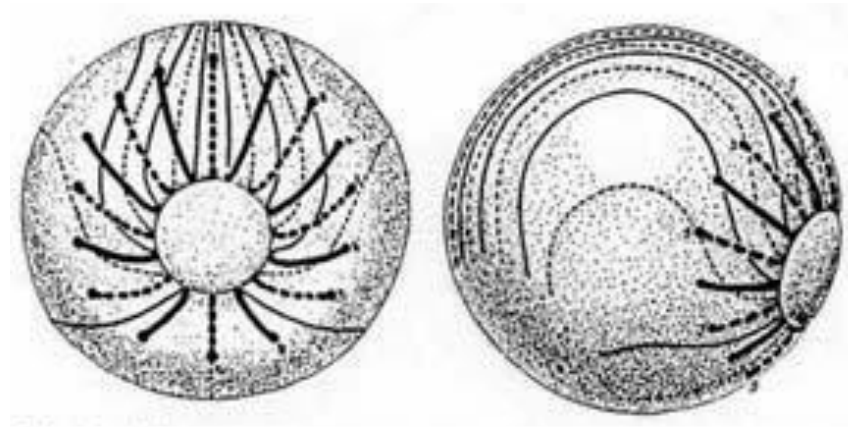
Endoderma e mesoderma scorrono lungo la superficie interna dell'ectoderma, attuando l'**involuzione**.

L'ectoderma si espande per **epibolia**.

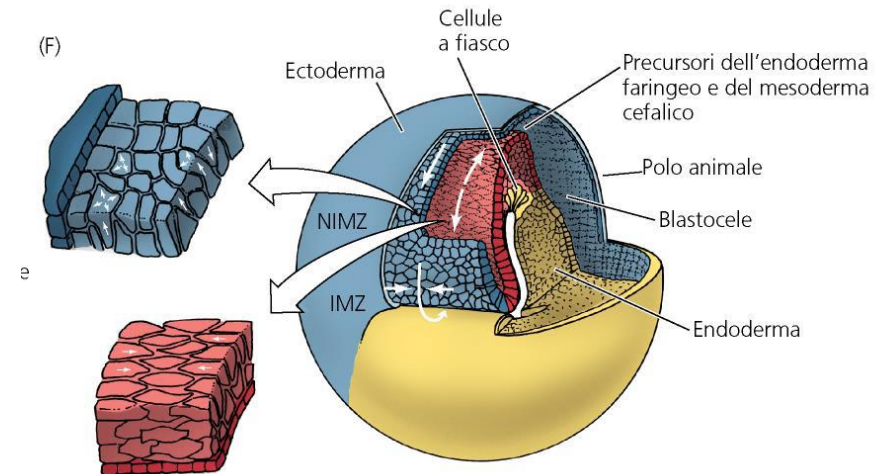
L'ectoderma e il mesoderma dorsale attuano l'**estensione convergente**.

Le cellule mesodermiche scorrono su una matrice ricca di fibronectina, prodotta dall'ectoderma sul tetto del blastocele.

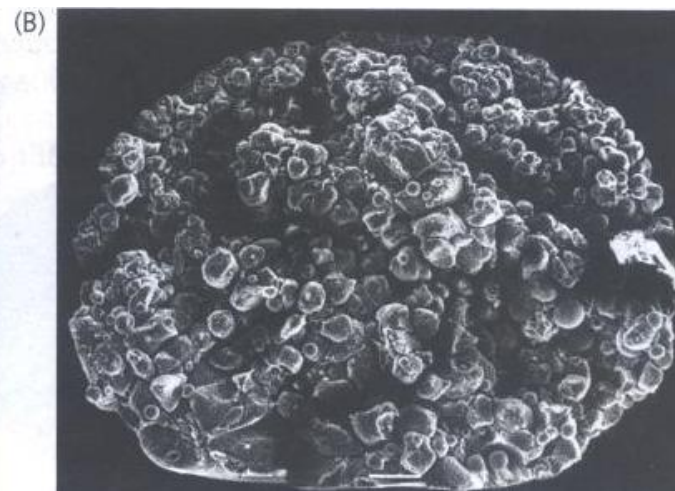
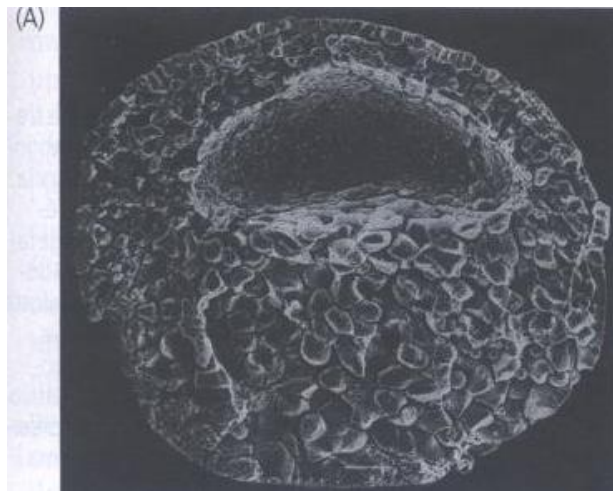
L'espressione differenziale di protocaderine impedisce il mescolamento di diverse tipologie di cellule mesodermiche.



Movimento delle varie parti della zona marginale durante la gastrulazione. Linee spesse: movimenti sulla superficie; linee sottili: movimenti delle cellule invaginate.



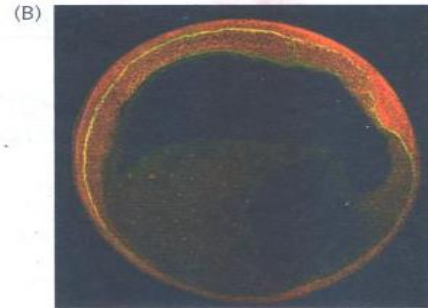
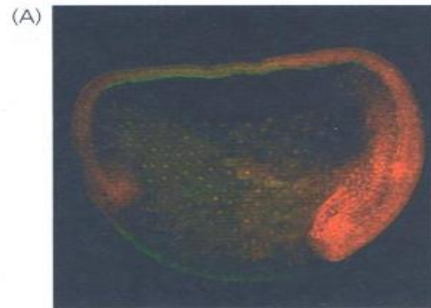
Ruolo del blastocele nella gastrulazione (l'integrità strutturale)



La deplezione dell'mRNA per l'EP-caderina nell'oocito di *Xenopus* provoca la perdita di adesione dei blastomeri e l'obliterazione del blastocele. (A) Embrione di controllo. (B) Embrione depleto dell'EP-caderina. (Da Heasman et al. 1994b; fotografie per gentile concessione di J. Heasman.)

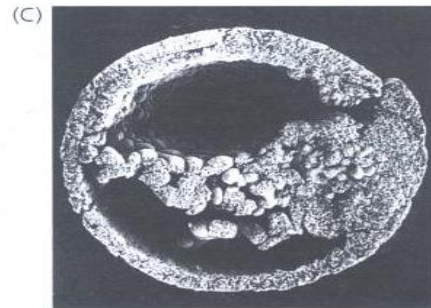
L'epitelio è organizzato da giunzioni occludenti, aderenti (desmosomi) e comunicanti

Ruolo del blastocele nella gastrulazione (la matrice extracellulare)



Sezioni sagittali di embrioni di *Xenopus* in stadi iniziale (A) e avanzato (B) della gastrulazione.

La **fibronectina** (FN) sul tetto del blastocele è immunomarcata in giallo, mentre **le cellule** sono colorate in rosso.



Immagini SEM di embrioni normali di salamandra (gruppo controllo).

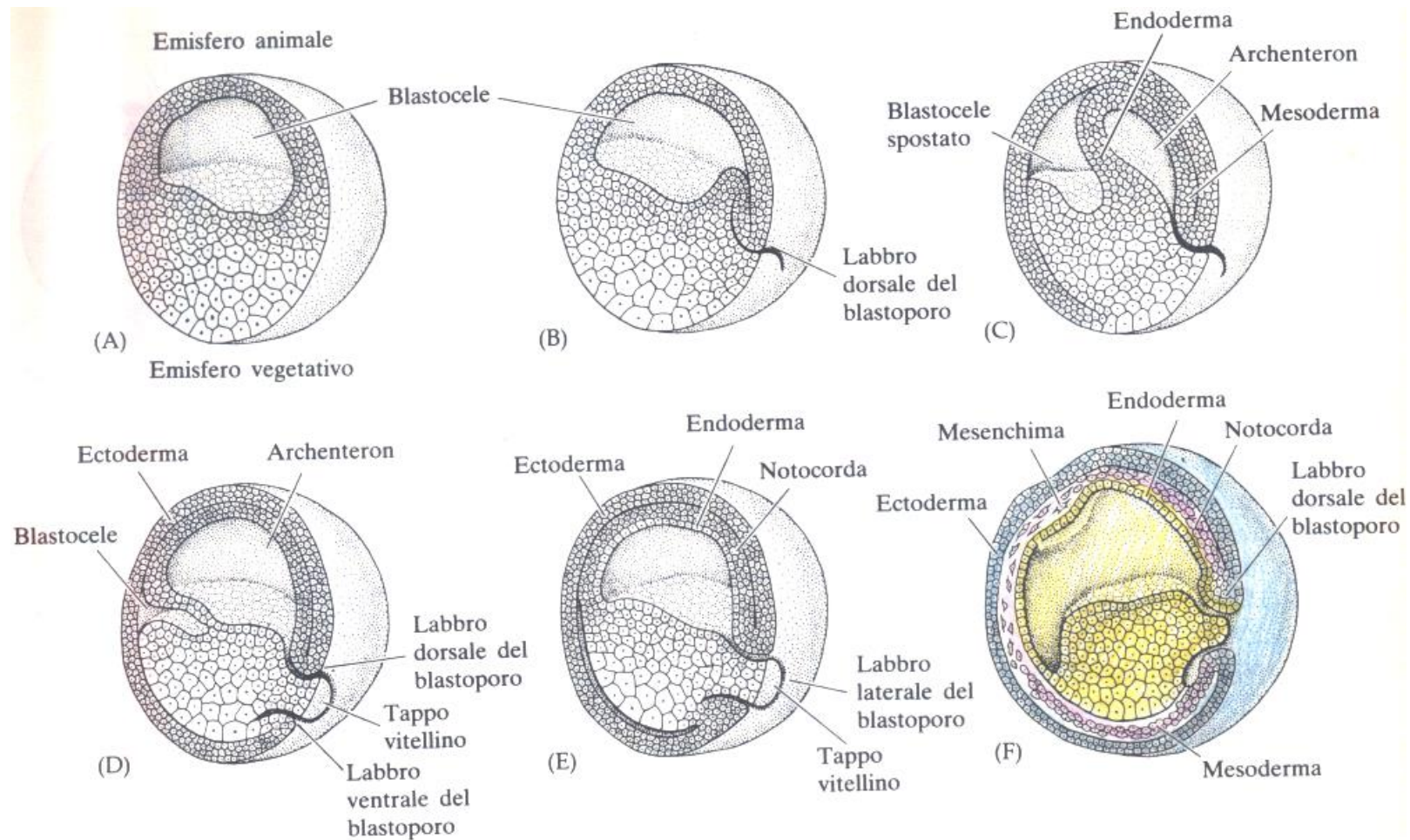
C) Sezione a metà gastrulazione.

D) Il tappo vitellino, verso la fine della gastrulazione.



(E-F) Embrioni agli stessi stadi, in cui è stato iniettato allo stadio di blastula un frammento sintetico di FN che si lega alle cellule.

La gastrulazione è interrotta e i precursori del mesoderma non sono in grado di riconoscere la normale via di migrazione. L'archenteron non si forma e i precursori del mesoderma, che non hanno attuato l'invaginazione, restano in superficie.



Gastrulazione della rana.

A) *Blastula*. B) La gastrulazione inizia quando le cellule si muovono verso l'interno a formare il *labbro dorsale del blastoporo*. C) L'involuzione di cellule attraverso il labbro dorsale e sotto il tetto del blastocele forma l'*archenteron* e sposta il blastocele. D, E) Cellule involute attraverso i labbri *laterali ventrale* del blastoporo, come pure attraverso il labbro dorsale; i precursori ectodermici migrano sopra l'emisfero vegetativo. Il *tappo vitellino* resta il solo endoderma visibile in superficie. F) La gastrulazione prosegue finchè l'embrione non è avvolto da ectoderma, l'endoderma è interno e le cellule del mesoderma si pongono tra loro.



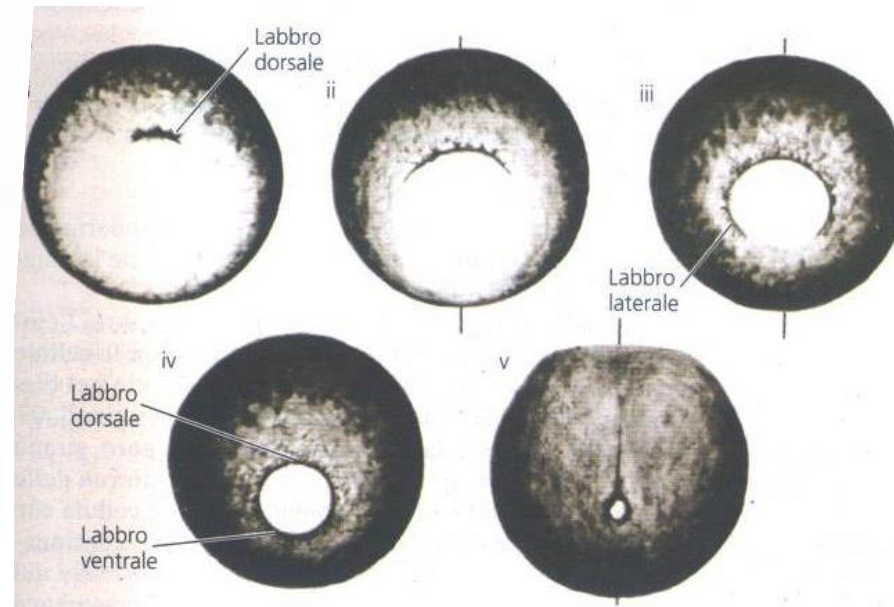
Dopo la formazione del labbro dorsale, il solco blastoporale si espande ulteriormente, con la formazione dei labbri laterali e poi del labbro ventrale.

Il blastoporo assume forma circolare, riducendosi gradualmente soprattutto per l'epibolia dell'ectoderma.

La massa di cellule vegetative circondata dal blastoporo è detta tappo vitellino.

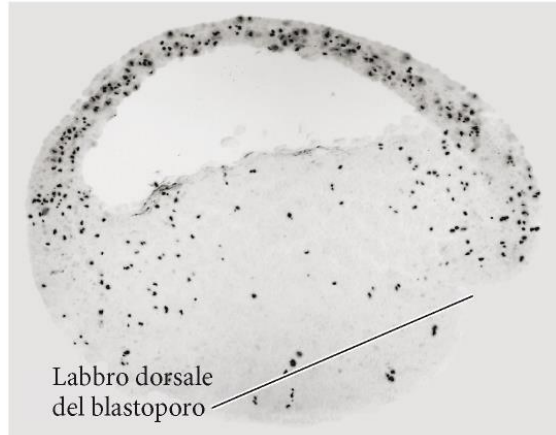


Labbro dorsale del blastoporo appena formato in *Xenopus*; vista in superficie. È facilmente apprezzabile la differenza di dimensioni tra i blastomeri animali e quelli vegetativi. (Microfotografia per gentile concessione di C. Phillips.)

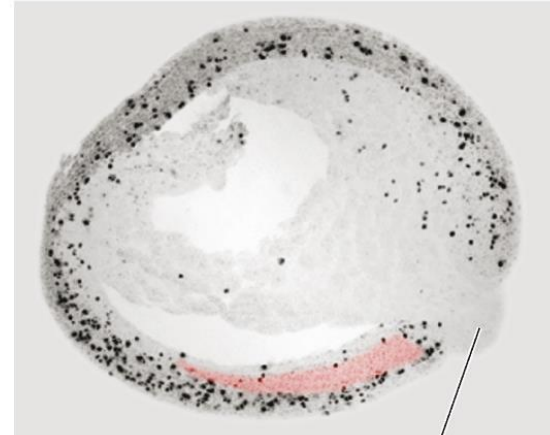


Epibolia dell'ectoderma presuntivo (proliferazione e intercalazione)

(A)



(B)

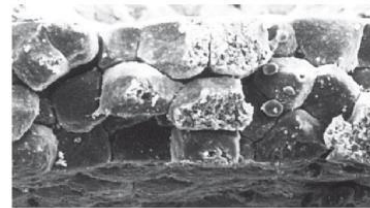


Tappo vitellino

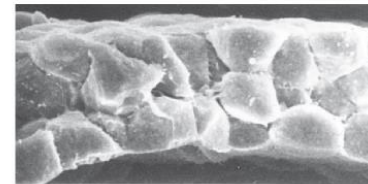
(C)



8



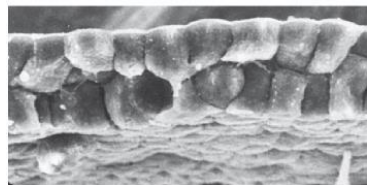
9



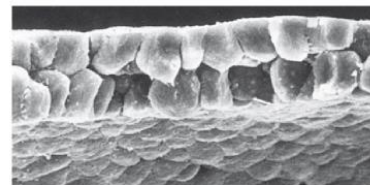
10

Stadio

10,5



11



11,5



L'epibolia dell'ectoderma avviene per divisione delle cellule e processi di interpolazione. (A, B) Divisione cellulare nell'ectoderma presuntivo. La divisione delle cellule è dimostrata dalla colorazione per l'istone 3 fosforilato, che è un marcatore della mitosi. I nuclei colorati appaiono neri. Nelle gastrule in stadio iniziale (A; stadio 10,5) la maggior parte delle divisioni cellulari avviene nell'ectoderma presuntivo dell'emisfero animale. Nelle gastrule in stadio avanzato (B; stadio 12) si osservano divisioni cellulari in tutto lo strato dell'ectoderma. (È interessante che il mesoderma dorsale non mostri divisioni cellulari.) (C) Immagini al microscopio elettronico a scansione del tetto del blastocele di *Xenopus*, in cui si osservano le modificazioni di forma e disposizione delle cellule. Gli stadi 8 e 9 sono blastule; Gli stadi 10-11,5 rappresentano gastrule in stadi progressivamente avanzati. (A, B, da Saka e Smith 2001, fotografie per gentile concessione degli autori; C, da Keller 1980, fotografie per gentile concessione di R.E. Keller.)



Figura 2.3

Continuazione dello sviluppo di *Xenopus laevis*. (A) La gastrulazione inizia con una invaginazione in forma di incisura nella futura faccia dorsale (quella in alto) dell'embrione. (B) Incisura e labbro dorsale del blastoporo visti dalla faccia ventrale (quella in basso) dell'embrione. (C) L'incisura diventa un solco circolare; il blastoporo. Le cellule del futuro mesoderma migrano all'interno dell'embrione attraverso i margini del blastoporo, e l'ectoderma (che darà origine all'epidermide e al sistema nervoso) si estende verso il basso sulla superficie dell'embrione. La parte restante, l'endoderma ricco di vitello, viene infine racchiusa. (D) Nella faccia dorsale cominciano a formarsi le pieghe neurali. (E) Si può osservare una doccia laddove si troverà il pavimento del tubo neurale. (F) Le pieghe neurali si uniscono dorsalmente sulla linea mediana formando un tubo neurale. (G) Sezione trasversale dell'embrione di *Xenopus* allo stadio di neurula. (H) Girino prima della schiusa, allorché le protrusioni del proencefalo cominciano a indurre la formazione dell'occhio. (I) Girino maturo, che è sgusciato fuori dalla massa gelatinosa dell'uovo e si nutre in modo indipendente. (Fotografie per gentile concessione di Michael Danilchik e Kimberly Ray.)

