

In questa opera sono stati considerati solo gli stadi precoci dello sviluppo. Di conseguenza i larvali, nei casi in cui esistono, non sono stati descritti in modo dettagliato.

Il contenuto di questa opera, lungi dall'essere completo, si propone di offrire agli studenti un contributo di lavoro che presenti in modo unificato la maggior parte dei modelli ai cui sviluppi viene tradizionalmente considerato.

Desideriamo ringraziare i nostri colleghi Prof. H. Boulekbache, J. Deutsch, G. Peaucellier e M. Legnez per l'aiuto nella ricerca di documenti e per alcune informazioni aggiuntive, nei casi in cui la letteratura non era esauriente.

## Introduzione



### 1.1 Le tappe dello sviluppo

In condizioni normali l'incontro tra i due gameti maschile e femminile alla fecondazione, fatta eccezione per i casi di partenogenesi, mette in moto in modo irreversibile il processo di formazione di un nuovo organismo fino a raggiungere lo stadio adulto. La fecondazione quindi, nella maggior parte dei casi, è l'evento che dà origine a una discendenza attraverso la riproduzione sessuata (Fig. 1.1).

L'ontogenesi è l'insieme dei fenomeni attraverso i quali dall'uovo fecondato si origina un adulto capace di riprodursi. Gli stadi precoci dello sviluppo corrispondono all'embriogenesi, in cui classicamente si distinguono tre fasi successive, la segmentazione, la gastrulazione e l'organogenesi, che seguono la fecondazione e le cui caratteristiche saranno descritte in seguito. Queste fasi molto importanti dello sviluppo si realizzano in un ambiente protetto, costituito da particolari involucri per le specie ovipare e dall'organismo materno per le specie vivipare; in questo periodo nel nuovo organismo si realizza la formazione di quelle strutture morfofunzionali, che gli assicurano una relativa autonomia a partire rispettivamente dal momento della schiusa o del parto.

Lo sviluppo post-embrionale è, per un gran numero di specie, il periodo successivo al momento della nascita; può avvenire sia in modo diretto che indiretto: nel primo caso il giovane organismo raggiunge progressivamente lo stato adulto attraverso un processo di accrescimento, mentre nel secondo l'organismo va incontro a un periodo critico, la metamorfosi, che assicura il passaggio da uno stato larvale allo stato adulto. Queste regole generali dello sviluppo tuttavia possono presentare numerose variazioni a seconda dei taxa e delle specie considerate. Ad esempio nei Mammiferi placentati si possono distinguere delle ulteriori fasi dello sviluppo in utero, con una fase embrionale propriamente detta, a

### 1.2 Le diverse fasi della embriogenesi

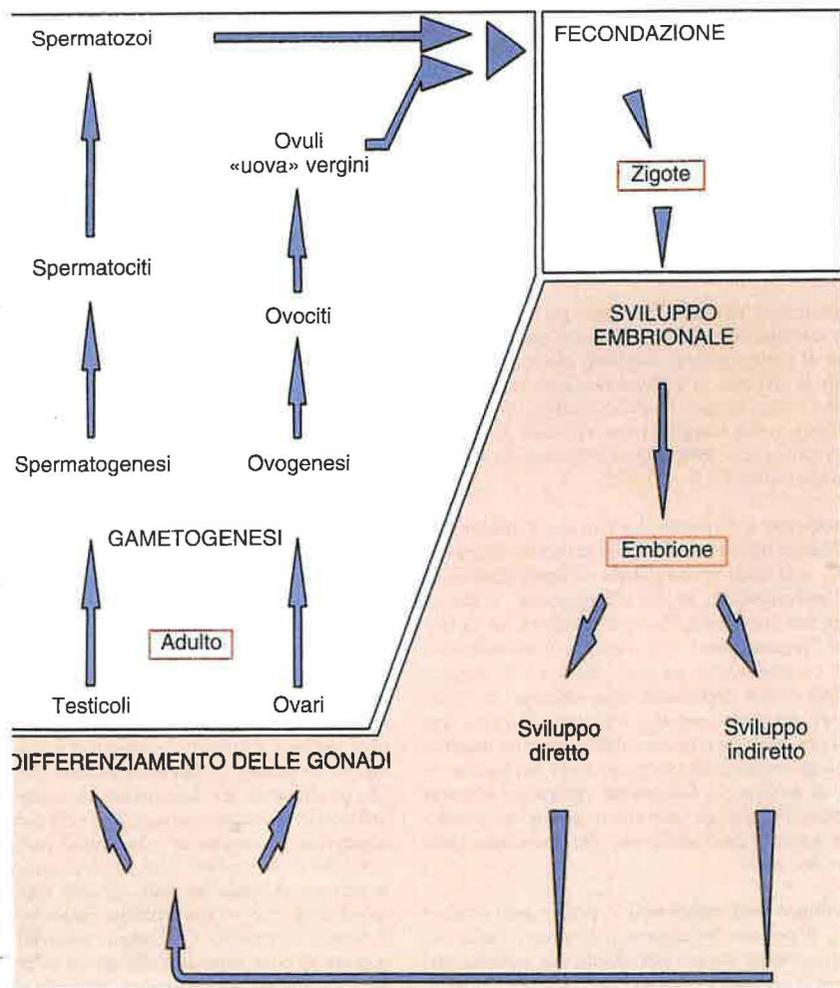
#### 1.2.1 La fecondazione

La fecondazione innanzitutto consente di ristabilire la ploidia caratteristica di ogni specie ed è caratterizzata da due fenomeni fondamentali. Il primo è l'uscita dallo stato di inattività fisiologica in cui si trova il gamete femminile, che si manifesta con l'attivazione del metabolismo cellulare e in alcuni casi con la ripresa delle divisioni meiotiche. Il secondo è rappresentato da profondi rimaneggiamenti del citoplasma, che portano a una redistribuzione di costituenti in grado di determinare la formazione dei grandi assi di simmetria, intorno ai quali si realizzerà la organizzazione del futuro embrione.

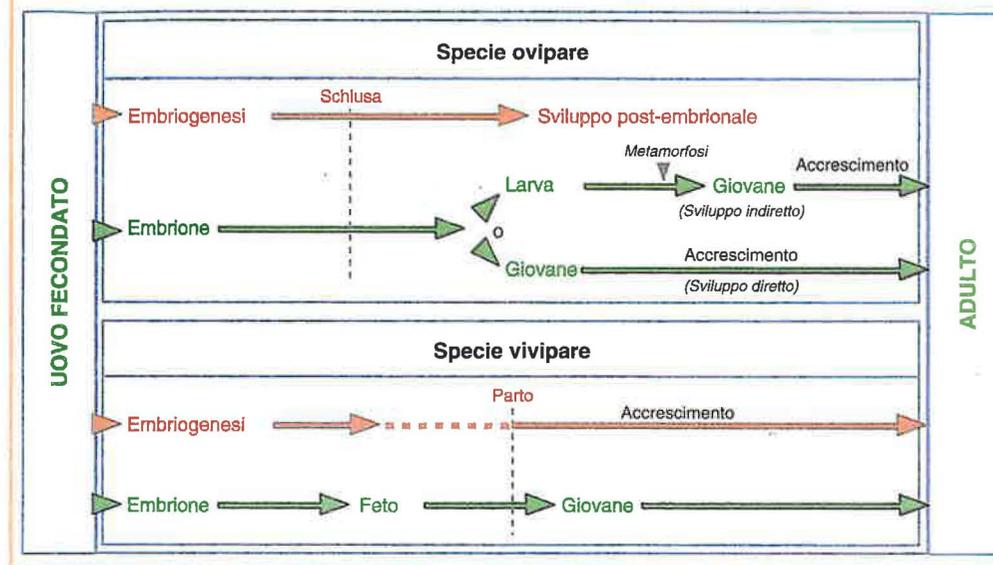
A questo proposito bisogna ricordare che l'uovo è in tutti i casi anisotropo, per la distribuzione asimmetrica dei suoi contenuti, e questo determina una organizzazione polare, indipendentemente dalla sua forma. Tra gli elementi che determinano la asimmetria iniziale dell'uovo, fecondato o non, si può ricordare la posizione eccentrica del nucleo in relazione al processo di emissione dei globuli polari, che per convenzione identifica la regione del polo animale. Questa regione in molte specie darà origine alle strutture cefaliche e agli organi di senso, caratteristici del regno animale. In posizione opposta al polo animale nelle specie ovipare si trova il polo vegetativo, generalmente ricco di sostanze di riserva, il vitello, i cui costituenti sono inglobati nelle strutture dell'embrione e della larva che hanno funzione trofica, ad esempio l'endoderma che darà origine al canale digestivo primitivo.

La quantità di vitello e la sua distribuzione citoplasmatica hanno un ruolo determinante, non soltanto sulla durata e i meccanismi di svolgimento delle tappe dell'embriogenesi (come descritto più avanti), ma anche sul

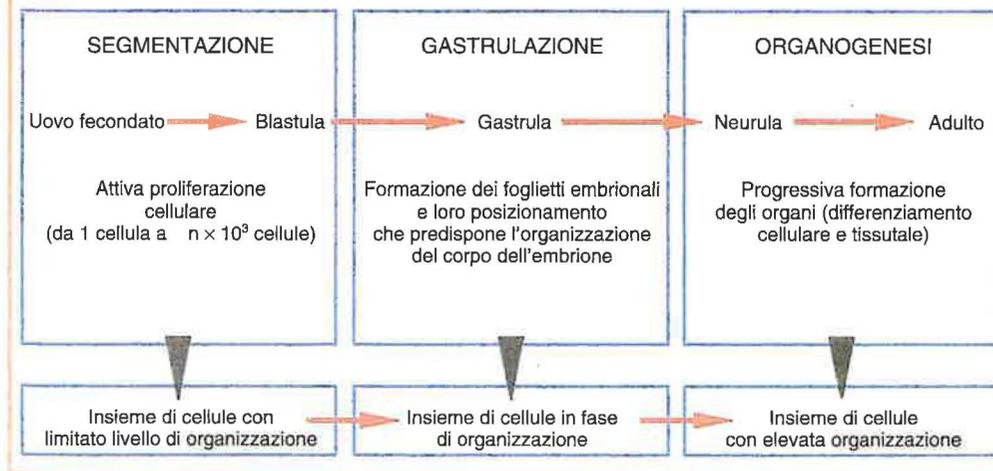
Fig. 1.1: Lo sviluppo embrionale nel ciclo vitale



Tab. 1.1: Differenze della ontogenesi nel regno animale



Tab. 1.2: Principali fasi dell'embriogenesi



La segmentazione

La segmentazione consiste fondamentalmente in una serie di divisioni cellulari, da cui si originano le cellule figlie o **blastomeri**, il cui citoplasma progredisce in misura dalla segregazione del citoplasma. In questa fase inoltre il rapporto nucleocitoplasmatico, in genere molto basso nell'ovocita, tende a avvicinarsi ai valori caratteristici di ogni

L'insieme di divisioni, che si susseguono con ritmi più o meno veloci a seconda della specie, porta ad uno stadio embrionale, chiamato **blastula** (Fig. 1.2), in cui il volume dell'embrione resta eguale a quello dell'uovo fecondato. L'embrione pluricellulare così formato può presentare una cavità delimitata da uno strato cellulare di tipo epiteliale e denominata **blastocoele**, che si va progressivamente ampliando con il susseguirsi delle divisioni cellulari. Questo tipo di blastula è designata come

**celoblastula** (ad esempio negli Echinodermi e negli Anfibi), a differenza di un altro tipo di blastula denominata **sterroblastula**, che si osserva negli Anellidi Policheti (Fig. 1.2a). Infine, in alcuni tipi di uova le divisioni non interessano tutta la massa dell'uovo fecondato, ma sono limitate a una area ben definita, e il completamento della segmentazione dà origine a una blastula designata come **periblastula** o **discoblastula** (Fig. 1.2b).

La quantità di vitello e la sua distribuzione nella cellula uovo danno origine a due grandi tipi di segmentazione, seguendo una regola costante per cui maggiore è la quantità di sostanze di riserva sotto forma di placchette o di globuli di vitello, più il processo mitotico è rallentato. Si distinguono quindi una **segmentazione totale**, detta **oloblastica**, in cui le divisioni cellulari interessano tutta la massa citoplasmatica della cellula uovo, in cui le riserve vitelline sono relativamente poco abbondanti, e una **segmentazione parziale**, detta **meroblastica**, in cui solo una parte limitata di citoplasma,

caratterizzata dalla scarsa presenza di vitello, è interessata dalle successive mitosi. I due tipi di segmentazione avvengono rispettivamente nelle uova **alecittiche**, **oligolecittiche** ed **eterolecittiche** da una parte e nelle uova **centrolecittiche** e **telolecittiche** dall'altra. Le caratteristiche di ognuna delle categorie di uova menzionate sono riportate nella *Tabella 1.3*.

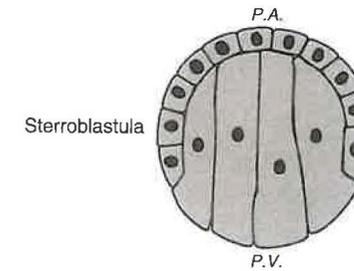
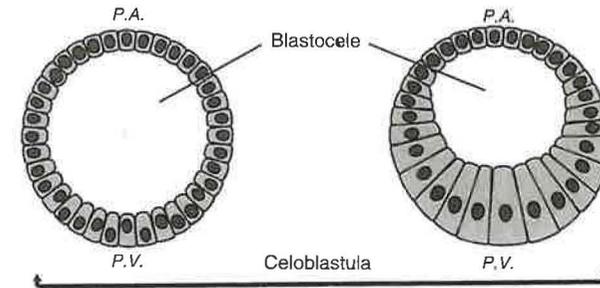
A seconda della ripartizione delle riserve di vitello e della posizione dei piani di segmentazione, le cellule figlie originate in un ciclo di divisione cellulare possono essere di dimensioni eguali o diverse. Particolarmente evidente nel caso delle uova con una **segmentazione di tipo oloblastico**, questa distinzione si manifesta con divisioni dette **eguali** o **inequali**, in relazione alla dimensione relativa dei blastomeri che si formano (Fig. 1.3). I blastomeri sono quindi designati come **micromeri**, **mesomeri** e **macromeri**, con questi ultimi in genere localizzati nell'emisfero vegetativo. Bisogna notare che raramente si osserva una segmentazione totale eguale per tutto il ciclo di divisioni cellulari nel corso

Tab. 1.3: **Caratteristiche dei diversi tipi di uova**

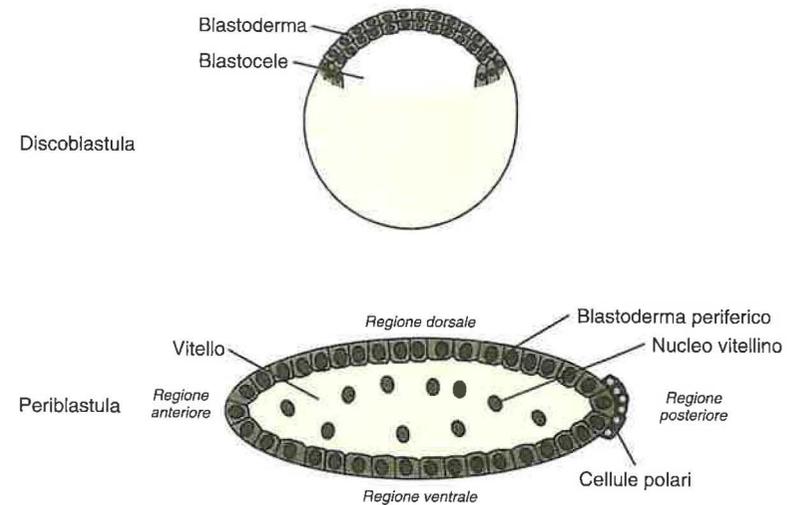
Tipo di uova	Quantità di vitello	Distribuzione citoplasmatica	Dimensione	Esempi di taxa
<b>Alecittico</b>	Assenza di riserve	-----	$\pm 100 \mu\text{m}$	Mammiferi aplacentati e placentati (Metateri, Euteri)
<b>Oligolecittico</b>	Riserve scarse	Distribuzione relativamente omogenea	$\pm 100 \mu\text{m}$	Echinodermi, Protocordati
<b>Eterolecittico</b> o <b>Mesolecittico</b>	Riserve scarse	Distribuzione ineguale. Esistenza di gradiente di tuorlo	$\pm 1 \text{ mm}$	Anfibi, Anellidi
<b>Centrolecittico</b>	Riserve molto abbondanti	Massa di tuorlo al centro dell'uovo	$\pm 1 \text{ mm}$	Insetti
<b>Telolecittico</b>	Riserve molto abbondanti	Distribuzione generalizzata. Zona germinativa limitata a un disco di citoplasma in posizione polare	$\pm 1 \text{ cm}$	Molluschi Cefalopodi, Numerosi pesci, Sauropsidi (Rettili/Uccelli), Mammiferi ovipari (Prototeri)

Fig. 1.2: **Tipi di blastula**

a) **Sezioni meridiane di blastule generate da segmentazione oloblastica**



b) **Sezioni di blastule generate da segmentazione meroblastica**



della segmentazione (un caso eccezionale è quello dell'Oloturoideo *Synapta digitata*). Tutte le uova a segmentazione oblastica in genere presentano blastomeri delle stesse dimensioni, almeno nelle due prime divisioni, in cui il piano di divisione contiene l'asse polo animale-polo vegetativo, che si sovrappone al gradiente vitellino. Tutti gli altri piani di divisione che non soddisfano questa condizione, nella maggior parte dei casi, danno origine a blastomeri di dimensioni ineguali.

La segmentazione parziale può avvenire con due diverse modalità, a seconda che si tratti di uova telolecitiche o centrolecittiche (Fig. 1.4). Nel primo caso le divisioni cellulari avvengono soltanto in una piccola zona del citoplasma, con la forma di disco, localizzato ad un polo dell'uovo, in cui il vitello è assente. Questa particolare modalità viene indicata come **segmentazione parziale discoidale** (Fig. 1.4a). Nel caso delle uova centrolecittiche il processo di divisione viene indicato come **segmentazione parziale periferica o superficiale**, poiché le divisioni cellulari e i blastomeri che si formano sono localizzati alla superficie dell'embrione, dando origine a una periblastula, come indicato in precedenza (Fig. 1.4b).

Resta da menzionare una ultima distinzione fondamentale per quanto riguarda le modalità con cui si svolge la segmentazione totale. In relazione alla disposizione dei piani di segmentazione che si formano nelle successive divisioni cellulari, si distinguono quattro differenti tipi di segmentazione indicati come **radiale**, **spirale**, **bilaterale** e **rotazionale**.

La realizzazione dei due primi tipi (radiale e spirale) è illustrata nella Fig. 1.3. Nel caso della **segmentazione radiale**, caratterizzata da una successione di piani meridiani e latitudinali, nei primi stadi di sviluppo è possibile unire virtualmente i due poli animale (PA) e vegetativo (PV) senza attraversare nessuno dei blastomeri precedentemente formati (Fig. 1.3a). Questo tipo di segmentazione si osserva negli Echinodermi e negli Anfibii. Viceversa questo non è possibile nel caso della **segmentazione spirale**, in cui ad ogni ciclo di divisione i fusi mitotici sono inclinati di 45° rispetto all'asse PA-PV, dando origine a una disposizione dei blastomeri inclinata rispetto a questo asse (Fig. 1.3b). Questa modalità è presente in diversi gruppi (Anellidi, Molluschi Lamellibranchi e Gasteropodi) e ha dato origine al loro raggruppamento sotto la denominazione di *Spiralia*, che non ha un valore tassonomico in senso stretto. Il terzo tipo di segmentazione (non illustrato), indicata come **bilaterale**, corrisponde al fatto che nelle prime divisioni i blastomeri neoformati si dispongono secondo gli assi antero-posteriore e dorso-ventrale del futuro individuo.

Questo tipo di segmentazione si osserva in particolare nei Tunicati. La segmentazione oblastica **rotazionale** è caratteristica dell'uovo dei Mammiferi ed è presente anche nei Nematodi. La sua peculiarità è rappresentata dal fatto che, a differenza della segmentazione radiale in cui i primi due piani di divisione sono meridiani e perpendicolari tra di loro, a una prima divisione meridiana segue una divisione in cui uno dei blastomeri si divide secondo un piano equatoriale e l'altro secondo un piano meridiano (Fig. 1.3c).

Qualche definizione sui riferimenti convenzionali, tradizionalmente adottati per descrivere l'organizzazione dell'embrione ai differenti stadi di sviluppo, può essere utile per facilitare la comprensione delle nozioni di orientamento descritte. I piani di segmentazione si riferiscono agli elementi di simmetria (assi e/o piani), che possono essere chiaramente identificati nell'embrione. I due elementi di riferimento generalmente adottati sono da una parte l'asse polo animale-polo vegetativo (PA-PV) e dall'altra un piano di simmetria bilaterale, che a sua volta contiene gli assi dorso-ventrale (D-V) e cefalo-caudale (T-C). I termini generalmente usati per definire i piani di segmentazione sono illustrati nella Fig. 1.5.

Nei primi stadi di sviluppo gli embrioni sono generalmente sferici e, finché non compaiono elementi di simmetria, l'asse PA-PV viene utilizzato come riferimento per identificare i piani di segmentazione che portano alla formazione dei nuovi blastomeri. È opportuno sottolineare che, quando si è realizzata una simmetria bilaterale, anche se l'embrione è sferico, l'uso di termini come sezioni meridiane o equatoriali deve essere evitato, a meno che non si faccia esplicito riferimento al piano di simmetria bilaterale. Egualmente deve essere evitato l'uso del termine sezione longitudinale per indicare sezioni che interessano l'embrione con simmetria bilaterale, secondo il suo asse maggiore; in questo caso infatti il termine è ambiguo, perché non distingue tra piani (para) sagittali e frontali.

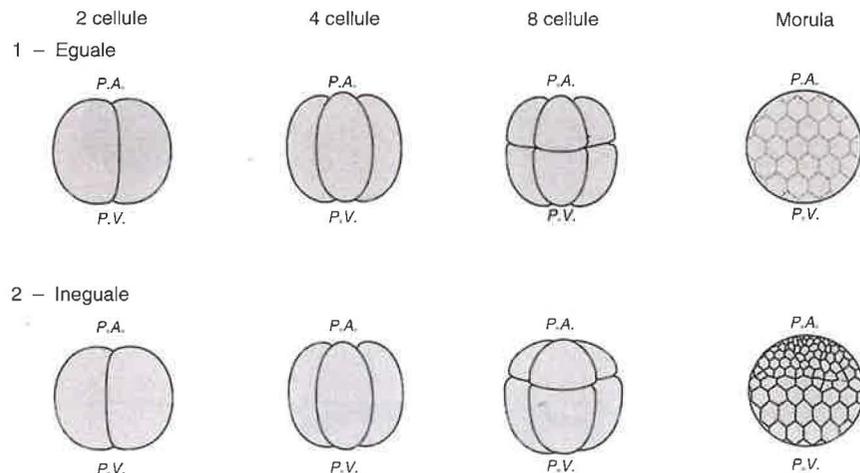
### 1.2.3 La gastrulazione

#### a) Caratteristiche generali

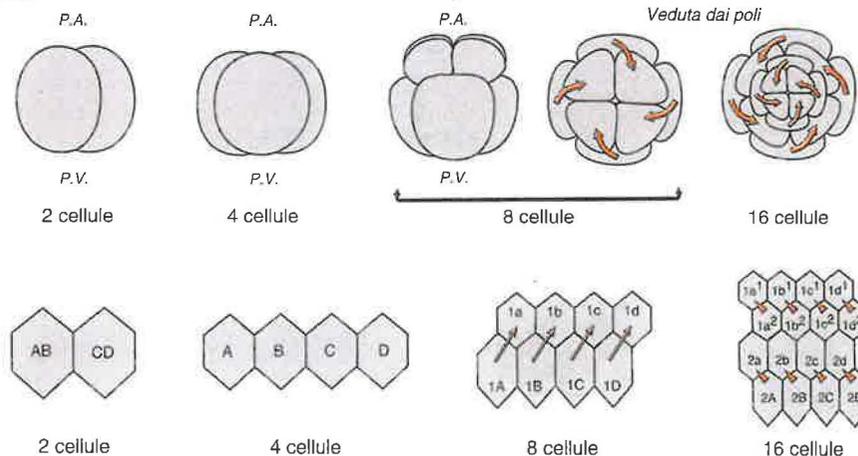
La gastrulazione, che segue la fase di intensa divisione cellulare descritta, è una tappa di fondamentale importanza nella vita dell'organismo in via di sviluppo; infatti la gastrulazione pone le basi per una armonica organizzazione interna dell'individuo, basata sulla formazione di tessuti ed organi diversi, determi-

Fig. 1.3: Esempi di segmentazione totale

#### a) Radiale



#### b) Spirale



#### c) Rotazionale

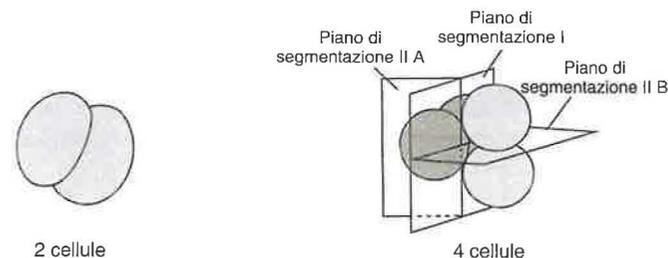
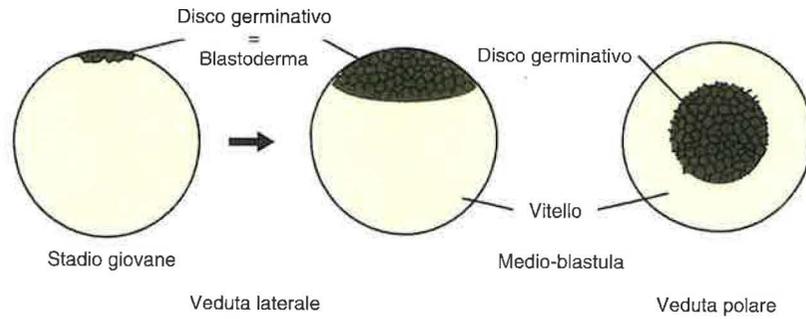


Fig. 1.4: Esempi di segmentazione parziale

a) Discoidale



b) Superficiale

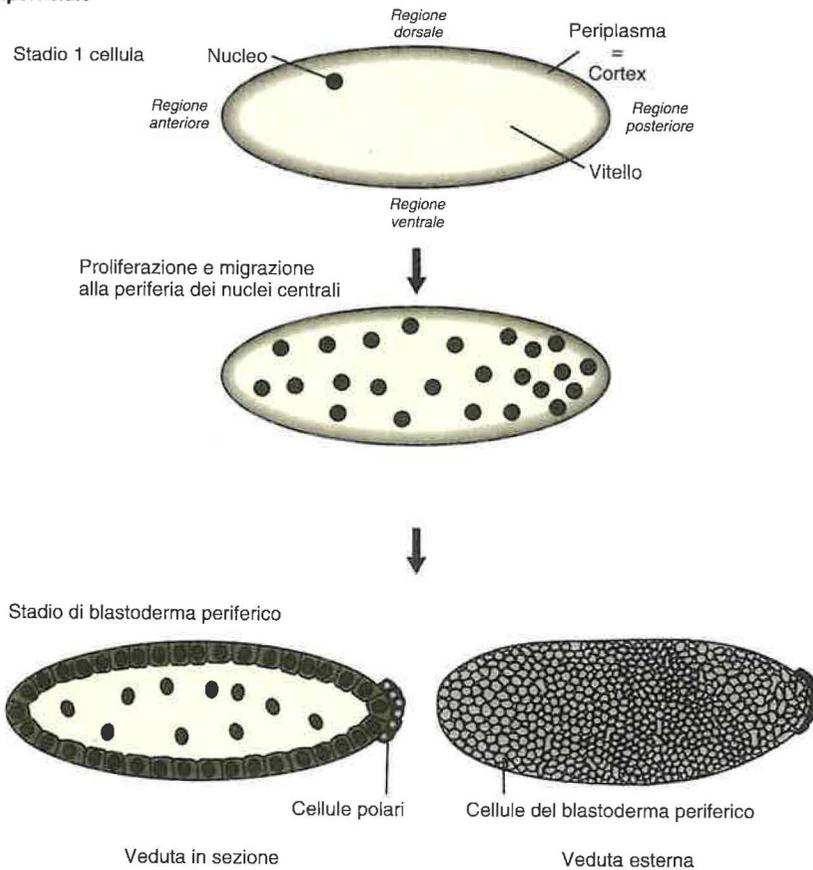
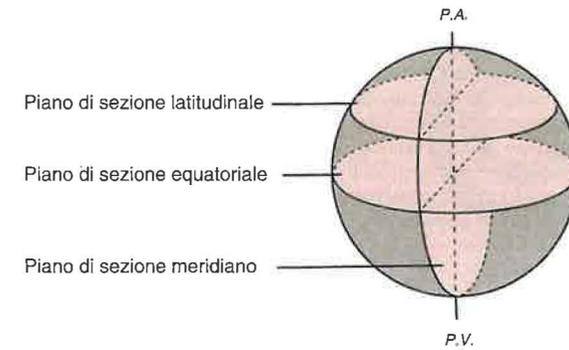
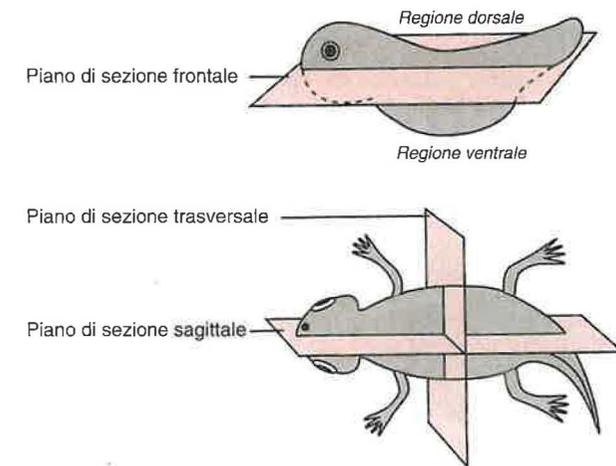


Fig. 1.5: Definizione dei piani di sezione

1°) Riferiti all'asse polo animale – polo vegetativo



2°) Riferiti agli assi antero-posteriore e dorso-ventrale



nati da un piano caratteristico per ogni specie. Come è stato accennato precedentemente, lo svolgimento di questa fase si manifesta con la progressiva formazione dei foglietti embrionali, in seguito al verificarsi dei movimenti morfogenetici. Questi danno origine a una disposizione concentrica dei foglietti, che prefigura a grandi linee la organizzazione generale dell'adulto. In questo processo alcuni territori cellulari si spostano all'interno dell'embrione, occupando così lo spazio del blastocoele, nei casi in cui questo è presente (Fig. 1.6). In genere il materiale che si sposta all'interno del-

l'embrione forma una cavità in comunicazione con l'esterno, che è destinata a formare l'intestino primitivo, chiamato archenteron. Nel periodo in cui avvengono questi movimenti l'embrione prende il nome di *gastrula*.

A seconda dei *taxa*, la gastrulazione può portare alla formazione di 2 o 3 foglietti embrionali. Due foglietti si differenziano nelle specie appartenenti ai gruppi considerati più primitivi (Poriferi, Cnidari e

Ctenofori), dando origine a uno stato **diblastico**. L'esistenza di tre foglietti embrionali si manifesta in tutti gli altri gruppi e viene indicata come stato **triblastico**. Nel primo caso si distingue un foglietto esterno, l'**ectoderma**, e un foglietto interno, l'**endoderma**, che delimita l'archenteron in comunicazione con l'ambiente esterno. La semplice organizzazione del corpo didermica, presente nell'adulto, deriva direttamente da questa organizzazione originata durante la gastrulazione, e mantiene la disposizione relativa dei foglietti che danno origine ai tessuti dell'adulto. L'archenteron infatti si trasforma progressivamente in cavità digerente, la cui parete è formata direttamente da cellule derivate dall'endoderma.

Negli embrioni triblastici si forma un terzo foglietto, il **mesoderma**, che si inserisce tra i due già descritti, ectoderma ed endoderma. Questo foglietto intermedio dà origine a un gran numero di tessuti e organi, che si localizzano tra le strutture di rivestimento di origine ectodermica e la massa viscerale dell'apparato digerente, di origine endodermica. Nei diversi *taxa* questo foglietto subisce delle importanti trasformazioni, che in alcuni casi possono portare alla formazione di una cavità, il celoma. Gli organismi vengono designati come **celomati** e **acelomati** a seconda che questa cavità sia presente o assente.

Una ulteriore suddivisione può essere fatta nelle specie con celoma. Si osserva infatti che il destino dell'orifizio che mette in comunicazione il lume dell'archenteron con l'esterno, l'**apertura del blastoporo**, varia a seconda delle specie. Il blastoporo può formare la bocca e non originare direttamente l'orifizio anale, come avviene negli Anellidi, Molluschi ed Artropodi, che in base a questo criterio sono classificati, insieme con altri *taxa* di minore importanza, come **Protostomi**. Le altre specie, per le quali l'ano corrisponde all'apertura del blastoporo, costituiscono il gruppo dei **Deuterostomi**.

Nel primo caso, i Protostomi, la cavità celomatica si forma per **schizocelia**, cioè per cavitazione all'interno della massa mesodermica (come avviene negli Anellidi). Nei Deuterostomi invece il celoma si forma per **enterocelia**, cioè a partire da vescicole che si formano nell'endo-mesoderma (ad esempio negli Echinodermi).

È interessante sottolineare che durante i movimenti morfogenetici, con una **cronologia** ben definita per ogni specie, hanno luogo dei contatti tra diversi territori cellulari con lo stabilirsi di interazioni, che sono alla base di processi di determinazione specifica.

#### b) Le differenti modalità della gastrulazione

Tra i diversi movimenti morfogenetici che hanno luogo nella gastrulazione, alcuni sono più direttamente coinvolti nello spostamento di cellule all'interno dell'embrione. I diversi modi in cui le strutture cellulari interne raggiungono la loro posizione sono riuniti in 5 grandi tipi illustrati nella Fig. 1.6.

La **delaminazione** corrisponde a divisioni cellulari perpendicolari allo strato cellulare che delimita il blastocele e che portano allo spostamento nella cavità dell'embrione di cellule figlie, che rimangono unite tra loro.

L'**invaginazione** o **embolia** indica un movimento di insieme di una parte della popolazione cellulare della blastula. Questo tipo di movimento verso l'interno porta alla formazione dell'archenteron, che rimane in continuità con l'ambiente esterno, ma senza creare discontinuità negli strati cellulari esistenti.

L'**immigrazione** si osserva nei casi in cui le cellule che formano lo strato epiteliale delimitante la blastula, si distaccano dalle cellule vicine e, migrando singolarmente, vanno poi a riunirsi all'interno del blastocele.

L'**epibolia** è caratterizzata dal fatto che una popolazione cellulare della blastula è interessata da una più attiva proliferazione e quindi tende a ricoprire progressivamente altre popolazioni cellulari con ritmi di proliferazione più lenta, che di conseguenza vengono ad assumere una posizione interna.

La **proliferazione polare** consiste nella divisione di cellule a uno dei poli della blastula. Le cellule figlie originate da questa proliferazione localizzata formano le nuove strutture interne.

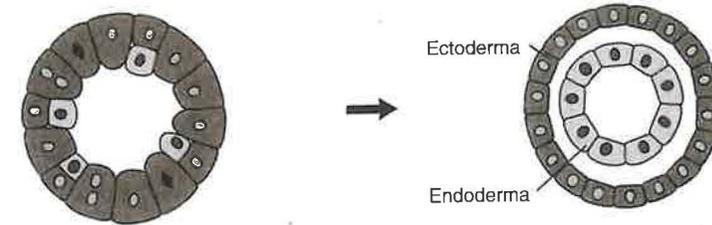
Nella *Tabella 1.4* sono riportate le diverse modalità con cui i processi di segmentazione e gastrulazione avvengono nell'insieme dei principali *taxa* animali. Pur non essendo **completo**, il quadro riportato nella tabella mostra la **diversità** di soluzioni che si sono selezionate nel corso della evoluzione per attuare le prime due tappe dell'embriogenesi, con la utilizzazione di un numero limitato di meccanismi.

#### 1.2.4 L'organogenesi

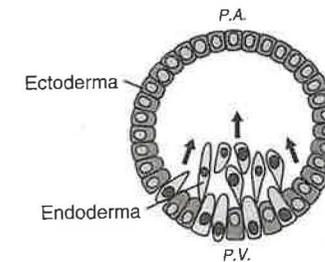
I movimenti morfogenetici della gastrulazione portano alla formazione di territori embrionali distinti, se-

Fig. 1.6: **Modalità della gastrulazione**

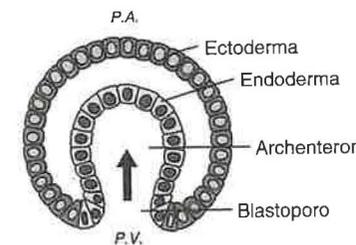
#### a) Delaminazione



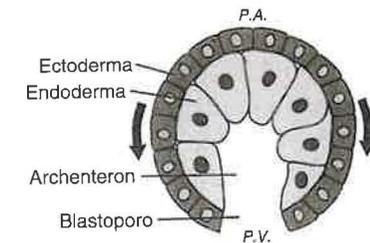
#### b) Immigrazione



#### c) Embolia



#### d) Epibolia



#### e) Proliferazione polare



guendo una cronologia rigorosa e specifica per le diverse forme animali; successivamente compaiono nell'embrione dei tessuti differenti e sempre più specializzati, capaci di interagire e di cooperare per la formazione degli organi e per lo svolgimento di funzioni specifiche. La fase dello sviluppo, che porta alla formazione di organi con diverse funzioni, costituisce l'organogenesi. Il grado di avanzamento di questo processo in alcuni casi può essere limitato, ma è in ogni caso sufficiente a consentire la formazione di organi vitali funzionanti e a permettere ai giovani organismi neoformati di provvedere ai propri bisogni. È questo il caso di numerose specie ovipare, che alla schiusa liberano dei giovani o delle larve capaci di vita autonoma.

In genere durante la loro formazione, gli organi nell'embrione occupano una posizione che è in relazione ai foglietti da cui si originano. Ad esempio lo strato epidermico, che assicura il rivestimento del futuro organismo, origina dall'ectoderma che forma il rivestimento esterno dell'embrione, mentre l'endoderma darà origine ai tessuti epiteliali dell'apparato digerente. Tuttavia bisogna ricordare che la formazione di un organo in genere richiede la partecipazione di diversi elementi cellulari, di cui alcuni sono deputati allo svolgimento delle funzioni specifiche dell'organo, mentre altri svolgono funzioni trofiche o di protezione. Quindi alla formazione degli organi che si formano in posizioni ben definite nell'organismo, contribuiscono più componenti e ogni organo pur formandosi prevalentemente da uno dei tre foglietti, per raggiungere la sua definitiva organizzazione contiene anche elementi derivati da altri foglietti.

Bisogna ricordare che il foglietto ectodermico, oltre al destino epidermico, è anche il foglietto da cui si formano il sistema nervoso e gli organi di senso; da questo deriva il termine **neuroectoderma** usato per designare il foglietto embrionale più esterno.

In molte specie e in particolare nei Vertebrati, la formazione del sistema nervoso a partire dall'ectoderma avviene in un momento precoce rispetto alla formazione di altri organi e costituisce la **neurulazione**, che porta alla identificazione di uno stadio ben definito dello sviluppo embrionale, la **neurula** (ad esempio negli Anfibi). Tuttavia nell'ambito dei Vertebrati in molti casi è difficile distinguere uno stadio preciso equivalente alla neurula degli Anfibi, poiché la formazione dell'abbozzo del sistema nervoso avviene in modo continuo e contemporaneamente ad altri eventi dello sviluppo. È questo il caso degli Uccelli, in cui i processi embriogenetici avvengono con una diversificazione spazio-temporale; la evoluzione precoce delle strutture nella regione anteriore dell'embrione, fa sì che la formazione del sistema nervoso centrale sia avanzata in questa regione, mentre nella futura regione caudale sono ancora in atto i movimenti morfogenetici della gastrulazione.

Sempre in relazione alla formazione del sistema nervoso, nei celomati si possono distinguere due strategie evolutive. Nei Protostomi il sistema nervoso occupa una posizione ventrale; esso è costituito da una catena gangliare disposta lungo tutto il corpo, in posizione ventrale rispetto al tubo digerente; il termine **iponeuri** è stato coniato per designare le specie che mostrano questa particolare organizzazione anatomica. Questi utilizzano un anello **peri-esofageo** formato da cordoni nervosi, per collegare la catena gangliare ventrale con i gangli cerebrali, in posizione dorsale rispetto all'orifizio boccale e alla regione faringea. In alcuni Deuterostomi si osserva una disposizione del sistema nervoso opposta a quella adesso descritta. Infatti quelli che presentano la formazione della **corda**, una struttura di sostegno d'origine mesodermica e in molti casi transitoria, presentano il sistema nervoso in posizione dorsale rispetto al tubo digerente e per questo sono denominati **epineuri**. Inoltre alcuni *taxa*, ad esempio gli Echinodermi, non presentano nessuna delle due disposizioni descritte per il sistema nervoso, ma hanno un sistema nervoso rudimentale, a volte scarsamente separato dall'epiderma periferico. Le specie con questa caratteristica sono designate con il termine **epitelioneuri**.

Infine nell'ambito della organogenesi dei celomati è necessario ricordare un altro fenomeno definito **metamerizzazione**, che porta a una struttura ripetitiva della organizzazione del corpo, basata sulla successione di segmenti o **metameri**, che hanno in comune un paio di gangli nervosi, un paio di appendici locomotorie e un paio di sacchetti celomatici. Mentre in alcune specie questa struttura a segmenti è ben identificabile, in altre subisce secondariamente numerose modificazioni, che possono portare alla sua scomparsa nell'adulto.

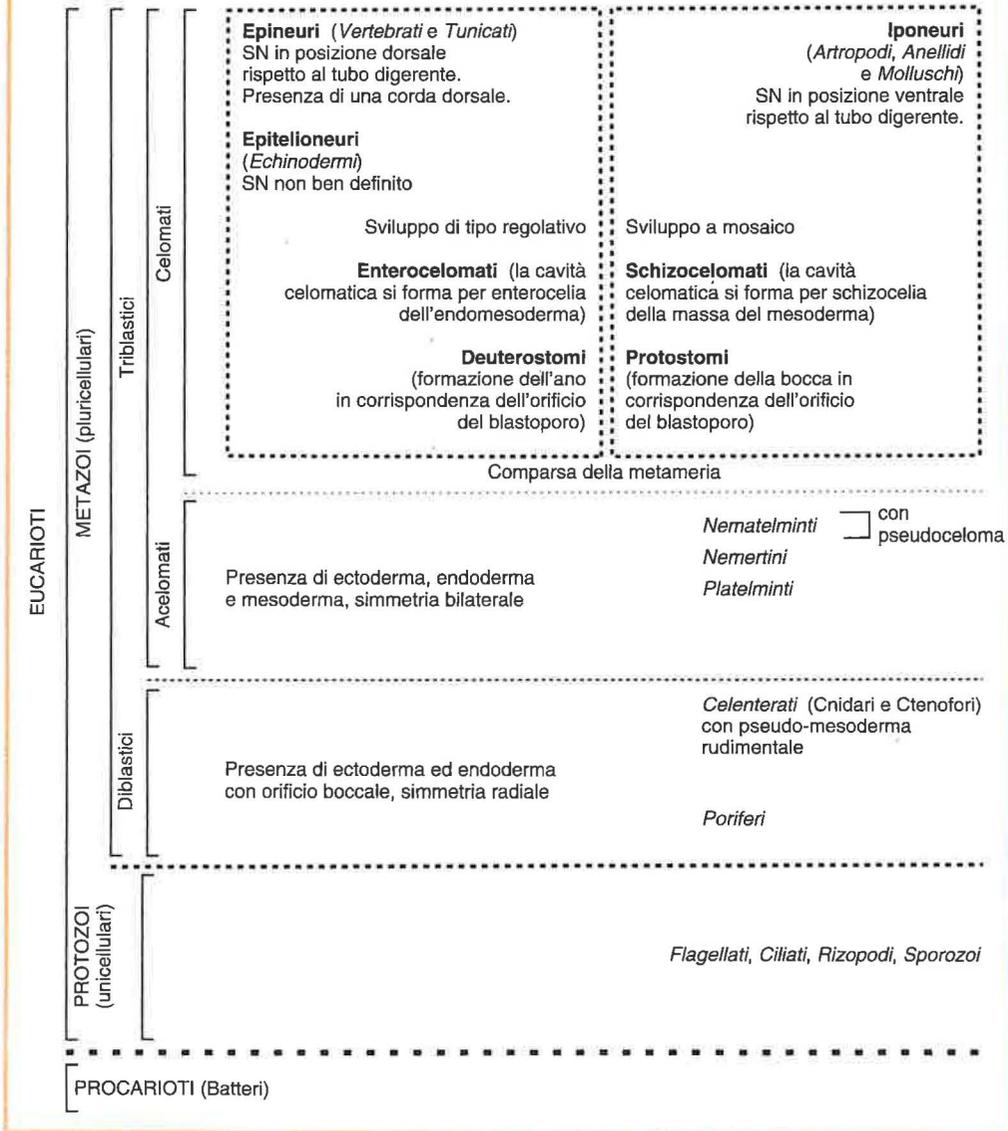
Nella *Tabella 1.5* è riportato uno schema semplificato delle diversità di sviluppo che si osservano nel regno animale. Tuttavia, nonostante la diversità della organizzazione del corpo che si osserva nelle diverse specie animali, la tabella mostra una profonda unità nei processi di sviluppo, che può essere considerata come il risultato di una pressione selettiva esercitata nel **periodo critico dello sviluppo precoce**. I processi evolutivi in queste fasi precoci dello sviluppo hanno determinato, per una data struttura, la scelta tra il suo mantenimento o la sua modificazione, in quest'ultimo caso con la necessità di una ulteriore scelta. Le diverse possibili soluzioni per la costruzione di un individuo, facilitate dal numero limitato di processi che entrano in gioco, hanno determinato un tipo dicotomico di organizzazione del mondo animale, qualora questo sia considerato secondo un criterio embriologico.

Tab. 1.4: **Modalità di segmentazione e gastrulazione nei taxa principali**

PHYLA	TIPO DI SEGMENTAZIONE	TIPO DI GASTRULAZIONE
PORIFERI	Totale radiale eguale o ineguale	Embolia, epibolia e immigrazione
CELEENTERATI (Cnidari e Ctenofori)	Totale radiale eguale o ineguale, raramente parziale superficiale	Immigrazione (polare o multipolare), delaminazione, epibolia, embolia
PLATELMINTI	Totale ineguale radiale o spirale con qualche modifica	Epibolia e/o embolia, immigrazione, movimenti cellulari non chiariti
NEMERTINI	Totale eguale spirale con qualche modifica	Embolia e immigrazione
NEMATELMINTI	Totale rotazionale quasi eguale	Embolia, immigrazione o epibolia
ANELLIDI	Totale spirale, eguale o ineguale, talvolta modificata da movimenti secondari	Epibolia e/o embolia, talvolta immigrazione
MOLLUSCHI	Totale spirale ineguale o parziale discoidale nei Cefalopodi	Embolia, epibolia e immigrazione
ARTROPODI	Crostacei: totale radiale, talvolta spirale e/o parziale superficiale	Embolia e epibolia o immigrazione
	Insetti: totale o parziale superficiale	Immigrazione e/o embolia
ECHINODERMI	Totale radiale eguale o ineguale, talvolta parziale superficiale	Embolia e immigrazione
TUNICATI	Totale bilaterale ineguale	Embolia o epibolia
VERTEBRATI	Totale radiale negli Anfibi	Embolia e epibolia Immigrazione
	Parziale in Pesci, Rettili e Uccelli	
	Totale rotazionale nei Mammiferi	

(modificato da Dawydoff, 1928)

Tab. 1.5: Modalità di sviluppo nel regno animale



Bisogna tenere presente tuttavia che i criteri adottati per descrivere l'organizzazione del mondo animale si riferiscono a una classificazione tradizionale, a cui attualmente viene in alternativa contrapposta la sistematica filogenetica. L'assenza o presenza di un carattere che porta a una diversificazione dicotomica dei viventi, come quella descritta in precedenza, suggerisce che l'assenza possa essere considerata come uno stato ancestrale, e non essere dovuta a eventuali perdite secondarie. Queste considerazioni sono in particolare rilevanti, in relazione alla questione della presenza o non del celoma. In questo testo gli autori, pur consapevoli del fatto che una classificazione su base filogenetica non considera i concetti di acelomati e pseudocelomati (tutti gli organismi triblastici sono considerati come celomati), hanno tuttavia mantenuto questa suddivisione (Tabella 1.5), al fine di una semplificazione descrittiva,

basata su dei dati anatomici facilmente osservabili. Questa scelta tuttavia non intende convalidare una classificazione pre-cladista basata su dei criteri che possono apparire obsoleti, poiché non è questo lo scopo di questo testo.

La descrizione sintetica delle differenti tappe che in una fase precoce determinano la costruzione di un nuovo organismo, intende fornire uno schema generale al lettore che non abbia familiarità con i processi della embriogenesi e con la terminologia in uso in questo campo. Gli esempi riportati nelle pagine seguenti sono descritti seguendo la sequenza cronologica degli eventi che caratterizzano l'embriogenesi dell'organismo in esame; la loro comprensione dovrebbe essere resa più facile dalle nozioni elementari che sono state descritte in questo capitolo.

# Sviluppo di un Nematode: *Caenorhabditis elegans*

2

Poca attenzione è stata dedicata allo sviluppo dei Nematodi, dopo gli studi di Boveri all'inizio del 1900, che avevano per oggetto il fenomeno della diminuzione cromosomica nella determinazione della linea germinale in *Parascaris aequorum*. Attualmente l'interesse per questo materiale biologico si è ravvivato, in seguito ai risultati raggiunti dagli studi sull'embriogenesi di un piccolo verme, *Caenorhabditis elegans*. Questo Nematode libero presenta l'organizzazione degli pseudocelomati, un gruppo intermedio tra gli acelomati, come i Plateminti, e i Protostomi celomati; oltre ad una anatomia molto semplice e piccole dimensioni (1 mm  $\times$  70  $\mu$ m) presenta numerosi vantaggi. Può essere allevato facilmente in laboratorio e per il suo ciclo vitale molto breve (3,5 giorni) è possibile ottenere un elevato numero di individui a stadi di sviluppo sincroni; l'insieme di queste caratteristiche ne fanno un materiale di studio privilegiato. Inoltre allo stato adulto questa specie ha un numero prestabilito di cellule somatiche (959 o 1031 nuclei somatici a seconda dei sessi), la cui discendenza è stata stabilita con precisione a partire dai primi stadi di sviluppo e questo permette di prendere in esame alcuni problemi del differenziamento cellulare. Inoltre questo organismo ha un genoma di dimensioni relativamente piccole (approssimativamente  $10^8$  paia di basi) e un limitato numero di geni stimato dagli autori in circa 3 500-15 000 distribuiti in 6 cromosomi. Queste caratteristiche rappresentano un grande vantaggio per l'individuazione dei geni coinvolti nei meccanismi dello sviluppo e del differenziamento cellulare.

## 2.1 L'uovo indiviso

Fondamentalmente la specie è ermafrodita proterandrica, cioè gli individui raggiungono la maturità sessuale di tipo maschile prima di quella femminile; gli individui maschi possono apparire spontaneamente nella popolazione con una frequenza di circa 1/700. La riproduzione si realizza sia per autofecondazione degli ermafroditi che per fecondazione incrociata in seguito all'accoppiamento di individui maschi ed ermafroditi.

L'ovulo corrisponde a un oocita I bloccato allo stadio di diacinesi della profase della I divisione meiotica. Se nella spermateca dell'individuo ermafrodita sono pre-

senti spermatozoi, si ha la scomparsa dell'involucro nucleare dell'oocita e, in seguito a contrazioni della parete dell'ovario, l'oocita raggiunge la spermateca dove viene fecondato. L'uovo fecondato rimane in questo organo per un breve periodo, durante il quale ha inizio la formazione di un guscio e lo sblocco del processo meiotico. Il proseguimento dello sviluppo si ha nell'utero, struttura che corrisponde alla parte della gonade più vicina all'orifizio genitale. La durata dell'embriogenesi varia in relazione alla temperatura (12 h, 14 h e 18 h rispettivamente a 25°C, 20°C e 16°C). La cronologia dello sviluppo è riportata nella *Tabella 2.1* ed è quella osservata alla temperatura di 25°C.

Se in modo arbitrario si considera come 0 il momento della fecondazione e 1 quello della prima divisione, si può dividere questo intervallo di tempo in frazioni e descrivere la sequenza di eventi di questa fase iniziale dello sviluppo. Al tempo 0,3 e 0,6 sono rispettivamente emessi il primo e il secondo globulo polare; la loro posizione in genere individua la futura regione anteriore dell'embrione. Nell'intervallo di tempo tra 0,6 e 0,85 si manifestano degli eventi fondamentali, che condizionano in modo definitivo la successiva embriogenesi. Oltre al verificarsi dell'anfimissi infatti, si manifestano dei movimenti citoplasmatici che causano una distribuzione non omogenea di materiali citoplasmatici nell'uovo fecondato, prima che abbia inizio la segmentazione.

Al tempo 0,6, che corrisponde all'emissione del secondo globulo polare, si manifestano delle contrazioni nella zona citoplasmatica corticale della regione anteriore. Questi movimenti progressivamente si propagano verso la regione mediana, dove si concentrano, e al tempo 0,7 determinano una costrizione, che dà una immagine simile a quella di una cellula in divisione. Durante questo periodo, detto di **pseudosegmentazione**, i costituenti citoplasmatici di origine materna si ripartiscono nell'uovo in modo asimmetrico. È quanto avviene in particolare per i **granuli P**, che da una distribuzione inizialmente omogenea, in seguito a questi movimenti vanno a concentrarsi nella regione periferica posteriore e corrispondono ai **determinanti citoplasmatici della linea germinale** (Fig. 2.1a). La Fig. 2.1b, in cui i granuli P sono specificamente messi in evidenza con la immunofluorescenza, mostra una immagine reale di questo fenomeno.

Tab. 2.1: Cronologia dello sviluppo di *Caenorhabditis elegans* (a 25°C)

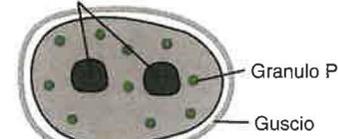
Tempi	Fasi
0 h	Fecondazione
0 h 40	Pseudosegmentazione
0 h 50	Anfimissi
1 h	2 cellule
1 h 15	6/8 cellule
1 h 30	24 cellule, inizio della gastrulazione
6 h	Fine della gastrulazione, inizio della morfogenesi e allungamento dell'embrione
7 h	Allungamento medio
8 h	Fine dell'allungamento
12 h	Schiusa, inizio della fase larvale L1
36 h	Verme adulto

(da Sulston *et al.*, 1983)

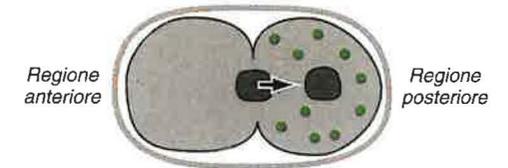
Fig. 2.1: Segregazione precoce e granuli P

a) Prime fasi della segmentazione

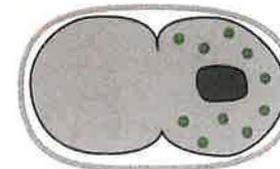
Pronuclei maschile e femminile



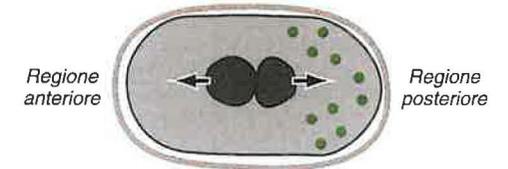
Uovo fecondato



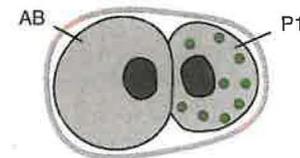
Pseudosegmentazione



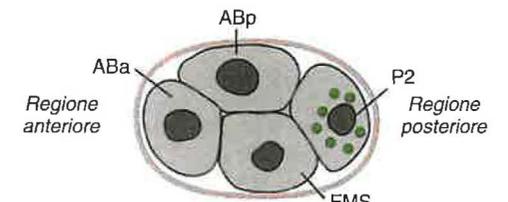
Anfimissi



Inizio della prima divisione

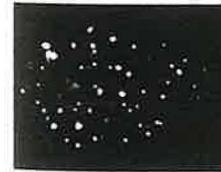


Stadio a 2 cellule



Stadio a 4 cellule

b) Microfotografia dei granuli P rivelati con immunofluorescenza (x 750)



Uovo fecondato



Anfimissi



Stadio a 2 cellule



Stadio a 8 cellule

(da Strome e Wood, 1983)

Nello stesso tempo il pronucleo maschile, localizzato nella regione posteriore dell'uovo, viene raggiunto dal pronucleo femminile privo di centrosoma e che ha superato la costrizione mediana. Il contatto tra i pronuclei quindi avviene senza una immediata fusione in una posizione leggermente spostata verso la regione posteriore dell'uovo.

Il proseguimento dell'embriogenesi è caratterizzato dai processi classici di segmentazione, gastrulazione e organogenesi. Nei paragrafi successivi questi eventi sono descritti per ragioni didattiche in un modo che può suggerire una sequenza di eventi successivi; tuttavia nella realtà queste diverse fasi in parte si sovrappongono e l'embriogenesi è caratterizzata dalla concomitanza di questi processi. Classicamente l'embriogenesi di *C. elegans* è suddivisa in due grandi fasi: una fase di proliferazione, che è caratterizzata da una attiva duplicazione cellulare e che riunisce le fasi della segmentazione e della gastrulazione, e una fase di allungamento, nel corso della quale le divisioni cellulari sono rallentate e l'embrione cambia la sua forma da una morfologia ovoidale a una morfologia vermiforme.

## 2.2 La segmentazione

La segmentazione è oblastica e ineguale fin dalla prima divisione. In conseguenza del marcato spostamento del fuso mitotico verso la parte posteriore dell'uovo, la prima divisione dà origine a un voluminoso blastomero anteriore, AB, e a un blastomero posteriore di dimensioni minori P1, che contiene i granuli P.

Alla seconda divisione si evidenziano delle differenze tra i due primi blastomeri. Infatti il blastomero AB è interessato da un piano di divisione meridiano e dà origine a due blastomeri di eguali dimensioni. La divisione del blastomero P1 è sfalsata nel tempo e si effettua secondo un piano longitudinale, che dà origine a due blastomeri di diverse dimensioni, EMS grande e P2 più piccolo. Questo tipo di segmentazione è simile a quella che si osserva nei Mammiferi ed è definita di tipo rotazionale (Fig. 2.1a).

Successivamente il blastomero AB va incontro a una serie di divisioni sincrone nelle quali si susseguono piani di divisione perpendicolari tra loro. La segmentazione dei blastomeri EMS e P2 prosegue con delle marcate differenze; P2 si divide in modo ineguale e dà origine a un piccolo blastomero P3, in cui si concentrano i granuli P, e un blastomero di dimensioni maggiori C. Nel blastomero EMS si osserva invece una divisione eguale, che dà origine ai blastomeri E ed MS.

Infine un ultimo ciclo di divisione importante per la determinazione del destino cellulare è la divisione ineguale, che interessa il blastomero P3, da cui si formano i blastomeri D e P4 (Fig. 2.2).

Questa sequenza di divisioni ineguali porta alla formazione di cellule fondatrici (AB, C, D, E, MS e P4), così definite in quanto capostipiti di cellule che presentano un destino differenziativo strettamente definito. La nomenclatura adottata per identificare i blastomeri generati da queste cellule fondatrici fa riferimento agli assi delle divisioni cellulari in rapporto agli assi dell'embrione. Così viene indicata come ABa la cellula figlia anteriore generata dalla cellula fondatrice AB, mentre viene indicata come ABar, in cui r sta per right (destra), la cellula figlia in posizione destra, nata dalla divisione della cellula ABa.

In questa fase precoce della segmentazione le divisioni asimmetriche sono sempre orientate secondo l'iniziale asse antero-posteriore dell'uovo, anche se la costrizione imposta dal guscio e la posizione assunta dai blastomeri modificano la visione che si ha del fenomeno. Inoltre le cellule fondatrici che si trovano nella posizione più posteriore danno origine a cellule che si dividono con una velocità minore rispetto alle cellule della regione anteriore.

## 2.3 La gastrulazione

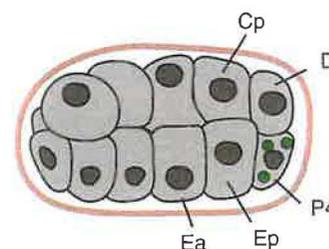
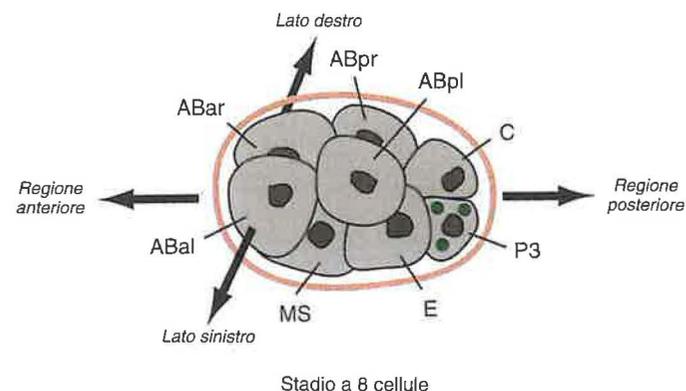
Questa fase dello sviluppo si sovrappone a quella precedente, in quanto inizia molto precocemente, a 20°C 100 minuti dopo la prima divisione, quando l'embrione è formato da 28 cellule. A questo stadio, 2 cellule originate da E e localizzate in posizione ventrale e posteriore cominciano ad invaginarsi. Quando l'embrione è formato da circa 100 cellule, il movimento di invaginazione si estende ventralmente con la internalizzazione di 2 cellule provenienti da P4 e di 8 cellule discendenti da MS. Infine C e D insieme con alcune cellule derivate da AB si spostano all'interno in corrispondenza di un solco ventrale, che si richiude dopo 4-5 ore (240-300 minuti) dall'inizio della segmentazione. A questo stadio l'embrione ha ancora una forma ovoidale ed è formato da circa 400 cellule (Fig. 2.2).

Bisogna sottolineare che durante questa fase di proliferazione (come definita in precedenza) all'interno della massa cellulare, che costituisce l'embrione, non si è formata una cavità equivalente al blastocele, ma sono presenti soltanto dei piccoli spazi intercellulari. Inoltre al termine della 6<sup>a</sup> ora, quando la gastrulazione si può considerare completata, le cellule discendenti da C e D, localizzate nella metà posteriore dell'embrione e che in particolare daranno origine alla muscolatura del corpo, si dispongono ai due lati dell'abbozzo del tubo digerente, mettendo in evidenza una rudimentale organizzazione di tipo triblastico.

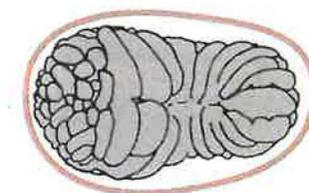
## 2.4 L'organogenesi

Parallelamente alla attiva proliferazione cellulare, che si completa entro 350 minuti dall'inizio dello sviluppo, concludendo la fase di proliferazione, si svolgono

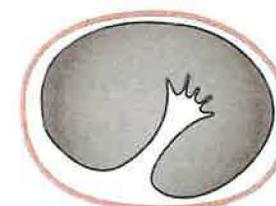
Fig. 2.2: Fasi finali dello sviluppo



Stadio a 28 cellule  
inizio della gastrulazione



Fine della gastrulazione  
e inizio dell'allungamento  
(veduta ventrale)



Stadio di allungamento medio

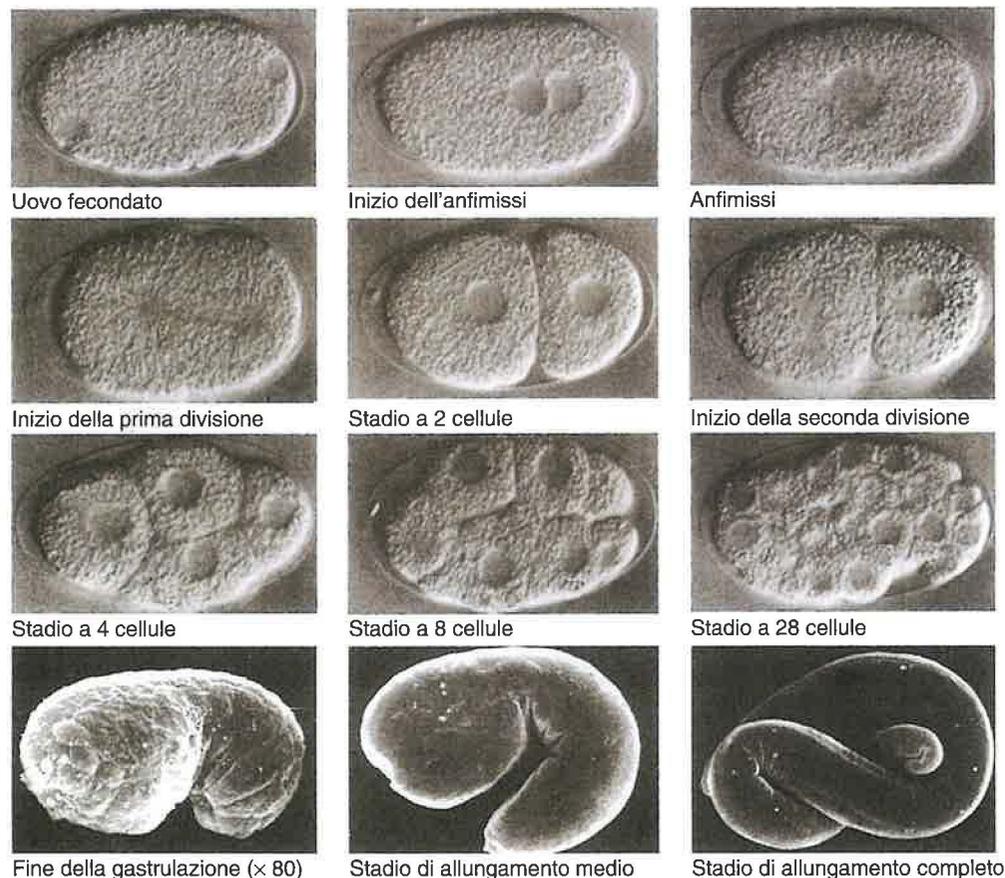
anche dei processi di differenziazione cellulare e si manifesta un inizio di organizzazione degli organi fondamentali del futuro adulto (ipoderma, intestino, faringe).

L'embrione, che alla fine della gastrulazione è costituito da 550 cellule, appare essenzialmente come una massa compatta di cellule di forma ovoidale; successivamente andrà incontro a delle continue trasformazioni, che caratterizzano il secondo periodo, quello di allungamento. Quest'ultimo si completa al momento della schiusa, che a 20°C avverrà circa 14 ore dopo la prima divisione. Oltre a fenomeni di differenziamento che interessano in modo continuo i diversi gruppi cellulari, si manifestano anche dei fenomeni di apoptosi, cioè di morte cellulare programmata, che cominciano all'incirca a 220 minuti di sviluppo e si completano intorno alla 10<sup>a</sup>

ora. Inoltre si hanno dei fenomeni morfogenetici dovuti a cambiamenti della forma cellulare, che hanno come conseguenza l'allungamento dell'embrione, il quale progressivamente assume un aspetto vermiforme. L'insieme delle tappe principali dell'embriogenesi è illustrato nella Fig. 2.3.

Per quanto riguarda il processo di differenziamento cellulare, le cellule fondatrici rappresentano l'origine di discendenze cellulari invariati, che partecipano in modo esclusivo alla formazione dei diversi organi. L'intestino è infatti formato esclusivamente da un clone cellulare generato dalla cellula fondatrice E, mentre il tessuto muscolare corporeo è formato da cellule discendenti dalle cellule fondatrici MS, C e D. Il differenziamento di questo tessuto ha inizio al 400° minuto di sviluppo, e

Fig. 2.3: Fasi dello sviluppo di *Caenorhabditis elegans* (x 100)



(da Schierenberg, 1986; Priess e Hirsh, 1986)

questo consente al verme in formazione di acquisire la capacità di muoversi in seguito alla organizzazione delle proteine contrattili.

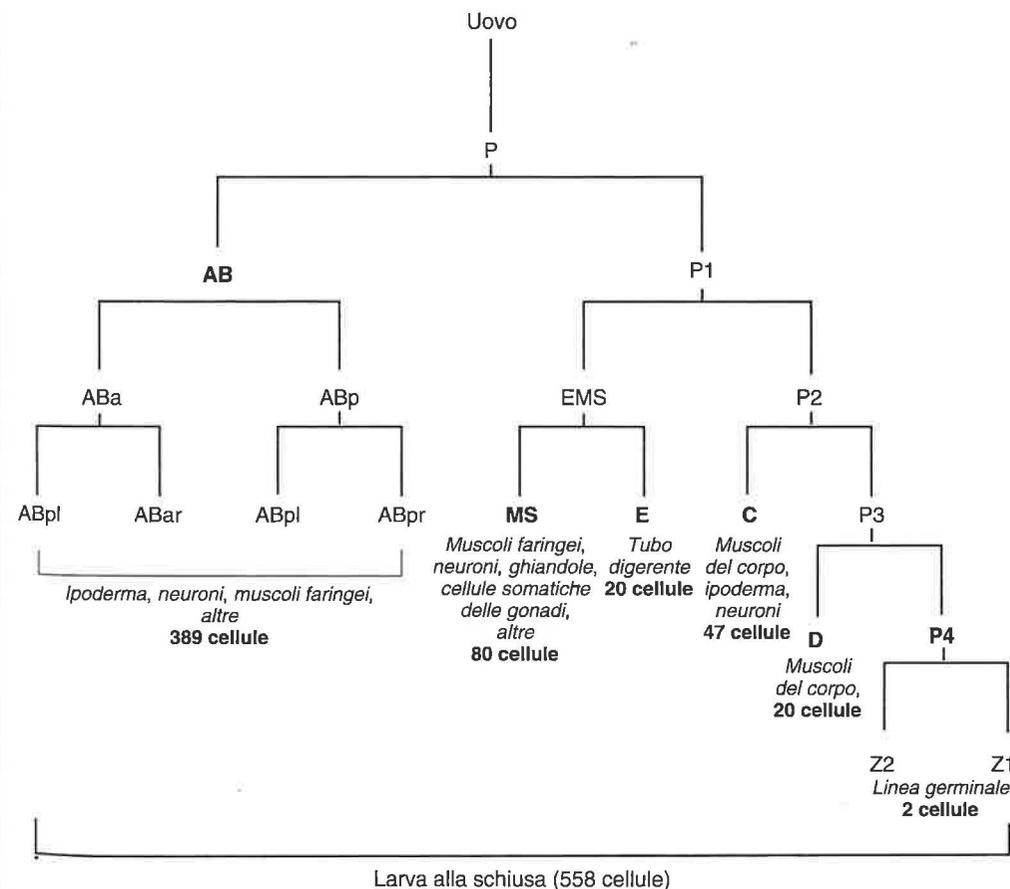
Nelle ultime ore della vita embrionale, a partire dalla 11<sup>a</sup> ora (660 minuti di sviluppo), si organizza una cuticola formata dai prodotti di secrezione delle cellule ipodermiche, che per la maggior parte sono polinucleate. Inoltre alcuni organi come la faringe diventano funzionanti.

Con la schiusa nasce un piccolo verme, la larva L1, di piccole dimensioni, ma morfologicamente simile all'adulto. Questa larva è formata da 556 cellule somati-

che, la cui discendenza è stabilita con precisione (Fig. 2.4), e da 2 cellule germinali Z1 e Z2, che derivano dalla divisione di P4.

Lo sviluppo post-embriionale è caratterizzato da 4 mute; allo stadio larvale L1, seguono gli stadi larvali L2, L3, L4 ed infine viene raggiunto lo stadio adulto. Nel succedersi di questi stadi, che si completano in 3 giorni, si manifesta una crescita regolare dell'organismo e un approssimativo raddoppio del numero di nuclei somatici. Al completamento del suo sviluppo il verme è formato da 959 cellule somatiche e circa 2 000 cellule germinali, nel caso sia ermafrodita, mentre il maschio è formato da 1 031 cellule somatiche e circa 1 000 cellule germinali.

Fig. 2.4: Discendenza delle cellule in *Caenorhabditis elegans*



# Sviluppo di un Anellide: *Arenicola cristata*

# 3

Lo scopo di questo capitolo è di illustrare le principali tappe dello sviluppo che caratterizzano un considerevole numero di specie diverse raggruppate sotto la denominazione di Spiralia. Ricordiamo che questi ultimi comprendono alcuni gruppi di Invertebrati che possiedono la caratteristica di avere una segmentazione di tipo spirale, quali i Platelmini (Turbellari Policladi), i Nemertini, gli Anellidi e i Molluschi (Lamellibranchi, Gasteropodi, Scafopodi). Al fine di evitare di fornire una descrizione troppo schematica, come potrebbe accadere riportando lo sviluppo di un archetipo virtuale, le osservazioni presentate in questo capitolo riguardano in particolare una specie americana, *Arenicola cristata* (Anellide Polichete). Tuttavia potranno essere menzionate anche caratteristiche proprie di altre specie appartenenti agli Spiralia, qualora queste presentino delle differenze accentuate rispetto allo schema di sviluppo esemplificato da *Arenicola*.

## 3.1 L'uovo indiviso

Come regola generale, le uova degli Anellidi sono sferiche salvo alcuni casi particolari come quello di *Arenicola*, dove l'uovo si presenta sotto forma discoidale ed acquista poi una forma sferica durante le fasi iniziali dello sviluppo. Le uova, relativamente ricche di tuorlo, sono di tipo eterolecitico e hanno un diametro massimo di circa 0,5 mm. In numerose specie, tra le quali *Arenicola*, l'uovo pronto per la fecondazione corrisponde ad un ovocita I bloccato in metafase della prima divisione meiotica ed in esso si manifesta precocemente una polarità dovuta ad una distribuzione eterogenea di costituenti citoplasmatici di origine materna, che si può accompagnare o meno alla localizzazione di specifici pigmenti. La fecondazione comporta sia l'emissione dei globuli polari sia alcune modificazioni della distribuzione di costituenti citoplasmatici dell'uovo. Ciò consente l'instaurarsi di una polarità assiale, definita grazie alla presenza di due emisferi distinti, quello animale e quello vegetativo. Le uova sono deposte sia singolarmente sia agglutinate insieme da una sostanza viscosa che, per esempio, in *Arenicola* forma un cordone di notevoli dimensioni contenente diverse migliaia di uova.

## 3.2 La segmentazione

La segmentazione è totale ed ineguale, di tipo spirale (vedi *Introduzione*). Durante la divisione dell'uovo nei primi due blastomeri, che si effettua secondo un piano meridiano, si assiste ad una distribuzione differenziale del contenuto citoplasmatico iniziale. Come conseguenza i due blastomeri hanno dimensioni diverse. Si deve osservare che a seconda delle specie che sono raggruppate nell'insieme degli Spiralia, la differenza di grandezza tra i blastomeri che si manifesta nella prima divisione di segmentazione, può essere correlata con la comparsa più o meno evidente di una protrusione citoplasmatica, il lobo polare (Fig. 3.1). Il riassorbimento di quest'ultimo in uno dei due blastomeri in formazione causa la differenza di dimensioni menzionata sopra. In certi casi non si osserva alcuna protrusione di un lobo polare, ma la prima divisione di segmentazione è nondimeno marcatamente ineguale (questo è il caso di *Arenicola*, ma anche degli Anellidi Oligocheti e Acheti; Fig. 3.2). Al contrario, in altre specie il volume raggiunto dal lobo polare si avvicina a quello dei blastomeri in formazione e ciò conferisce all'embrione un aspetto transitorio detto stadio a "trifoglio" (come in *Sabellaria sp.* - Polichete sedentario - o in *Dentalium sp.* - Mollusco Scafopode). Nel caso di situazioni intermedie si possono avere protuberanze poco accentuate (per esempio nei Molluschi Gasteropodi, Fig. 3.1). Per convenzione si usano le lettere AB e CD per designare i primi due blastomeri che originano dalla prima divisione di segmentazione ineguale. CD è quello più voluminoso e comprende il contenuto citoplasmatico del lobo polare nei casi in cui questa struttura si forma.

Il ciclo successivo di segmentazione è caratterizzato dalla formazione di 4 blastomeri A, B, C e D che corrispondono ai 4 quadranti di cellule che formeranno l'insieme dell'embrione. D corrisponde al blastomero più grande e la sua posizione determina la futura regione dorsale dell'embrione (Fig. 3.2). Grazie alla costanza delle posizioni relative dei blastomeri originati dai diversi cicli di divisione, è stato possibile individuare una precisa discendenza cellulare. La messa a punto di una nomenclatura ha consentito di designare i blastomeri indicandoli con una lettera preceduta da un coefficiente e accompagnata da un esponente (Tabella 3.1, pagina 41).

Il carattere a spirale della segmentazione si manifesta a partire dal terzo ciclo di divisione. Si osserva infatti che a ciascun ciclo di divisione gli assi dei fusi mitotici non sono né orizzontali né verticali ma sono disposti obliquamente rispetto all'asse di polarità PA-PV, comportando così una rotazione di  $\pm 45^\circ$  dei blastomeri in rapporto a questo asse. Le cellule figlie risultano disposte in corone secondo piani orizzontali e ciascuna cellula si viene a trovare tra due blastomeri adiacenti dello strato sottostante. Per di più a ciascuno dei cicli si assiste ad un'alternanza nell'orientamento dei fusi di divisione che sono inclinati o verso destra (fusi destrorsi) o verso sinistra (fusi sinistrorsi). La localizzazione nella regione sopra-equatoriale dei fusi della terza divisione dà origine a quattro micromeri animali che formano il primo quartetto (1a - 1d) e a quattro macromeri vegetativi (1A - 1D).

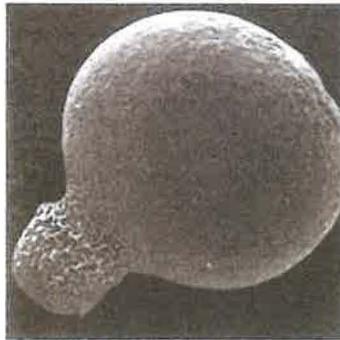
Durante i tre cicli di divisione successivi, a partire dai macromeri, continuano a formarsi quartetti di micromeri di serie 2, 3 e 4, mentre i micromeri preesistenti si dividono anch'essi dando ciascuna volta due corone cellulari: una superiore verso il polo animale che, in accordo con il sistema di nomenclatura adottato, è caratterizzata da un esponente 1, ed una inferiore identificata da un esponente 2. Al momento della sesta segmentazione, da cui si origina una blastula di 64 cellule, si individua un'ultima generazione di quartetti, la quarta, formata da 4a - 4d, mentre i macromeri originati da questa divisione sono designati come 4A - 4D (Tabella 3.1). Le successive divisioni diventano asincrone, e non è più possibile dare ai blastomeri una nomenclatura che segua le regole precedenti.

Fig. 3.1: Esempi di stadi precoci di Spiralia

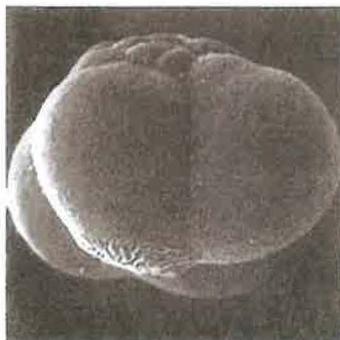
Polo vegetativo di un uovo fecondato di Crepidula (x 300)



Lobo polare di uovo fecondato di Buccino (x 250)



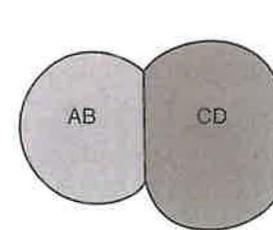
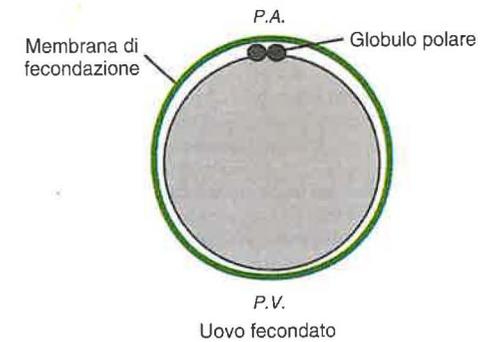
Embrione di Crepidula allo stadio di 4 blastomeri (visto dal polo vegetativo). Il blastomero D è identificabile grazie alla presenza di villosità (x 180)



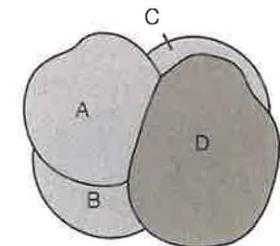
Embrione di Crepidula allo stadio di 24 blastomeri (visto lateralmente). Il blastomero 3D è caratterizzato da villosità (x 200)

(da Dohmen e Van der Mey, 1977)

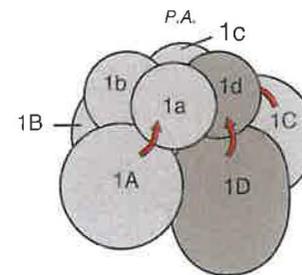
Fig. 3.2: Le prime tappe della segmentazione



Prima divisione completata  
2 blastomeri

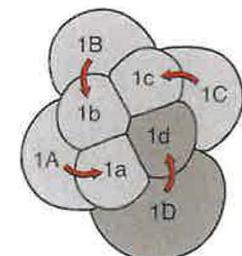


4 blastomeri



Veduta laterale

8 blastomeri



Veduta dal polo animale

I differenti blastomeri generati durante i primi sei cicli di divisioni di segmentazione danno origine a gruppi di cellule con un destino definito e che formeranno specifiche strutture corporee nelle future larve e negli adulti.

Nella blastula costituita da 64 cellule possono essere individuati i diversi territori presuntivi come riportato schematicamente in Fig. 3.3.

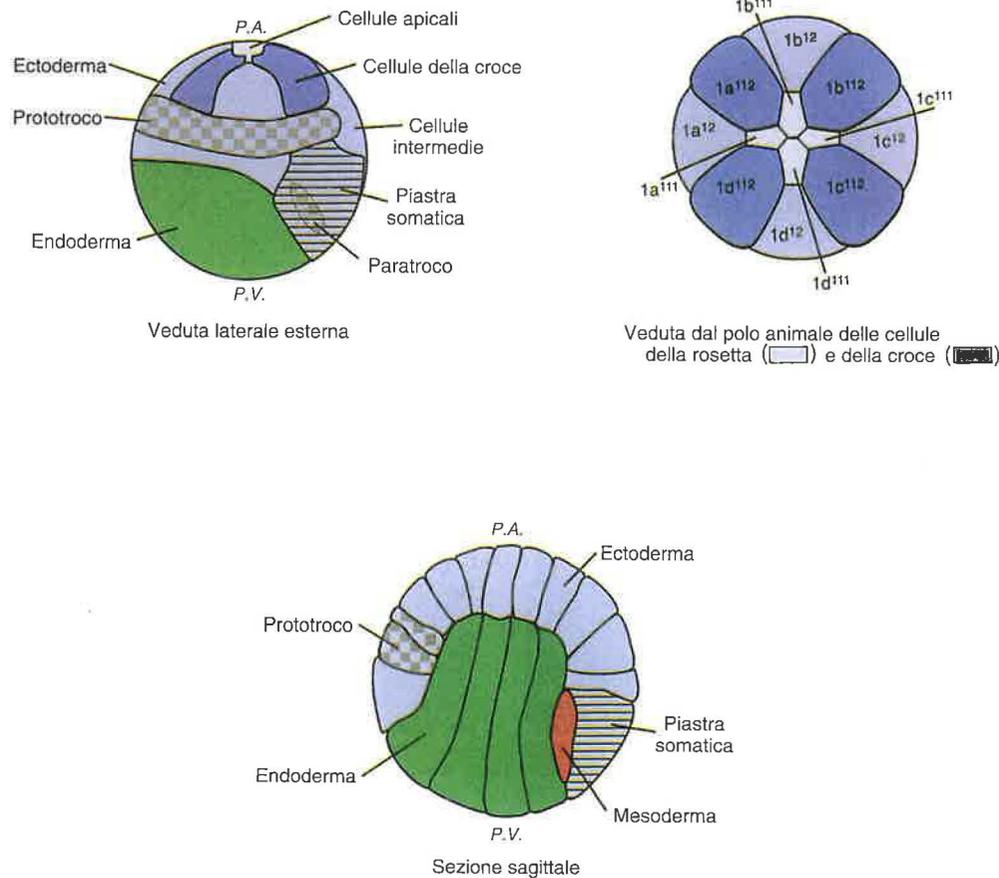
L'emisfero animale presenta un'organizzazione ben definita a livello del polo apicale, con 4 cellule che formano la *rosetta* e, tra queste, le loro cellule sorelle che si intercalano costituendo la *croce*. Quantunque questa disposizione peculiare delle cellule apicali possa presentare delle varianti a seconda dei *taxa*, essa rappresenta una modalità caratteristica dello sviluppo degli Spiralia. La parte restante dell'emisfero animale comprende blasto-

meri denominati *cellule intermedie* e i *trocoblasti*, che nella larva daranno origine rispettivamente all'ectoderma della sua parte superiore ed alle bande ciliate (il *prototroco* e il *paratroco*).

Nella zona di confine tra i due emisferi, un insieme di blastomeri derivato dal 3° quartetto e da una parte del 2° quartetto darà origine alle regioni ectodermiche equatoriali. A livello medio-dorsale, si trovano le cellule del 2° quartetto derivate da 2d. Questo blastomero inizialmente di grandi dimensioni corrisponde al primo *somatoblasto* dal quale, in seguito a divisioni bilaterali, discendono le cellule che costituiscono la *piastra somatica*.

Per quanto riguarda l'emisfero vegetativo questo è occupato per la maggior parte dai 4 macromeri 4A - 4D e

Fig. 3.3: *Territori della blastula iniziale*



dalle cellule del 4° quartetto. L'insieme di queste cellule dà origine all'endo-mesoderma. Il micromero 4d rappresenta la sola cellula capostipite del mesoderma e già dalla sua formazione si addentra in profondità nell'embrione (Fig. 3.3).

A seconda dei vari *taxa* facenti parte degli Spiralia, la segmentazione dà origine ad una steroblastula o ad una celoblastula con il blastocele spesso di dimensioni ridotte. Tuttavia, quali che siano le precise modalità della segmentazione, la quasi totalità dei territori cellulari è determinata molto precocemente (tipo di sviluppo a mosaico). Così in *Arenicola*, già a partire dallo stadio di 64 blastomeri, è possibile identificare i vari foglietti embrionali, e l'insieme dei blastomeri è indirizzato verso vie di differenziamento ben precise. Come conseguenza i movimenti che hanno luogo durante la gastrulazione non fanno altro che disporre in modo ordinato nello spazio foglietti già determinati.

### 3.3 La gastrulazione e l'organogenesi embrionale

Le modalità della gastrulazione possono variare a seconda della specie e negli Anellidi sono stati osservati soprattutto processi di *epibolia* ed/o di *embolia*. Nel caso di *Arenicola* la gastrulazione si effettua soprattutto per *epibolia*. Le tappe principali di questa sono rappresentate schematicamente nelle Figure 3.4 e 3.5. Per conoscere la derivazione esatta delle diverse popolazioni cellulari alle quali si farà riferimento a proposito dei processi di differenziamento e di morfogenesi si può consultare la Tabella 3.1.

Nell'emisfero animale le posizioni relative dei differenti territori cellulari precedentemente definiti restano più o meno invariate e i differenziamenti si realizzano *in situ*. Le cellule animali più apicali provenienti dal primo quartetto, danno origine a vari derivati ectodermici specifici. Così la *rosetta* è all'origine della futura *piastra sin-cipitale* a partire dalla quale si differenzierà un organo di senso tipicamente larvale provvisto di un ciuffo di ciglia sensoriali. Per quanto riguarda il *centro nervoso apicale*, che è disposto sotto questa piastra, esso deriva da materiale della *croce*. Infine, in associazione con cellule trocoblatiche secondarie provenienti dal secondo quartetto, i trocoblasi primari formano una cintura ciliata preorale, il *prototroco*, che resta inizialmente aperto dal lato dorsale a causa del fatto che i blastomeri appartenenti al quadrante dorsale D non partecipano alla sua costituzione.

Le cellule intermedie, derivanti anch'esse dal primo quartetto, sono distribuite inizialmente tra le braccia della *croce* e danno origine alla quasi totalità dell'ectoderma della parte superiore della futura larva trocofora (*episfera*), che formerà successivamente il rivestimento epidermico cefalico dell'adulto.

Le cellule del secondo e del terzo quartetto partecipano alla costituzione di numerose strutture anteriori della larva quali in particolare lo *stomodeo* (depressione ectodermica in corrispondenza della quale si aprirà la bocca, formata soprattutto a partire dagli *stomatoblasti*, blastomeri derivati dal terzo quartetto) e le corone ciliate quali il *prototroco*, già citato, ed il *metatroco* situato in posizione post-orale.

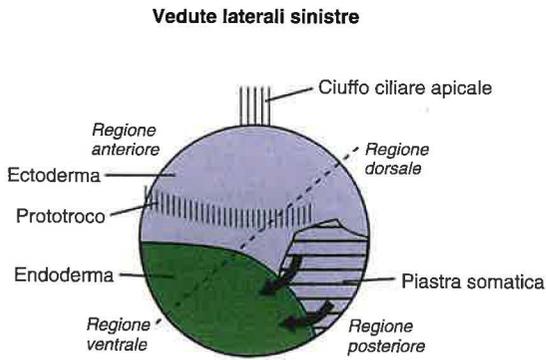
In posizione postero-dorsale, situato sotto la prima corona ciliata, si trova un gruppo di cellule disposte in monostrato che costituisce la *piastra somatica* menzionata precedentemente. Questa, derivata dal blastomero 2d (vedi sopra), si estende progressivamente da ciascun lato del piano di simmetria bilaterale verso la regione ventrale e ciò la porta a ricoprire le popolazioni cellulari dell'emisfero vegetativo (Fig. 3.4). Questa piastra, terminata la sua estensione, darà origine alla quasi totalità dell'ectoderma della parte inferiore della larva trocofora (*iposfera*) e successivamente all'ectoderma del tronco e della parte posteriore del verme adulto.

La zona compresa tra i due bordi laterali della piastra somatica costituisce il *blastoporo*. La sua superficie si riduce man mano che le due labbra laterali si avvicinano e si saldano poi in posizione medio-ventrale, eccetto che nella regione anteriore, proprio al di sotto del prototroco. Tale regione darà origine allo *stomodeo*, in corrispondenza del quale si aprirà la bocca. In modo tipico in *Arenicola*, la formazione dell'ano nella regione posteriore del blastoporo è associata all'esistenza di una cellula anale appartenente alla *piastra somatica* (blastomero 2d<sup>22</sup>). È a partire dai bordi marginali ventrali della piastra somatica che si forma successivamente la futura catena nervosa che si trova quindi topologicamente situata in posizione ventrale rispetto al tubo digerente, disposizione questa tipica degli *iponeuri*.

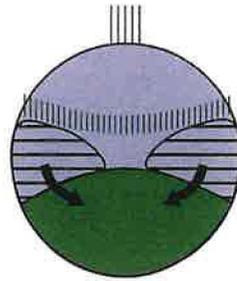
Infine 2 blastomeri, derivati dal somatoblasto secondario 4d, si dispongono simmetricamente rispetto al bordo posteriore del blastoporo e daranno origine alla formazione di due cordoni compatti, le *strie mesodermiche*, situate da una parte e dall'altra del piano di simmetria bilaterale (Fig. 3.5).

Alla schiusa si libera una larva natante, la *trocofora*, caratteristica degli Anellidi Policheti, l'archetipo della quale è rappresentato in Figura 3.6. La fotografia dal vivo rappresenta una larva trocofora di *Sabellaria sp.* Si deve ricordare che, sebbene in altre classi di Anellidi, quali Acheti ed Oligocheti dove lo sviluppo è diretto, questa larva è generalmente assente, essa è invece presente in forma tipica o modificata negli altri *taxa* quali i Molluschi Scafopodi, i Lamellibranchi o certi Gasteropodi. Nei casi più tipici la sua forma ricorda quella di una trotola non metamerizzata. La presenza di una corona ciliata principale che passa davanti alla bocca, il *prototroco*, la suddivide in due regioni: l'*episfera* e l'*iposfera*.

**Fig. 3.4: Gastrulazione (vedute esterne)**

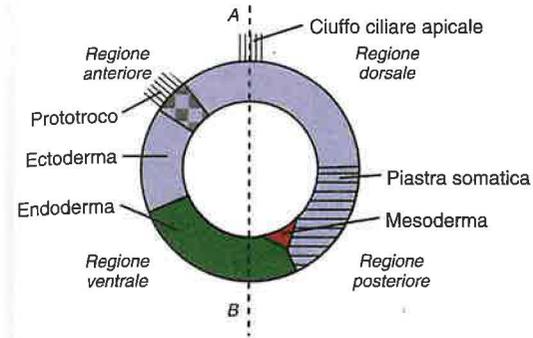


**Vedute antero-ventrali**



**Fig. 3.5: Gastrulazione (sezioni)**

**Sezioni sagittali**



**Sezioni corrispondenti al piano AB**

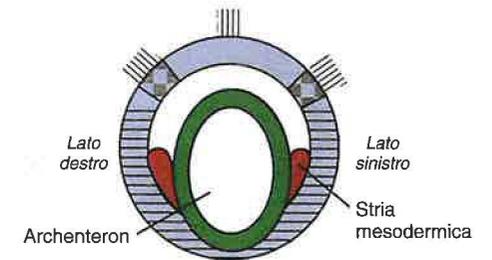
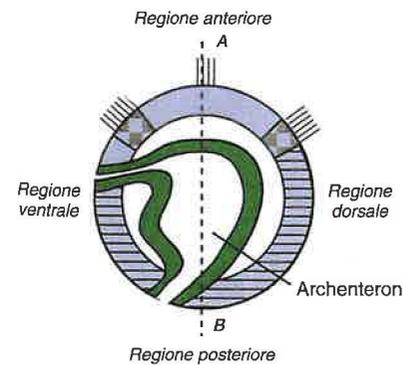
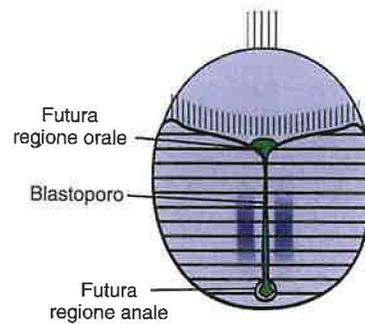
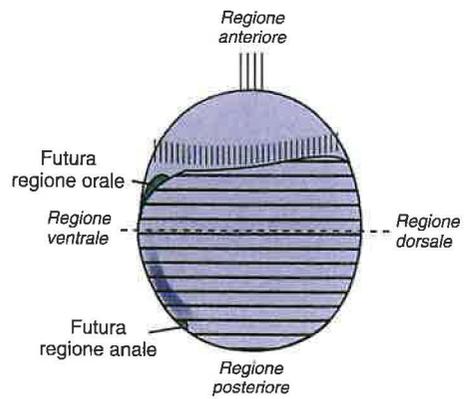
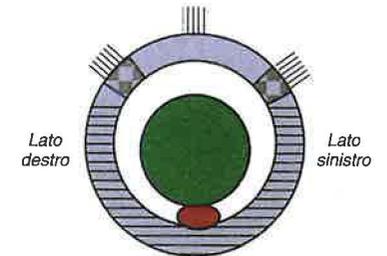
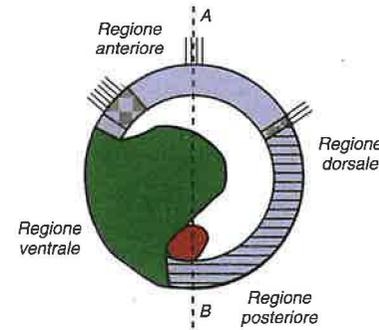
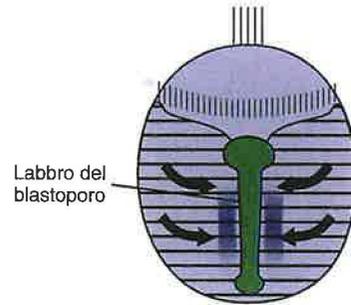
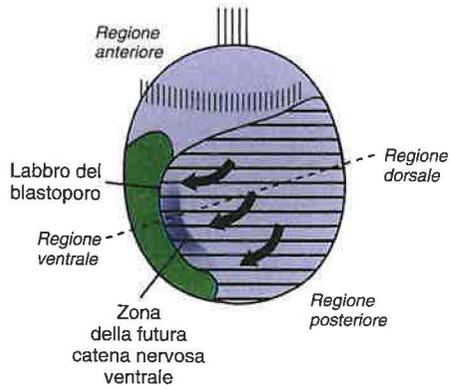
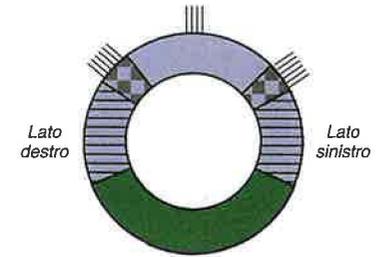
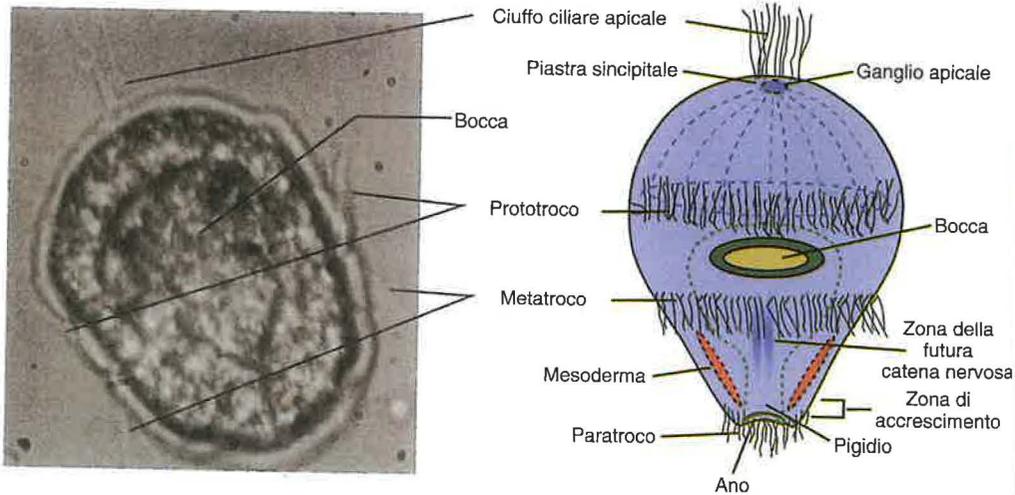
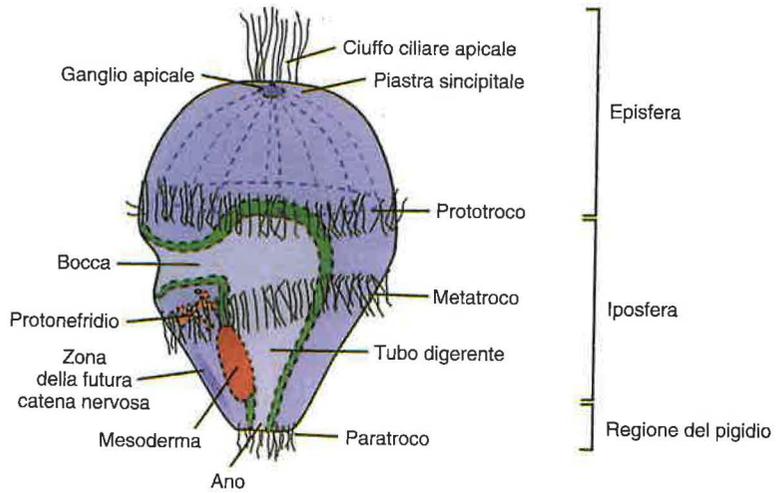


Fig. 3.6: Larva trocofora, organizzazione interna ed esterna



Tab. 3.1: Discendenza cellulare in Arenicola cristata

Stadio	2 blastomeri	4 blastomeri	8 blastomeri	16 blastomeri	32 blastomeri	64 blastomeri	Derivati		
Uovo	AB	A	1a	1a <sup>1</sup> Ectoderma cefalico e cervello	1a <sup>11</sup> Cellule apicali	1a <sup>111</sup>	Rosetta		
						1a <sup>112</sup>	Croce		
						1a <sup>121</sup>	Cellule intermedie (ectoderma cefalico)		
						1a <sup>122</sup>			
						1A	1a <sup>2</sup> Trocoblasto primario	1a <sup>21</sup>	Trocoblasti primari (corona ciliata preorale)
								1a <sup>212</sup>	
								1a <sup>221</sup>	
								1a <sup>222</sup>	
						2A	2a	2a <sup>1</sup>	Trocoblasti secondari
								2a <sup>11</sup>	
2a <sup>12</sup>									
2a <sup>21</sup>									
3A	3a	3a <sup>1</sup>	Stomatoblasti						
		3a <sup>2</sup>							
4A	4a	4a <sup>1</sup>	Endoderma						
		4a <sup>2</sup>							
B	Stessi derivati di A								
C	Stessi derivati di A								
Uovo	CD	D	1d	1d <sup>1</sup> Ectoderma cefalico e cervello	1d <sup>11</sup> Cellule apicali	1d <sup>111</sup>	Rosetta		
						1d <sup>112</sup>	Croce		
						1d <sup>121</sup>	Cellule intermedie (ectoderma cefalico)		
						1d <sup>122</sup>			
						1D	1d <sup>2</sup> Trocoblasto primario	1d <sup>21</sup>	Trocoblasti primari (corona ciliata preorale)
								1d <sup>212</sup>	
								1d <sup>221</sup>	
								1d <sup>222</sup>	
						2D	2d Somatoblasto primario (ectoderma del tronco, piastra somatica)	2d <sup>1</sup>	Piastra somatica (ectoderma del tronco)
								2d <sup>11</sup>	
2d <sup>12</sup>									
2d <sup>21</sup>									
3D	3d	3d <sup>1</sup>	Stomatoblasti						
		3d <sup>2</sup>							
4D	4d	4d <sup>1</sup>	Stomatoblasto secondario Cellula capostipite del mesoderma						
		4d <sup>2</sup>							
Endoderma									

(da Child, 1990)

In rapporto alla sua modalità di vita libera, questa larva possiede:

- un apparato locomotore ciliare ben sviluppato (oltre al prototroco possono essere presenti, il metatroco situato dietro la bocca e il paratroco in posizione perianale),
- un'organizzazione nervosa complessa munita di organi sensoriali specifici (per esempio la presenza di statocisti nella trocofora di *Arenicola*),
- una muscolatura di origine mesenchimatica nella parte episferica.

Sulla faccia ventrale e tra le due bande ciliate del pro- e metatroco si apre l'apertura orale che prosegue verso l'interno con il tubo digerente. Questo presenta un rigonfiamento a livello dello stomaco e da una parte e dall'altra della sua parte posteriore sono accolte due bande mesodermiche aventi quindi una localizzazione

esclusivamente iposferica. Inoltre si differenzia un apparato escretore larvale sotto forma, salvo eccezioni, di un solo paio di protonefridi, che si aprono all'esterno sulla faccia latero-ventrale. Infine il ganglio nervoso situato sotto la piastra sincipitale è collegato mediante 4 paia di cordoni nervosi ad un anello nervoso equatoriale disposto sotto il prototroco.

Lo stadio larvale di trocofora ha breve durata in *Arenicola*. Rapidamente ha luogo la metamorfosi durante la quale si osservano processi di regressione con scomparsa delle strutture larvali provvisorie (trochi, strutture sensoriali, muscolatura...), un allungamento progressivo del corpo, la realizzazione di una organizzazione metamerica nel tronco, alla quale è associata la segmentazione del materiale mesodermico. In rapporto alla modalità di vita sedentaria tipica di *Arenicola* la metamerizzazione sarà di tipo eteronomo e il processo di cefalizzazione sarà fortemente ridotto.

## Sviluppo di un Insetto: *Drosophila melanogaster*

Se esiste una specie animale che ha suscitato da circa un secolo un'attenzione costante da parte dei biologi, divenendo un modello di elezione per lo studio dei meccanismi di base degli organismi viventi, questa è certamente *Drosophila*. Infatti, il moscerino dell'aceto grazie alla sua facilità di allevamento, al suo ciclo vitale relativamente breve (2-3 settimane) e alla sua grande variabilità genetica, ha costituito un oggetto di studio privilegiato per comprendere le leggi dell'eredità. Nel corso di questi ultimi 20 anni, il campo d'interesse degli studi su *Drosophila* si è ulteriormente esteso nella misura in cui questa specie si è rivelata adatta a fornire delle risposte riguardanti la programmazione genetica dello sviluppo.

In questo contesto, la necessità di conoscere con precisione tutti gli aspetti dello sviluppo, ed in particolare le modificazioni che hanno luogo sul piano anatomico e morfologico durante le fasi dell'embriogenesi, appare indispensabile. Associato all'utilizzazione delle metodiche fornite dalla Biologia molecolare, l'apporto dell'Embriologia descrittiva ha consentito di rivelare progressivamente dove, quando e come certi geni agiscono con il ruolo di protagonisti specifici nella regolazione dei meccanismi dello sviluppo.

### 4.1 L'uovo indiviso

Nel corso dell'ovogenesi, in seno all'organismo materno, ha luogo la produzione di vari costituenti molecolari, che consentiranno l'accumulo di altrettante sostanze di riserva necessarie per il futuro embrione. Le 15 cellule nutritive risultanti dall'evoluzione delle cellule sorelle del futuro ovocita, e che restano in comunicazione con quest'ultimo grazie a ponti citoplasmatici, forniranno una parte rilevante di prodotti materni, in particolare sotto forma di particelle ribonucleoproteiche nelle quali sono associati numerosi RNA messaggeri. Un contributo più tardivo è fornito dalle cellule follicolari ovariche. Queste si comportano inoltre da intermediari nell'approvvigionamento del tuorlo dell'ovocita, i cui costituenti molecolari sono elaborati dalle cellule dei corpi grassi. Nel complesso la vitellogenesi, che si effettua all'interno di ovaroli di tipo meroistico politrofico, porta alla formazione di un uovo voluminoso di forma ovale molto ricco di riserve. Questo uovo è detto di tipo centrolecitico data la

distribuzione soprattutto centrale delle riserve di tuorlo (Fig. 4.1a). Queste ultime sono distribuite tra due strati di citoplasma chiaro, uno dei quali, il **periplasma**, è disposto perifericamente al di sotto della membrana plasmatica, mentre l'altro, l'**ooplasma**, è disposto intorno al nucleo. Una sottile membrana vitellina è accollata alla membrana plasmatica, ed essa stessa aderisce verso l'esterno ad uno spesso strato protettivo elaborato dalle cellule follicolari, il **corion**. Quest'ultimo è perforato ad una delle sue estremità da un sottile canale, il **micropilo**, attraverso il quale penetrano gli spermatozoi al momento della fecondazione. La posizione di questa apertura apicale indica la futura regione anteriore dell'embrione. In posizione opposta, nel citoplasma del polo posteriore, si trova una regione particolare indicata con il nome di **plasma polare** o **oosoma**, dove si trovano concentrati dei componenti che hanno un'importanza fondamentale nella determinazione della linea germinale (vedi di seguito).

L'ovogenesi è bloccata nell'ovario allo stadio di metafase della prima divisione meiotica. Questo blocco è rimosso al momento dell'ovulazione. L'uovo è fecondato quando la prima divisione meiotica non è ancora terminata e corrisponde quindi ad un ovocita I.

Subito dopo la fecondazione l'uovo va incontro ad uno sviluppo molto rapido, e l'embriogenesi si completa in meno di 24 ore, a 25°C (Tabella 4.1).

### 4.2 La segmentazione

Questa prima fase dell'embriogenesi presenta delle caratteristiche peculiari. Infatti, si osserva che in un primo tempo, il nucleo zigotico si divide attivamente e dà origine a nuclei figli sparsi all'interno della massa di tuorlo centrale. Queste cariocinesi successive si effettuano rapidamente in modo sincrono (ogni 9-10 minuti circa) durante i primi 7 cicli. Nel corso dell'8° ciclo di segmentazione i nuclei, ciascuno circondato da un sottile anello di citoplasma chiaro (**energidi**), iniziano a migrare in direzione della periferia dell'uovo (Fig. 4.1b). Si forma così un **blastoderma sinciziale**. I primi nuclei che raggiungono il periplasma sono quelli della regione polare posteriore. Questi nuclei sono circondati dal plasma polare e formano in un primo tempo delle protuberanze verso

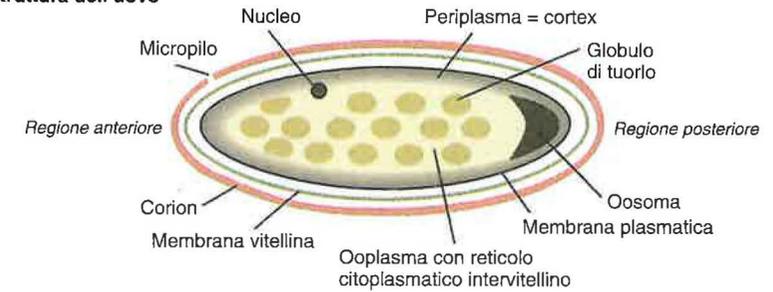
Tab. 4.1: Cronologia dello sviluppo di *Drosophila melanogaster* (a 25°C)

TEMPI	TAPPE DELLO SVILUPPO	STADIO
0-15 min	Fusione dei pronuclei	1
15-70 min	Cicli mitotici da 1 a 9	2
70-90 min	Formazione delle cellule polari	3
90-130 min	Blastoderma sinciziale, cicli mitotici 10-13	4
130-180 min	Cellularizzazione del blastoderma	5
180-195 min	Inizio della gastrulazione, invaginazione del mesoderma e dell'endoderma posteriore	6
195-200 min	Allungamento dell'embrione	7
200-230 min	Allungamento dell'embrione, inizio delle mitosi post-segmentazione	8
230-260 min	Allungamento dell'embrione	9
260-320 min	Inizio dell'invaginazione dello stomodeo	10
320-440 min	Evoluzione del mesoderma e migrazione dei neuroblasti	11
440-560 min	Inizio della retrazione dell'embrione, formazione dei segmenti	12
21-22 ore	Schiusa	16

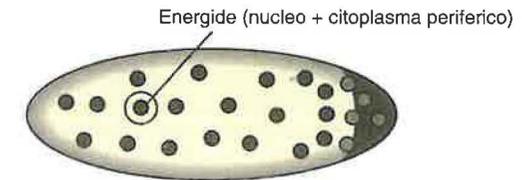
(da Campos-Ortega e Hartenstein, 1985)

Fig. 4.1: L'uovo e la segmentazione

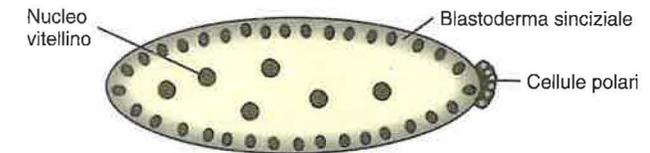
## a) Struttura dell'uovo



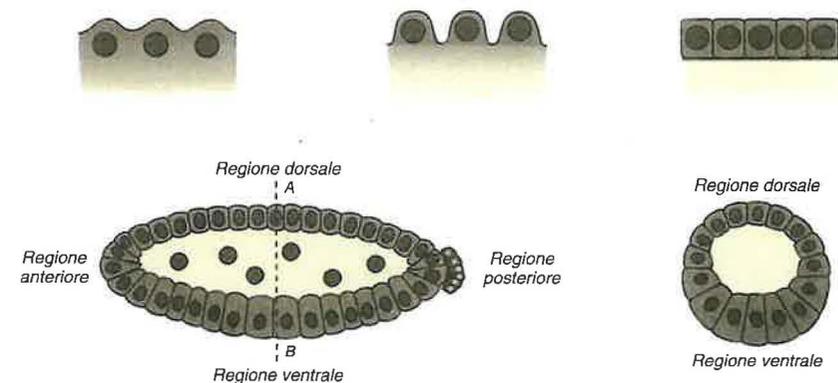
## b) Moltiplicazione nucleare intravitellina



## c) Fase di migrazione



## d) Evoluzione del blastoderma periferico



Blastula in sezione sagittale

Blastula in sezione trasversale a livello AB

l'esterno. Durante il 10° ciclo (stadio a 512 nuclei) essi danno origine ad una trentina di cellule polari distinte, relativamente voluminose, precursori delle future cellule germinali. Alla fine del 10° ciclo, i nuclei figli sono tutti distribuiti regolarmente nel periplasma eccetto 26 nuclei che, non essendo migrati, rimangono nella massa di tuorlo. Sono i nuclei vitellini che daranno origine ai vitellofagi, cellule poliploidi, il cui ruolo esatto nella utilizzazione delle riserve di tuorlo è ancora in discussione (Fig. 4.1c). Gli ultimi due cicli si effettuano ancora in assenza di citodieresi e si svolgono in modo parasincrono, secondo onde mitotiche che iniziano in corrispondenza di ciascuna delle due estremità dell'embrione e si propagano poi verso la regione centrale di questo. Soltanto a partire dal 13° ciclo di divisione si formeranno, per invaginazione della membrana plasmatica, dei setti membranosi perpendicolari alla superficie dell'uovo, che separeranno così i nuclei gli uni dagli altri. Quando i setti hanno raggiunto il confine con il tuorlo, la compartimentazione dei nuclei è completata, e resta soltanto un sottile ponte citoplasmatico tra le cellule da poco separate e la massa del tuorlo sottostante (Fig. 4.1d). 3 ore e 30 minuti dopo la fecondazione, allorché la cellularizzazione è stata completata, l'embrione comprende circa 5 000-6 000 cellule, che formano un blastoderma cellulare. La segmentazione è considerata terminata a questo stadio dello sviluppo. Essa è di tipo meroblastico superficiale (o periferico) e porta alla formazione di una periblastula.

### 4.3 La gastrulazione

La mappa dei territori presuntivi individuata nell'embrione alla fine della segmentazione (Fig. 4.2a) mostra come in posizione ventrale si situino i territori mesodermici che si presentano come una zona del blastoderma ispessita per la presenza di cellule alte e voluminose. Da una parte e dall'altra di questa zona medio-ventrale si estendono lateralmente e dorso-lateralmente i territori ecto-neurodermici. Infine, in posizione anteriore e posteriore, si trovano i territori ectodermici ed endodermici che parteciperanno direttamente alla formazione del futuro tubo digerente. Questi territori organogenetici del futuro embrione costituiscono la banda germinale (a volte indicata con il nome di scudo embrionale), che nel caso di *Drosophila* occupa la quasi totalità della superficie ventrale dell'embrione, ma in altri Insetti può avere un'estensione variabile.

La gastrulazione in *Drosophila* è caratterizzata dal verificarsi di due grandi eventi indipendenti l'uno dall'altro che si manifestano con dei movimenti di invaginazione che riguardano essenzialmente da una parte il mesoderma e dall'altra i due territori endodermici. Parallelamente a questi movimenti morfogenetici, si realizza progressivamente un allungamento generale della banda germinale, che porta quest'ultima a ripiegare la sua regione posteriore in posizione dorsale.

Quando la cellularizzazione nella regione dorsale è ancora incompleta, i territori blastodermici ventrali, costituiti da cellule completamente formate, si approfondano rapidamente per tutta la lunghezza dell'embrione, causando così in posizione mediana-ventrale la formazione di un solco ventrale (Fig. 4.2b e 4.3). Questo, richiudendosi, causa l'internalizzazione del materiale mesodermico sotto forma di una struttura tubulare, la quale successivamente darà origine a cellule isolate che si disporranno a formare un monostrato in un primo tempo accollato direttamente all'ectoderma sottostante (Fig. 4.2b).

L'endoderma dà origine all'intestino medio, che è la sola parte assorbente del futuro tubo digerente dell'adulto. Come è stato ricordato precedentemente, il territorio presuntivo dell'endoderma si trova diviso in due zone distinte che subiranno ciascuna, indipendentemente l'una dall'altra, un movimento d'invaginazione. L'invaginazione dell'endoderma posteriore, che darà origine alla parte posteriore dell'intestino medio, si effettua quando questo è localizzato in posizione dorsale a causa del ripiegamento della banda germinale (vedi sopra). Nel corso di questo processo, si realizza anche l'internalizzazione delle cellule polari, che si trovano inizialmente in contiguità con la zona epiteliale corrispondente al territorio endodermico. Al tempo stesso l'ectoderma situato alla periferia della zona d'invaginazione è trascinato dall'approfondamento del materiale endodermico e forma il proctodeo, che darà successivamente origine all'intestino posteriore corrispondente alla parte posteriore ectodermica del tubo digerente.

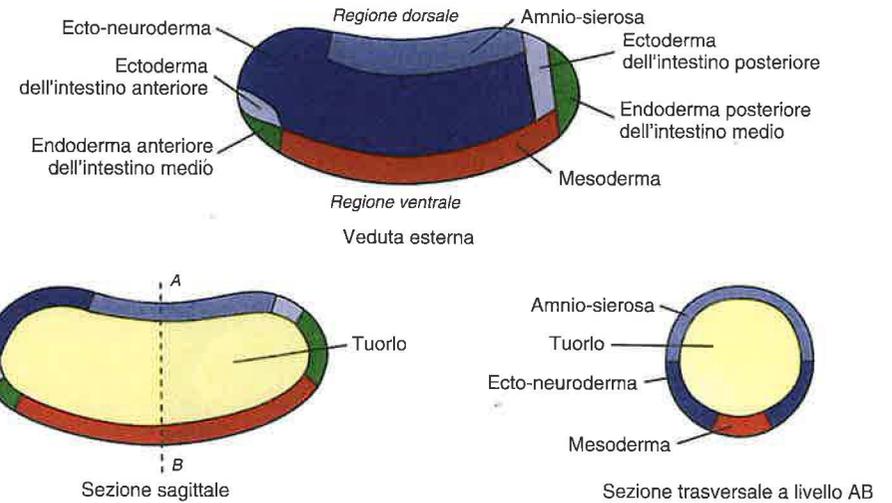
Un movimento d'invaginazione si effettua egualmente a carico dell'endoderma anteriore, anche se più lentamente rispetto a quello della regione posteriore. Esso porta alla formazione di una sorta di imbuto, localizzato ventralmente davanti al solco longitudinale mediano, che corrisponde alla penetrazione del materiale mesodermico (Fig. 4.3). Questo territorio endodermico formerà la parte anteriore del futuro intestino medio. In posizione anteriore a questo territorio, ed in contiguità con esso, è situata una zona ectodermica che costituirà lo stomodeo. Tale zona si invaginerà anch'essa più tardivamente dando origine al futuro intestino anteriore, di natura ectodermica.

Le due formazioni endodermiche invaginate, posteriore ed anteriore, progrediscono in direzione opposta l'una rispetto all'altra, sotto forma di due masse cellulari distese situate in posizione ventro-laterale, da una parte e dall'altra della massa di tuorlo, tra questa ed il foglietto mesodermico (Fig. 4.4).

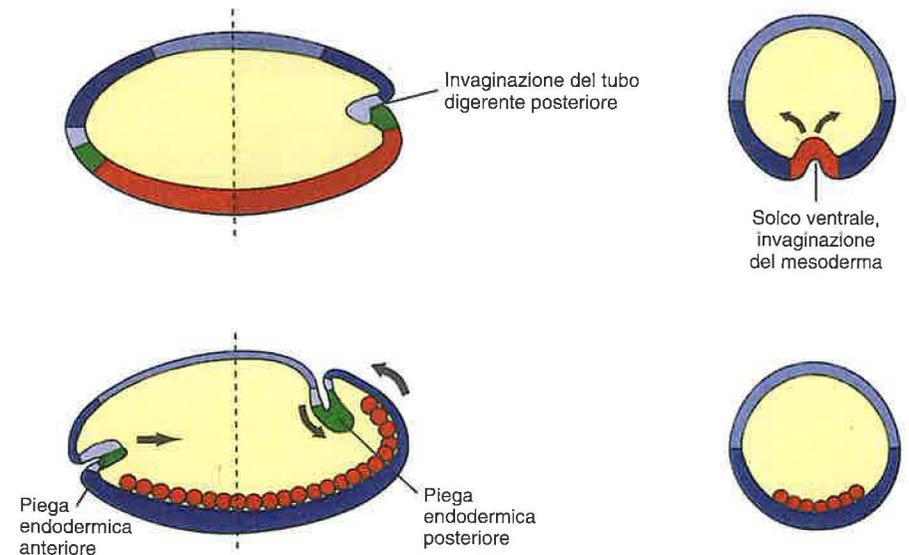
Alcune delle cellule che costituiscono la zona ectodermica medio-ventrale, costituita da territori originariamente adiacenti al materiale mesodermico invaginato, vanno incontro ad un fenomeno di delaminazione e si inseriscono tra l'ectoderma e la soprastante lamina mesodermica. Sono le cellule neuroblastiche che daranno origine alla futura catena nervosa, che si differenzierà succes-

Fig. 4.2: Mappa dei territori presuntivi e gastrulazione

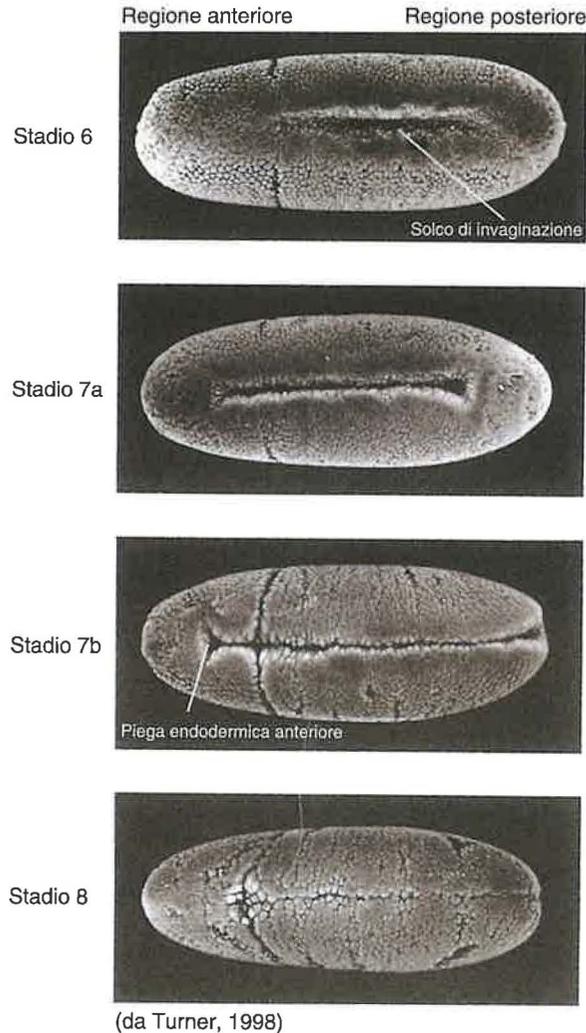
#### a) Mappa dei territori presuntivi



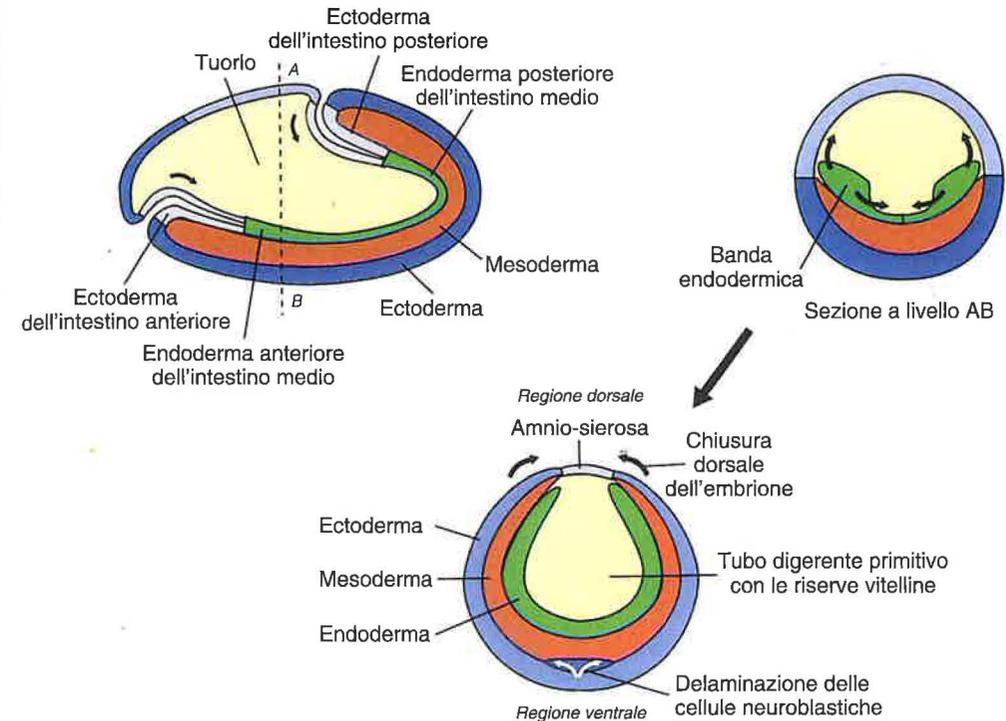
#### b) Gastrulazione



**Fig. 4.3:** Internalizzazione del mesoderma in seguito all'invaginazione delle future cellule mesodermiche. Microfotografie dell'embrione visto dalla faccia ventrale (x 140)



**Fig. 4.4:** Formazione del tubo digerente ed inizio della formazione del sistema nervoso



sivamente in posizione ventrale rispetto al tubo digerente, disposizione questa caratteristica degli iponeuri (Fig. 4.4).

Per quanto riguarda l'epitelio dorsale, di origine ectodermica e che non partecipa direttamente ai territori organogenetici embrionali, esso forma in un primo tempo delle profonde pieghe trasversali che permettono così di assorbire l'allungamento progressivo della banda germinale. Questo epitelio si evolve in un sottile strato cellulare appiattito detto *amnio-sierosa*, che si ripiega contemporaneamente tra la futura regione cefalica e l'estremità posteriore della banda germinale, e sui lati di questa a partire dai suoi due bordi laterali (Fig. 4.5).

#### 4.4 L'organogenesi

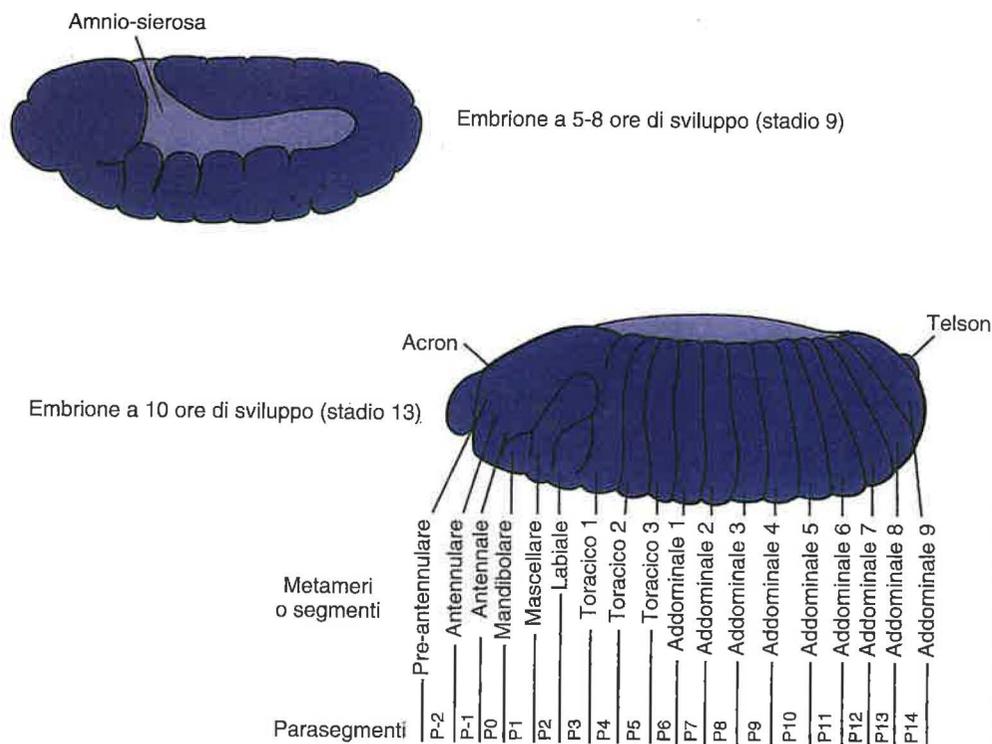
Durante i movimenti responsabili della gastrulazione, si manifestano le premesse dell'organogenesi soprattutto a causa della formazione del sistema nervoso e della comparsa progressiva di una regionalizzazione del corpo.

Le fasi che seguono la separazione dei differenti foglietti embrionali sono caratterizzate da altri movimenti

morfogenetici che permettono di completare la formazione delle strutture embrionali iniziata durante la precedente fase di sviluppo. Così si può osservare una retrazione generale dell'abbozzo embrionale dopo che questo ha subito una fase di estensione massima, consentendo al tempo stesso l'incontro e la continuità delle due parti endodermiche che formeranno l'intestino medio. Inoltre si attua un'espansione latero-dorsale dei foglietti endodermici e mesodermici che si incontrano e si saldano secondo una linea mediana-dorsale. La massa del tuorlo viene ad essere progressivamente inglobata nel lume centrale del tubo digerente in formazione.

Durante la fase di estensione massima dell'embrione, si manifestano i primi segni morfologici della segmentazione del corpo. La metamerizzazione richiede un insieme di processi la cui attuazione spazio-temporale è sotto la dipendenza stretta di geni specifici il cui studio esula dall'ambito degli argomenti riportati in questo trattato. Durante la fase di allungamento massimo (stadio 9, Fig. 4.5), sono visibili delle costrizioni del tegumento che corrispondono ai confini dei *parasegmenti*, suddivisioni transitorie del corpo che comprendono ciascuna la metà posteriore e quella anteriore di due metameri contigui e

Fig. 4.5: L'organogenesi (vedute laterali)



che giocano un ruolo importante nella compartimentazione dell'embrione durante il suo sviluppo. Questi scompaiono a partire dalla fase di retrazione per lasciare il posto, a partire dallo stadio 13, all'espressione morfologica delle suddivisioni segmentali vere e proprie (Fig. 4.5 e 4.6).

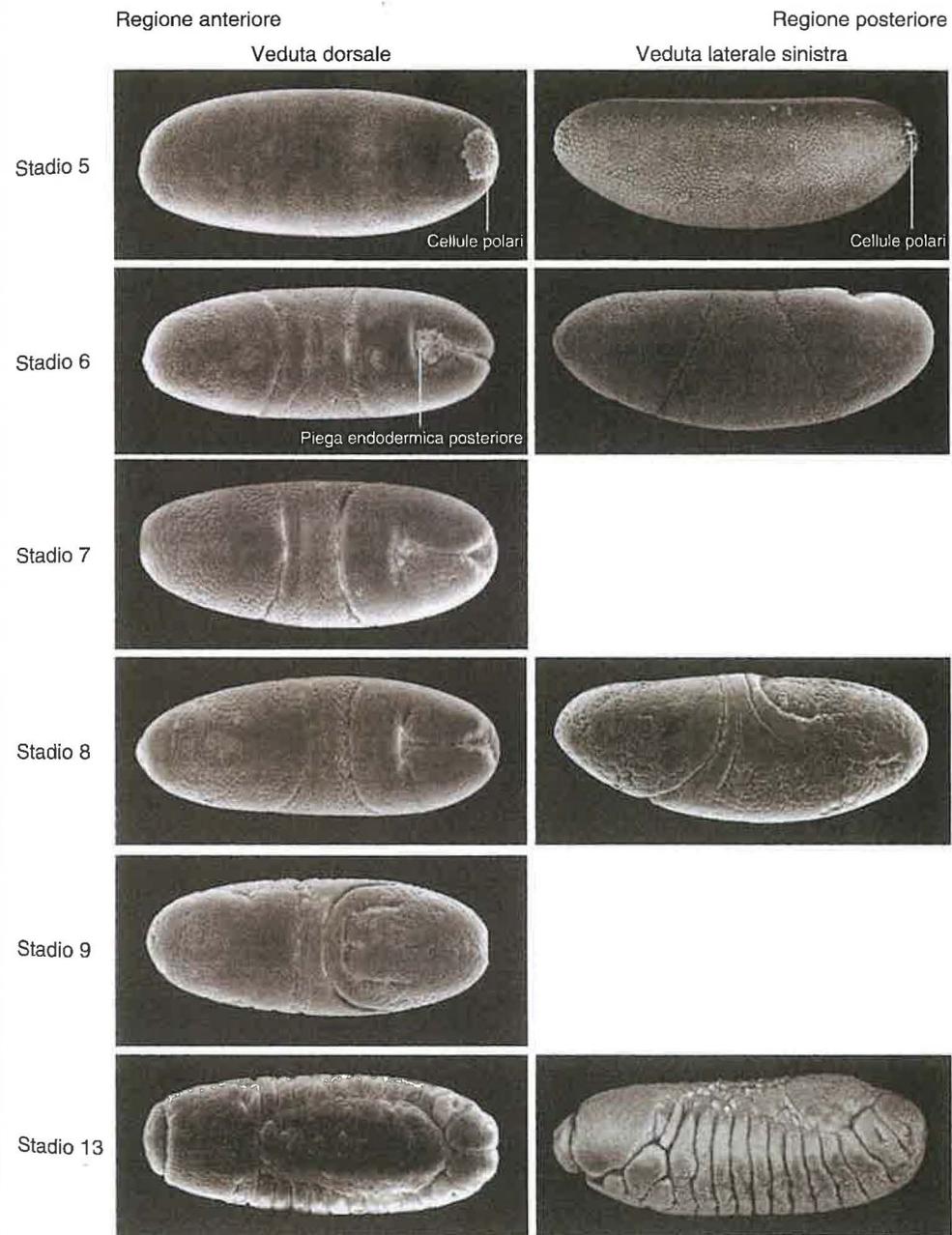
Durante gli ultimi stadi dell'organogenesi hanno luogo processi di fusione di metameri sia a livello addominale che nella regione anteriore dell'embrione dove il capo ha origine dalla fusione dell'acron con 6 o 7 segmenti (numero ancora controverso). Nelle future larve e nell'adulto saranno quindi visibili solo 3 segmenti toracici e 8/9 segmenti addominali provenienti dalla fusione di alcuni metameri che si realizza in modo diverso a seconda del sesso.

Inoltre, durante queste stesse ultime ore dell'embriogenesi si definisce l'organizzazione anatomica dell'embrione in formazione. Così il materiale mesodermico costituisce dei raggruppamenti cellulari a disposizione metamERICA, la cui evoluzione varia a seconda della posizione che occupano lungo il corpo. Essi in particolare

sono all'origine del celomesenchima a partire dal quale si differenziano la muscolatura dei segmenti larvali, il cuore, gli emociti, i corpi grassi etc.

Per quanto riguarda il sistema nervoso, in ciascun segmento i neuroblasti situati all'interno della superficie ventro-laterale (vedi sopra) si raggruppano per formare un paio di gangli collegati tra loro da commessure. Questi gangli sono collegati inoltre mediante cordoni nervosi ai gangli dei metameri adiacenti, formando così una catena nervosa gangliare ventrale. Nella futura regione cefalica, al di sopra dello stomodeo, alcune cellule neuroblastiche si aggregano costituendo così l'abbozzo dei gangli cerebrali. Esse entrano in relazione con due espansioni della catena nervosa ventrale che costituiscono l'abbozzo dell'anello peri-esofageo. A livello dell'acron, corrispondente alla parte più anteriore dell'embrione che non ha valore di metamero (come il telson, portatore dell'ano, all'estremità posteriore), si forma un placode in seguito ad un ispessimento locale dell'epidermide. Questo, dopo aver subito un'invaginazione ed essere venuto in contatto con i gangli cerebrali in formazione, darà origine ai lobi ottici.

Fig. 4.6: Microfotografie (vedute esterne, x 140)



(da Turner, 1998)

Durante questo periodo dell'embriogenesi si differenziano anche altri organi. Così l'apparato escretore si forma sotto forma di tubuli del Malpighi che provengono dalla proliferazione e dal differenziamento di cellule progenitrici di origine ectodermica situate nel punto di giunzione dell'intestino medio e posteriore. Per quanto riguarda la formazione delle gonadi, questa si effettua a livello del 5° segmento addominale, a partire dall'associazione di cellule mesodermiche con le cellule polari che, dopo la loro invaginazione precoce, sono raggruppate in due gruppi di-

stinti. Infine la formazione del sistema respiratorio inizia ad abbozzarsi con la comparsa, nei segmenti posteriori, degli stigmi tracheali di origine ectodermica.

Al completamento dell'embriogenesi, con la schiusa si libera una larva che presenterà le caratteristiche di sviluppo degli Insetti con metamorfosi completa (Insetti olometaboli) con una successione di mute larvali che precedono lo stadio di pupa, seguito dalla muta immaginaria, da cui origina l'adulto.

## Sviluppo di un Echinoderma: *Paracentrotus lividus*

# 5

Gli embrioni degli Echinodermi, ed in particolare quelli dei ricci di mare, hanno rappresentato per lungo tempo, e lo sono tuttora, un eccellente modello per lo studio dei meccanismi che regolano lo sviluppo embrionale. La loro utilizzazione in Embriologia sperimentale ha contribuito largamente alla elaborazione del concetto di gradiente morfogenetico, al quale si deve associare soprattutto il nome di Hörstadius. Più recentemente, questo modello embrionale ha suscitato un rinnovato interesse in quanto, mediante l'utilizzazione delle tecniche e dei concetti attuali della Biologia cellulare e molecolare, ha consentito l'analisi dei meccanismi che sono alla base dei movimenti morfogenetici e delle interazioni intercellulari che hanno luogo durante la gastrulazione.

La cronologia delle tappe principali dello sviluppo del riccio di mare è riportata nella *Tabella 5.1*.

### 5.1 L'uovo indiviso

Il gamete femminile pronto per la fecondazione ha completato la meiosi e conseguentemente sono stati già emessi entrambi i globuli polari. Questi ultimi sono inglobati nell'involucro gelatinoso, e quindi non è possibile osservarli.

L'uovo contiene riserve di tuorlo poco abbondanti e distribuite in modo relativamente omogeneo ed è un tipico uovo oligolecitico.

Le uova non fecondate sono circondate da un involucro gelatinoso e possiedono una membrana vitellina che è in stretto contatto con la membrana plasmatica. Durante la fecondazione si forma la membrana di fecondazione costituita dalla membrana vitellina alla quale si uniscono dei costituenti molecolari che provengono dai granuli corticali. Il contenuto di questi ultimi è stato liberato nello spazio perivitellino in seguito alla fusione dei granuli con la membrana plasmatica dell'uovo. Inoltre, in questa specie, in seguito alla fecondazione, si manifestano dei rimaneggiamenti citoplasmatici come dimostra la ridistribuzione di pigmenti. Questi, ampiamente distribuiti nell'emisfero vegetativo, si concentrano sotto forma di un anello pigmentato arancione situato in posizione subequatoriale, in modo da lasciare una piccola area priva di pigmenti intorno al polo vegetativo.

### 5.2 La segmentazione

#### 5.2.1 Le tappe cronologiche

La segmentazione è totale e radiale e diviene diseguale a partire dal 4° ciclo di divisione.

I primi due piani di segmentazione sono meridiani e perpendicolari tra loro, dando origine a 4 blastomeri di uguale grandezza. Il terzo piano è equatoriale e si formano 8 blastomeri uguali tra loro, 4 animali e 4 vegetativi. Il materiale dell'anello pigmentato segrega in questi ultimi.

Il 4° ciclo di segmentazione, come conseguenza della divisione delle cellule dell'emisfero animale mediante piani di segmentazione meridiani, porta alla formazione di 8 blastomeri animali uguali, indicati con il termine di mesomeri. Nell'emisfero vegetativo, invece, questo ciclo di divisione consiste di divisioni latitudinali molto ineguali che portano alla formazione di 4 grandi blastomeri contenenti il materiale pigmentato, i macromeri, e di 4 piccole cellule situate al polo vegetativo, i micromeri.

Durante il 5° ciclo di divisione, i piani di segmentazione che si formano in ciascuno dei due emisferi sono invertiti rispetto a quelli del ciclo precedente. Infatti gli 8 mesomeri animali si dividono secondo un piano latitudinale e danno origine a 2 strati sovrapposti di cellule di grandezza simile. Utilizzando la terminologia di Hörstadius, gli 8 mesomeri più polari sono denominati an1, e sono situati sopra una corona di altri 8 blastomeri animali, an2. Nell'emisfero vegetativo, i 4 macromeri si dividono secondo piani meridiani ed originano 8 macromeri. Per quanto riguarda i 4 micromeri, questi si dividono ugualmente e formano al polo vegetativo una popolazione di 8 micromeri.

L'embrione, costituito da 32 blastomeri, va incontro al 6° ciclo di divisione che è caratterizzato dalla comparsa di due sottopopolazioni di macromeri sovrapposti, veg1 e veg2. Questi si formano al momento della divisione degli 8 macromeri iniziali grazie ad un piano di segmentazione latitudinale. Così lo stadio di 64 cellule, derivato dal 6° ciclo, corrisponde ad un embrione che presenta una zonazione latitudinale dovuta alla presenza di 5 popolazioni di blastomeri che sono denominate rispettivamente, in successione dal polo animale verso il polo

Tab. 5.1: Cronologia dello sviluppo di *Paracentrotus lividus* (a 25°C)

TEMPI (ore)	STADI DI SVILUPPO
0 h	Fecondazione
1 h	2 blastomeri
2 h	4 blastomeri
3 h	8 blastomeri
4-5 h	Morula (32/64 blastomeri)
6 h	Blastula
10 h	Schiusa: blastula natante
12 h	Blastula con mesenchima primario (inizio della gastrulazione)
24 h	Gastrula con mesenchima secondario
	Organogenesi: giovane larva
48 h	Larva pluteo

(da Giudice, 1973)

vegetativo, an1 (16 cellule), an2 (16 cellule), veg1 (8 cellule), veg2 (8 cellule) e micromeri (16 cellule).

L'insieme di queste trasformazioni è illustrato nella Figura 5.1a dove i disegni schematici corrispondono ad alcuni degli stadi di sviluppo riportati nella tavola di microfotografie di pagina 57 (Fig. 5.2).

Al 7° ciclo di segmentazione, tutte le cellule si dividono in modo meridiano e danno così un embrione di 128 cellule. Durante i cicli successivi si instaura progressivamente un asincronismo nel ritmo delle divisioni, e soltanto qualche limitato territorio cellulare mantiene in modo transitorio un certo sincronismo delle divisioni cellulari. Questo cambiamento si accompagna con una riduzione graduale delle differenze di grandezza tra i blastomeri.

Dallo stadio di 8 blastomeri all'interno dell'embrione comincia ad essere delimitata una cavità, il **blastocele**, mentre le cellule acquisiscono parallelamente un'organizzazione di tipo epiteliale. Le cellule disposte in monostato sviluppano una lamina basale in corrispondenza del loro versante basale volto verso il blastocele. Verso l'esterno, sul versante apicale delle cellule compaiono dei microvilli che sono poi sostituiti, nella blastula media, dalla formazione di ciglia. I movimenti dell'embrione dovuti al battito ciliare, come anche la liberazione di enzimi nello spazio perivitellino, provocano la rottura degli involucri protettivi e liberano così, una **blastula sferica ciliata**, capace di nuotare liberamente nel mezzo circostante.

### 5.2.2 I territori presuntivi

La mappa dei territori presuntivi è stata inizialmente costruita da Hörstadius grazie all'iniezione in determinati blastomeri, a partire dallo stadio di 32/64 cellule, di coloranti vitali quali per esempio il blu Nilo. Mediante questa tecnica sono stati attribuiti i destini specifici a ciascuno dei 5 gruppi cellulari presenti allo stadio di 64 cellule riportati sopra. An1: ectoderma del polo animale; an2: ectoderma equatoriale; veg1: ectoderma dell'emisfero vegetativo; veg2: endo-mesoderma che originerà l'archenteron ed il mesenchima secondario; micromeri: mesenchima primario responsabile delle strutture scheletriche larvali. Più recentemente è stata attuata una ridefinizione dei destini di questi diversi gruppi di cellule, tenendo conto della polarità dorso-ventrale che si manifesta nell'embrione durante la gastrulazione. Così si è stabilito che an1, an2 e veg1 danno origine all'ectoderma aborale (dorsale) ed orale (ventrale). Quest'ultimo tipo di territorio ectodermico dà origine all'epitelio della regione orale ed ad una banda ciliata situata a livello del confine tra le 2 zone ectodermiche. Veg2 darà l'archenteron e i suoi derivati. Per quanto riguarda i micromeri, una sotto-popolazione più numerosa dà origine al mesenchima primario, mentre una frazione cellulare più piccola prende parte alla formazione delle vescicole celomatiche. L'insieme di queste osservazioni è illustrato nella Figura 5.1b.

## 5.3 La gastrulazione

Proprio prima che si manifestino i movimenti morfogenetici caratteristici dell'inizio della gastrulazione, l'embrione, costituito da circa un migliaio di cellule, subisce un brusco rallentamento del ritmo delle divisioni e mostra a ciascuno dei suoi poli una evidente trasformazione. La comparsa di un ciuffo ciliare apicale al polo animale si accompagna infatti ad un appiattimento e ad un ispessimento della regione del polo vegetativo che costituisce ora la cosiddetta piastra vegetativa.

Il primo evento osservato successivamente consiste nella migrazione, all'interno del blastocele, della maggior parte delle cellule discendenti dai micromeri. Queste cellule formano il mesenchima primario che successivamente provvederà ad elaborare le spicole, elementi scheletrici larvali. Dalla piastra vegetativa si distaccano anche in un secondo tempo alcune cellule che daranno origine a cellule pigmentate.

La gastrulazione continua con un movimento di invaginazione (o embolia) che riguarda le restanti cellule della piastra vegetativa che comprendono essenzialmente il futuro materiale endo-mesodermico originato da veg2 ed inoltre un piccolo numero di derivati dei micromeri che non sono immigrati nel blastocele. Questa invaginazione a dito di guanto causa la formazione di un tubo corrispondente all'**archenteron**, un'estremità del quale è a fondo cieco mentre l'altra si apre all'esterno mediante un **blastoporo**, che formerà il futuro ano (Fig. 5.3). Più tardivamente, la parete della sommità dell'archenteron formerà delle gemme e le cellule coinvolte in questo fenomeno, denominate cellule del mesenchima secondario, si staccheranno e formeranno nel blastocele due vescicole celomatiche dalle quali avranno origine i derivati mesodermici. A questo stadio di sviluppo, la gastrulazione può essere considerata in via di completamento presentando l'embrione 3 foglietti cellulari concentrici, uno esterno, l'ectoderma, uno interno corrispondente all'archenteron ed uno non continuo, situato topologicamente tra i due foglietti precedenti, e costituito dalle cellule del mesenchima primario e secondario.

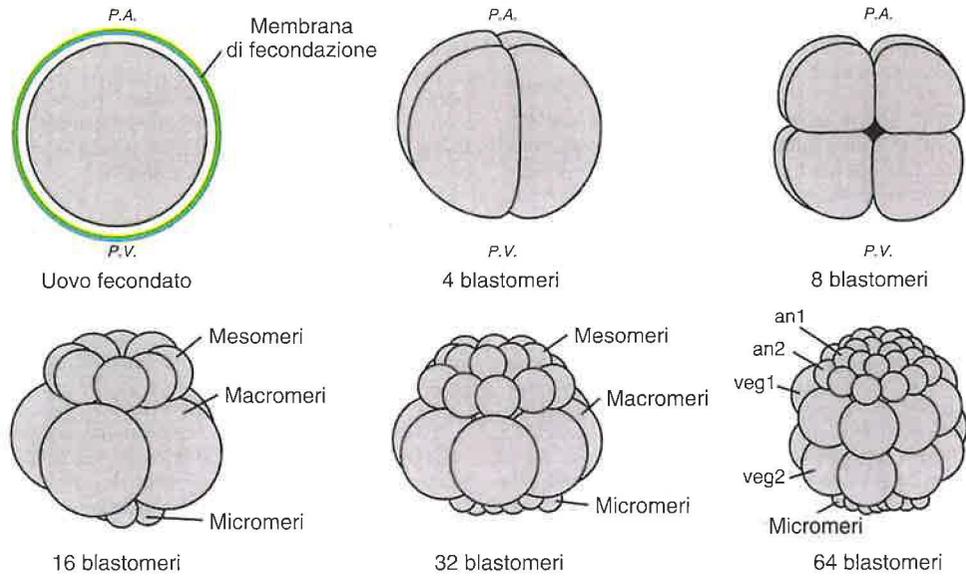
## 5.4 La formazione della larva pluteo

In una fase avanzata della gastrulazione, mentre si liberano le cellule del mesenchima secondario, si manifestano nell'embrione i primi segni visibili dell'acquisizione progressiva di una simmetria bilaterale.

Nella zona laterale che diventerà la regione ventrale della larva, compare un appiattimento in corrispondenza del quale si forma in seguito una depressione detta **depressione stomodeale**. A livello di quest'ultima si aprirà l'apertura orale, che è quindi situata nella zona dove l'estremità dell'archenteron, incurvandosi verso la faccia

Fig. 5.1: Segmentazione e territori presuntivi

a) Segmentazione (vedute laterali)



b) Mappa dei territori presuntivi

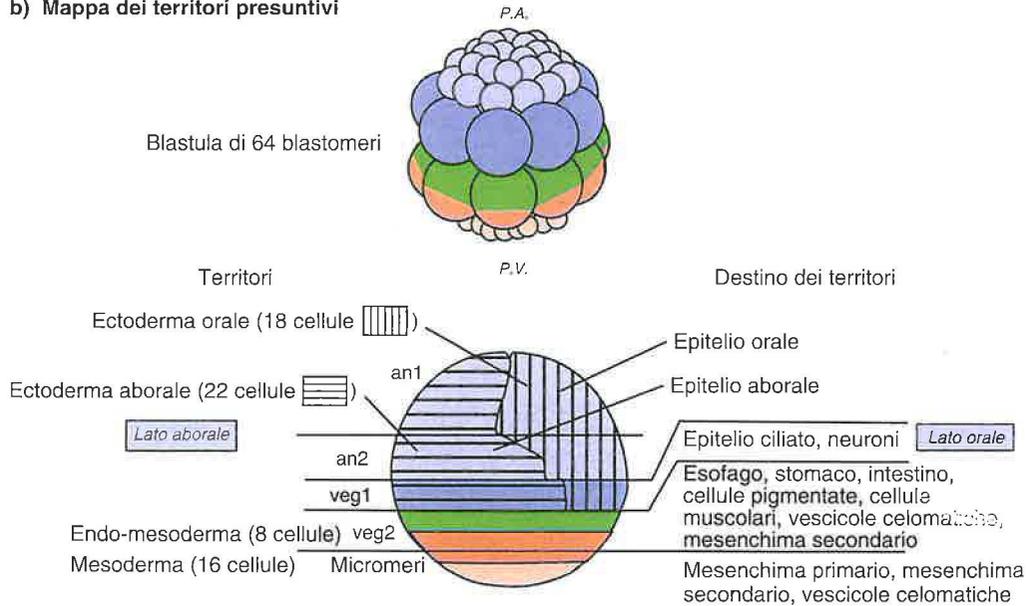


Fig. 5.2: Microfotografie della segmentazione (x 375)

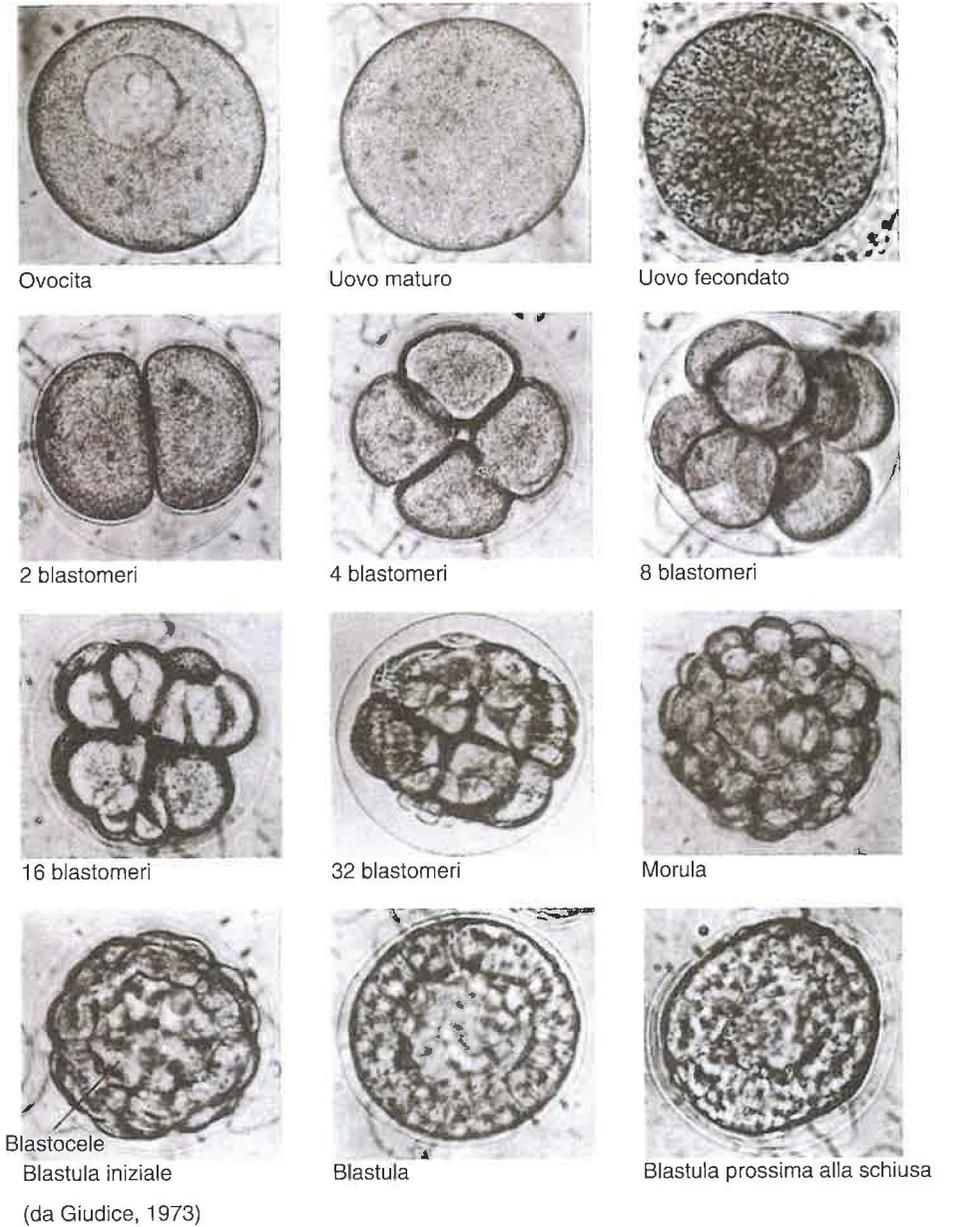
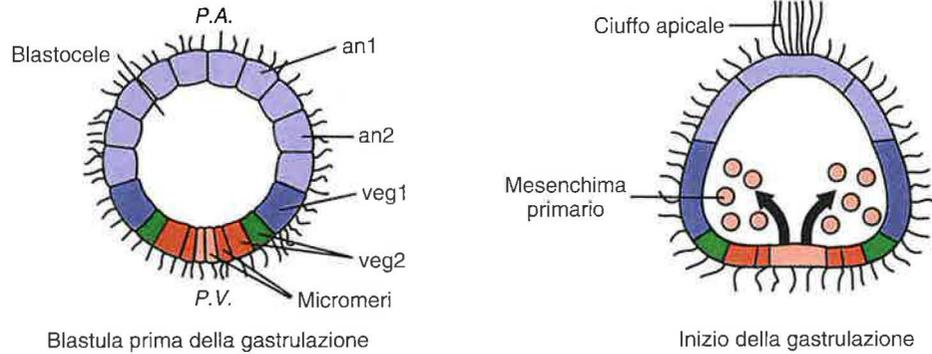


Fig. 5.3: Gastrulazione (sezioni meridiane)



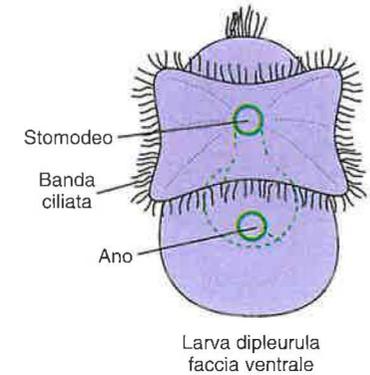
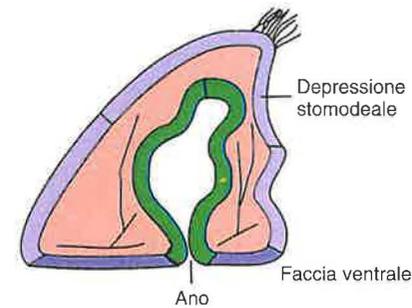
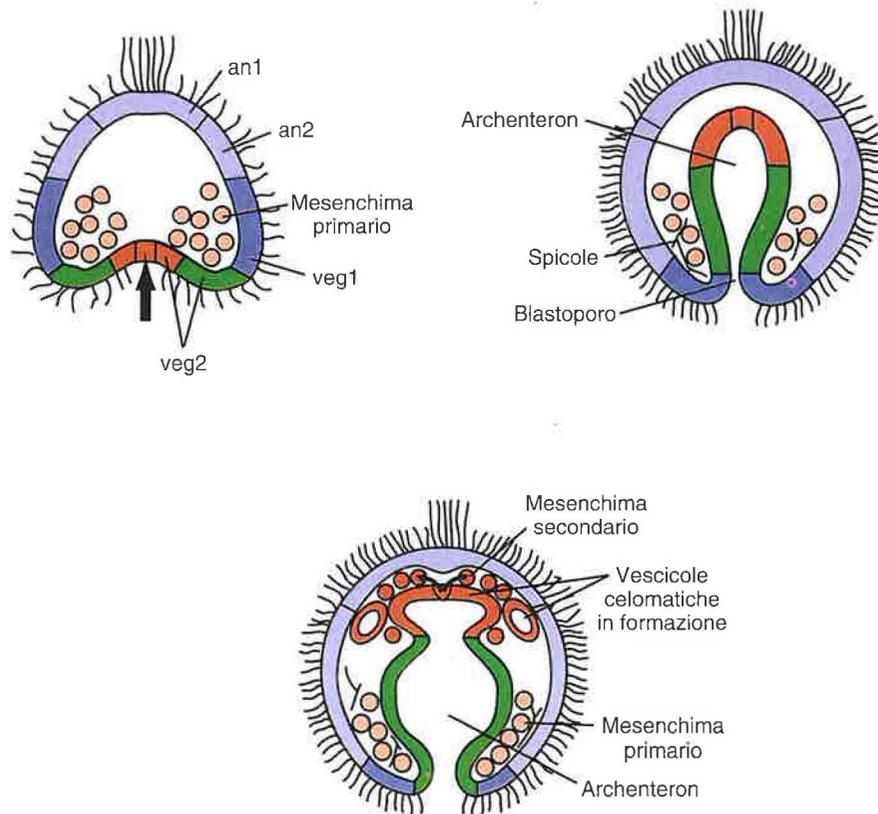
ventrale dell'embrione precedentemente definita, entra in contatto con la faccia interna della depressione stomodeale. Il campo orale ventrale così formato si circonda di una banda ciliata circumorale. L'archenteron si organizza in tre parti: un esofago ed un intestino molto breve e tra questi una parte rigonfiata corrispondente allo stomaco. Per quanto riguarda il blastoporo, questo ha la funzione di ano embrionale ed abbandona la regione del polo vegetativo per aprirsi sulla faccia ventrale.

orifici del tubo digerente. L'apertura orale è posta al centro di una depressione bordata da una corona ciliata circumorale.

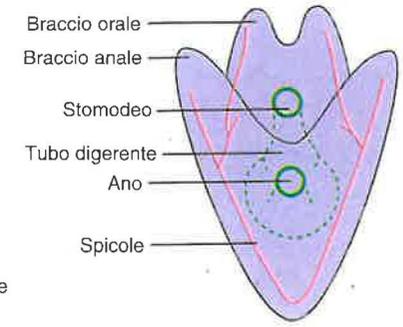
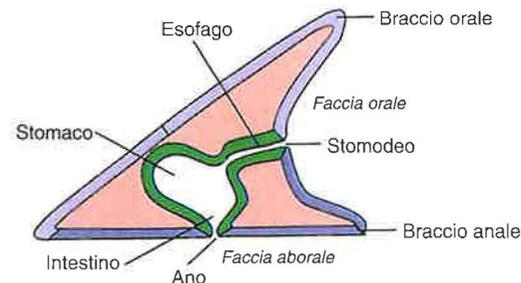
A partire da questa forma larvale si differenzia nei ricci di mare la larva *echinopluteo*, spesso designata semplicemente come *pluteo*. La regione circumorale dà origine a 4 espansioni lobate, i bracci, sostenute da spicole scheletriche calcaree che sono state elaborate da due raggruppamenti di cellule del mesenchima primario, localizzati nel blastocoele in posizione ventro-laterale. La larva così formata, 2-3 giorni dopo la fecondazione, si presenta a forma di una piccola torre Eiffel asimmetrica (Figg. 5.4 e 5.5). La larva *pluteo* conduce vita libera e nuota ruotando su se stessa grazie ai battiti della corona ciliare circumorale.

A questo punto è distinguibile una larva detta *dipleurula* che rappresenta uno stadio transitorio comune a tutti gli Echinodermi, a partire dalla quale si evolvono le forme larvali caratteristiche di questo phylum. Essa si presenta sotto forma di larva ovoidale con una faccia appiattita a livello della quale si aprono i due

Fig. 5.4: Formazione della larva pluteo



Larva pluteo



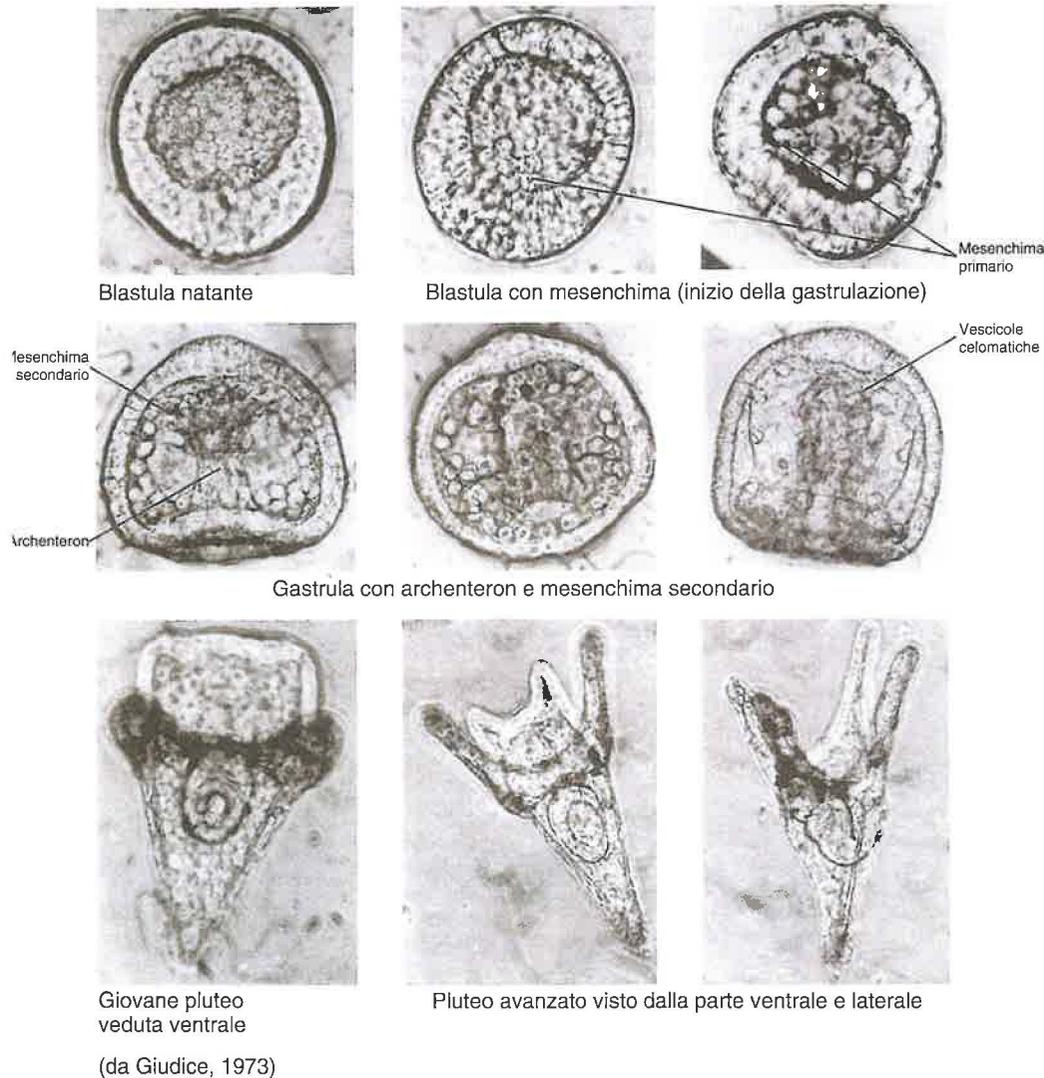
Sezione laterale

Veduta ventrale esterna

La larva subisce in seguito dei profondi rimaneggiamenti caratteristici della specie alla quale essa appartiene, e nel corso dei quali i tessuti derivati dalla vescicola celomatica sinistra giocano un ruolo fondamentale. Essi entreranno infatti a fare parte di una struttura

immaginale dalla quale, al momento della metamorfosi, si formerà il giovane riccio di mare. In quest'ultimo si instaura *ex novo* una simmetria radiale, che ora è di tipo pentamero come tipicamente si osserva nelle forme adulte del phylum degli Echinodermi.

Fig. 5.5: Microfotografie della gastrulazione (x300) e della larva pluteo (x130)



## Sviluppo di un Urocordato: *Halocynthia roretzi*

# 6

Lo studio dello sviluppo degli Urocordati (Tunicati) è attualmente oggetto di un rinnovato interesse, stimolato da una parte dalla loro particolare posizione sistematica e dall'altra dalle nuove possibilità sperimentali offerte dall'utilizzazione delle metodiche della Biologia molecolare. Tuttavia storicamente questo materiale biologico è stato per lungo tempo oggetto di un'attenzione particolare da parte degli embriologi. Infatti, le esperienze pionieristiche effettuate sulle uova di Ascidie dal francese L. Chabry alla fine del XIX secolo, ebbero come conseguenza non solo quella di aprire la via ad un approccio sperimentale in Embriologia ma anche di mettere in evidenza un tipo di sviluppo a quell'epoca sconosciuto, detto a mosaico, caratterizzato dall'esistenza di una determinazione precoce dei territori all'interno dell'uovo fecondato.

La scelta di alcune specie di Urocordati come materiale di studio, quali quelle appartenenti ai generi *Ascidia*, *Ciona*, *Halocynthia*, *Phallusia*, *Styela*, è dovuta ai differenti vantaggi che esse offrono. Oltre ad essere facilmente reperibili, le Ascidie presentano uno sviluppo generalmente veloce, con la schiusa larvale che si effettua in meno di 24 ore dopo la fecondazione. Inoltre, quando la segmentazione è completata, la maggior parte delle specie possiede embrioni con un numero ridotto di cellule (dell'ordine di un centinaio), caratteristica che permette di seguire facilmente il destino dei blastomeri durante le tappe precoci dello sviluppo. Questo tipo di osservazione è facilitato in *Ascidia* o *Phallusia* dalla trasparenza degli embrioni, e può essere ulteriormente facilitato in alcune specie, come *Styela partita*, dall'esistenza di costituenti pigmentati che si ridistribuiscono nei blastomeri in modo specifico durante la segmentazione. La pigmentazione differenziale dei blastomeri può essere utilizzata come un marcatore della determinazione di un territorio embrionale in quanto essa appare associata alla presenza di specifici determinanti citoplasmatici responsabili del destino dei blastomeri. Questa caratteristica, insieme all'uso di metodiche messe a punto per seguire il destino delle cellule, ha permesso di stabilire con esattezza la discendenza delle cellule che costituiscono gli organi larvali.

Inoltre, durante la vita della larva, da una parte l'esistenza transitoria di una notocorda e dall'altra il verificarsi di profondi rimaneggiamenti tissutali al momento della metamorfosi successiva alla fissazione ad un substrato rappresentano dei fenomeni di grande interesse

per la ricerca di base relativa ai campi della filogenesi e del differenziamento.

Infine l'esistenza di un genoma di grandezza ridotta può facilitare, mediante il clonaggio, lo studio dei geni implicati nel processo di sviluppo. Si deve tuttavia sottolineare che la maggior parte delle specie studiate non consente un approccio globale ai problemi dell'ontogenesi. In effetti, le difficoltà incontrate a proposito del loro allevamento in laboratorio e l'esistenza in molti casi di periodi riproduttivi brevi limitano la possibilità di effettuare un'analisi genetica del loro sviluppo.

Il modello considerato in questo capitolo è quello di un'ascidia solitaria, *Halocynthia roretzi*. Questa specie, comune sulle coste del Giappone, presenta il vantaggio di avere uno sviluppo ben documentato soprattutto a causa dell'interesse che ha suscitato in relazione alla determinazione della linea delle cellule muscolari. Infatti, lo studio del differenziamento della muscolatura larvale in questa specie ha consentito l'analisi dei meccanismi molecolari implicati non solo nell'espressione del programma genetico ma anche nelle interazioni cellulari necessarie per il differenziamento.

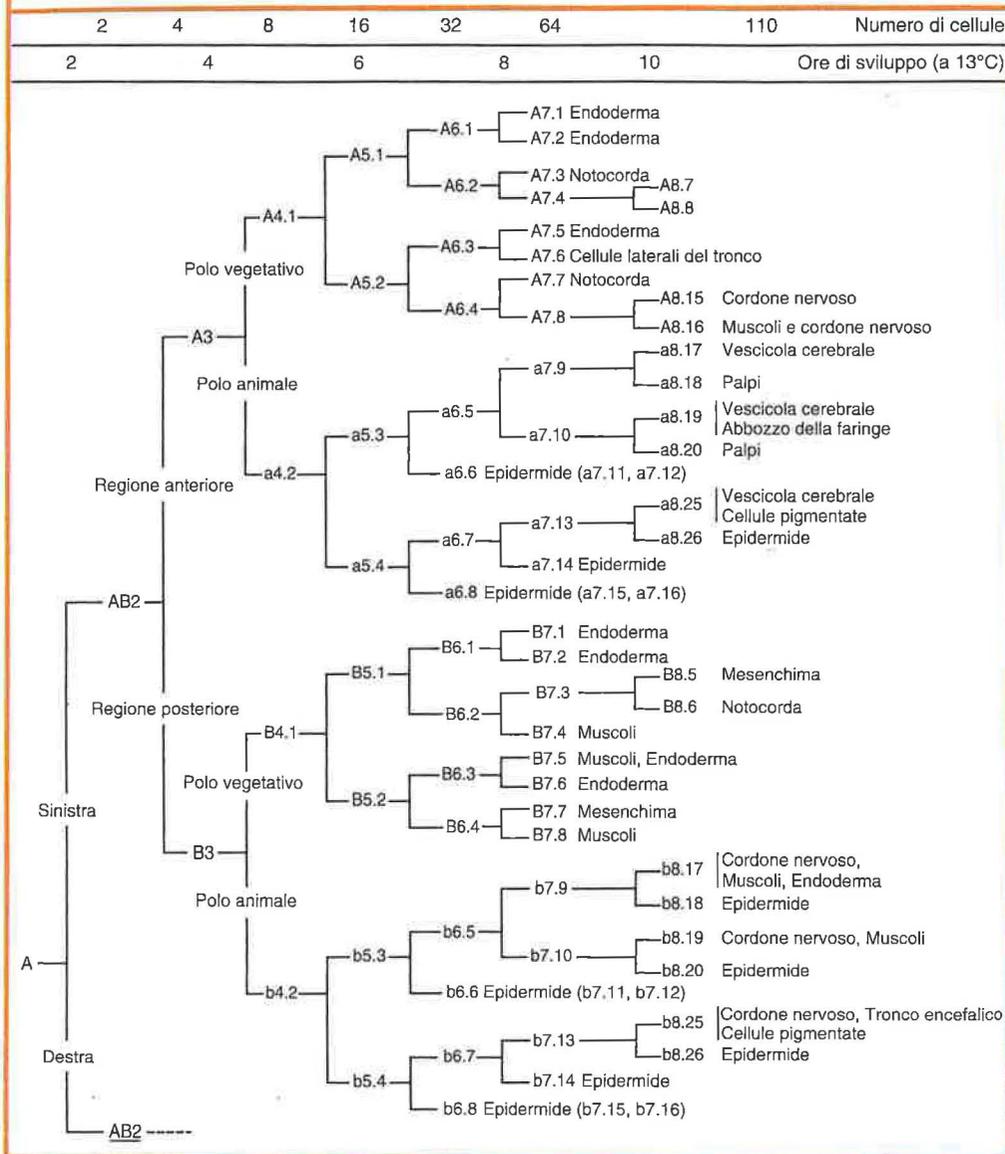
### 6.1 L'uovo indiviso

Le Ascidie sono specie con ermafroditismo simultaneo nelle quali, a partire da un ovotestis costituito originariamente da cellule indifferenziate, si differenziano anatomicamente e funzionalmente sia le strutture ovariche che quelle testicolari.

L'ovogenesi è caratterizzata da una vitellogenesi nel corso della quale si accumulano sostanze di riserva distribuite in modo uniforme nella maggior parte del citoplasma dell'ovocita (a volte designato con il termine di *endoplasma*). L'uovo è di tipo *oligolecitico*. La regione corticale dell'ovocita, di spessore ridotto, è arricchita di organuli ed eventualmente di pigmenti. Questi costituenti citoplasmatici sono immersi in un reticolo di elementi citoscheletrici ricchi di actina situato al di sotto della membrana plasmatica. Questa zona citoplasmatica periferica contiene il *mioplasma*. Il nucleo dell'ovocita (o vescicola germinale), leggermente eccentrico, è situato nella regione che corrisponde al polo animale.

Nel corso dell'ovogenesi si forma intorno ad ogni cellula germinale un "involucro" complesso che persiste dopo

Tab. 6.1: Discendenza cellulare e cronologia dello sviluppo precoce di Halocynthia roretzi



(da Satoh, 1994, modificata)

la deposizione dell'uovo, dopo un'eventuale fecondazione e durante tutte le tappe dell'embriogenesi. Mediante un processo di delaminazione si dispongono intorno all'ovocita due strati cellulari, derivati da un epitelio follicolare primitivo. Il monostrato esterno di cellule follicolari produce sostanze capaci di attrarre gli spermatozoi ed alla sua superficie interna è accollato un corion, struttura acellulare costituita di glicoproteine secrete dalle cellule follicolari stesse. Lo strato cellulare interno è discontinuo ed è costituito da cellule testali (o cellule perivitelline) aderenti alla membrana plasmatica dell'ovocita (Fig. 6.1a). Queste ultime interverranno con le loro secrezioni nella formazione della pinna della coda costituita a partire dallo strato esterno della tunica della larva (vedi di seguito).

Al momento della deposizione dell'uovo il corion si ritrae e ciò determina la comparsa di uno spazio perivitellino. Questo si allargherà in seguito alla fecondazione e le cellule testali vi si disporranno liberamente con movimenti ameboidi (Fig. 6.1a).

L'uovo di *H. roretzi* è di taglia relativamente piccola (circa 250 µm), translucido e leggermente colorato in giallo\*. Esso corrisponde ad un ovocita I bloccato in metafase della prima divisione meiotica. La penetrazione dello spermatozoo al momento della fecondazione provoca non soltanto il completamento della meiosi con l'emissione dei globuli polari al polo animale, ma anche profondi rimaneggiamenti nella distribuzione dei costituenti citoplasmatici. La ripartizione finale di questi costituenti causa la determinazione degli assi embrionali ancor prima che si sia realizzata la prima divisione di segmentazione. L'andamento delle ridistribuzioni è ben visibile in alcune specie, quali ad esempio *Styela partita*, a causa di colorazioni diverse dovute alla presenza di pigmenti (es. mioplasma colorato in giallo).

In un primo tempo il mioplasma, sormontato dall'ectoplasma (zona del citoplasma che possiede i determinanti responsabili dei futuri territori ectodermici), si concentra nella regione del polo vegetativo in seguito a contrazioni del sistema di microfilamenti corticali. Il rimanente citoplasma ricco di tuorlo, l'endoplasma, è sospinto verso l'emisfero animale. Una seconda fase di ridistribuzione si manifesta in seguito con lo spostamento della maggior parte del materiale mioplasmico verso una determinata regione dell'uovo. Questo processo sarà sotto l'influenza del sistema di microtubuli astrali associati al pronucleo maschile. La localizzazione finale del mioplasma, sotto forma di semiluna, corrisponde alla futura regione posteriore dell'embrione (Fig. 6.1b, c). Contemporaneamente l'ectoplasma raggiunge l'emisfero animale, causando così lo spostamento dell'endoplasma verso l'opposto emisfero vegetativo. È durante questi estesi fenomeni

di segregazione a carico del materiale citoplasmatico che ha luogo la fusione dei pronuclei maschile e femminile.

Al termine di questi rimaneggiamenti, si è instaurata una simmetria bilaterale, con un asse antero-posteriore (il territorio occupato dal mioplasma indica la regione posteriore) ed un asse dorso-ventrale che coincide con l'asse animale-vegetativo (dove la regione ventrale è costituita dal polo animale riconoscibile perché in esso è localizzato il punto di emissione dei globuli polari) (Fig. 6.1c). (Per evitare confusione si paragonino questi elementi di simmetria con quelli osservati negli Anfibi - Capitolo 8 - nei quali l'asse polo animale-polo vegetativo corrisponde al futuro asse antero-posteriore).

## 6.2 La segmentazione

L'attuazione di una distribuzione differenziale precoce dei determinanti citoplasmatici ha consentito di tracciare, già a partire dallo zigote non ancora diviso, una mappa dei territori che daranno origine ai diversi tessuti della futura larva. L'emisfero animale è occupato dall'ectoderma che darà origine all'epidermide ed al sistema nervoso. Il territorio dell'endoderma costituisce la maggior parte dell'emisfero vegetativo e, localizzato tra i 2 territori precedenti in posizione sub-equatoriale, si trova il materiale responsabile della determinazione mesodermica delle cellule (Fig. 6.1c). Durante i primi cicli di divisione di segmentazione, la distribuzione dei determinanti citoplasmatici nelle cellule ha potuto essere seguita grazie all'elaborazione di una nomenclatura cellulare appropriata ed ha consentito di individuare la discendenza cellulare per i tessuti che si differenziano nella larva (Tabella 6.1).

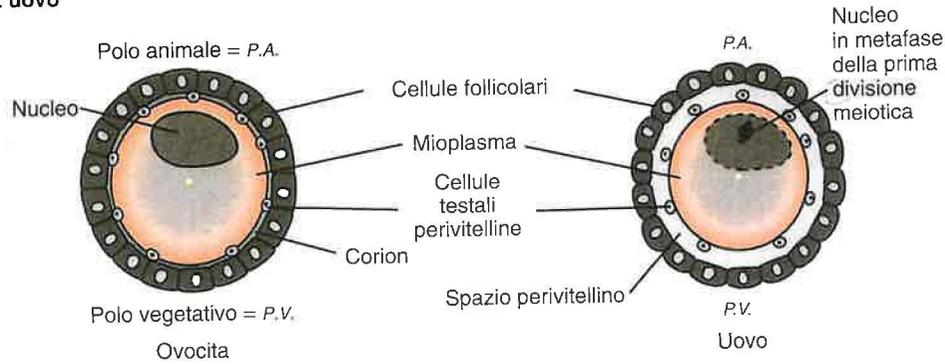
In *H. roretzi*, come nella maggior parte delle specie di Ascidi, la prima divisione di segmentazione si realizza nelle prime ore che seguono la fecondazione (2 ore a 13°C), dopo che i rimaneggiamenti citoplasmatici sono completati. Il primo piano di segmentazione coincide col piano di simmetria bilaterale (PSB). I cicli di divisione successivi portano ad una disposizione simmetrica dei blastomeri da una parte e dall'altra del PSB. Questa disposizione corrisponde ad un tipo particolare di segmentazione definita bilaterale (Fig. 6.2).

Una nomenclatura specifica definita da Conklin (1905) permette l'identificazione dei blastomeri e di seguire la loro discendenza. Essa si basa su un sistema di lettere (A, a, B, b) e di numeri (Tabella 6.1 e Fig. 6.2). L'insieme di queste lettere è utilizzato a partire dal 3° ciclo di divisione. Il tipo di lettera indica la regione anteriore o posteriore (A ed a per i blastomeri anteriori, B e b per i blastomeri posteriori). Il carattere della lettera corrisponde alla posizione della cellula lungo l'asse dorso-ventrale. (A e B corrispondono ai blastomeri dell'emisfero vegetativo, cioè della regione dorsale, mentre a e b sono utilizzate per designare i blastomeri dell'emisfero animale e

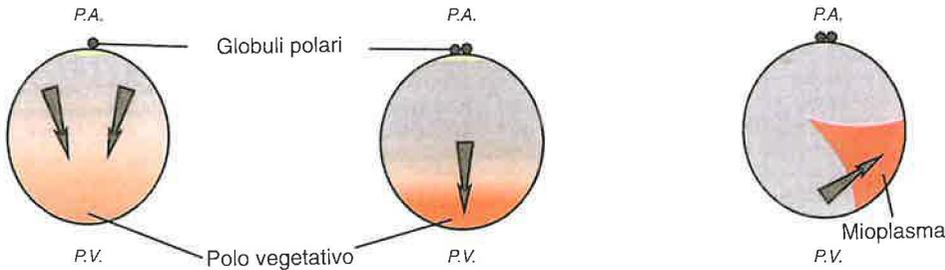
\* Nella Figura 6.1a, è stata scelta per l'uovo una colorazione rosata a causa del destino mesodermico del mioplasma periferico (il mesoderma per convenzione si rappresenta in rosso).

fig. 6.1: L'uovo ed i movimenti citoplasmatici dopo la fecondazione

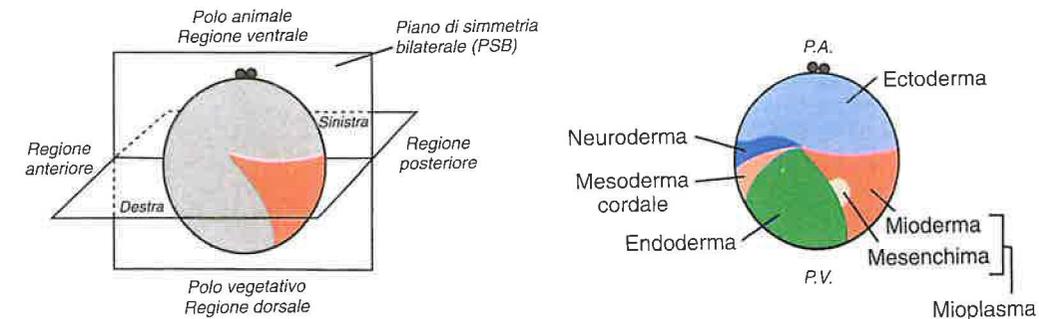
## a) L'uovo



## b) Movimenti del mioplasma



## c) Piano di simmetria bilaterale e mappa dei territori presuntivi nell'uovo fecondato



cioè quelli situati nella regione ventrale). A questo sistema di lettere si aggiunge un sistema di numeri. Un numero posto immediatamente vicino alla lettera indica a quale stadio della segmentazione si è formato il blastomero (1 : zigote, 2 : stadio a 2 blastomeri, 3 : stadio a 4 blastomeri etc.). Un secondo numero separato dal precedente da un punto consente di identificare, per un determinato stadio, ciascun blastomero all'interno del quadrante (vedi di seguito) al quale appartiene. Infine, tenendo conto della simmetria esistente, i blastomeri che occupano la stessa posizione rispetto al PSB sono indicati con la stessa nomenclatura ma, allo scopo di distinguerli tra loro in funzione del lato dove sono situati, i blastomeri appartenenti alla metà destra sono sottolineati. (Esempio: il blastomero a4.2 è il blastomero antero-ventrale destro del quadrante Aa4 allo stadio di 8 blastomeri).

Per convenzione la cellula uovo iniziale è designata con A1. Il primo piano di segmentazione coincide con il PSB. I 2 blastomeri formati sono AB2 a sinistra e AB2 a destra. I territori citoplasmatici presenti nell'uovo indiviso (ecto-endo-e mioplasma) si suddividono in parti uguali tra i primi 2 blastomeri (Figg. 6.2a, 6.3b). La seconda divisione porta alla formazione di 4 blastomeri di grandezza pressoché identica che costituiscono i quadranti di riferimento per la nomenclatura descritta sopra. A3 e A3 costituiscono rispettivamente i quadranti anteriori destro e sinistro, B3 e B3 i quadranti posteriori destro e sinistro. A questo stadio, il mioplasma si trova localizzato esclusivamente nei 2 blastomeri posteriori, B3 e B3 (Fig. 6.2a). Al 3° ciclo di divisione, il piano di segmentazione, perpendicolare rispetto ai 2 precedenti, è equatoriale e gli 8 blastomeri sono distribuiti in numero uguale tra i due emisferi animale e vegetativo (Figg. 6.2b, 6.3d). I 4 blastomeri situati nell'emisfero vegetativo, e cioè la regione dorsale dell'embrione, sono A4.1 e A4.1 nella regione anteriore, B4.1 e B4.1 nella regione posteriore. Secondo la stessa logica di nomenclatura, l'emisfero animale (lato ventrale) comprende i blastomeri a4.2 e a4.2 nella regione anteriore e b4.2, b4.2 nella regione posteriore. A questo stadio, si realizza una segregazione molto evidente delle aree citoplasmatiche (Fig. 6.2b). Il mioplasma che darà origine ai tessuti muscolari e mesenchimatici è concentrato quasi esclusivamente nei blastomeri posteriori dorsali B4.1 e B4.1, mentre l'endoplasma e l'ectoplasma sono distribuiti soprattutto l'uno nei blastomeri vegetativi (dorsali) e l'altro nei blastomeri animali (ventrali). Questa distribuzione differenziale dei territori meso-, endo- ed ectodermici persisterà perfezionandosi progressivamente nel corso dei successivi cicli di divisione. Al 4° ciclo, gli orientamenti dei piani di segmentazione nella regione animale e vegetativa sono differenti (Fig. 6.3e) e a partire dal 5° ciclo di divisione inizia a manifestarsi un asincronismo nelle divisioni cellulari (Figg. 6.2c, 6.3f, g).

La segmentazione propriamente detta è considerata terminata quando l'embrione è costituito da 110 cellule. La blastula così formata non possiede un blastocele e

non è perfettamente sferica a causa di un appiattimento in corrispondenza del polo vegetativo (Fig. 6.3h e Fig. 6.4a). Dopo questo stadio iniziano a manifestarsi i primi movimenti morfogenetici che caratterizzano la gastrulazione.

## 6.3 La gastrulazione

Questa si effettua con movimenti morfogenetici sequenziali riguardanti in modo specifico ciascuno dei territori presuntivi.

La prima tappa consiste in un movimento d'**invaginazione** che riguarda le cellule dell'endoderma presuntivo. Sono soprattutto le cellule situate nella regione del polo vegetativo (A7.1, A7.1 e B7.1, B7.1) le quali, deformandosi, provocano l'inizio del movimento generale di penetrazione delle cellule endodermiche (Fig. 6.4a e Fig. 6.5a, b). Queste, una volta invaginate, effettuano una migrazione verso la regione anteriore al di sotto dello strato cellulare ectodermico. Questa prima fase si conclude con la comparsa di una profonda depressione che si apre verso l'esterno grazie ad un ampio orifizio corrispondente al **blastoporo** (Fig. 6.4b, c). Le cellule mesodermiche formano le labbra del blastoporo e sono distribuite da una parte e dall'altra del PSB. Esse corrispondono in sequenza antero-posteriore ai futuri territori mesodermici della notocorda, del mesenchima e dei muscoli della coda della larva.

In un secondo tempo sono in particolare questi territori mesodermici che vanno incontro ad un movimento di **involuzione**, e cioè a uno scorrimento a livello delle labbra del blastoporo che porterà alla loro penetrazione all'interno dell'embrione. Questo processo ha inizio a partire dalle labbra anteriori del blastoporo e poi prosegue a livello di quelle laterali ed infine di quelle posteriori. Le cellule mesodermiche, una volta invaginate, migrano sulla faccia interna dello strato cellulare ectodermico (Fig. 6.4c).

Quando la penetrazione dell'insieme delle cellule endodermiche e mesodermiche è terminata, la gastrulazione viene completata da un movimento di **epibolia** a carico del materiale cellulare ectodermico. Le cellule dell'ectoderma, si appiattiscono e si estendono secondo una direzione antero-posteriore, costituendo così progressivamente il foglietto di rivestimento esterno dell'embrione (Fig. 6.5d).

## 6.4 L'organogenesi

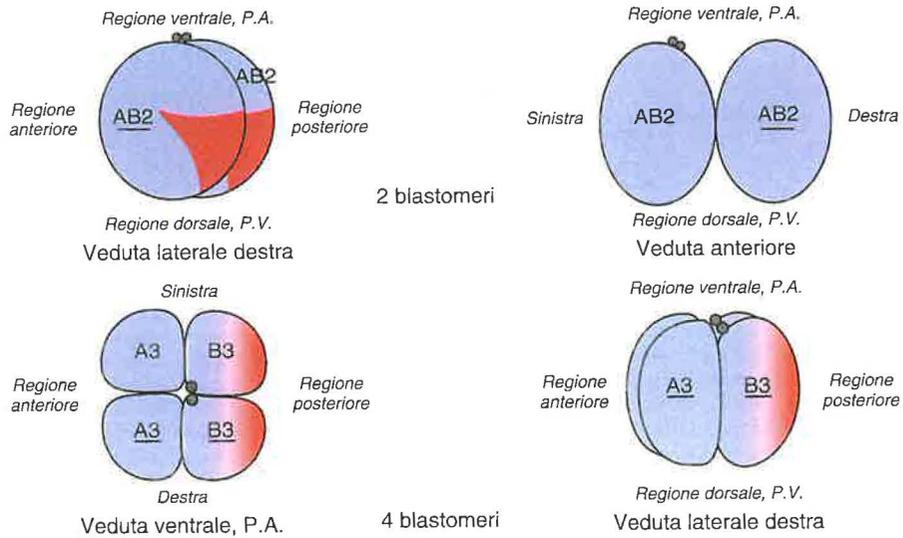
I tessuti si formano a partire da un numero di divisioni cellulari generalmente ridotto. Così la maggior parte delle cellule che costituiscono la larva si sono già formate tra il 9° e il 12° ciclo delle divisioni di segmentazione.

## 6.4.1 La neurulazione

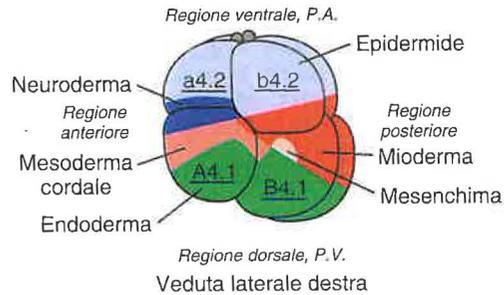
La formazione del tessuto nervoso coincide con il completamento dei movimenti morfogenetici della gastrulazione. Le cellule neurodermiche corrispondenti alla regione dorsale dell'ectoderma anteriore (Fig. 6.5d e Fig. 6.6a) formano una piastra neurale dorsale. La costi-

6.2: La segmentazione

Le prime tappe



8 blastomeri



12 blastomeri

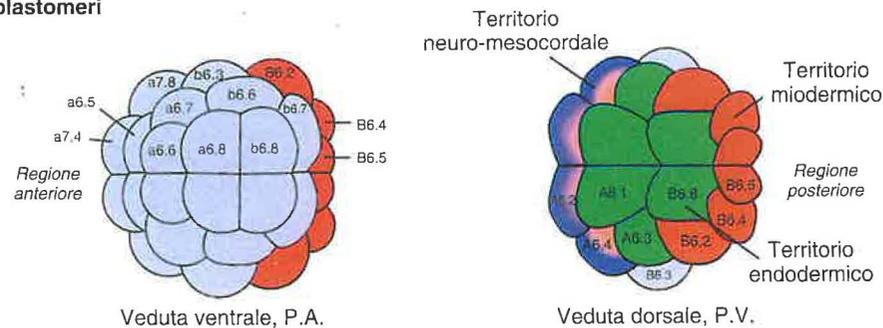
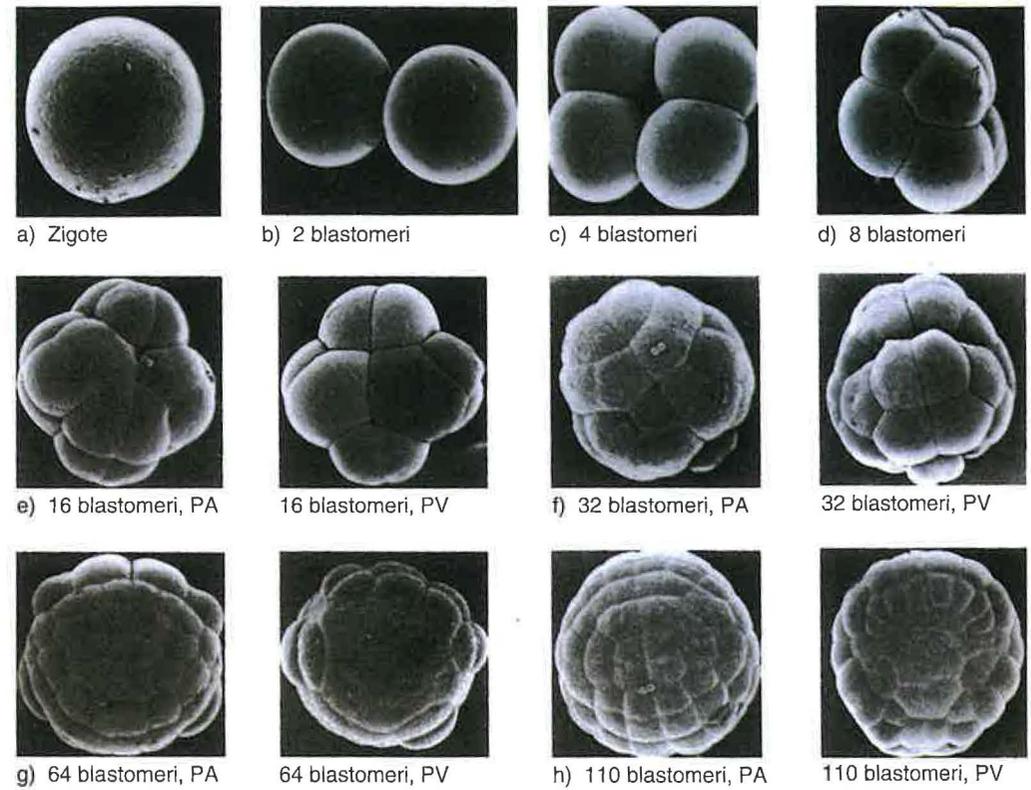


Fig. 6.3: Microfotografie della segmentazione di *Halocynthia roretzi*



(da Satoh, 1979)

tuzione di questa piastra, unitamente a movimenti d'insieme che riguardano le cellule internalizzate dell'endoderma e del mesoderma (verso la regione anteriore per le prime e verso la regione posteriore per le seconde), porta ad un allungamento generale dell'embrione secondo l'asse antero-posteriore.

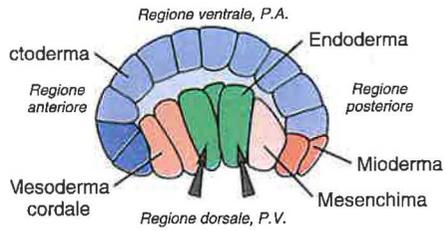
In seguito ad un cambiamento di forma generale delle cellule della piastra neurale, appare una sorta di depressione longitudinale che dà origine alla formazione di una doccia i cui bordi si avvicinano progressivamente a partire dalla regione posteriore verso la regione anteriore, provocando la chiusura del tubo neurale dorsale per tutta la lunghezza dell'embrione (Fig. 6.6a,b e Fig. 6.7a,b). Alla sua estremità anteriore il lume del tubo neurale è in comunicazione con l'esterno per mezzo di un orifizio, il **neuroporo** (Fig. 6.6b e Fig. 6.7c). La neurula si presenta di forma ovale e si trasforma in giovane bottone caudale 24 ore dopo la fecondazione a 13°C.

6.4.2 Formazione della larva giriniforme

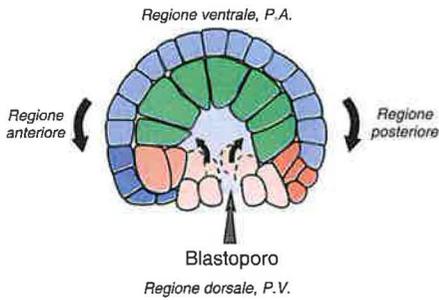
Questa fase costituisce l'ultima tappa dell'embriogenesi. Oltre ai fenomeni di differenziamento cellulare che sono associati classicamente a questo periodo dello sviluppo, si realizzano dei movimenti a carico di differenti territori cellulari. L'insieme di questi processi ha come risultato il modellamento progressivo dell'embrione per dare la futura forma larvale caratteristica degli Urocordati che viene chiamata **girino** a causa della sua morfologia. Si assiste infatti alla regionalizzazione del corpo in 2 parti con la formazione di una regione cefalica rigonfiata seguita da una coda allungata (Fig. 6.8).

6.4: La gastrulazione

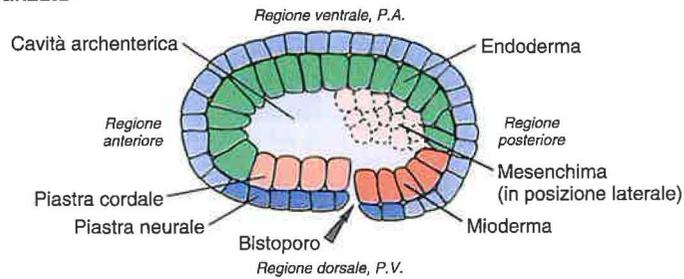
Gastrula iniziale



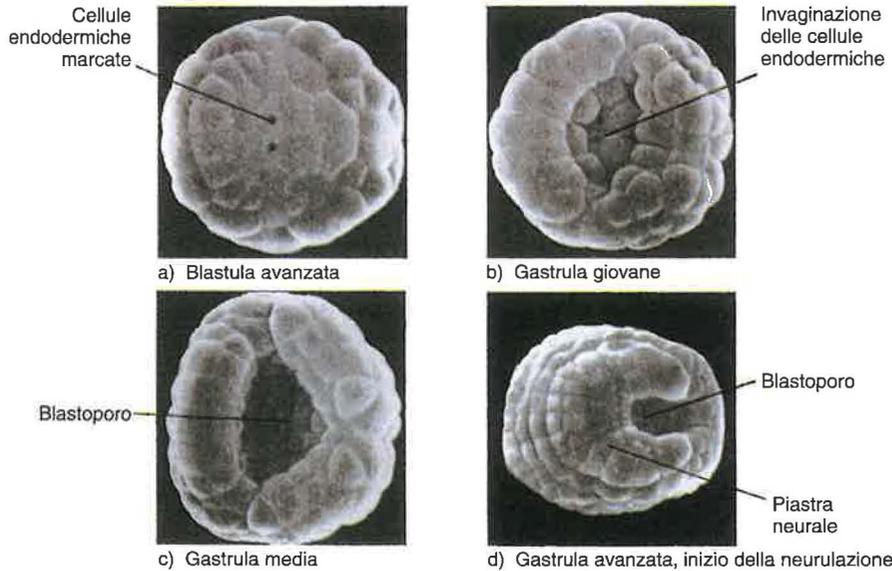
b) Gastrula media



Gastrula avanzata



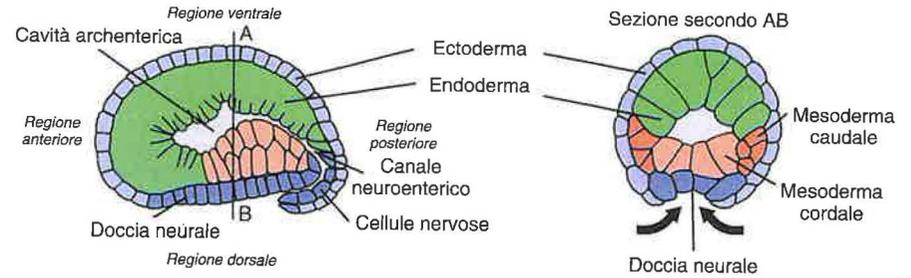
6.5: Microfotografie della gastrulazione vista dal polo vegetativo



(da Satoh, 1978; Nishida, 1986)

Fig. 6.6: La neurulazione

a) Formazione della doccia neurale



b) Formazione del tubo neurale

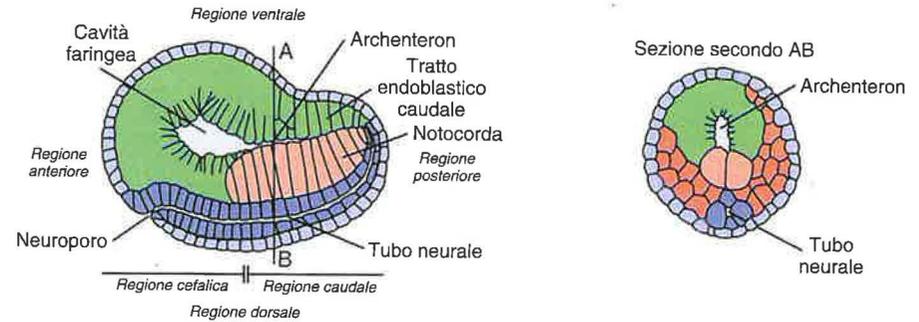
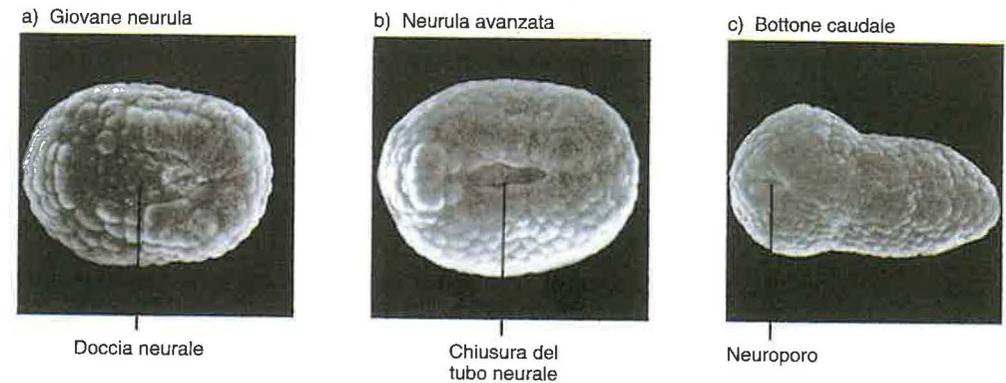


Fig. 6.7: Microfotografie della neurulazione vista dal polo vegetativo



(da Nishida, 1986)

Riferendoci alla tabella della discendenza cellulare di *Halocynthia*, come in altre specie animali appartenenti a taxa differenti dagli Urocordati, si osserva che la determinazione precoce del destino dei blastomeri non si accompagna ad una unicità di origine cellulare per i diversi organi formati (vedi per esempio § 2.4 p. 30). Infatti la maggior parte dei tessuti larvali sono costituiti da cellule che derivano da quadranti differenti (per esempio la notocorda si forma a partire da A4.1, A4.1 e B4.1, B4.1).

Il tubo neurale derivato dal materiale neurodermico si regionalizza in una vescicola cerebrale ed un cordone nervoso spinale. A livello della vescicola cerebrale si differenziano delle formazioni con ruolo sensoriale, lo statolito e l'ocello.

A livello dell'epidermide sono elaborati gli organi adesivi della larva. Inoltre le cellule epidermiche secernono lo strato interno della tunica larvale, mentre lo strato esterno di quest'ultima è formato da secrezioni che provengono dalle cellule privitelline (vedi sopra).

Il materiale endodermico resta essenzialmente indifferenziato durante tutta l'embriogenesi e formerà l'apparato digerente solo dopo la metamorfosi alla quale andrà incontro la larva dopo essersi fissata ad un substrato.

Nelle larve il mesoderma dà origine ai tessuti mesenchimatici di riempimento soprattutto a livello del tronco, mentre nella regione della coda dà origine alle cellule muscolari ed alla notocorda. La larva giriniforme di *Halocynthia roretzi* possiede all'interno della coda 21 cellule muscolari striate e uninucleate per lato. Queste cellule

provengono dal differenziamento, in proporzioni variabili, dei blastomeri B4.1, B4.1 (28), A4.1, A4.1 (4) e b4.2, b4.2 (10) dell'embrione allo stadio di 8 cellule (Tabella 6.1). Il raggiungimento del differenziamento funzionale delle cellule muscolari si effettua subito prima della schiusa larvale.

L'esistenza di una notocorda, che è una struttura transitoria poiché è presente solo durante la fase larvale, costituisce una delle caratteristiche fondamentali degli Urocordati che giustifica i numerosi studi di tipo filogenetico dedicati a questo taxon.

Il materiale mesodermico presuntivo della notocorda è localizzato inizialmente nella regione anteriore dell'embrione (Fig. 6.2c). A partire dalla neurulazione, le cellule del mesoderma cordale, la cui origine è stata chiarita sopra, migrano in direzione della regione embrionale posteriore. Tra i 2 gruppi di cellule situate da una parte e dall'altra del PSB si effettua un processo di intercalazione che porta alla formazione di un'unica fila di 40 cellule contigue, favorendo così il fenomeno di allungamento della regione caudale della larva. Il compimento della costruzione della notocorda si ottiene con la sua trasformazione in una struttura tubulare al centro della quale si accumula materiale extracellulare.

Quando lo sviluppo avviene a 13°C, la schiusa della larva ha luogo 35 ore dopo la fecondazione. Dopo aver condotto una vita libera di breve durata, la larva aderisce ad un substrato per mezzo del suo apparato adesivo e va poi incontro ad una metamorfosi detta di "fissazione" durante la quale spariscono numerosi organi larvali (organi sensoriali, notocorda, muscolatura etc.).

## Sviluppo di un Pesce: *Danio rerio*

7

Questa specie tropicale di acqua dolce, conosciuta con il nome comune di **pesce zebra**, è stata per lungo tempo un modello di studio poco conosciuto, mentre maggiore attenzione è stata data ad altre specie di Vertebrati inferiori quali gli Anfibi. Tuttavia nel corso di questi ultimi 15 anni, essa è diventata una specie privilegiata per affrontare i numerosi aspetti dello sviluppo precoce dei Vertebrati.

Infatti, questa specie resistente e di piccola taglia (4-5 cm) può essere allevata facilmente e possiede un ciclo vitale relativamente breve dell'ordine di 3 mesi. Lo sviluppo è rapido (2-4 giorni) e nelle prime 24 ore gli embrioni sono trasparenti. Ciò permette di seguire in tempo reale i movimenti cellulari e le principali fasi dell'organogenesi.

Inoltre, grazie a mutagenesi indotte sperimentalmente (sostanze chimiche, radiazioni U.V.) seguite da incroci appropriati, è possibile ottenere numerose mutazioni a carico dello sviluppo che rendono possibile effettuare l'analisi genetica dei processi ontogenetici precoci.

Unendo i vantaggi presentati da *Drosophila* (ciclo vitale breve e facilità di analisi della funzione di geni specifici) e dagli Anfibi (sviluppo esterno), il pesce zebra è diventato nello spazio di qualche anno, grazie in particolare all'utilizzazione delle tecniche offerte dalla Biologia molecolare, un modello dello sviluppo animale altrettanto utilizzato quanto gli altri modelli classici, come dimostra il numero crescente di studi che gli sono stati dedicati.

Lo sviluppo del pesce zebra sarà illustrato in modo particolareggiato in quanto esso è il primo esempio di embriogenesi dei Vertebrati descritto in questo trattato. Si assiste infatti alla formazione di nuove strutture che richiedono nuove strategie di sviluppo che si ritroveranno in seguito anche negli altri rappresentanti di questo raggruppamento, sebbene appartenenti a Classi diverse.

### 7.1 L'uovo indiviso

Le uova deposte dalla femmina sono **ovociti II bloccati in metafase** della seconda divisione meiotica. Le uova non fecondate, circondate da un corion, hanno un diametro di circa 0,7 mm e possiedono abbondante tuorlo distribuito in modo omogeneo in tutto il citoplasma. Lo sper-

matozoo passa attraverso un canalino che decorre nel corion in corrispondenza del futuro polo animale, il **micro-pilo**, che si oblitererà dopo la penetrazione del gamete maschile nell'uovo. La fecondazione causa il **completamento** della meiosi con l'espulsione del 2° globulo polare. Dopo 10 minuti, si comincia a manifestare un fenomeno che continuerà durante le fasi iniziali della segmentazione e che consiste nella concentrazione di citoplasma privo di tuorlo ad uno dei poli dello zigote, il polo animale.

L'uovo presenta così un **disco germinale** (o **blastodisco**), che sormonta la maggior parte della massa citoplasmatica nella quale sono **concentrate** le riserve di tuorlo (Fig. 7.1a). In seguito a questa trasformazione, nei minuti che seguono la fecondazione, le uova del pesce zebra possono essere considerate di tipo **teleolecitico**, e quindi dello stesso tipo di quelle osservate nei Saurropsidi o nei Molluschi Cefalopodi.

Tra il momento della fecondazione e quello della schiusa trascorre un periodo di circa 3 giorni. Le principali tappe dello sviluppo che si succedono durante questo breve intervallo di tempo sono riportate nella Tabella 7.1.

### 7.2 La segmentazione

La grande quantità di tuorlo presente nel citoplasma dell'uovo condiziona le modalità della segmentazione, che si effettua essenzialmente a livello del blastodisco. La segmentazione è di conseguenza **meroblastica** (= parziale) **discoidale**.

La prima divisione di segmentazione inizia 40 minuti dopo la fecondazione e porta, grazie ad un solco verticale formatosi nel disco germinale, alla formazione di 2 blastomeri di uguale grandezza, in continuità con il tuorlo sottostante. 15 cicli di divisione successivi sono sincroni e si susseguono con un ritmo di circa 15 minuti ciascuno. Il secondo **piano** di segmentazione è perpendicolare al primo, mentre il 3° ciclo di divisione comporta la formazione di 2 solchi paralleli al 1° solco di divisione e posti da una parte e dall'altra di esso (Fig. 7.1b; Fig. 7.3a-c). Lo stadio di 16 blastomeri è raggiunto grazie alla formazione, all'inizio del 4° ciclo, di 2 solchi paralleli al 2° solco di segmentazione. I 4 blastomeri centrali sono completamente delimitati dalla

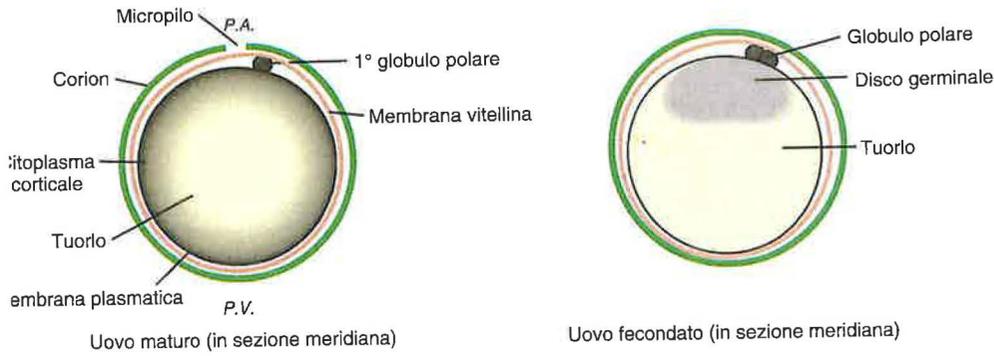
Fig. 6.8: Larva giriniforme



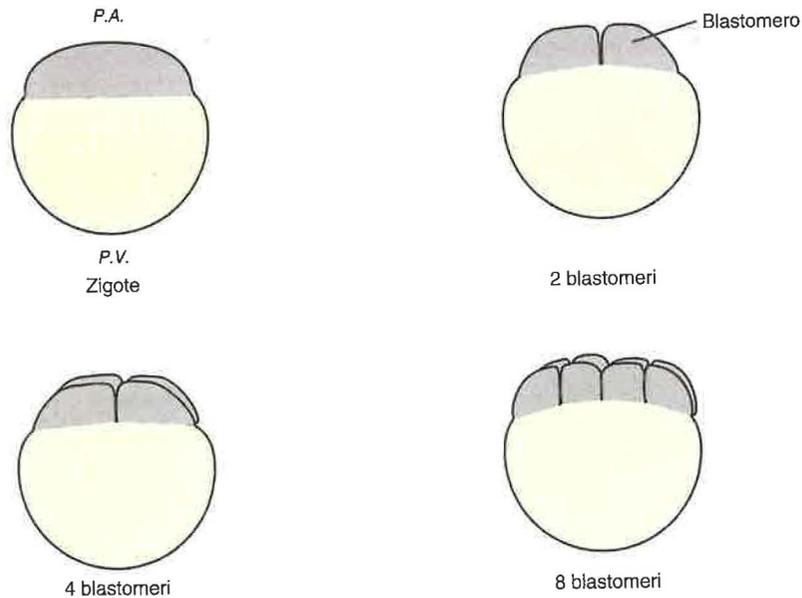
(da Nishida, 1994)

Fig. 7.1: Prime tappe della segmentazione

L'uovo prima e dopo la fecondazione



La segmentazione: primi stadi (vedute laterali esterne)



Tab. 7.1: Cronologia dello sviluppo di Danio rerio (28,5°C)

TEMPI	TAPPE DELLO SVILUPPO	STADIO
0 h	Zigote	
45 min	2 blastomeri	3
1 h	4 blastomeri	4
1 h 15	8 blastomeri	5
1 h 30	16 blastomeri	6
1 h 45	32 blastomeri	7
2 h	64 blastomeri	8
2 h 15	128 blastomeri	9
3 h	1 000 cellule	10
3 h 40	Blastula alta	11
4 h	Sfera	12
4 h 20	Cupola, inizio dell'epibolia	13
4 h 40	30% di epibolia	14
5 h 15	Giovane gastrula, 50% di epibolia	
6 h	Scudo embrionale	15
8 h	75% di epibolia	16
10 h	Completamento della gastrulazione, bottone caudale	17
10 h 20	1 somite	
11 h 40	5 somiti	18
16 h	14 somiti	19
19 h	20 somiti	20
48 h	Bottone caudale avanzato	---
72 h	Schiusa	---

(da Hisoaka e Battle, 1958)

brana cellulare, mentre i 12 blastomeri periferici (= ginali) restano collegati mediante ponti citoplasmatici la massa del tuorlo. Durante i cicli successivi, le cellule vate dai blastomeri marginali restano in contatto con il tuorlo sottostante a differenza delle cellule che vengono dai blastomeri centrali. Il 5° ciclo di divisione ltimico che presenta dei solchi di divisione verticali e i lastomeri così formati sono disposti in un solo strato ermente incurvato (Fig. 7.2a; Fig. 7.3d). La sesta divi- e di segmentazione è caratterizzata da divisioni quasi ontrali dei blastomeri. Essa porta alla comparsa di 2 po- zioni di cellule: l'una forma lo strato di rivestimento lastoderma, costituito da tutti i blastomeri dello strato riore; l'altra dai blastomeri marginali dello strato inferiore; ra, che è ricoperta dalla popolazione precedente, è for- a da cellule profonde corrispondenti ai blastomeri in- ri centrali (Fig. 7.2a; Fig. 7.3e).

A partire da questo stadio la disposizione regolare dei tomeri comincia ad essere persa ed inoltre le divi- i cessano di essere realmente sincrone. Esse si effet- to ad ondate che si propagano nell'insieme del bla- lerna provocando in questo modo dei leggeri sfasa- ti nell'entrata in mitosi dei differenti blastomeri.

Tra il 7° e il 10° ciclo il blastoderma forma una sorta protrusione arrotondata al polo animale (Fig. 7.3f) a sa del fatto che le cellule profonde proliferano in mi- i maggiore delle cellule dello strato di rivestimento, invece formano un foglietto epiteliale unistratificato iattito. A questi stadi, l'embrione corrisponde ad una rane blastula che, in assenza di un blastocele, è da siderare una sterroblastula.

Allo stadio di 512 cellule, derivato dal 9° ciclo di divi- e, inizia il fenomeno detto transizione di medio-bla- a che, come caratteristiche generali, presenta l'inizio 'attività di trascrizione embrionale accompagnata da diversa durata dei cicli cellulari; l'asincronia delle di- oni dei blastomeri diventa da questo momento mar- i (vedi Capitolo 8 sullo sviluppo degli Anfibi).

A questo stadio ha luogo un processo caratteristico Pesci Teleostei che è la formazione di uno strato vi- no sinciziale. Questo si forma a partire dalle cellule ginali che si disintegrano e versano il loro contenuto l'adiacente citoplasma ricco di tuorlo (Fig. 7.2a). Il zio vitellino così formatosi è costituito da nuclei cir- dati di citoplasma privo di tuorlo e si suddivide in i regione interna e in una regione periferica disposta anello intorno al blastoderma.

A partire dallo stadio di 1024 cellule, che si raggiunge a 3 ore dopo la fecondazione, si assiste a dei cambia- ti nell'aspetto morfologico della blastula. Questi cam- menti sono legati alla preparazione ed all'inizio dell'epi- ia, che consiste in un movimento di rivestimento della ione vegetativa vitellina da parte delle cellule del bla-

stoderma (Fig. 7.3h-k). A 3 ore e 20, la blastula avanzata presenta un blastoderma disposto sulla sommità della massa del tuorlo (blastula "alta", Fig. 7.3h). 20 minuti più tardi il blastoderma comincia ad appiattirsi, e ciò consente all'em- brione di ritrovare progressivamente la forma sferica ini- ziale dell'uovo non fecondato (stadio di "sfera" a 4 ore, Fig. 7.3i). Questo appiattimento si accompagna ad un inseri- mento delle cellule profonde del blastoderma negli strati più superficiali (intercalazione radiale). La maggior parte delle cellule sono impegnate nel 13° ciclo di divisione di segmentazione. A questo stadio, i nuclei dello strato vitellino sinciziale sono per la maggior parte in posizione interna e completano la loro ultima divisione di segmentazione.

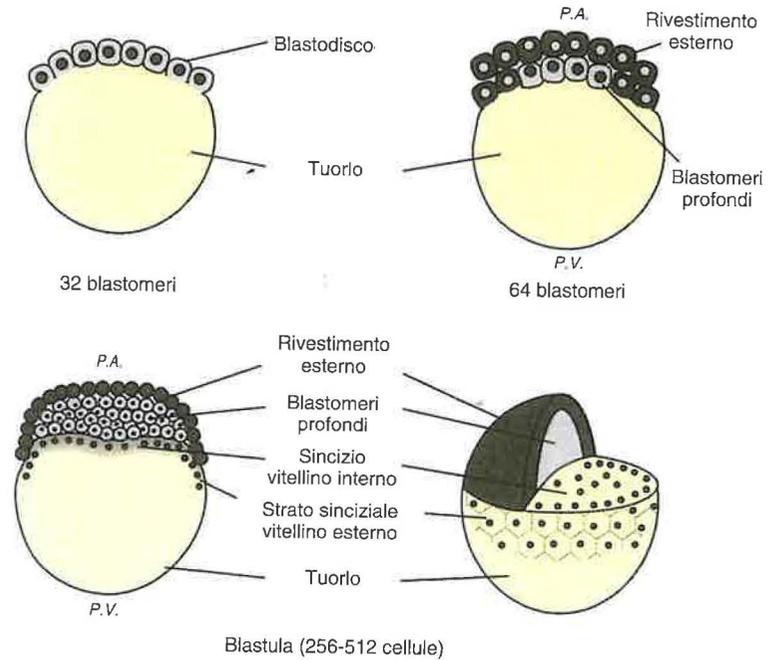
L'epibolia inizia in modo effettivo con la comparsa di uno stadio detto di "cupola" a 4 ore e 20. L'interfaccia blastoderma/massa del tuorlo, fino ad ora piana, diventa bombata a causa della rapida intrusione della massa di tuorlo in direzione del polo animale, sotto lo strato blastodermico assottigliato (Fig. 7.3j). A partire da questo punto il materiale cellulare blastodermico inizia a ricoprire la zona vitellina dell'embrione in direzione della zona equatoriale. Questo movimento è, almeno nelle sue fasi iniziali, dipendente dall'attività delle cellule dello strato sinciziale vitellino, nelle quali il sistema citosche- letrico microtubulare sembra giocare un ruolo preponde- rante. Il grado di avanzamento dell'epibolia è misurato in base alla percentuale di progressione del processo di rivestimento in rapporto all'asse polo animale-polo vitellino in direzione di quest'ultimo. Così a 4 ore e 40, l'epibolia è al 30%. Quando l'epibolia raggiunge il 50% (Fig. 7.3k), la segmentazione è considerata completata. A questo stadio è stata costruita una mappa dei territori presuntivi (Fig. 7.2b). Soltanto le cellule profonde del blastoderma sono organogeneriche, mentre le cellule dello strato di rivestimento esterno danno origine al periderma, sottile struttura epiteliale di protezione che riveste l'embrione.

7.3 La gastrulazione

A partire dallo stadio con 50% di epibolia, e cioè a 5 ore e 15 dopo la fecondazione, mentre continua il processo di rivestimento, si manifestano degli ulteriori movimenti morfogenetici che segnano l'inizio della gastrulazione. Nel margine del blastoderma in avanzamento compare, prima sul futuro lato dorsale e poi su tutta la circonferenza, un ispessimento (anello germinale) dovuto al fatto che, sotto lo strato di rivestimento, i territori blastodermici periferici si ripiegano su se stessi per un movimento di involuzione (Fig. 7.4a-c). In questa zona si sono così formati 2 strati, uno superiore esterno che costituisce l'epiblasto, l'altro inferiore sottostante e in continuità col precedente, l'ipoblasto. Quest'ultimo progredisce all'interno in direzione del polo animale e corrisponde a territori endo-mesodermici. Le cellule che restano a livello epiblastico quando la gastrulazione è completata, costituiscono il territorio ectodermico.

Fig. 7.2: Le tappe finali della segmentazione e la mappa dei territori presuntivi

a) La segmentazione (sezioni meridiane)



b) Mappa dei territori presuntivi allo stadio 50% di epibolia

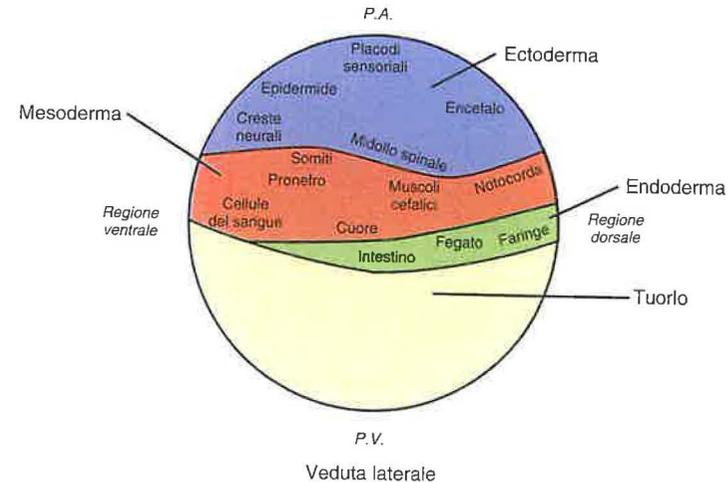
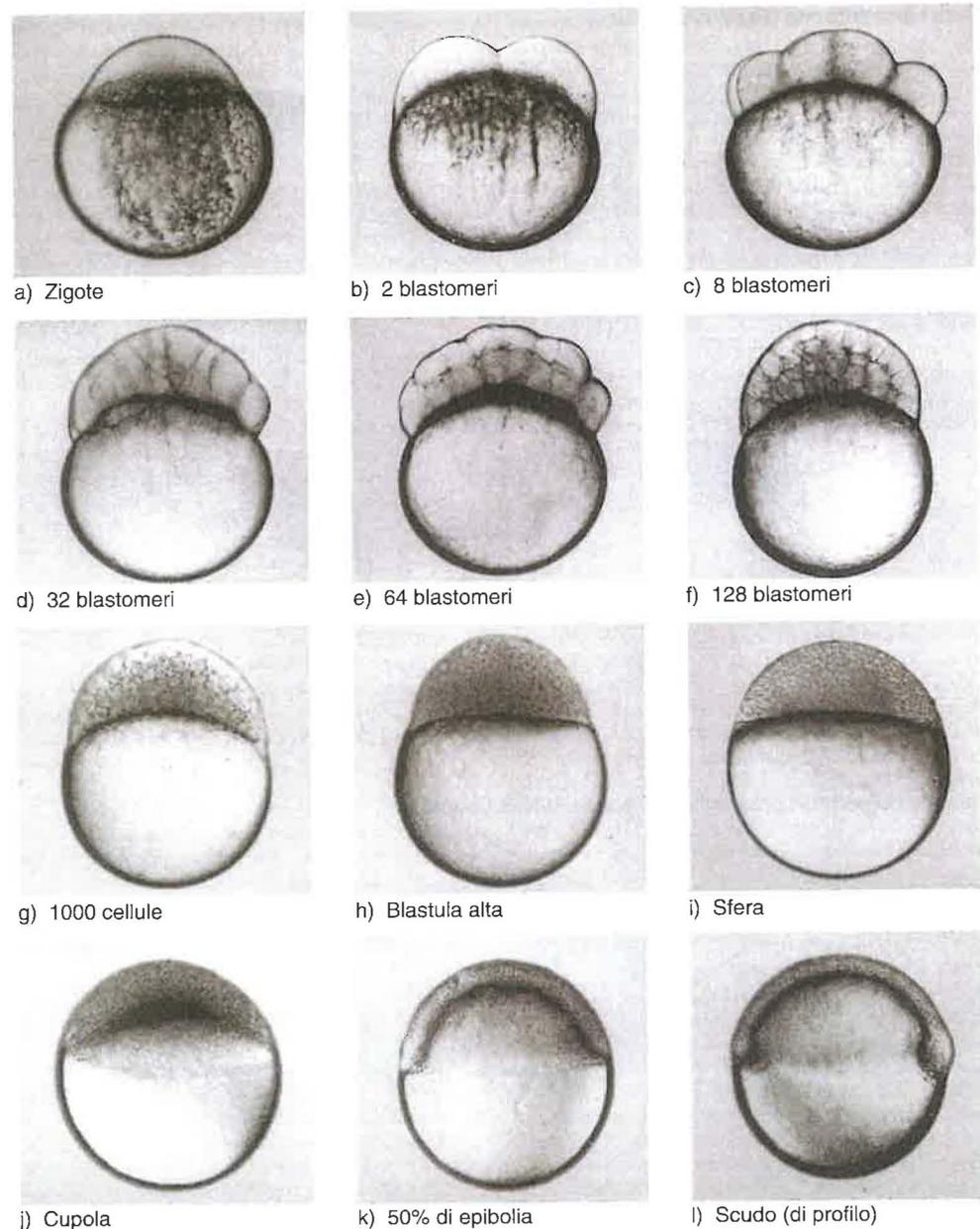
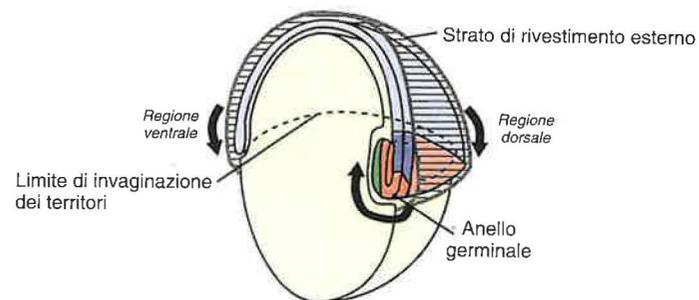


Fig. 7.3: Microfotografie di embrioni di *Danio rerio* (x50)

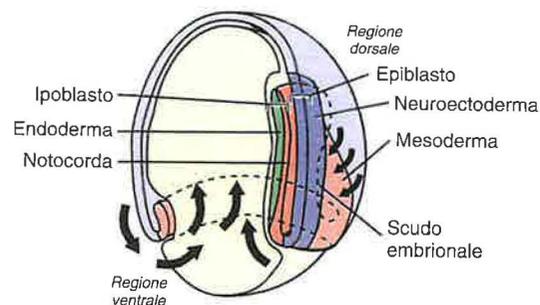
(da Boulekbache, 1998)

Fig. 7.4: La gastrulazione

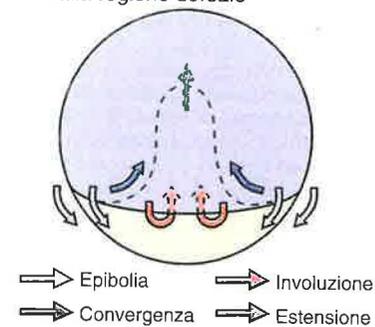
## a) Embrione con 50% di epibolia



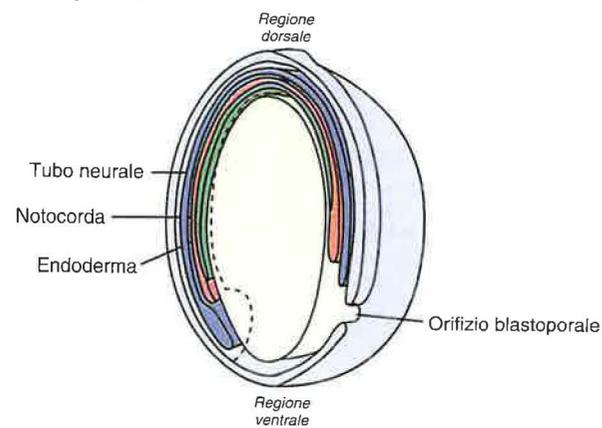
## b) Embrione con 75% di epibolia (senza rivestimento esterno)



## c) Embrione con 75% di epibolia: movimenti dei territori visti esternamente dalla regione dorsale



## d) Embrione con 100% di epibolia



parallelamente ai movimenti di involuzione, verso le quali manifesta un movimento di convergenza che in materiale epiblastico e ipoblastico a concentrarsi o dell'embrione corrispondente al futuro lato dorso (Fig. 7.3); Fig. 7.4b-c). Il rigonfiamento così formato con il termine di **scudo embrionale**, può essere considerato come l'omologo del labbro dorsale del poro osservato negli Anfibi (vedi *Capitolo 8*). In seguito a riarrangiamenti cellulari si produce un movimento laterale dello scudo contemporaneamente allungamento in direzione del polo animale. Ciò si accompagna al movimento di **estensione** (o di **allungamento**) che contribuisce alla formazione dell'asse antero-posteriore dell'embrione (Fig. 7.4c; Fig. 7.6a). A 10 ore l'ipoblastica ha raggiunto il 100% ed il blastoderma ha eticamente ricoperto la massa del tuorlo, segnando completamente la fase di gastrulazione. Questo è detto "bottono caudale" (Fig. 7.6a) a causa di un rigonfiamento che si osserva nella regione caudale, in direzione dorsale rispetto all'orifizio blastoporale. Questo rigonfiamento è situato ventralmente a causa di sfasamenti nei tra i movimenti morfogenetici che hanno luogo nelle regioni dorsale e ventrale (Fig. 7.4d).

La morfogenesi del corpo comincia a manifestarsi con evidenti differenze tra le regioni cefalica, del tronco e caudale. A partire da gruppi di cellule che hanno disposizioni precise, inizia la segregazione delle future strutture del sistema nervoso, la notocorda e la muscolatura del tronco (vedi di seguito). Così, contrariamente a ciò che si osserva al momento della gastrulazione in altre specie, si osserva al fatto che non si forma l'archenteron (interprimitivo), si constata che i tre foglietti embrionali non si individuano in modo evidente. I due strati ipoblastici presentano dei riarrangiamenti rapidi in tutto il corpo parallelamente ai movimenti morfogenetici della gastrulazione ed alla formazione degli abbozzi degli organi senza che si realizzi precedentemente un diffrangimento netto dei foglietti embrionali.

## L'organogenesi

### 4.1 Da 10 a 24 ore

Dopo il completamento della gastrulazione, tra la 10<sup>a</sup> e la 14<sup>a</sup> ora dopo la fecondazione, hanno luogo un certo numero di eventi di notevole importanza che caratterizzano la fase dello sviluppo indicata con il termine di **bottono caudale**. Durante questo periodo, si assiste infatti ad un accrescimento dell'estremità caudale che presenta in particolare un allungamento considerevole in direzione secondo l'asse antero-posteriore. Allo stesso tempo appaiono distintamente numerosi abbozzi degli organi. Ma questa tappa dello sviluppo è caratterizzata in tutto dalla realizzazione di una segmentazione del corpo che riguarda alcuni tessuti in corso di differenziazione (muscolare, scheletrico e nervoso). Si noteranno a proposito che, data la sua organizzazione relativa-

mente semplice, il pesce zebra costituisce un buon modello per lo studio dei processi di metamerizzazione nei Vertebrati. Nel complesso, la formazione dei diversi organi e la comparsa delle strutture metameriche si effettuano secondo un'onda antero-posteriore portando di conseguenza, a seconda delle posizioni del corpo considerate, a sfasamenti nel grado di avanzamento dell'organogenesi.

#### a) Somitogenesi

Il differenziamento dei somiti costituisce l'evento più importante di questo periodo e serve di riferimento per definire la progressione degli stadi di sviluppo. Il primo somite compare tra 10 ore e 10 ore e 30 dopo la fecondazione, a metà altezza lungo l'asse cefalo-caudale (Fig. 7.6a). I 5 somiti successivi si differenziano ogni 20 minuti ciascuno e i rimanenti con un ritmo più lento. (Come riferimento, il 18° somite appare alla 18<sup>a</sup> ora e il numero definitivo di 30-34 somiti è raggiunto alla 24<sup>a</sup> ora). Dei 3 territori del somite che si osservano in genere nei Vertebrati, il **miotomo** è qui preponderante. Le masse cellulari miotomiche segmentate sono separate le une dalle altre da un setto trasversale, e si presentano sotto forma di frecce con la punta della V diretta in avanti. Esse daranno origine ad una muscolatura parietale molto ben sviluppata, caratteristica tipica dei Pesci, da mettere in relazione con la loro modalità di locomozione. Lo **sclerotomo**, che darà origine alle cartilagini vertebrali, è ridotto e si individua nella porzione medio-ventrale di ciascun somite (Fig. 7.5). L'esistenza del 3° territorio, il **dermatomo**, in questo caso è ancora incerta.

#### b) Neurulazione

La neurulazione costituisce l'altro evento significativo di questo periodo. Alla fine della gastrulazione, si forma una **piastra neurale**, corrispondente ad una zona appiattita ed ispessita dell'ectoderma nella regione medio-dorsale. Questo territorio neuro-ectodermico va incontro a movimenti simili a quelli osservati nei Vertebrati tetrapodi, con la differenza che non si formano le pieghe neurali e poi la doccia neurale, ma una sorta di primordio senza lume (carenatura neurale) che solo secondariamente acquisterà una forma cilindrica ed andrà incontro ad un processo di cavitazione, dando così origine al tubo neurale (Fig. 7.5).

A partire dalla 12<sup>a</sup> ora, si realizza un modellamento graduale della regione cefalica, e a 18 ore si ha la comparsa di costrizioni che indicano un processo di metamerizzazione. Sono ora visibili 10 **neuromeri** che corrispondono al telencefalo, diencefalo, mesencefalo e rombencefalo. Quest'ultimo è costituito da 7 **rombomeri**.

Dallo stadio di 5 somiti, si differenziano gli abbozzi delle vescicole ottiche mentre i placodi otici appaiono solo più tardivamente allo stadio di 15 somiti. Verso la 18<sup>a</sup> ora, si manifestano costrizioni spontanee dei miotomi che indicano la comparsa di una innervazione fun-

Fig. 7.5: La neurulazione (sezioni trasversali a livello del tronco)

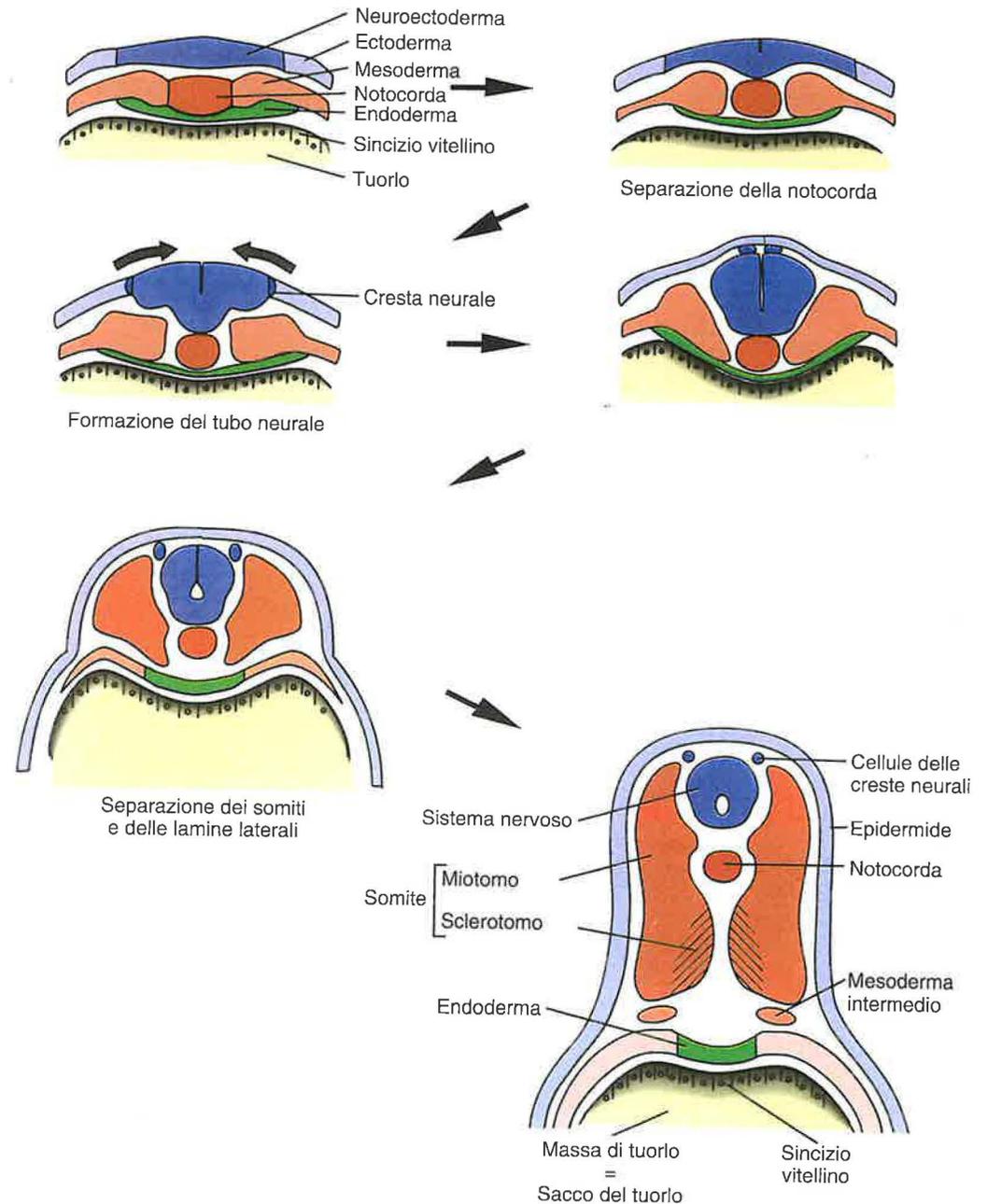
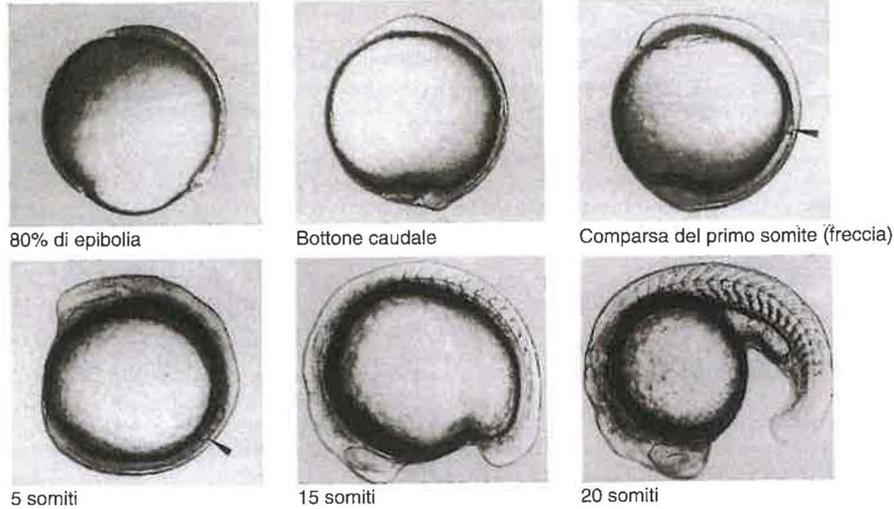
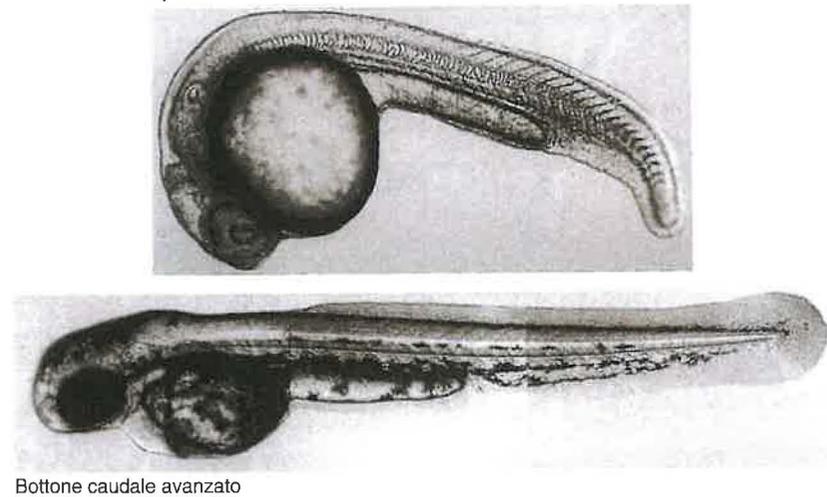


Fig. 7.6: Microfotografie della formazione del bottone caudale e della formazione della larva (x50)

a) Formazione del bottone caudale e somitogenesi



b) Raddrizzamento del bottone caudale



c) Formazione della larva natante



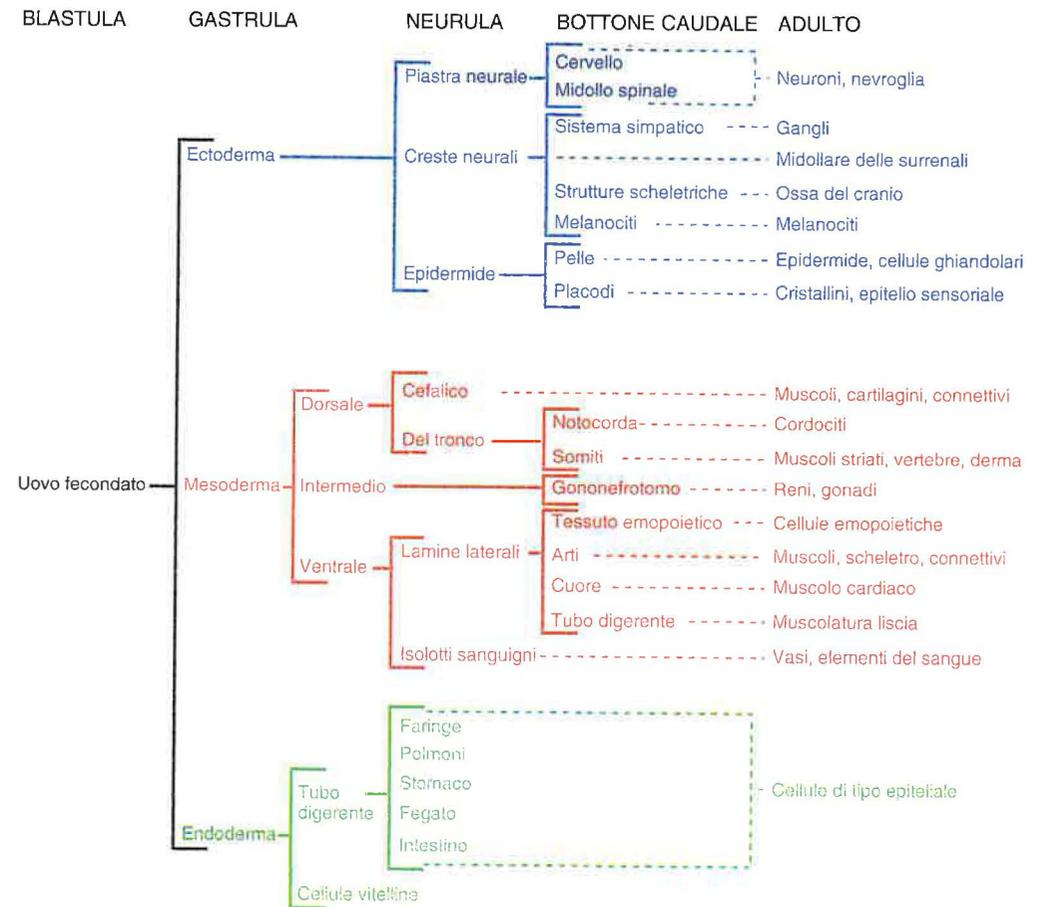
(da Boulekbache, 1998)

zionale delle strutture muscolari in corso di differenziazione. Infine, è da sottolineare che nel corso della formazione del tubo neurale, si manifesta un fenomeno tipico dei Vertebrati e cioè la separazione per distacco e migrazione, a partire dallo stadio di 8 somiti, di una popolazione cellulare molto particolare e con destini molteplici: le cellule delle creste neurali (Figg. 7.5; 7.7).

Contemporaneamente alla somitogenesi ed alla neurulazione si è formata la notocorda, che costituisce un asse di sostegno embrionale ventrale rispetto al tubo

neurale e che, a partire da una struttura compatta, assume poi un aspetto vacuoloso. Inoltre durante questo periodo, si assiste alla formazione dell'apparato escretore: allo stadio di 8 somiti, compare a livello del 3° somite l'abbozzo del pronefro, e l'uretere primario progredisce verso la regione posteriore per raggiungere, a livello del 15° somite, una zona dove si formerà l'ano. Infine nella regione cefalica compaiono altre strutture sotto forma di placodi ectodermici che daranno origine agli archi viscerali faringei, mentre l'endoderma resta ancora in uno stato indifferenziato.

Fig. 7.7: Differenziamento delle principali linee cellulari nei Vertebrati



(da Slack, 1991)

## 1.4.2 Da 24 ore a 48 ore

ino al completamento della formazione dei somiti, il brioncino è fortemente ricurvo come se fosse avvolto nel sacco vitellino a livello della regione cefalica e della regione anteriore del tronco. In un secondo periodo di gastrulazione, che ha luogo tra le 24 e le 48 ore dopo la fecondazione, si assiste alla perdita della curvatura embrionale. Questo raddrizzamento è facilitato in parte dal riassorbimento progressivo delle riserve di lipidi (Fig. 7.6b).

Contemporaneamente a questa evoluzione morfologica generale, l'organogenesi prosegue e iniziano o si accelerano i differenziamenti funzionali delle nuove strutture. Così il tubo cardiaco, il cui abbozzo è apparso precocemente al termine della gastrulazione, manifesta i primi battiti verso le 24 ore. Questo organo è in un primo tempo un orientamento transitorio dovuto alle costrizioni meccaniche esercitate dalla massa vitellina, per acquisire poi la sua organizzazione definitiva in 4 camere verso la 40<sup>a</sup> ora. Parallelamente, l'inizio della vascolarizzazione embrionale tra le 24 e la 30<sup>a</sup> ora consente una circolazione sanguigna prelevata a livello dei tessuti differenziati.

Durante questo periodo compaiono anche le pinne.

Le pinne impari si formano a partire da pieghe epidermiche situate nel piano sagittale, mentre lateralmente le pinne pari, pettorali e pelviche si differenziano come gli arti dei Vertebrati tetrapodi a partire da abbozzi (per esempio, gli abbozzi delle pinne pettorali appaiono al livello del 3° somite).

Inoltre, mentre la formazione del tubo digerente si realizza lentamente, si assiste ad una morfogenesi precoce delle regioni boccale e faringea come anche degli archi viscerali branchiali. Si osserva anche una crescita veloce delle formazioni cartilaginee alcune ore prima della schiusa. Quest'ultima tappa, con la quale termina lo sviluppo embrionale, si effettua in modo asincrono nell'ambito delle uova deposte insieme, durante tutto il 3° giorno seguente la fecondazione. La schiusa dà origine a larve con lunghezza media di 3-3,5 mm (Fig. 7.6c).

L'analisi dell'embriogenesi del pesce zebra evidenzia l'esistenza di processi morfogenetici che in modo caratteristico si ritrovano nello sviluppo degli altri Vertebrati. L'omogeneità di questo *taxon* sul piano ontogenetico appare inoltre evidente quando si prendono in considerazione i derivati dei differenti foglietti embrionali (Fig. 7.7). Questi infatti si mantengono nel complesso identici dai Vertebrati inferiori fino alla specie umana.

Sviluppo di un Anfibio:  
*Xenopus laevis*

8

Da più di un secolo, gli Anfibi sono considerati come il materiale biologico per eccellenza per lo studio sperimentale dei meccanismi che regolano l'embriogenesi, poiché presentano numerosi vantaggi. In primo luogo la relativa facilità di allevamento, soprattutto per quanto concerne le specie che permangono in ambiente acquatico durante tutto il loro ciclo vitale. Inoltre, mediante l'induzione ormonale, è possibile pianificare la deposizione delle uova e conoscere con precisione i tempi di sviluppo del materiale che viene utilizzato. Infine, la dimensione delle uova (1-2 mm) permette non solamente una osservazione facile e diretta dei cambiamenti morfologici osservabili esternamente, ma rende anche possibile l'utilizzo della microchirurgia come approccio sperimentale.

Diverse specie appartenenti alle due principali sottoclassi di Anfibi, Anuri ed Urodeli, sono state scelte come modelli di studio dalle diverse scuole e in relazione alle specifiche tematiche sperimentali. Citiamo, per esempio, tra gli Anuri le specie dei generi *Rana*, *Discoglossus*, *Xenopus* o tra gli Urodeli i rappresentanti dei generi *Ambystoma*, *Pleurodeles* o *Cynops*. Attualmente, malgrado certi vantaggi presentati dagli Urodeli rispetto allo *Xenopus* (ad esempio la maggiore dimensione delle uova, uno sviluppo più lento con le tappe principali che si completano entro le 24 ore, movimenti morfogenetici più semplici), quest'ultimo, inizialmente scelto dalla comunità scientifica anglosassone, è divenuto il sistema sperimentale prevalente soprattutto per uno studio che richieda approcci di biologia molecolare. *Xenopus laevis* è un rospo sudafricano strettamente acquatico, robusto, che sopporta bene condizioni di allevamento poco sofisticate e ha una embriogenesi più rapida (meno di 48 ore) rispetto alle altre specie (Tabella 8.1). Nel corso degli ultimi venti anni, questa specie ha prodotto risultati importanti per la comprensione di alcuni meccanismi, in particolare quelli relativi alla induzione embrionale, e ha permesso la creazione di una importante banca di dati molecolari.

## 8.1 L'uovo indiviso

Negli Anfibi in generale, l'ovogenesi si caratterizza per una rilevante fase di vitellogenesi che dà luogo ad un accumulo di sostanze di riserva citoplasmatiche ripartite secondo un gradiente. Questo complesso processo di ac-

cumulo può avere una durata variabile da un periodo di più mesi fino ad un anno come in *Xenopus*, anche in relazione alle condizioni climatiche. Questo consente lo sviluppo di un uovo di tipo mesolecitico. Come in altri Vertebrati l'ovogenesi subisce un arresto nella maturazione degli ovociti allo stadio di diplotene della prima profase meiotica. L'ovulazione provoca la rimozione di questo blocco e si accompagna al completamento della divisione in corso con l'espulsione del primo globulo polare. L'uovo deposto corrisponde ad un ovocita II bloccato in metafase della seconda divisione meiotica. Espulso dall'organismo materno ciascun uovo vergine è circondato da una membrana vitellina accollata alla membrana plasmatica (o plasmalemma) e più esternamente da uno strato gelatinoso, i cui costituenti si sono depositati durante il transito nell'ovidotto (Fig. 8.1a). Le uova deposte hanno un diametro di circa 1,3 mm e presentano un emisfero pigmentato di colore nerastro corrispondente all'emisfero animale, nel quale si evidenzia una piccola macchia chiara, corrispondente al punto di emissione del primo globulo polare, la macchia di maturazione. La regione opposta è l'emisfero vegetativo di colore chiaro e ricco di tuorlo.

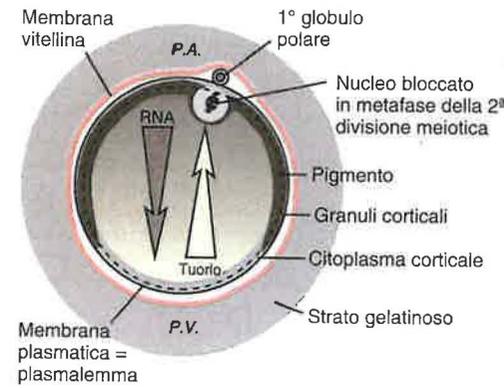
A differenza di altre specie di Anfibi, un solo spermatozoo penetra nell'uovo in un punto non definito dell'emisfero animale; il punto di penetrazione determina la futura regione ventrale dell'embrione. Nei minuti che seguono, oltre all'espulsione del secondo globulo polare, che segna il completamento della meiosi, si osservano diversi fenomeni importanti per le future tappe dell'embriogenesi. In seguito alla formazione della membrana di fecondazione si produce una rotazione di orientamento, che porta l'uovo fecondato ad orientarsi con l'emisfero vegetativo verso il basso. Dall'altra parte, nell'emisfero animale avviene un movimento di rotazione di circa 30° dello strato corticale citoplasmatico, ricco di pigmento, verso il punto di ingresso dello spermatozoo. Tutto ciò porta alla formazione di una zona di depigmentazione superficiale, non evidente nello *Xenopus*, ma che in altre specie (ad es. i Pleurodéli) si manifesta sotto forma di una semiluna denominata con il termine di semiluna grigia o semiluna depigmentata, che individua la futura regione dorsale embrionale. Nel corso di questa ultima rotazione, detta rotazione di simmetrizzazione, si determina la simmetria bilaterale dell'embrione alla quale è associata la ri-

Tab. 8.1: Cronologia comparata dello sviluppo di tre Anfibi

Tempi (ore)	<i>Rana pipiens</i> (18°C)		<i>Pleurodeles waltl</i> (18°C)		<i>Xenopus laevis</i> (22°C)	
	Tappe	Stadi	Tappe	Stadi	Tappe	Stadi
0	Fecondazione	1	Fecondazione	0	Fecondazione	0
1	Rotazione di simmetrizzazione	2			Inizio della 1ª divisione	1
1,5					2 cellule	2
2,5					8 cellule	4
3,5	2 cellule	3				
4,5	4 cellule	4			Giovane blastula	7
5,5	8 cellule	5			Medio-blastula	8
6			2 cellule	1		
6,5	16 cellule	6				
7						
7,5	32 cellule	7	4 cellule	2		
9			8 cellule	3	Giovane gastrula	10
11			16 cellule	4b		
14			Giovane blastula	5		
15					Fine della gastrulazione	13
16	Medio-blastula	8				
16,5					Inizio neurulazione	14
18,5					Doccia neurale	16
21	Fine della segmentazione	9			Tubo neurale	19
22			Medio-blastula	6		
26	Giovane gastrula	10				
27			Fine della segmentazione	7	Giovane bottone caudale	24
31	Medio-gastrula	11	Giovane gastrula	8		
38,5			Medio-gastrula	9		
42	Fine della gastrulazione	12			Battito cardiaco	33
50	Piastra neurale	13			Schiusa	36
56			Fine della gastrulazione	13		
62	Doccia neurale	14				
63			Piastra neurale	14		
72	Tubo neurale	16				
80			Tubo neurale	21		
84	Bottone caudale	17				
87			Bottone caudale	22		
118	Battito cardiaco	19				
130			Battito cardiaco	28		
140	Schiusa	20				
264			Schiusa	34		

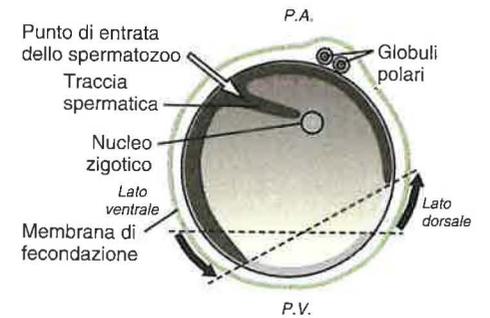
Fig. 8.1: L'uovo e le prime tappe della segmentazione

a) L'uovo maturo non fecondato



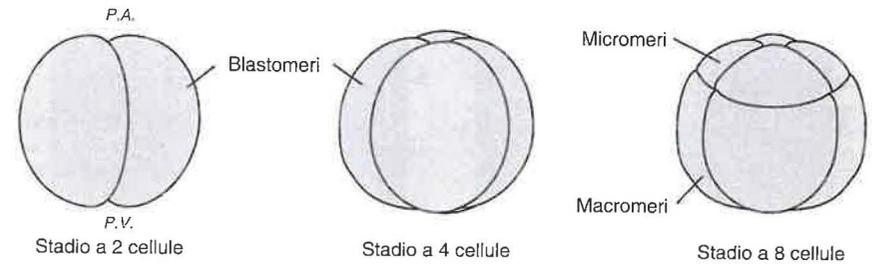
b) Rotazione di simmetrizzazione

(l'uovo è rappresentato senza strato gelatinoso)

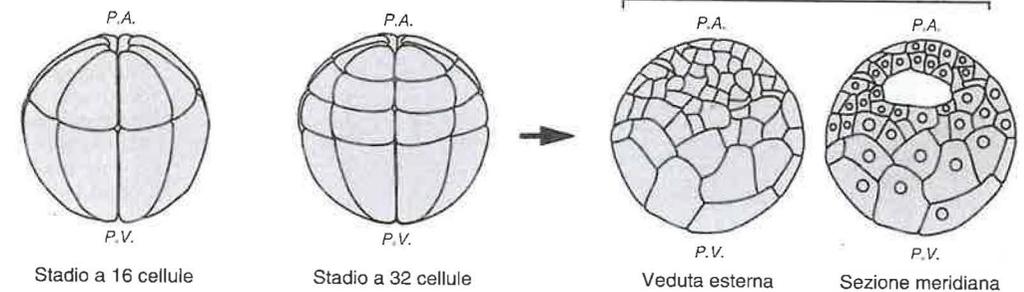


c) La segmentazione vista dall'esterno

(lo strato gelatinoso, la membrana di fecondazione e i globuli polari non sono rappresentati)



d) Blastula



da Shumway, 1940; Gallien e Durocher, 1957; Hausen e Riebesoll, 1991)

one di costituenti citoplasmatici. All'asse di polo animale-vegetativo (PA-PV, futuro asse uddale), unico elemento di simmetria dell'uovo si aggiunge nell'uovo fecondato un piano di simmetria laterale, definito dall'intersezione dell'asse PA-PV passante per il punto di ingresso dello spermatozoo e per il punto a questo diametralmente opposto. Il piano si osserva la **traccia spermatrica** a volte nel citoplasma e dovuta a pigmenti che sono derivati dallo spermatozoo quando quest'ultimo ha rotto lo strato corticale pigmentato (Fig. 8.1b).

## Segmentazione

Immediatamente dopo la fecondazione si effettua la prima fase di segmentazione, il cui piano di divisione coincide spesso con il piano di simmetria bilaterale. La seconda divisione, egualmente meridiana, si ripercuote perpendicolarmente alla prima, originando così 4 strati di dimensioni identiche. Essendo coinvolto l'embrione, la segmentazione è dunque totale, vale a dire oblastica, e di tipo radiale. La terza divisione di segmentazione, perpendicolare alle due precedenti, si effettua secondo un piano longitudinale spostato verso il polo animale a causa della massa di tuorlo presente al polo vegetativo. Questa divisione sopra-equatoriale porta alla formazione di 8 blastomeri i quali presentano differenze di dimensione e di pigmentazione. Si evidenziano infatti 4 blastomeri animali più piccoli di dimensioni minori, i micromeri, sovrastanti 4 micromeri più voluminosi e ricchi di tuorlo, detti macromeri (Fig. 8.1c). Le divisioni di segmentazione si susseguono in un primo tempo ogni 30 minuti in maniera sinclonizzata. Lo stadio di morula (32-64 cellule) segue la blastula interna della quale, parallelamente all'aumento del numero dei blastomeri, si forma una cavità in posizione eccentrica spostata verso il polo animale, circondata dal blastocele. Il tetto del blastocele è costituito da strati di piccole cellule animali pigmentate, e le cellule dell'emisfero vegetativo, di cui alcune formano il pavimento della cavità, sono voluminose poiché ricche di tuorlo (Fig. 8.1d; Fig. 8.2). Tra queste cellule si differenziano quelle cellule che diventeranno le cellule germinali primordiali.

Il secondo ciclo di divisione nella blastula, costituita da 16 cellule, si manifesta un insieme di fenomeni che segna il passaggio dal controllo materno al controllo zigosomico di sviluppo. A partire da questo momento i cicli cellulari rallentano e diventano asincroni, in relazione con la presenza nei cicli cellulari delle fasi G1 e G2, la cui durata caratterizza i cicli precedenti. Questo importante fenomeno è da collegare alla comparsa di una attività enzimatica zigosomica che caratterizza la transizione di fase dalla blastula. In questa fase infatti il tasso di sintesi proteica aumenta rapidamente di circa 200 volte. Dopo la fine della segmentazione, durante la quale le divisioni

si sono susseguite con un volume dell'embrione costante, può considerarsi conclusa. A questo stadio nell'embrione si possono distinguere tre regioni: quella dell'emisfero animale, quella dell'emisfero vegetativo e, a livello peri-equatoriale, la zona detta marginale, la cui regione dorso-laterale è sovrapponibile alla semiluna grigia.

Le tecniche con marcatori colorati, la microiniezione di traccianti e la microscopia a scansione, utilizzate per seguire i movimenti morfogenetici della gastrulazione, hanno permesso di tracciare, in questo stadio, una mappa di territori presuntivi (Fig. 8.3a), che presenta alcune peculiarità rispetto alle mappe stabilite per altri Anfibii. Infatti negli Urodeli, rappresentati per esempio dalle specie appartenenti ai generi *Pleurodeles* o *Ambystoma*, si osserva che il territorio presuntivo del mesoderma corrisponde alla zona marginale nel suo complesso e include la totalità dei blastomeri presenti su tutto lo spessore del materiale cellulare costituente la zona suddetta (Fig. 8.3b). Al contrario, in *Xenopus* e nella maggior parte degli Anuri, le cellule della zona marginale possono seguire un destino differente in base alla loro posizione. Infatti le cellule situate negli strati profondi danno origine ai tessuti mesodermici, mentre le cellule localizzate negli strati superficiali formeranno solamente territori presuntivi ectodermici ed endodermici (Fig. 8.3a).

## 8.3 La gastrulazione

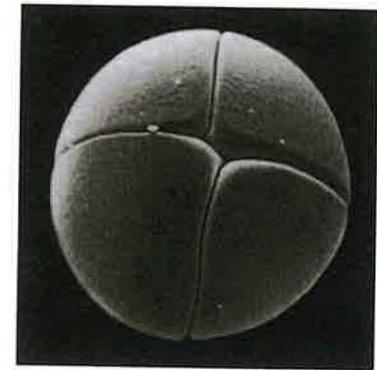
Convenzionalmente l'inizio della gastrulazione è indicato dalla comparsa di una depressione, che diventerà il labbro dorsale del blastoporo, nella regione dorso-vegetativa della zona subequatoriale, anche se dei movimenti cellulari preliminari possono essere osservati precedentemente.

La comparsa di questo solco, delimitato verso la regione del polo animale dal labbro dorsale del blastoporo, è dovuta a un cambiamento nella morfologia di un gruppo di cellule endodermiche della zona marginale dorsale. Queste cellule sono dette **cellule a bottiglia** a causa della tipica morfologia acquisita in seguito alla contrazione dei microfilamenti localizzati nella regione apicale e al riarrangiamento della componente microtubulare del citoscheletro (Fig. 8.4a-c). Questo fenomeno, che dà origine ad un movimento di **invaginazione** o **embolia**, va progressivamente estendendosi dalla regione medio-dorsale, lateralmente e poi ventralmente, in seguito al reclutamento di cellule che subiscono la stessa trasformazione. L'apertura blastoporale, rappresentata inizialmente da un solco falciforme, prende la forma di un manico di panierino e poi a ferro di cavallo (Fig. 8.6b, negli Urodeli). Quando le labbra del blastoporo si riuniscono ventralmente, si forma un anello di invaginazione al cui centro si trova del materiale cellulare vegetativo di origine endodermica, il **tappo vitellino**, che progressivamente verrà internalizzato.

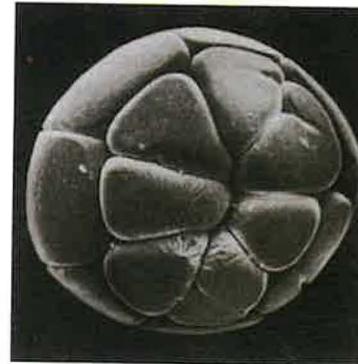
Fig. 8.2: Microfotografie di embrioni di *Xenopus* in corso di segmentazione (gli embrioni sono privi di strato gelatinoso e di membrana di fecondazione, x 50)



Stadio a 2 cellule



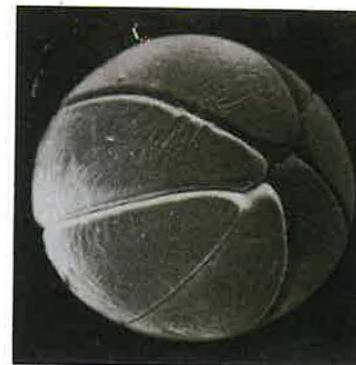
Stadio a 4 cellule



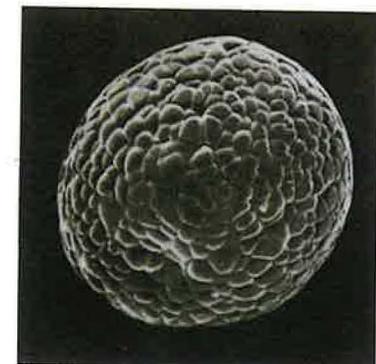
Stadio a 16 cellule, visione dal polo animale



Stadio a 16 cellule, visione dal polo vegetativo



Stadio a 32 cellule in formazione

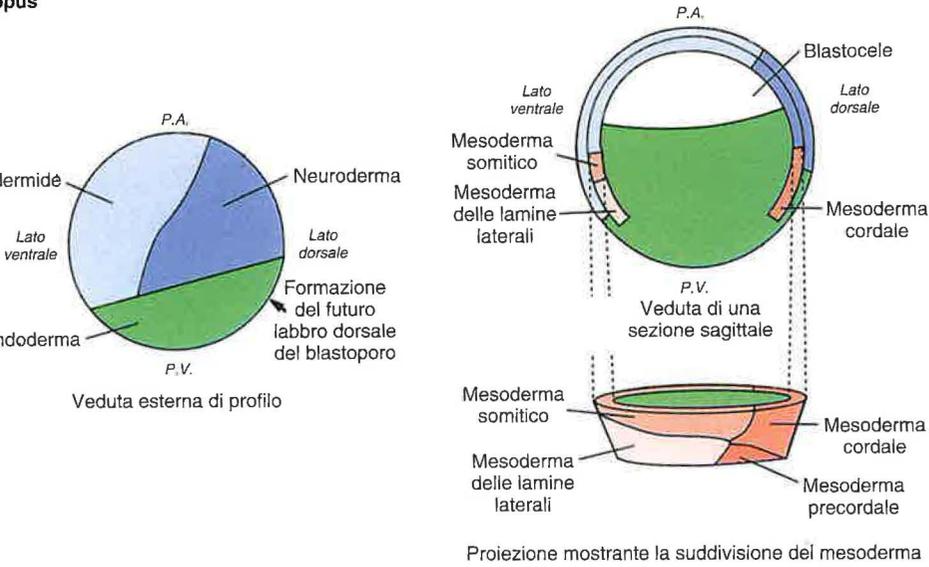


Blastula tardiva, visione dal polo animale

(da De Vos e Van Gansen, 1980)

Mappa schematica dei territori presuntivi

opus



celi

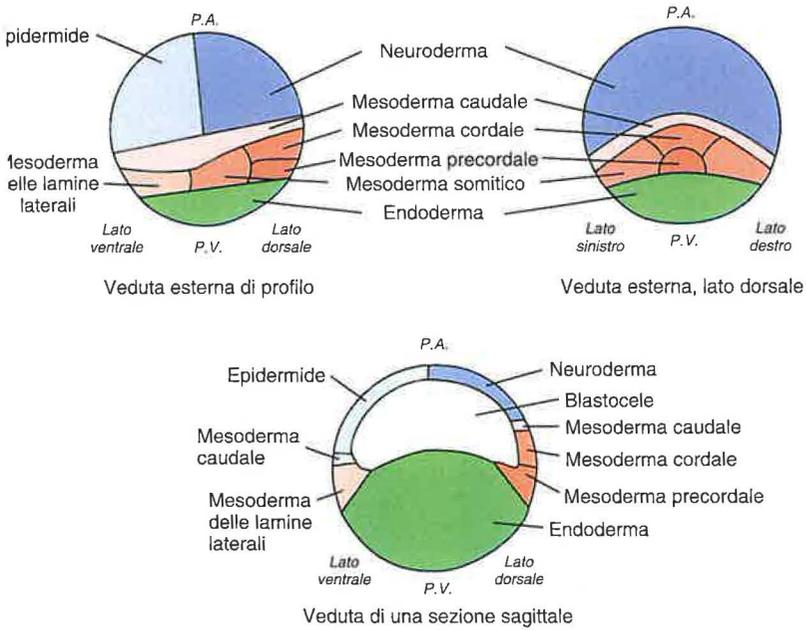
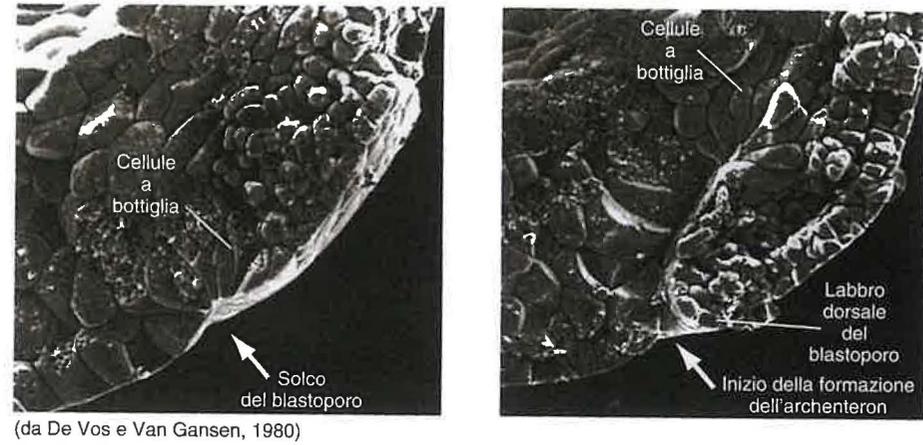
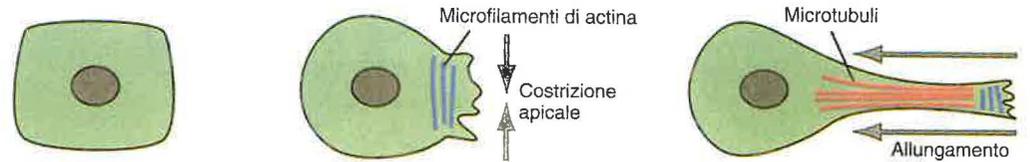


Fig. 8.4: Formazione del solco blastoporale

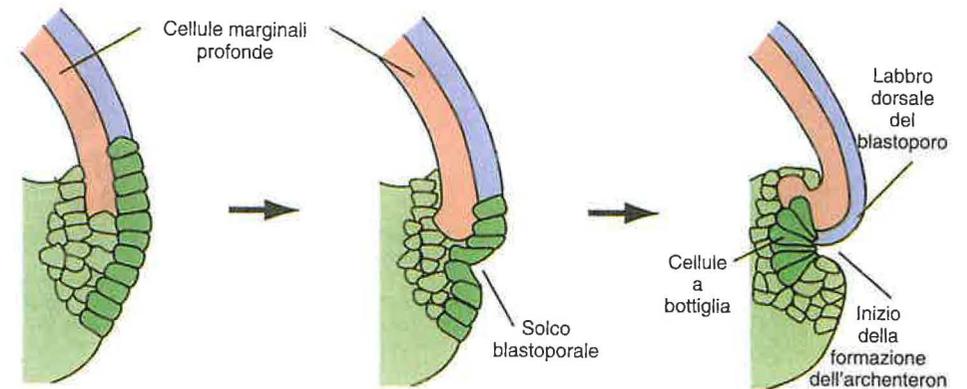
a) Microfotografie del solco blastoporale di *Xenopus* (x 150)



b) Formazione delle cellule a bottiglia



c) Schema di formazione dell'archenteron



Gastrulazione dello *Xenopus* (vista in sezioni sagittali)

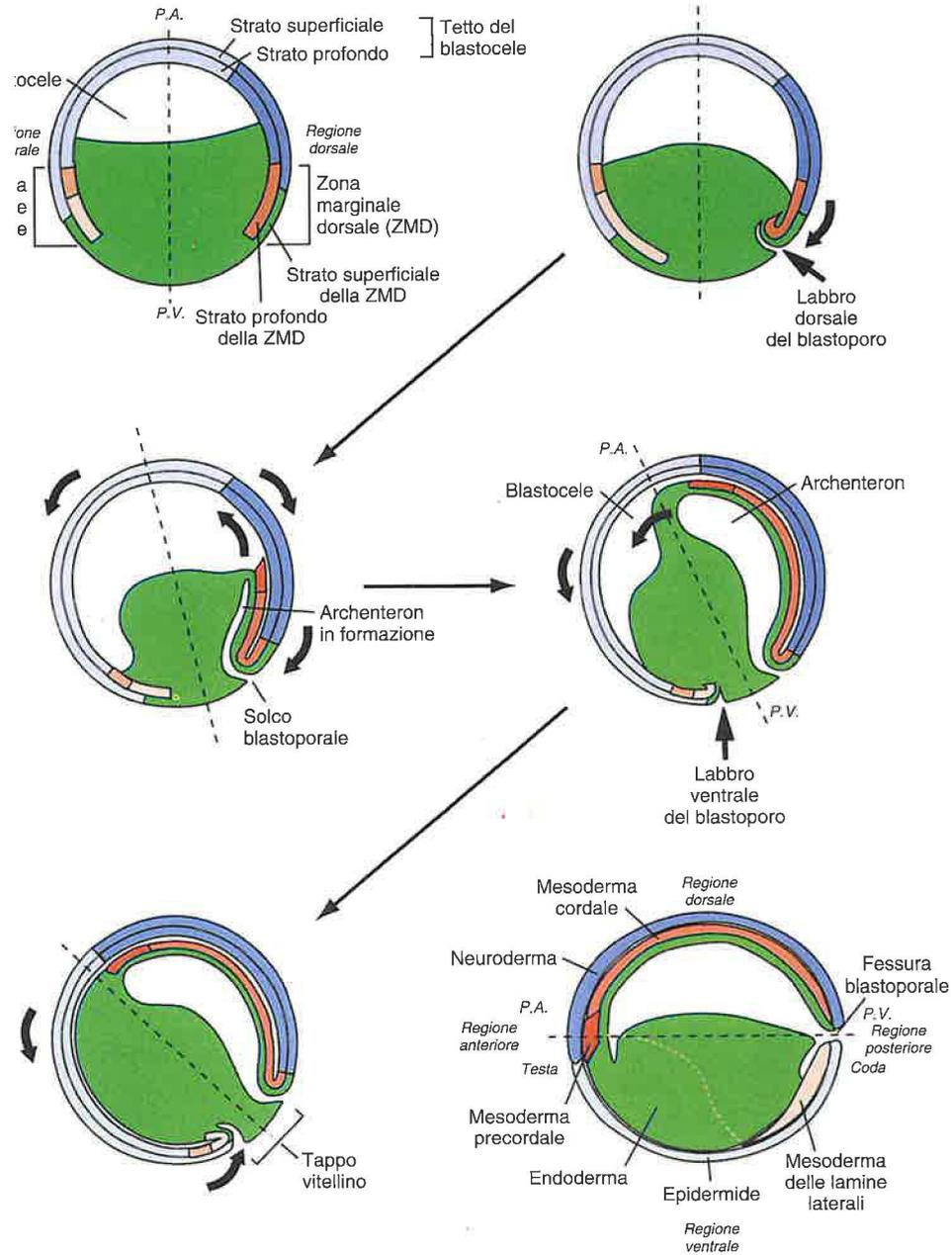


Fig. 8.6: Assi e movimenti morfogenetici della gastrulazione negli Anfibii Urodeli

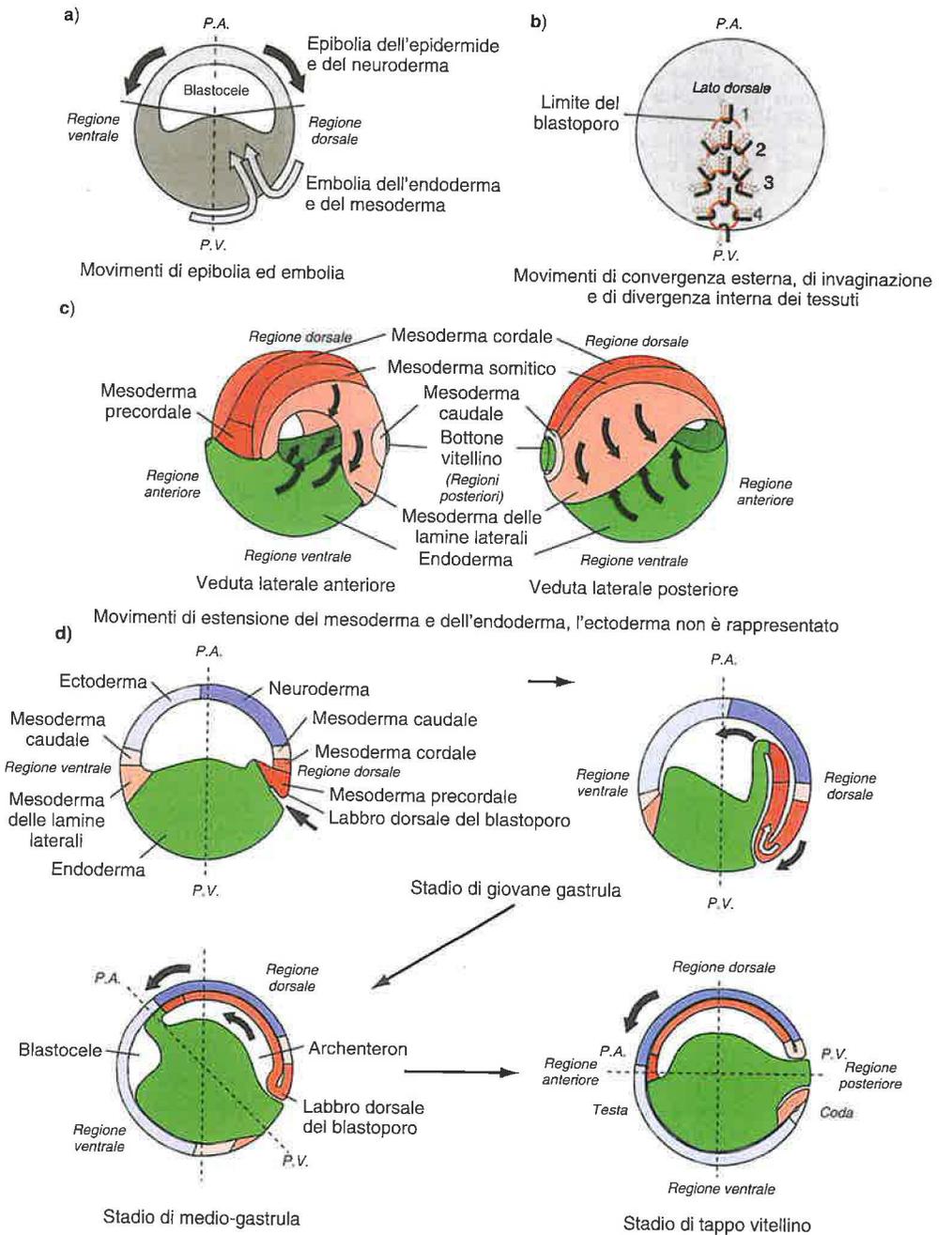


Fig. 8.5, Fig. 8.8a, illustranti il processo negli Urodeli. Il completamento di questo processo è indicato dalla formazione di una fessura blastoporale che rappresenta l'apertura verso l'esterno dell'intestino primitivo, l'archenteron. Questo orifizio è situato come per i Vertebrati nell'area della futura regione anale. A differenza di quanto si osserva negli Urodeli, negli Anuri esso in un secondo tempo si chiude e nel caso di *Xenopus*, l'ano si aprirà quindi successivamente.

La migrazione iniziale delle cellule a bottiglia, la quale costituisce l'evento che darà luogo alla gastrulazione, la quale prosegue poi grazie alla comparsa di altri movimenti morfogenetici. In effetti, la migrazione apicale delle cellule a bottiglia, che localmente deformano la superficie dell'embrione, fa sì che le cellule contigue della zona marginale si incurvano nel solco blastoporale e spingano le cellule vicine adiacenti verso l'interno dell'embrione. L'ultimo movimento esercita una pressione sulle cellule profonde della zona marginale dorsale che occupa il territorio mesodermico presuntivo; di conseguenza il materiale mesodermico precordale è costretto a ripiegarsi su se stesso e ad entrare in contatto con il strato interno delle cellule del mesoderma (Fig. 8.4 e Fig. 8.5). A partire da questo momento, si avvia un movimento di involuzione, paragonabile a quello di un *tapis roulant*, che va ad interessare le cellule della zona marginale profonda. Queste, una volta piegate verso l'interno, si spostano attivamente verso il polo animale e raggiungono gli strati interni che formano il tetto del blastocele. La migrazione di questo materiale mesodermico prende il posto del motore che avevano inizialmente le cellule a bottiglia e per l'entrata del materiale endodermico. Con modalità si spostano in posizione interna, per la migrazione nella regione dorsale, prima il materiale mesodermico precordale, che raggiungendo la regione dorsale dell'embrione darà origine al mesenchima centrale; successivamente al materiale mesodermico corale (Fig. 8.5).

Il movimento d'involuzione è accompagnato da riarrangiamenti cellulari. Poco dopo la loro penetrazione infatti le cellule dello strato profondo della zona marginale, inizialmente disposte su più strati, subiscono una **intercalazione radiale** e si dispongono in un solo strato cellulare, che si estende in direzione del polo ventrale. Inoltre le cellule mesodermiche che penetrano dorsalmente subiscono un secondo tipo di intercalazione, laterale e non più radiale, e si raggruppano lungo la linea medio-dorsale, provocando così un ispessimento antero-posteriore verso il polo animale. La struttura da esse formata. Questo fenomeno è noto con il nome di **estensione convergente**. La penetrazione del materiale mesodermico della zona marginale è prevalente nella regione dorsale ri-

spetto alle regioni laterali e ventrale, non soltanto perché inizia più precocemente ma anche a causa della estensione convergente. Questo comporta che, alla fine della gastrulazione, il tetto dell'archenteron sia formato essenzialmente dal materiale invaginato dorsalmente, e solo una parte minima della regione posteriore dell'archenteron provenga da processi di invaginazione nella regione latero-ventrale. Inoltre lo strato cellulare che delimita la parte superiore dell'archenteron è costituito dallo strato superficiale della zona marginale, trascinato passivamente dalla involuzione del materiale mesodermico. È da notare che questo strato non esiste negli Anuri e Urodeli. L'archenteron che si è costituito fin dalla comparsa del blastoporo, presenta nella sua parte anteriore le cellule a bottiglia, che evolveranno ulteriormente in cellule faringee dell'intestino anteriore. Infine le cellule vitelline, da cui origina l'endoderma, e che si sono invaginate in modo passivo, formano il pavimento dell'archenteron, la cui espansione ha progressivamente compresso il blastocele nella regione opposta al blastoporo, fino a renderlo una cavità virtuale (Fig. 8.5).

Parallelemente al movimento di involuzione che interessa le cellule profonde della zona marginale in corrispondenza del blastoporo, per **epibolia** le cellule ectodermiche tendono a rivestire progressivamente tutto l'embrione. La mappa dei territori presuntivi indica che sono responsabili di questo processo le cellule che costituiscono il tetto del blastocele a livello dell'emisfero animale. Esse sono disposte in più strati, di cui uno superficiale e almeno due più profondi. L'epibolia risulta da una parte da una attiva proliferazione cellulare, alla quale sono associate delle modificazioni della morfologia cellulare (appiattimento delle cellule superficiali), e dall'altra dalla riorganizzazione spaziale dei differenti strati cellulari. In effetti, alcuni cambiamenti di forma collegati a un processo di intercalazione radiale permettono alle cellule più profonde di inserirsi progressivamente tra le cellule degli strati cellulari superiori. Alla fine della gastrulazione, quando è terminata l'invasione del blastocele da parte dei tessuti mesodermici, l'embrione è ricoperto da un foglietto esterno, l'ectoderma, costituito da un solo strato di cellule.

A titolo comparativo, nella Fig. 8.6 sono illustrati i principali movimenti morfogenetici degli Urodeli.

## 8.4 L'organogenesi

In *Xenopus* così come negli altri Anuri, soltanto dopo che la gastrulazione è terminata, si manifestano i primi segni dell'organogenesi che inizia con la formazione del sistema nervoso. Diversamente da quanto avviene nei Vertebrati superiori, quindi le tappe dell'embriogenesi si realizzano in modo sequenziale.

### 8.4.1 La neurulazione

Durante la gastrulazione nell'embrione, che per tutta questa fase mantiene la sua forma sferica, a causa della ridistribuzione interna della massa cellulare endodermica ricca di tuorlo, si manifesta una rotazione in modo da orientare la regione ventrale verso il basso. La gastrulazione è considerata terminata nel momento in cui i tre foglietti si sono formati e hanno assunto una disposizione concentrica gli uni rispetto agli altri, da una posizione più superficiale a una più profonda; a questo stadio l'embrione comincia ad allungarsi secondo l'asse antero-posteriore. Parallelemente a questo cambiamento morfologico esterno, si produce un appiattimento e un ispessimento dello strato ectodermico dorsale. Questo fenomeno, che si manifesta verso la 15<sup>a</sup> ora dalla fecondazione, corrisponde alla comparsa della **piastra neurale**, la cui area coincide con la zona ectodermica situata al di sopra dell'archenteron (Fig. 8.7a). La piastra è delimitata da **pieghe** o **cercini neurali** per tutta la sua lunghezza e nella futura regione cefalica presenta una forma simile a quella di una racchetta da tennis. Progressivamente le pieghe neurali si avvicinano le une alle altre mentre la parte centrale della piastra si incurva, dando così origine alla **doccia neurale** (Fig. 8.7b; Fig. 8.8b). I due bordi di questa si ricongiungono prima nella regione del tronco, e successivamente le pieghe venute in contatto si saldano lungo la linea medio-dorsale per tutta la lunghezza dell'embrione. Così si forma il **tubo neurale**, che presenta nella sua regione anteriore un ampio rigonfiamento che darà origine all'encefalo (Fig. 8.7c; Fig. 8.8b). Alle estremità di questo tubo permangono in maniera transitoria degli orifizi, i **neuropori** anteriore e posteriore, che si chiuderanno in seguito. Il foglietto ectodermico dorsale che non partecipa alla formazione del tessuto nervoso, ricopre quest'ultimo e corrisponde ora all'**epidermide**. Infine nel corso del processo di chiusura del tubo neurale le cellule neuroectodermiche, che sono situate ai lati della linea dorsale di chiusura, si separano. Queste sono le **cellule delle creste neurali**, che successivamente migreranno e daranno luogo, in forme varie e differenziate, alla formazione di molteplici derivati tissutali. Gli embrioni in cui manifestano questi fenomeni sono indicati con il termine di **neurula**.

Durante questo stadio di sviluppo si osserva anche una riorganizzazione delle strutture interne dell'embrione. Nel foglietto mesodermico si ha la formazione della notocorda in posizione medio-dorsale, seguita dalla separazione del materiale mesodermico dei somiti e delle lamine laterali. L'inizio della somitogenesi si evidenzia nella regione anteriore mentre il mesoderma delle lamine laterali comincia a formare una cavità che costituirà il celoma. Al confine tra mesoderma somitico e quello delle lamine laterali si individua il mesoderma intermedio, che nella regione anteriore formerà il pronefro (Fig. 8.7c). Infine il tubo digerente comincia a regionalizzarsi. È da notare che negli Urodeli nella formazione del tubo digerente, a differenza degli Anuri, il tetto dell'archenteron è formato ini-

zialmente da materiale mesodermico e non da uno strato superficiale di cellule endodermiche. In questo caso, nella massa endodermica ventrale si forma una doccia longitudinale i cui bordi, richiudendosi dorsalmente, portano alla formazione del tubo digerente.

### 8.4.2 Il completamento dell'organogenesi

Nel corso delle ore che seguono, si realizza un modellamento progressivo delle principali strutture corporee che sono state abbozzate durante la neurulazione. I cambiamenti morfologicamente più evidenti sono l'allungamento globale dell'embrione e la divisione del corpo in tre grandi regioni: cefalica, del tronco e caudale (Fig. 8.9a-c). La formazione di una coda, a partire da una massa mesenchimale in sede posteriore, ha dato il nome di **bottone caudale** allo stadio che segue la neurulazione.

Nella testa, incurvata ventralmente prima di allinearsi lungo l'asse del corpo, sono presenti gli occhi e l'abbozzo delle ventose, organi tipici degli Anuri e deputati all'ancoraggio delle larve (gli Urodeli non li possiedono, ma presentano una struttura omologa per l'equilibrio, i bilancieri). Alla congiunzione con la regione del tronco si formano gli abbozzi delle branchie.

Il tronco è suddiviso per tutta la sua lunghezza in due parti: una dorsale, che mostra nettamente la metamerizzazione somitica, e una ventrale, il cui aspetto rigonfio è dovuto alla presenza del tubo digerente, le cui cellule sono cariche di riserve vitelline. Al confine tra queste due regioni si osserva una linea longitudinale per la presenza dell'uretere primario che si prolunga a partire da una piccola zona oblunga corrispondente al pronefro.

Posteriormente all'ano, che si è aperto e che segna il confine posteriore del tronco, una massa tissutale indifferenziata costituisce l'abbozzo della coda.

Allo stesso tempo, l'organizzazione interna si affina (Fig. 8.9a-b). Il sistema nervoso centrale prosegue la sua formazione in particolare modo con la formazione delle vescicole cerebrali (3 e 5), mentre ha inizio la formazione dei gangli simpatici a partire dalle cellule delle creste neurali. Nei somiti si individuano 3 regioni: dermatomo, miotomo e sclerotomo. Il mesoderma delle lamine laterali si cava formando la cavità celomatica, le cui pareti sono la **somatopleura** e la **splanchnopleura**. La prima si differenzierà soprattutto in strutture mesoteliali e la seconda, aderente all'endoderma, costituirà tra l'altro le tuniche connettivale e muscolare del tubo digerente. Ventralmente nella regione anteriore, si differenziano a partire dal materiale mesodermico gli elementi dell'apparato circolatorio (cuore, vasi e i precursori delle cellule del sangue). Dorsalmente, da una parte e dall'altra del mesentero dorsale, si formano per ispessimento dell'epitelio celomatico, le creste genitali. Al di sopra di quest'ultime, si forma un blastema nefrogeno mesenchimatico. Da questo si formerà il mesonefro in posizione

7. La neurulazione

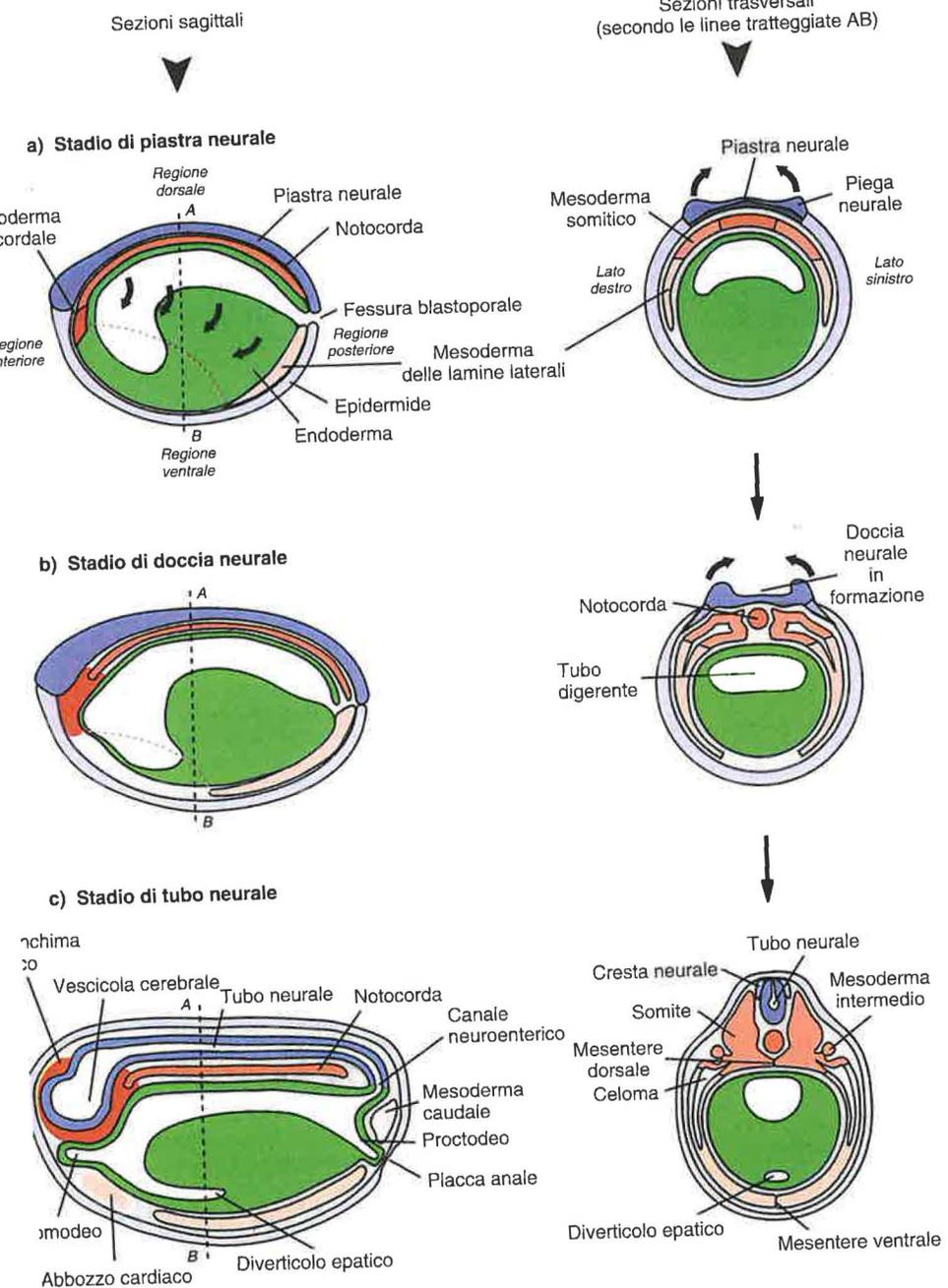
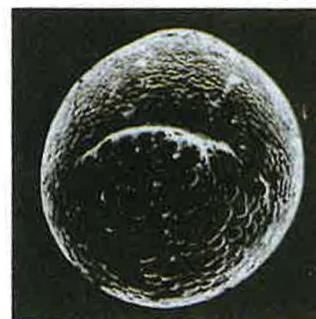


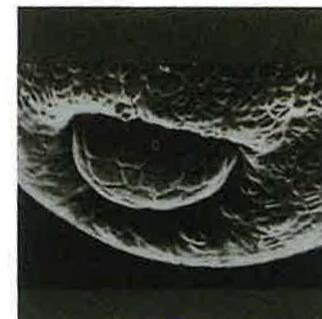
Fig. 8.8: Microfotografie della gastrulazione e della neurulazione nello *Xenopus*

a) La gastrulazione

(gli embrioni sono senza strato gelatinoso e senza membrana di fecondazione, x 50)



Giovane gastrula, una visione dorsale, allo stadio di solco blastoporale



Gastrula allo stadio di tappo vitellino

b) La neurulazione

(gli embrioni sono senza strato gelatinoso e senza membrana di fecondazione, x 50)



Giovane neurula allo stadio di doccia neurale



Medio-neurula, la doccia neurale è chiusa nella regione del tronco



Neurula tardiva

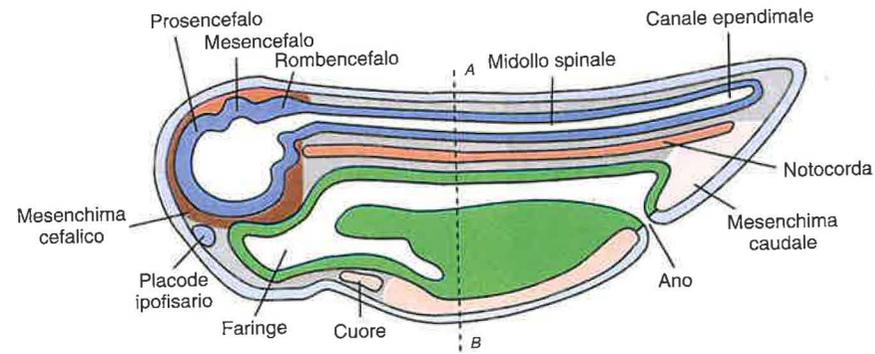
(da De Vos e Van Gansen, 1980)



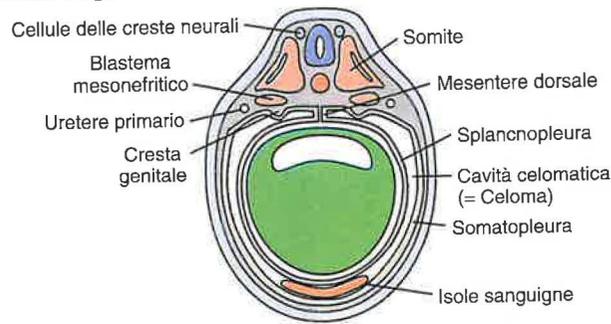
Bottone caudale

fig. 8.9: **Bottone caudale**

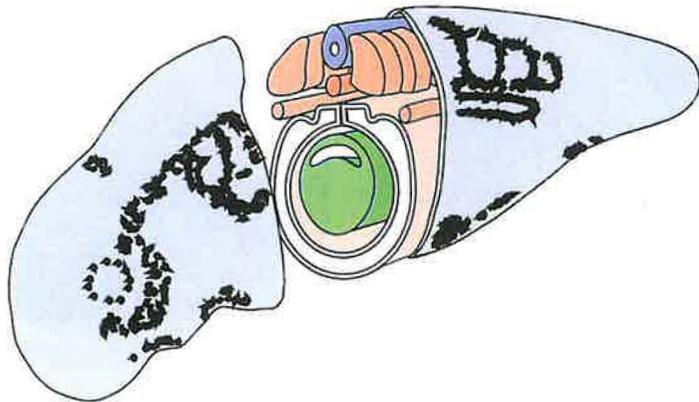
a) Sezione sagittale



b) Sezione trasversale lungo AB



c) Metamerizzazione somitica



posteriore rispetto al pronefro embrionale transitorio, precedentemente menzionato; il mesonefro costituirà il rene negli individui adulti. Infine a partire dal materiale endodermico, si formano le fessure branchiali nella regione faringea e cominciano a formarsi gli organi associati al tubo digerente (come il fegato, il pancreas...).

La schiusa avviene a circa 36 ore dalla fecondazione ed è notoriamente più precoce di quella che si

osserva negli altri Anfibi, specialmente a causa delle condizioni ambientali di temperatura (Tabella 8.1). La larva continua ad utilizzare le sue risorse fino all'apertura della bocca, in corrispondenza dello stomodeo; la larva condurrà una vita acquatica libera, aiutata in questo dalla respirazione branchiale e dalla presenza di una regione caudale differenziata in pinna. La metamorfosi darà origine a una forma adulta strettamente acquatica.

# Sviluppo di un Uccello: *Gallus domesticus*

# 9

Lo sviluppo degli Uccelli ha in tutti i tempi affascinato gli spiriti curiosi e, nel corso dei secoli passati, è stato il punto di partenza di numerose riflessioni sia sul piano scientifico che filosofico. Questo modello di sviluppo, in particolare quello del pollo, offre numerosi vantaggi. Infatti uova fecondate possono essere ottenute facilmente, l'osservazione è resa agevole dalle dimensioni degli embrioni, anche se questi non sono direttamente accessibili, e infine la durata dello sviluppo (20-21 giorni) è relativamente breve.

La formazione delle differenti strutture anatomiche e morfologiche nel corso dell'embriogenesi è ben conosciuta come risultato delle conoscenze accumulate nel corso dei secoli. Questa conoscenza ha rappresentato una condizione di partenza privilegiata per lo studio dei meccanismi alla base dei fenomeni osservati, utilizzando tutti gli approcci sperimentali resi disponibili dalla biologia moderna.

La possibilità di eseguire esperimenti di microchirurgia nel pollo ha permesso la realizzazione di numerosi trapianti tissutali. Si possono ricordare a questo proposito alcuni risultati fondamentali che sono stati ottenuti grazie alla realizzazione di chimere con delle specie tassonomicamente vicine, come ad es. la quaglia; questi studi sono stati sviluppati soprattutto dalla scuola francese di embriologia di Nogent.

Inoltre gli Uccelli, in quanto Amnioti, rappresentano un materiale privilegiato per studiare le modalità di sviluppo nei Vertebrati superiori. In effetti lo studio è più difficile o delicato sia nel caso dei Rettili (difficoltà d'allevamento e di ottenimento di deposizioni regolari) che dei Mammiferi (sviluppo *in utero*). Lo sviluppo del pollo ha permesso di studiare gli annessi embrionali, la cui comparsa è stata molto importante nei processi evolutivi. Indirettamente, l'esistenza degli annessi embrionali ha rappresentato un vantaggio per lo studio dell'embriologia poiché, conferendo una certa forma di indipendenza all'embrione nel corso dello sviluppo, ne ha permesso l'osservazione e/o la sperimentazione in questa specie che resta un modello sperimentale di grande attualità.

## 9.1 L'uovo indiviso

Al fine di evitare ogni ambiguità che può manifestarsi sul piano terminologico, è necessario precisare che cosa si intende con il termine "uovo di pollo", poiché questo termine è usato indifferentemente per indicare strutture il cui significato può essere diverso in un contesto scientifico o culinario. Il termine uovo utilizzato a proposito degli Uccelli designa generalmente l'oggetto depresso dalla gallina e che corrisponde ad un insieme complesso di strutture, risultanti da un processo di deposizioni successive che sono avvenute nell'organismo materno (*vedi sotto*). Se ci si riferisce al gamete femminile, in questo caso solo il "giallo" deve essere preso in considerazione, in quanto è questa la struttura corrispondente all'uovo che potrà essere fecondata, prima che si realizzi la formazione di strati di rivestimento durante il transito nelle vie genitali materne.

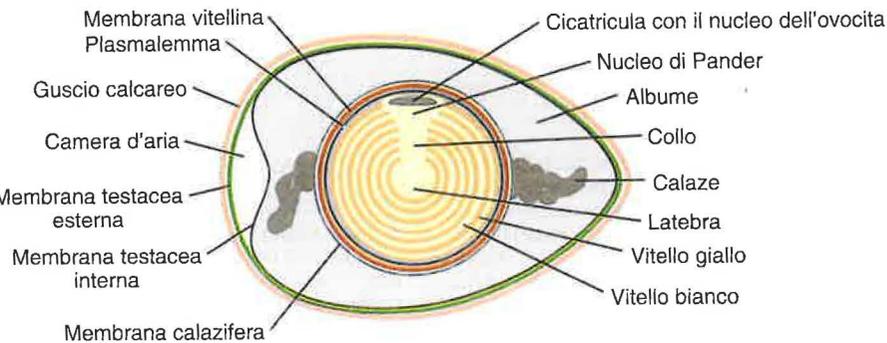
Negli Uccelli esistono solo l'ovaio e le vie genitali del lato sinistro. In questa gonade unica, da 8 a 10 giorni prima della deposizione dell'uovo, gli ovociti I subiscono un fenomeno di accrescimento dovuto ad un accumulo di sostanze di riserva depositate concentricamente con un ritmo giornaliero (essenzialmente durante la notte sono depositate le proteine idratate - vitello bianco - mentre durante il giorno si ha la deposizione di grassi e di pigmenti - vitello giallo). Questo accumulo di una notevole quantità di vitello sposta il nucleo, circondato da una zona di citoplasma privo di riserve, verso un polo della cellula. Il processo porta alla formazione del disco germinativo o cicatricola, di circa 3 mm di diametro, localizzata al polo animale (*Fig. 9.1a*). Questa poggia su una zona piatta di vitello bianco, il **nucleo di Pander**, che comunica per mezzo di un collo con la **latebra**, situata in profondità al centro della cellula.

Qualche minuto prima della ovulazione viene espulso il primo globulo polare e l'ovocita si arresta in seconda divisione meiotica, alla stadio di metafase. L'uovo è dunque un ovocita II che, per il suo elevato contenuto in vitello, rappresenta l'archetipo dell'uovo telolecitico.

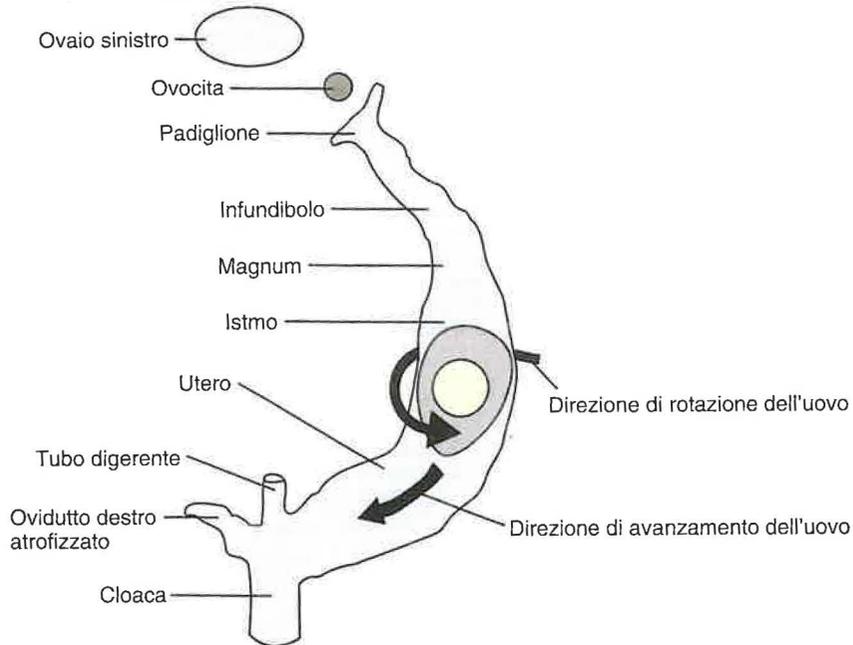
L'ovulo, che misura circa 3 cm di diametro, è raccolto a livello del padiglione della tuba situata all'estremità dell'ovidutto e può essere o no fecondata. In tutti i casi l'ovulo o lo zigote si incanala nell'ovidutto e lo percorre per finire nell'utero, dove vengono successivamente deposti gli altri rivestimenti (*Fig. 9.1b*).

## Organizzazione dell'uovo e transito nel tratto genitale materno

## Organizzazione dell'uovo



## Transito nel tratto genitale materno



Nel magnum, la parte superiore dell'ovidutto, in circa tre ore viene depositato il bianco o albume, il cui strato più interno forma la **membrana calazifera**; quest'ultima si spiralizza e forma ai due lati opposti del tuorlo, due **calaze** con un avvolgimento a destra per una e a sinistra per l'altra. Nell'istmo, sull'albume già formato, in un'ora viene secreta e deposta la **membrana testacea**, formata da un doppio strato, uno interno sottile ( $15\ \mu\text{m}$ ) ricco di fibre di cheratina e uno esterno più spesso di  $40\text{-}50\ \mu\text{m}$  posizionato contro lo strato interno del guscio. In corrispondenza del polo ottuso questi due strati si allontanano e danno origine alla formazione della **camera d'aria**. L'uovo arriva finalmente nell'utero nel quale permane per circa 20 ore, periodo durante il quale aumenta considerevolmente il suo volume grazie all'idratazione dell'albume, dovuta a secrezione della parete uterina. È in questa parte distale del tratto genitale che si forma un **guscio poroso** impregnato di **calcare**. Questa mineralizzazione differenzia l'uovo degli Uccelli da quello dei Rettili, nella maggior parte dei quali il guscio resta molle. Quest'ultimo rivestimento, che si forma in 20 ore circa, è costituito da tre strati: uno esterno, che forma una fine cuticola proteica, uno intermedio, di tessuto spugnoso contenente cristalli di calcite disposti in maniera radiale, e uno interno, che presenta diverse protuberanze (strato mammillare). I tempi necessari per la deposizione di questi diversi rivestimenti fanno sì che possa essere depositato un solo uovo al giorno.

È da notare che durante il transito nelle vie genitali, se l'uovo è stato fecondato, cominciano le prime fasi dell'embriogenesi. Quando l'uovo viene espulso dall'organismo materno attraverso la cloaca, sono passate 24 ore dall'ovulazione. Lo sviluppo avviato in questo periodo non continua, se all'esterno dell'organismo materno non viene mantenuta una temperatura fisiologica di circa  $38^\circ\text{C}$  di incubazione. Questa condizione è in natura realizzata con la cova (Tabelle 9.1 e 9.2).

## 9.2 La segmentazione

A causa della rilevante quantità di tuorlo contenuto nel citoplasma, le divisioni di segmentazione non possono interessare l'intero uovo, e la segmentazione è dunque parziale, vale a dire di tipo **meroblastico**. Inoltre essa risulta essere **discoidale**, in quanto nelle divisioni mitotiche è coinvolto soltanto il disco germinativo, dando così origine a una struttura chiamata **blastoderma**.

La prima divisione avviene 4-5 ore dopo la fecondazione e si manifesta sotto forma di un solco meridiano. La seconda divisione si effettua circa 20 minuti dopo la precedente con un solco di divisione perpendicolare al primo. Un'ora dopo il 2° ciclo di divisione appaiono due

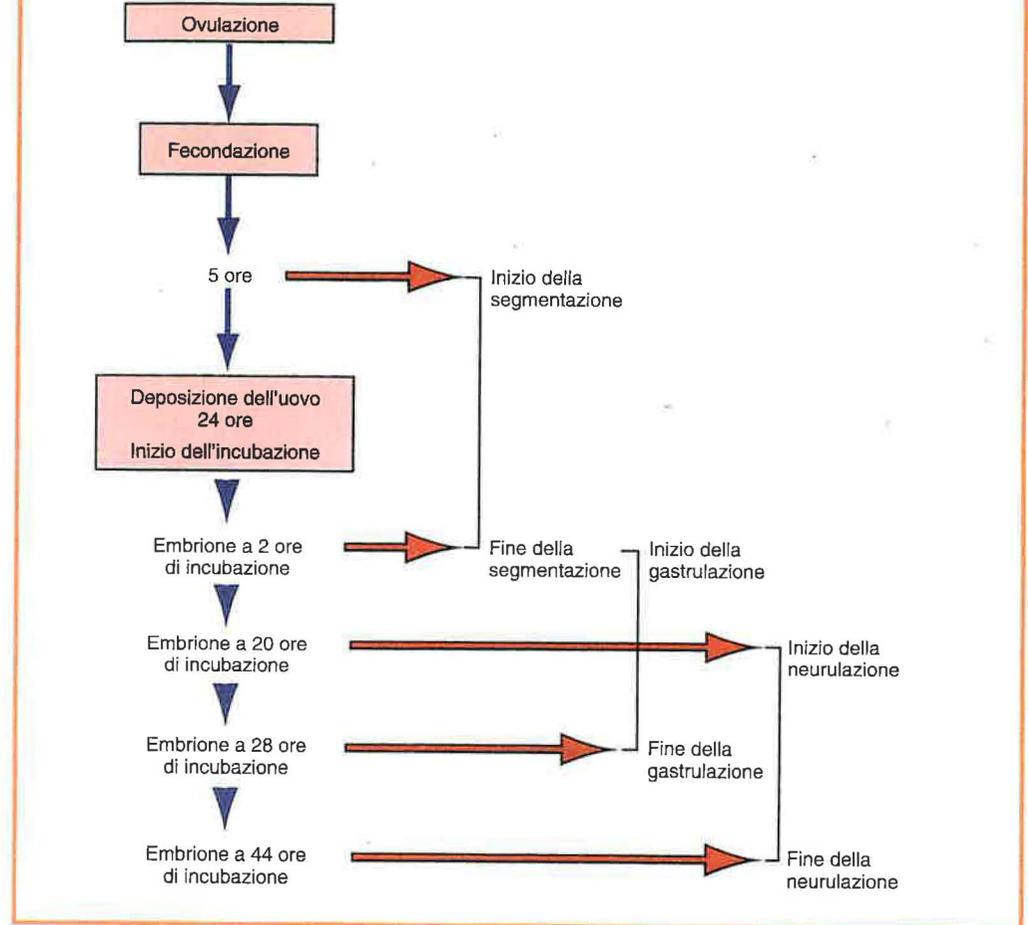
piani di divisione, paralleli al primo piano di segmentazione, che portano allo stadio di 8 blastomeri. Questo stadio corrisponde generalmente all'arrivo dell'uovo fecondato nell'utero. Il 4° ciclo di divisione avviene con un piano di divisione perpendicolare a tutti i piani di divisione precedenti e che determina la formazione di 16 blastomeri (Fig. 9.2a). Nel corso di queste prime divisioni il confine della membrana plasmatica che delimita ogni singolo blastomero non è completo; essi, infatti, rimangono aperti sulla massa vitellina sottostante (Fig. 9.2b). A partire dal 5° ciclo, il susseguirsi delle divisioni si effettua in modo più irregolare. Una veduta superficiale della cicatrice rivela la comparsa di cellule di aspetto più o meno sferico in posizione centrale, mentre alla periferia del blastoderma si osservano dei solchi radiali che danno origine a dei blastomeri solo parzialmente separati dal vitello (Fig. 9.2a). Allo stadio di 64 blastomeri compaiono in profondità dei piani di segmentazione paralleli alla superficie del blastoderma, che determinano una separazione progressiva delle cellule centrali rispetto allo strato di tuorlo sottostante. Così, allo stadio di 128 cellule, si osserva un blastoderma pluristratificato, che nella parte centrale è sovrastante a una **cavità sub-germinale** appiattita, chiamata anche **blastocela primaria**, il cui pavimento è formato dalla massa vitellina; a contatto con quest'ultima sono posizionati, in posizione periferica, alcuni blastomeri voluminosi, che mantengono la continuità con la massa vitellina e delimitano alla loro periferia le cellule centrali (Fig. 9.2b). A partire da questo stadio, con le divisioni successive, le cellule diventano più numerose, e superficialmente comincia a manifestarsi una generale espansione del blastoderma. Si giunge così alla formazione di una **blastula primaria**, nella quale si distinguono due grandi zone: una regione centrale, l'**area pellucida**, costituita dalle cellule sovrastanti il blastocela primaria, e una regione periferica, l'**area opaca**, formata da più strati di cellule marginali. Nell'area opaca, si possono distinguere più regioni. Da una parte, alcuni blastomeri ben definiti formano sia una **zona germinativa**, direttamente in contatto con le cellule centrali dell'area pellucida, sia una **zona di rivestimento** situata ai limiti esterni della blastula. Questa zona è sede di una intensa attività mitotica. Inoltre, alcuni blastomeri localizzati in profondità, in continuità con il tuorlo, costituiscono una **zona di congiunzione** che mantiene una struttura sinciziale (Fig. 9.3a).

Poco prima della deposizione dell'uovo si forma uno strato supplementare, l'**ipoblasto**, che determina la formazione di un embrione bi-stratificato: la **blastula secondaria**. Questo evento rappresenta una tappa importante poiché la formazione di questa struttura corrisponde alla prima manifestazione morfologica della esistenza nel blastoderma di assi di polarità, i quali successivamente determineranno l'orientamento del corpo del futuro embrione. In effetti a questo stadio nell'area pellucida, formata da circa 6 strati cellulari, si osserva un fenomeno di **delaminazione** in direzione

Tab. 9.1: Cronologia dello sviluppo di Gallus domesticus (38°C)

Tempi	Tappe	Stadi
0 h	Fecondazione	1
5 h	Inizio della segmentazione	2
23/25 h	Fine della segmentazione	6
23-26 h	Inizio della gastrulazione, 1 somite	7
26-29 h	4 somiti	8
29-33 h	7 somiti	9
33/38 h	10 somiti	10
40/45 h	Inizio della neurulazione, 13 somiti	11
45/49 h	16 somiti	12
48/52 h	Fine della gastrulazione, 19 somiti	13
50/53 h	22 somiti	14
50/56 h	24/28 somiti	15-16
51/68 h	Fine della neurulazione, 26-36 somiti	16-18
68/72 h	37/43 somiti	19-20
84/96 h	44 somiti	21-22
20/21 giorni	Schiusa	46

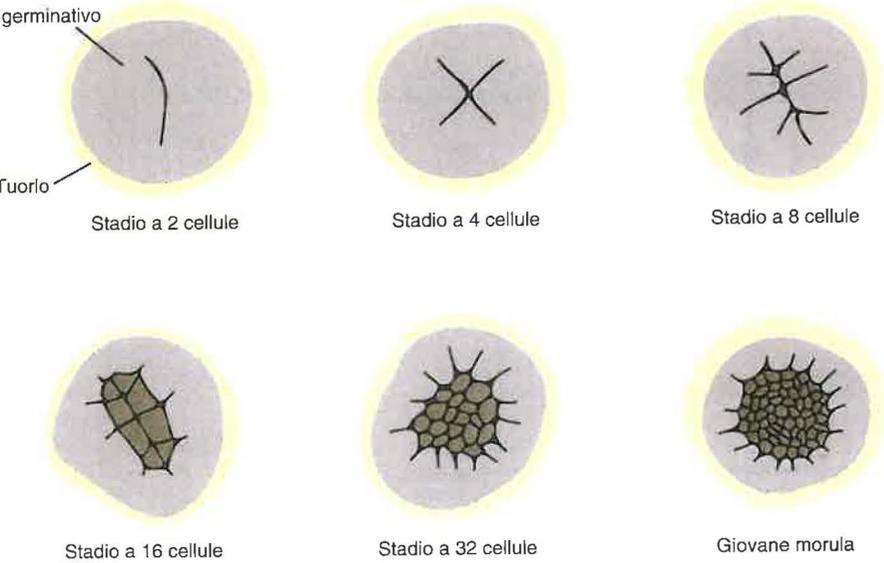
Tab. 9.2: Tempi delle prime tappe dello sviluppo di Gallus domesticus (38°C)



(da Hamburger e Hamilton, 1951)

2: La segmentazione

servazione ed evoluzione in una veduta polare del disco germinativo



servazioni in sezione del disco germinativo

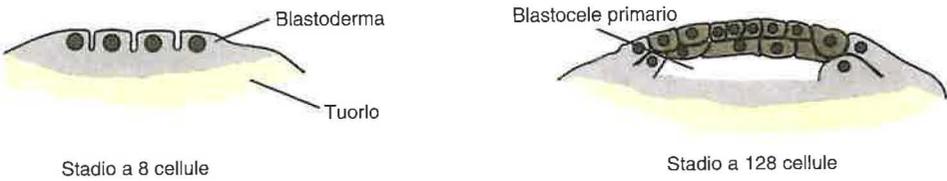
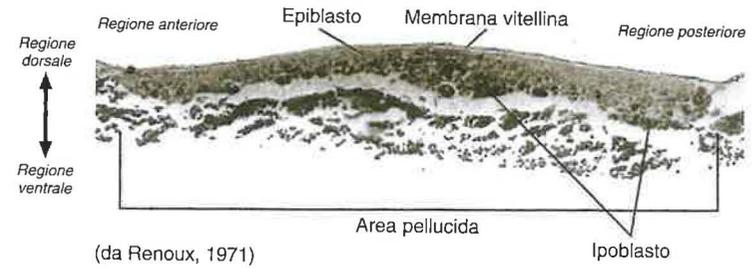
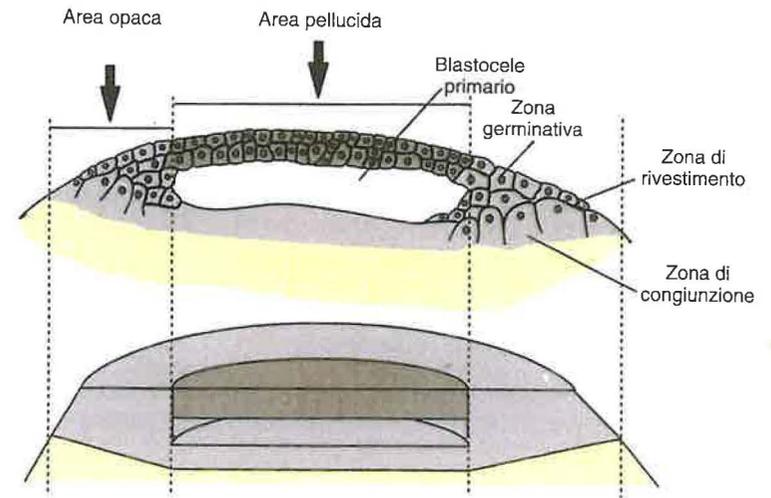


Fig. 9.3: Gli stadi di blastula primaria e secondaria

a) Blastula primaria (sezione, schema e microfotografia [x 375])



b) Blastula secondaria

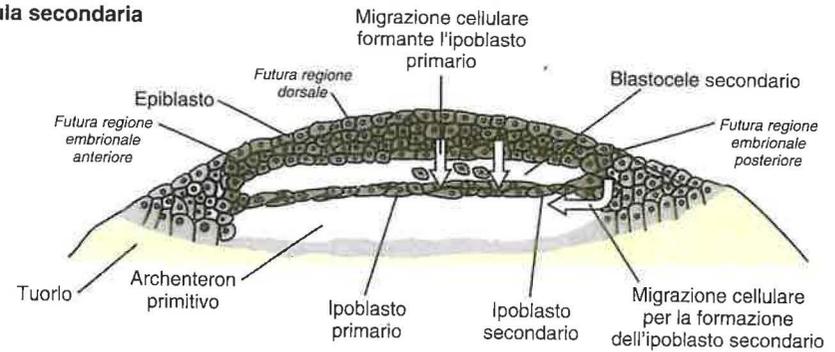
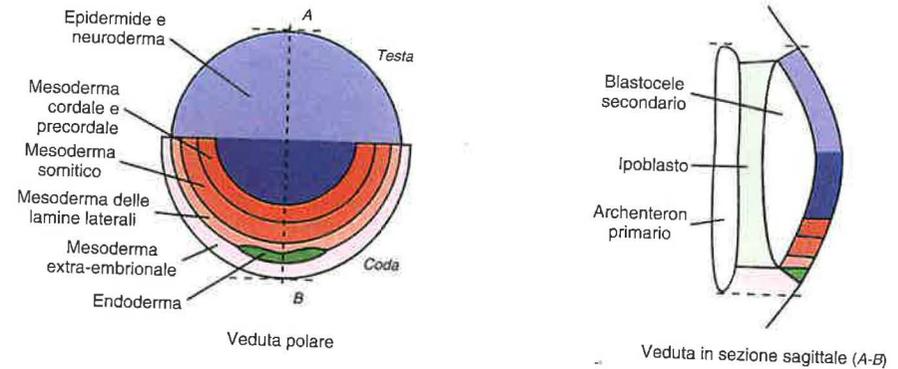
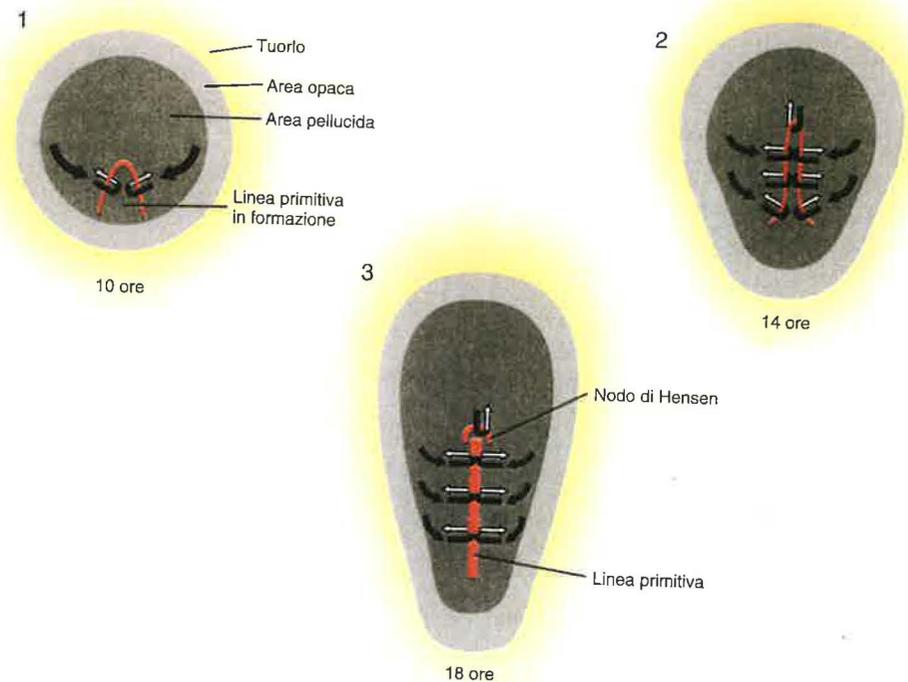


Fig. 9.4: Mappa dei territori presuntivi e fasi iniziali della gastrulazione

## a) Mappa dei territori presuntivi a livello dell'epiblasto



## b) Gastrulazione: movimenti di convergenza, formazione della linea primitiva e del nodo di Hensen



convergenza precedentemente citato, si manifestano dei movimenti d'immigrazione (ingresso) riguardanti l'endo-mesoderma, di divergenza per il mesoderma embrionale ed extra-embriionale così come per l'endoderma, e di allungamento, che coinvolge l'embrione nel suo complesso.

Verso le 10-12 ore d'incubazione, cominciano a manifestarsi nella regione posteriore dell'area pellucida, i movimenti di immigrazione che interessano il materiale mesodermico extra-embriionale e il materiale endodermico (Fig. 9.5a-b). Le cellule endodermiche migrano individualmente e si inseriscono nell'ipoblasto sottostante, respingendo le cellule ipoblastiche da una parte e dall'altra della linea mediana fino all'area extra-embriionale. A partire soltanto da questo materiale endodermico si formerà l'abbozzo dell'apparato digerente dell'embrione.

A partire dalla 14<sup>a</sup> ora di incubazione, il movimento di immigrazione si estende ai territori mesodermici embrionali. La immigrazione si accompagna alla comparsa nell'epiblasto di una piccola depressione longitudinale medio-dorsale, che porta alla formazione di un solco, la **linea primitiva**. Questa si può considerare omologa al blastoporo descritto negli Anfibi. All'estremità anteriore di questo solco si forma il **nodo di Hensen**, una piccola protuberanza, sede di una ingressione cellulare attiva paragonabile a quella osservata a livello del labbro dorsale del blastoporo degli stessi Anfibi (Fig. 9.4b2, 3). È da notare che la linea primitiva si ritrova anche nei Mammiferi, mentre è assente nei Rettili. In questi ultimi persiste la formazione di un blastoporo, e lo svolgimento della gastrulazione presenta numerosi tratti misti, vale a dire caratteristiche comuni sia ai Vertebrati inferiori che superiori.

Nelle ore che seguono il materiale mesodermico embrionale che si è inserito tra lo strato epiblastico e il foglietto interno ipoblasto-endoderma, si congiunge tramite il territorio delle lamine laterali al mesoderma extra-embriionale. Per un movimento di divergenza, l'insieme di questi territori forma una lamina che si estende lateralmente avanzando verso la regione anteriore (Fig. 9.5c-e).

Verso la 18<sup>a</sup> ora, la linea primitiva presenta la massima estensione. Inoltre anteriormente al nodo di Hensen, si osserva in trasparenza negli strati più profondi una struttura allungata denominata **prolungamento cefalico**. Questa struttura si forma per condensazione in posizione medio-dorsale anteriore del materiale mesodermico assiale internalizzato, che costituirà i territori cordali e pre-cordali (Fig. 9.5e). Posteriormente al prolungamento cefalico, in continuità con la corda in formazione, si localizza il materiale cellulare somitico, affiancato al materiale mesodermico delle lamine laterali.

cavità subgerminale. Questa migrazione cellulare alla formazione di isolotti formati da 5-20 cellule insieme dei quali costituisce l'ipoblasto prima a maggior parte delle cellule centrali resta in situ formando l'epiblasto che costituisce la regione e blastodermica. L'ipoblasto primario sottostante a in posizione centrale (Fig. 9.3b). La formazione di ipoblasto corrisponde all'espressione di una prima tappa assiale, dorso-ventrale, cui va ad aggiungersi dopo una seconda, antero-posteriore. Infatti, subito dopo la comparsa delle cellule ipoblastiche primarie, si ha la migrazione di uno strato laminare di cellule proveniente dal limite dell'area opaca, da una parte che diventerà la regione posteriore del blastocoele. Questa popolazione cellulare che forma l'ipoblasto secondario incorpora, via via nella sua progressione verso la regione anteriore, gli ammassi cellulari dell'ipoblasto primario. In questo modo si forma l'ipoblasto, che divide il blastocoele primario in due cavità distinte: una superiore situata sotto l'epiblasto (blastocoele secondario) e una inferiore direttamente al di sotto della massa vitellina (archenteron primitivo) (Fig. 9.3c). L'embrione che presenta questa organizzazione è la **blastula secondaria**. In questa, a livello dell'epiblasto, la sola regione che darà origine all'embrione, è stata individuata una mappa di territori presuntivi (Fig. 9.4a). L'ipoblasto invece formerà le strutture associate a uno degli annessi embrionali, il vitellino.

l'uovo è generalmente deposto a questo stadio di sviluppo e il proseguimento dell'embriogenesi si potrà osservare solo se si effettua una incubazione. Nel pollo l'uovo si completa in circa 21 giorni a 38°C (vedi Fig. 9.1). A partire dalla deposizione, le varie tappe dello sviluppo sono definite in relazione ai tempi di incubazione.

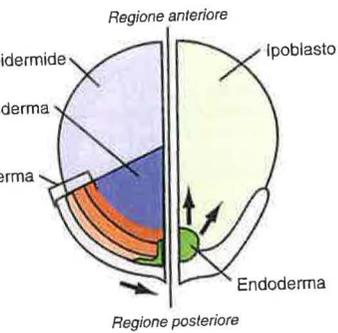
## La gastrulazione

I primi segni della gastrulazione si manifestano qualche ora dopo la deposizione, con la comparsa di una concentrazione di materiale cellulare epiblastico nella regione marginale posteriore dell'area pellucida (Fig. 9.4a). Questa concentrazione è dovuta a un movimento di convergenza che interessa i territori mesodermici e, in misura minore, l'endoderma, poiché quest'ultimo si trova situato all'inizio in posizione posteriore (Fig. 9.4a). L'ispessimento epiblastico risultante da questo movimento di cellule è in un primo tempo di forma ovale, poi va progressivamente allungandosi anteriormente e concentrandosi lungo la linea medio-dorsale (Fig. 9.4b2).

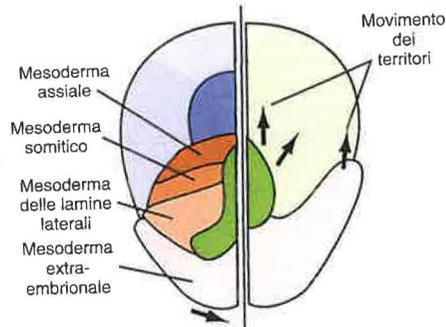
Nel corso delle tappe dello sviluppo, che si svolgono nelle prime 20 ore di incubazione, sono osservabili movimenti morfogenetici. Oltre al movimento di

## Convergenza esterna e divergenza interna dei territori

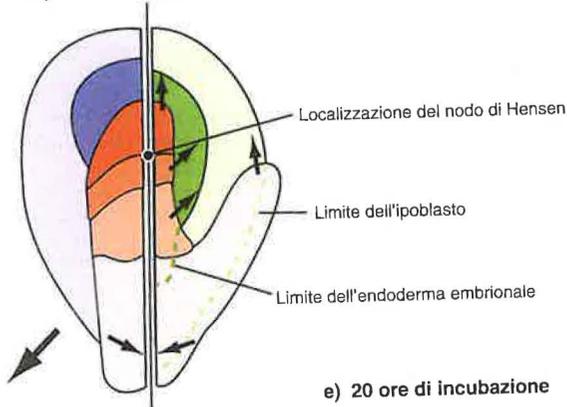
a) 12 ore di incubazione



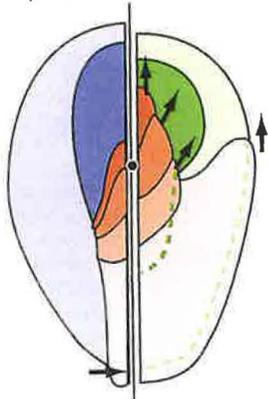
b) 13 ore di incubazione



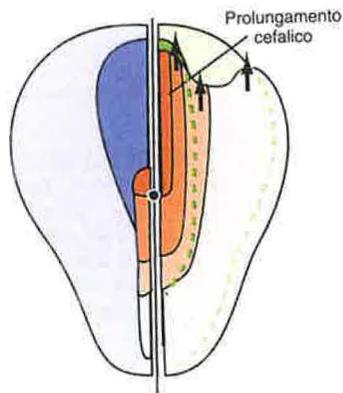
c) 15 ore di incubazione



d) 16 ore di incubazione



e) 20 ore di incubazione



Con il progressivo spostamento in profondità del materiale mesodermico, e in particolare di quello assiale, si osserva una parallela diminuzione della lunghezza della linea primitiva, con uno spostamento in posizione sempre più posteriore del nodo di Hensen, dando così l'impressione che quest'ultimo indietreggi verso la futura estremità caudale. In realtà, l'avanzamento dello sviluppo embrionale procede lungo l'asse antero-posteriore, con la formazione prima delle strutture della regione anteriore e successivamente di quelle della regione posteriore. Quindi a 18 ore, mentre sta ancora avvenendo l'ingresso in corrispondenza della linea primitiva nella regione posteriore, nella regione anteriore cominciano le prime fasi dell'organogenesi con la formazione della notocorda. Questo fenomeno è ben evidente nella osservazione di sezioni trasversali a diversi livelli lungo l'asse dell'embrione (Fig. 9.6a). Lo sfasamento nella formazione delle strutture lungo l'asse antero-posteriore è schematizzato a 20 ore di incubazione nella Fig. 9.6b e prosegue nelle ore successive.

Parallelamente al posizionamento dei tre foglietti embrionali con una disposizione relativa sovrapposta, si assiste anche ad un generale allungamento dell'embrione accompagnato da un considerevole rigonfiamento della regione anteriore rispetto a quella posteriore (Fig. 9.5e).

A 20 ore di incubazione, la gastrulazione è considerata in larga parte conclusa, in quanto permane sulla superficie dell'embrione solo materiale ectodermico, almeno nella regione anteriore e mediana. Tuttavia, nella regione posteriore continua lo spostamento all'interno dell'embrione del materiale mesodermico a livello della linea primitiva, il cui progressivo accorciamento è cominciato a partire dalla 18ª ora.

## 9.4 L'organogenesi

## 9.4.1 Eventi precoci

L'organogenesi si manifesta pienamente a partire dalla 20ª ora di incubazione con la comparsa dei primi segni della neurulazione nella regione anteriore. L'ectoderma disposto al di sopra del materiale mesodermico assiale, corrispondente al prolungamento cefalico, s'ispesisce e viene delimitato lateralmente da due pieghe neurali (Fig. 9.7). Queste tendono progressivamente a riavvicinarsi sulla linea mediana e vanno a formare una doccia neurale che comincerà a chiudersi nella regione, che diventerà il cervello medio (vedi sotto). Come descritto precedentemente, con l'avvio dell'organogenesi continua ad essere evidente la differenza tra regioni anteriori e posteriori con la formazione del sistema nervoso, che inizia nella regione cefalica, mentre nella regione posteriore è ancora in corso la gastrulazione. A questo proposito si può notare che fin dalla 18ª ora si formano i territori che daranno origine ai placodi sensoriali.

Parallelamente a questi eventi, la parte anteriore dell'embrione comincia a sollevarsi sulla massa vitellina, in seguito alla formazione della plica cefalica ectodermica ventrale. Durante questo processo, l'endoderma sottostante subisce un ripiegamento favorendo la formazione dell'intestino anteriore. Questi processi sono illustrati nella Fig. 9.8a, che si riferisce allo stadio a 24 ore di incubazione. Infine, intorno alla 20-21ª ora, a partire dal mesoderma parassiale si differenzia il primo paio di somiti. Nelle ore successive, compare una coppia di somiti ogni ora e mezza di incubazione e in seguito ciascun somite si suddivide in tre parti: sclerotomo, miotomo e dermatomo.

Le tappe considerate più significative per l'elaborazione delle strutture embrionali corrispondono ai tempi di incubazione di 24, 33, 48 e 72 ore.

## 9.4.2 Da 24 a 33 ore di incubazione

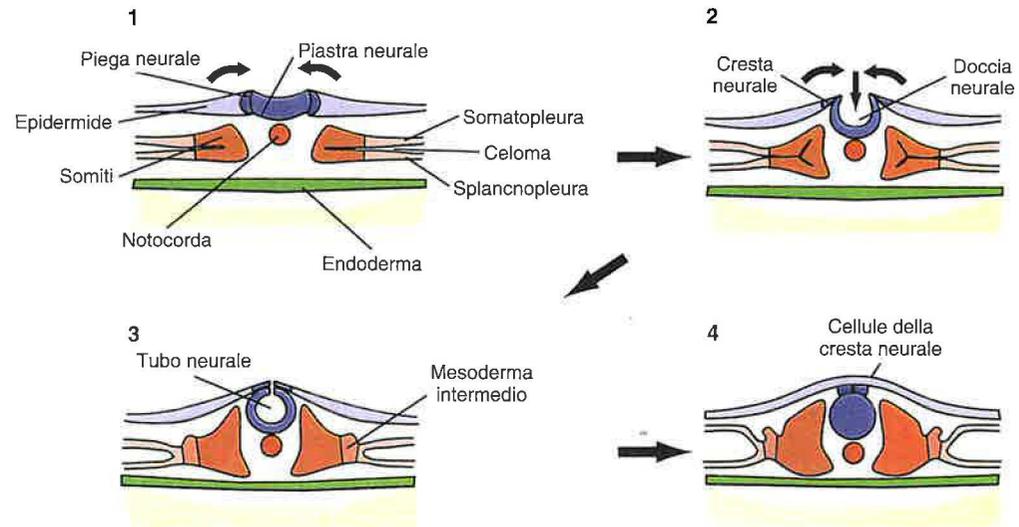
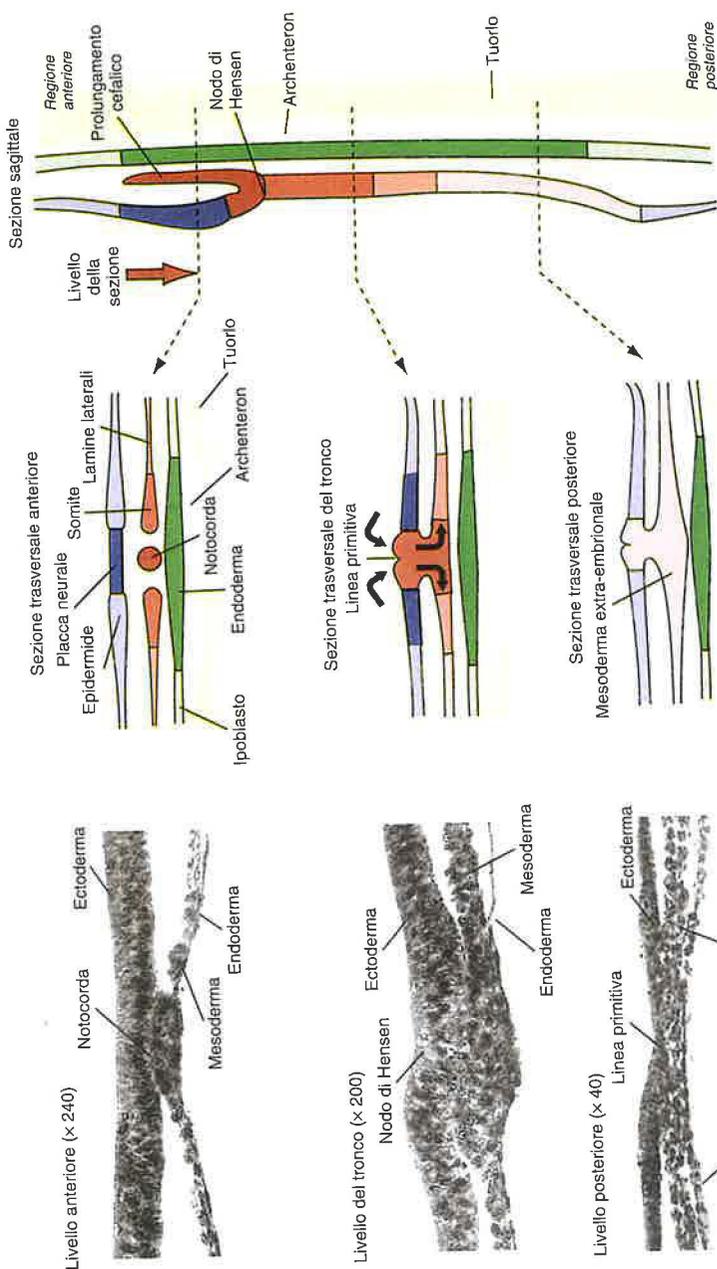
La fusione delle pieghe neurali inizia nella regione medio-dorsale verso la 26ª ora di incubazione all'altezza del cervello medio e prosegue anteriormente, realizzando così la formazione del cervello tra le 30-33 ore. A questo stadio, il prosencefalo, il mesencefalo e il rombencefalo derivati dalla vescicola cerebrale primitiva sono chiaramente separati (Fig. 9.8b). Il prosencefalo presenta delle grandi vescicole laterali, dalle quali si differenzieranno in seguito le vescicole ottiche. Il tubo neurale alle sue estremità presenta due orifizi, i neuropori, che transitoriamente mettono in comunicazione il lume del tubo con l'esterno. Il neuroporo anteriore si oblitera rapidamente, mentre quello posteriore si oblitererà soltanto verso la 44ª ora, una volta che la chiusura del tubo neurale nella regione caudale sia stata completata. All'estremità posteriore, le pieghe neurali ancora aperte si chiudono lentamente mentre la linea primitiva è in corso di regressione. Questa zona costituisce il seno romboidale.

Inoltre dopo la 30ª ora, in seguito alla chiusura progressiva del tubo neurale, nella regione cefalica si manifesta la delaminazione delle cellule della cresta neurale. Questo processo prosegue nelle ore successive (es. delaminazione nella regione del tronco a 48 ore), seguendo la chiusura del tubo neurale in direzione posteriore. Nello stesso tempo, le singole cellule della cresta neurale cominciano a migrare verso i diversi siti dove si realizzerà il loro differenziamento terminale.

Nel blastoderma il mesoderma è inserito tra l'ectoderma e l'endoderma, salvo che nella regione anteriore dove questi due foglietti, appiattiti l'uno contro l'altro, formano la regione del proamnio (Fig. 9.8a). Ai due lati della corda, in direzione antero-posteriore, si realizza la metamerizzazione del mesoderma parassiale dando origine ai somiti. Il numero di questi passa all'incirca da 4 a 12-13 entro le 24 e le 33 ore di incubazione.

Fine della gastrulazione e neurulazione

Fig. 9.7: Neurulazione (osservata in tempi successivi su sezioni allo stesso livello della regione anteriore)



zione. Lateralmente ai somiti, il mesoderma non segmentato forma il **mesoderma intermedio**. Nel mesoderma delle lamine laterali, in seguito alla formazione della cavità celomatica, si distinguono due foglietti separati, la **somatopleura**, addossata all'ectoderma, e la **splanchnopleura**, addossata al foglietto misto endoderma/ipoblasto. In questo periodo, il celoma si suddivide in due regioni: il celoma embrionale in corrispondenza dell'embrione e il celoma extra-embryonale presente nella restante parte del blastoderma (Fig. 9.9). Alla periferia di quest'ultimo, il mesoderma delle lamine laterali extra-embryonale, non ancora separato in foglietti, si inserisce nell'area opaca e partecipa alla formazione degli annessi embrionali (Fig. 9.8b). Dopo 24 ore, nella parete della splanchnopleura extra-embryonale si formano delle **isole sanguigne**, da cui originano le cellule del sangue e capillari sanguigni, che formeranno l'area vascolare extra-embryonale.

intorno al tubo cardiaco (futuro **endocardio**), si forma un rivestimento esterno (futuro **miocardio**) dovuto alla fusione sulla linea mediana della splanchnopleura. Lo spazio che separa le due strutture costituisce la **cavità pericardica**. Infine intorno alle 96 ore, in seguito a una colonizzazione cellulare secondaria, si formerà sulla superficie del miocardio, uno strato epiteliale corrispondente al **pericardio**.

Posteriormente alla regione cefalica, in posizione ventrale rispetto all'intestino anteriore formato dal ripiegamento dell'endoderma, si evidenzia l'abbozzo cardiaco. A partire dalle 24 ore, cellule provenienti dalla splanchnopleura embrionale formano due strutture vascolari, che a 30 ore si fondono in posizione mediana dando origine ad un unico tubo cardiaco. Questo si prolunga in avanti nell'aorta ventrale che si biforca formando la prima coppia di archi aortici; questi ultimi assicurano la connessione con l'aorta dorsale che si prolunga verso la regione posteriore dell'embrione. Inoltre,

Nel corso della sua formazione, il cuore si dilata e si piega progressivamente verso destra. In più nella struttura cardiaca in formazione si realizza una separazione in compartimenti, che porta alla comparsa, dalla regione anteriore verso quella posteriore, del **bulbo cardiaco**, del **ventricolo**, dell'**atrio** e del **seno venoso**, al quale si congiungono due **vene onfalomesenteriche** neoformate. L'insieme di questi eventi è illustrato nelle **Figg. 9.8b e 9.9**.

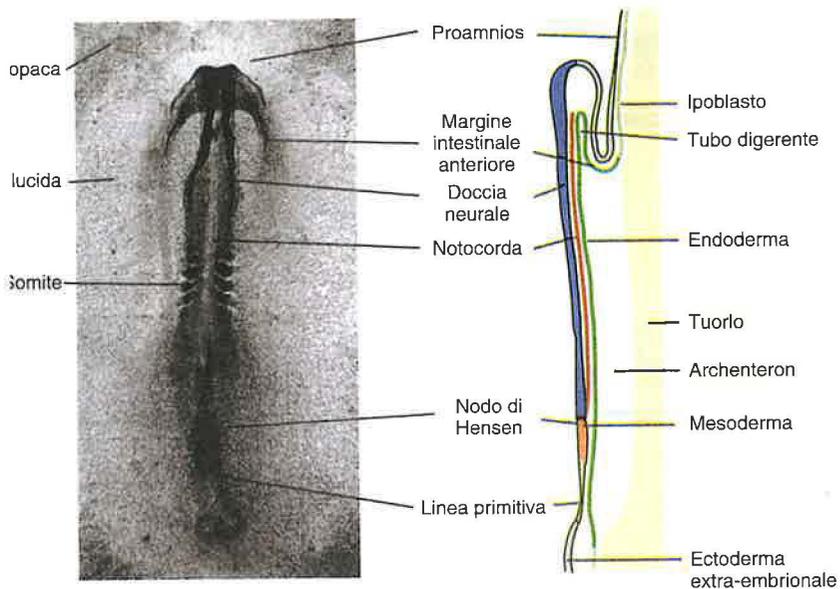
9.4.3 Da 33 a 72 ore di incubazione

A partire dalla 35-36<sup>a</sup> ora d'incubazione si manifesta nella regione anteriore dell'embrione una flessione della regione cefalica e una torsione del corpo verso destra. Questi due fenomeni modificano l'aspetto generale dell'embrione che, nella sua parte anteriore, appare adagiato sul fianco sinistro mentre la regione del tronco e caudale restano appoggiate ventralmente sulla massa vitellina (Fig. 9.10 e Fig. 9.11).

(da Renoux, 1971)

Embrioni a differenti stadi di sviluppo in una veduta "in toto" (fotografie da Renoux, 1971)  
 > in sezione sagittale

a 24 ore (dimensione dell'embrione: circa 3,5 mm)



a 33 ore (dimensione dell'embrione: circa 5 mm)

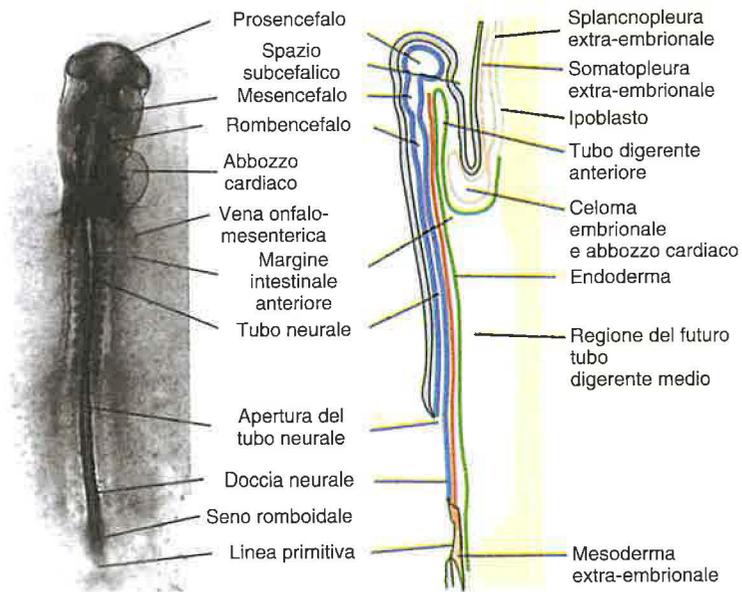
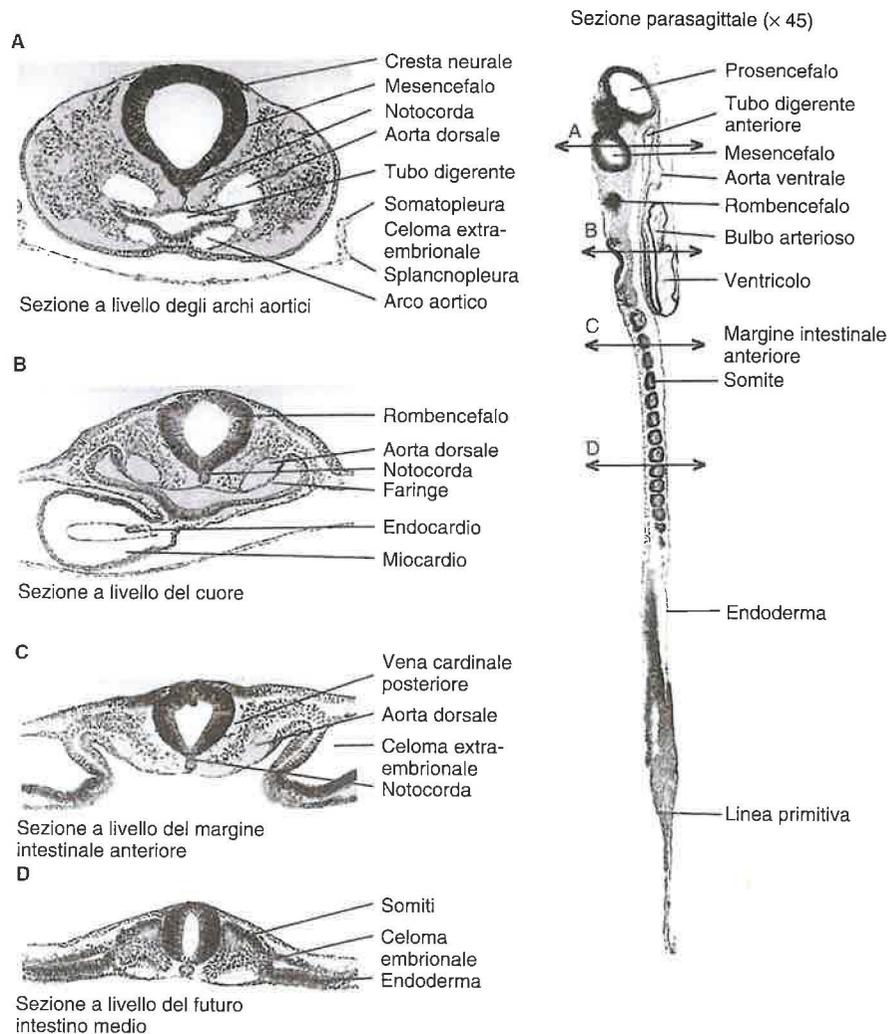


Fig. 9.9: Embrione di 33 ore (Microfotografie da Renoux, 1971; x 120)



A 48 ore il cervello mostra una trasformazione rapida e per il marcato aumento del suo volume e la formazione di 5 vescicole ben distinte (telencefalo, cefalo, mesencefalo, metencefalo e mielencefalo). Le vescicole uditive, che si sono formate dai placodi otici comparsi verso le 35 ore, nel telencefalo si osserva la comparsa dei placodi olfattivi. In seguito alle vescicole ottiche provenienti dal diencefalo, queste determinano la comparsa dei placodi cristallini nell'epidermide con la quale sono in contatto. Il tubo neurale si è completato sulla lunghezza dell'embrione, in seguito alla scomposizione della linea primitiva verso la 38ª ora di incubazione (Fig. 9.10a).

Durante questo periodo, prosegue la formazione del tubo digerente. A 48 ore la parte anteriore si regionalizza con il differenziamento della zona faringea, mentre nel tronco la formazione dell'intestino resta ancora incompleta, poiché la parete ventrale dell'intestino medio non si è ancora formata e questo resta dunque aderente sulla massa di tuorlo sottostante. Nella parte caudale compare una piega iniziale dell'endoderma con il contatto dell'embrione rispetto al tuorlo. Con modalità analoghe a quelle descritte per la regione anteriore si ha l'abbozzo dell'intestino posteriore, dal quale si origina alla 60ª ora il diverticolo allantoideo (Fig. 9.10b e § 9.5.3). Una spina nell'epidermide (il proctodeo) determina l'inspessimento molto localizzato di quest'ultima con l'endoderma, costituendo la placca anale, la quale provvisoriamente si sposta in posizione ventrale per l'accostamento del materiale mesodermico dell'abbozzo del tubo digerente. In modo analogo, si ha la formazione del diverticolo orificiale, il quale si apre al 3º giorno, ma è evidenziale a 48 ore per la comparsa dello stomaco, depressione della parete della plica ventrale dell'epidermide cefalica, che entra in contatto con l'endoderma sottostante. Si osserva inoltre che in questo periodo epidermico, associato alla curvatura cefalica dell'embrione, si forma un diverticolo dorsale a lato del tubo digerente, la tasca del Rathke, che entra in contatto con l'infundibolo, un'evaginazione del pavimento del tubo digerente (Fig. 9.10a); queste strutture daranno rispettivamente origine all'ipofisi anteriore e posteriore. Lo stomaco in avanti della piega endodermica che dà origine all'intestino nella regione posteriore, porta in contatto con la piega anteriore e determinerà la curvatura graduale dell'intestino medio eccetto che nella parte in cui si forma il peduncolo vitellino (§ 9.5.1). A 72 ore numerose strutture associate al tubo digerente cominciano a formarsi e a differenziarsi (ad esempio, tre fessure viscerali faringee, l'abbozzo dei polmoni e del fegato, la formazione delle ghiandole).

In questo periodo, si completa la formazione del sistema circolatorio embrionale ed extra-embriale. Il cuore, le cui prime contrazioni si osservano alla 35ª ora, aumenta di volume e, da un semplice ri-

piegamento iniziale, effettua una torsione completa ben evidente a 48 ore (Fig. 9.10a); si completa inoltre la formazione dei diversi compartimenti cardiaci. Dalla 35ª alla 72ª ora, la circolazione embrionale è caratterizzata, per quanto riguarda le arterie, dalla comparsa successiva delle prime 4 paia di archi aortici i che in seguito andranno incontro a varie modificazioni. Le ultime due paia si formeranno più tardivamente alla fine del 4º giorno di incubazione. Dal quarto arco aortico destro si formerà l'arco aortico definitivo. Lo sviluppo della vascolarizzazione vitellina e allantoidea inizia con la formazione progressiva di una intensa circolazione extra-embriale.

Verso la 33ª ora si differenzia il pronefro, a partire dal materiale mesodermico non metamerizzato della regione intermedia. Esso regredisce durante il terzo giorno, prima ancora di diventare una struttura funzionante. Il canale di Wolff, la cui formazione è più precoce di quella del pronefro, diviene il canale escretore del mesonefro che si è formato durante la regressione del pronefro. Questo resterà funzionale fino a una fase di sviluppo più avanzata.

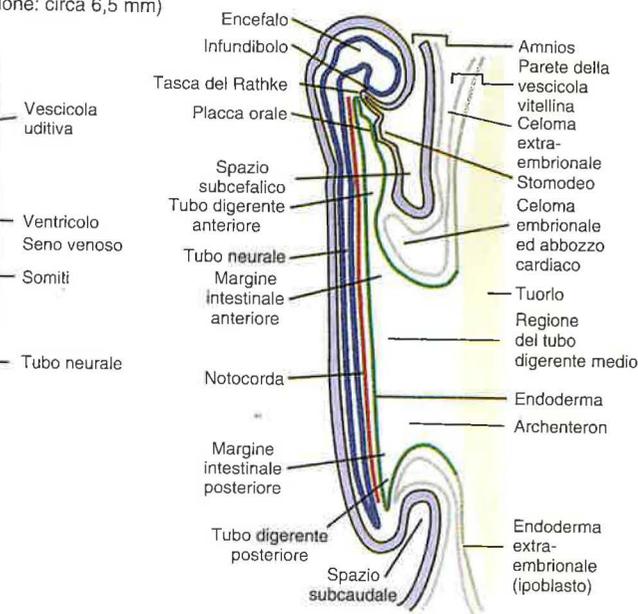
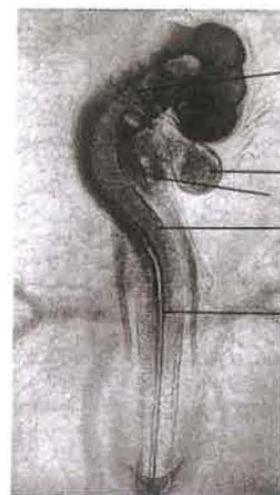
Durante questo periodo compaiono anche gli abbozzi degli arti, a livello del 15-20º paio di somiti per l'abbozzo delle ali e del 27-32º per l'abbozzo delle zampe. Gli abbozzi degli arti si formano a partire dal materiale mesodermico della somatopleura e dei somiti che formeranno gli elementi scheletrici e muscolari. Le estremità degli abbozzi presentano un ispessimento epidermico, la cresta apicale.

Infine, parallelamente alla formazione dell'embrione, inizia la formazione in posizione extra-embriale, delle pliche anteriori e posteriori (rispettivamente alla 33ª e 48ª ora), formate dall'accostamento dell'ectoderma alla somatopleura; questo accostamento formerà l'amnios (§ 9.5.2) e in seguito alla comparsa di pieghe della stessa natura in posizione laterale si realizzerà la formazione della cavità amniotica, che si completerà verso la 72ª ora.

Alla fine del 3º giorno di incubazione, la maggior parte degli organi principali si sono formati sotto forma di abbozzi più o meno sviluppati. Nei giorni che seguiranno prima della schiusa, si realizzeranno essenzialmente dei fenomeni di accrescimento e di differenziamento tissutale. Durante questo periodo, compaiono alcune caratteristiche tipiche degli uccelli: in particolare si manifesterà lo sviluppo inizialmente sproporzionato dei lobi oculari e la differenziazione morfologica degli arti anteriori e posteriori. Inoltre i diversi annessi si modificheranno profondamente. Alla schiusa, il grado di sviluppo raggiunto dal pulcino gli permetterà di acquisire rapidamente una indipendenza, per quanto riguarda la nutrizione e il movimento.

Fig. 9.10: **Embrioni a differenti stadi di sviluppo, veduta "in toto" (microfotografie da Renoux, 1971) e in sezioni sagittali**

**a) Stadio a 48 ore** (dimensione dell'embrione: circa 6,5 mm)



**b) Stadio a 72 ore** (dimensione dell'embrione: circa 6,6 mm)

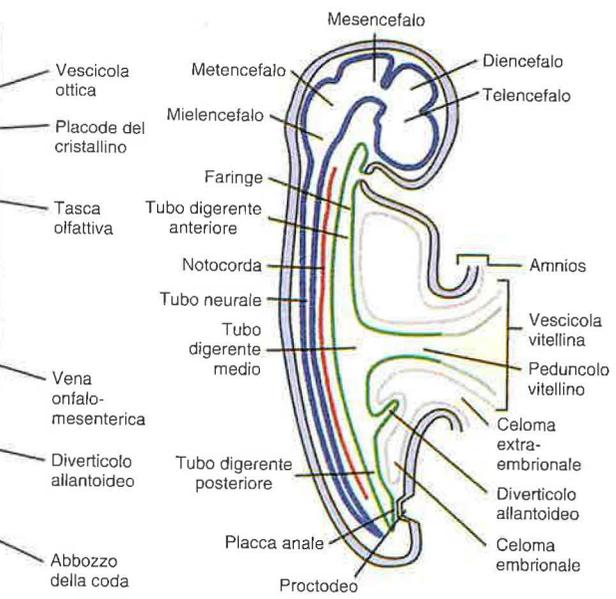
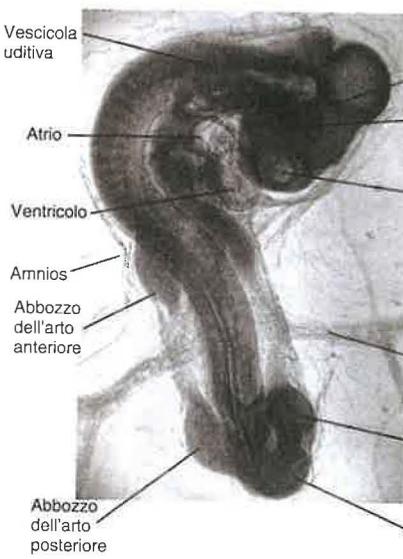
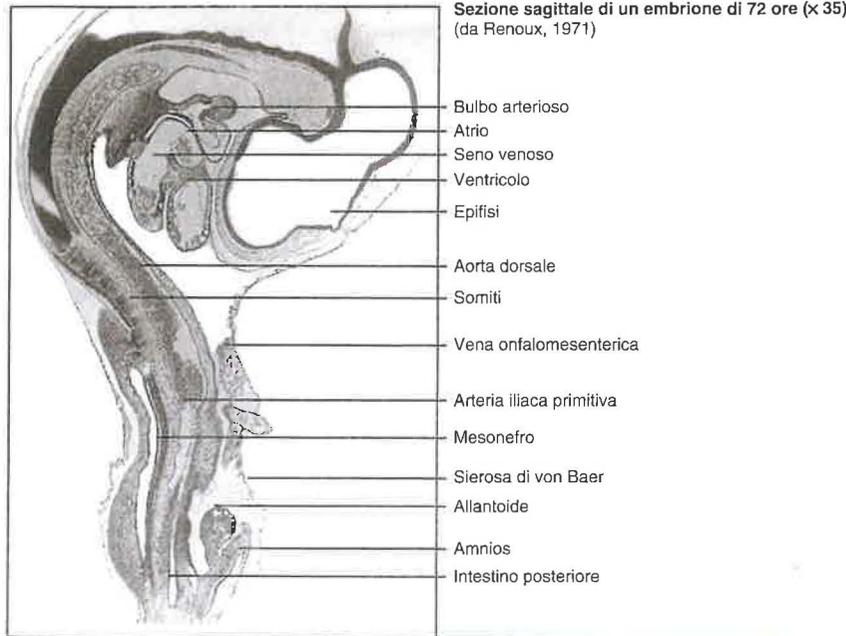


Fig. 9.11: **Stadio a 72 ore**

Microfotografia di un embrione di 72 ore di incubazione, privato dell'amnios (x 30)  
(da De Vos e Van Gansen, 1980)

## 9.5 La formazione degli annessi embrionali

Nello sviluppo del pollo, parallelamente alla formazione di strutture che partecipano direttamente all'organogenesi dell'embrione, compaiono degli elementi transitori, i tre annessi embrionali: il sacco vitellino, l'amnios e l'allantoide; questi non danno origine a organi definitivi, ma svolgono funzioni di protezione durante lo sviluppo embrionale e assicurano all'embrione l'autonomia metabolica (nutrizione, escrezione, respirazione).

### 9.5.1 Il sacco vitellino

Il sacco vitellino svolge un ruolo trofico; infatti è la sede in cui vengono accumulate le riserve vitelline che permetteranno all'embrione di provvedere ai bisogni nutritivi nel corso di tutto il suo sviluppo.

Negli stadi più precoci dello sviluppo il disco germinativo si estende progressivamente sulla superficie del tuorlo, dal quale è separato da due foglietti, uno ectodermico extra-embriale, e l'altro ipoblastico, direttamente in contatto con la massa vitellina (§ 9.2). Tra questi si inserisce il mesoderma extra-embriale che si cavita formando il celoma extra-embriale delimitato dalla somatopleura e dalla splancoopleura extra-embriale, che rimarrà addossata all'ipoblasto (Fig. 9.12a-c). Al sesto giorno di incubazione, la quasi totalità del tuorlo è ricoperta da questa espansione ad eccezione di una zona ridotta. Il contenuto del sacco vitellino così costituito è in connessione con il lume del tubo digerente a livello dell'intestino medio, mediante un canale vitellino-intestinale di natura ipoblastica. Questo corrisponde al **peduncolo vitellino** rappresentato nella Figura 9.13. A partire dalla 20ª ora di incubazione, compaiono nella splancoopleura delle isole sanguigne, dalle quali si differenzieranno le cellule del sangue e una rete vascolare. Verso la 40ª ora di incubazione si attiva una circolazione vitellina che assicura il trasferimento all'embrione delle sostanze nutritive, provenienti dalla massa vitellina e ne consente la utilizzazione. Alla fine del periodo di incubazione, all'incirca i 2/3 della quantità iniziale di tuorlo sono stati utilizzati. Poco prima della schiusa, il sacco si retrae e viene portato all'interno del lume intestinale. Grazie al rimanente tuorlo ancora presente, nei giorni immediatamente successivi alla schiusa il pulcino provvederà ai suoi bisogni nutritivi senza l'apporto di materiale alimentare supplementare.

### 9.5.2 L'amnios

La conquista di un ambiente terrestre per i Vertebrati è stato accompagnato in alcuni casi dalla formazione di strutture extra-embriali provvisorie che permettono loro di essere indipendenti dall'ambiente acquatico. L'amnios ha in questo un ruolo fondamentale. L'esistenza di certi annessi nei soli Sauropsidi (Rettili e Uccelli) e Mammiferi ha portato ad indicare questi ultimi

con il termine di **amnioti**, in opposizione agli **anamni** che comprendono i Vertebrati inferiori (Pesci e Anfibi), che restano, per l'assenza di alcuni annessi, dipendenti dall'ambiente acquatico per tutto o parte del loro ciclo vitale.

Negli amnioti l'embrione potrà svilupparsi all'interno di una cavità riempita di liquido, la cavità amniotica, delimitata da una parete, l'amnios. Questo ambiente liquido assicura all'embrione una protezione contro un possibile essiccamento e contro eventuali danni meccanici. In più esso rende possibile uno sviluppo armonioso nelle tre dimensioni dello spazio, limitando quindi i rischi di malformazioni che potrebbero derivare dall'accostamento dell'embrione a strutture membranarie. Il movimento del liquido amniotico dovuto a delle contrazioni della parete della cavità contribuisce all'efficacia di quest'ultima protezione.

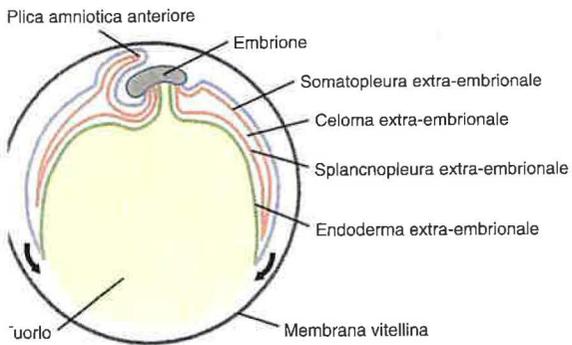
La formazione di questo annesso nel corso dello sviluppo dell'embrione di pollo inizia verso la 30ª ora di incubazione, quando al di sopra dell'embrione, nella sua parte anteriore, si forma una piega dell'ectoderma extra-embriale rivestita dalla somatopleura extra-embriale (Fig. 9.12a). Più tardivamente, verso la 50ª ora, un fenomeno analogo si osserva nella regione posteriore (Fig. 9.12b). L'allungamento di ciascuna di queste pieghe in direzione opposta porta verso la 62ª ora d'incubazione al loro incontro, in particolare in corrispondenza dei loro bordi laterali. Nella cavità così formata permane un orifizio all'altezza del 29º somite, il poro amniotico, che si chiuderà al 4º giorno (Fig. 9.12c). Le pliche che si sono formate a partire dalla doppia struttura epidermide/somatopleura extra-embriale danno origine nel versante rivolto verso l'embrione alla parete della cavità amniotica, vale a dire l'amnios, e sul versante esterno al corion o sierosa di von Baer, struttura addossata al guscio. Nessuna di queste due strutture sarà vascolarizzata. Oltre alla sua funzione di protezione, questo doppio annesso giocherà un ruolo nel riassorbimento tardivo dell'albume, mettendolo in contatto direttamente con l'embrione (vedi sotto).

### 9.5.3 L'allantoide

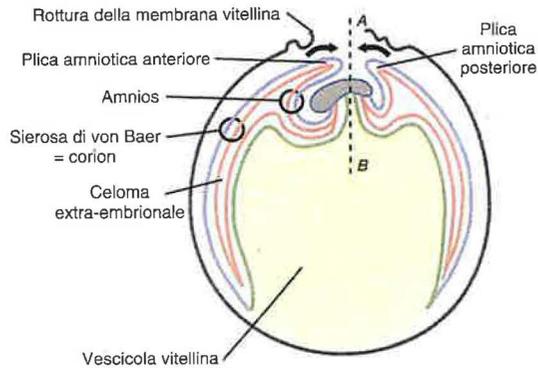
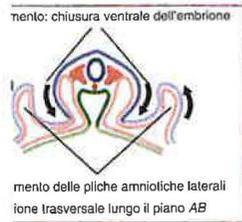
Verso la 60ª ora di incubazione, nell'intestino posteriore in formazione compare un diverticolo in posizione ventrale. Rivestita dalla splancoopleura extra-embriale, questa struttura, designata con il termine di **allantoide**, s'inserisce progressivamente nel celoma extra-embriale fino ad occuparlo completamente (Fig. 9.13). Nel corso di questo processo, la doppia parete dell'allantoide si accolla al corion che forma il limite esterno della cavità celomatica extra-embriale. Si forma così un **allanto-corion**, che viene schiacciato contro il guscio con l'aumento del volume della vescicola allantoidea. A partire dal quarto giorno di incubazione si sviluppano in seno alla splancoopleura e si estendono alla somatopleura corionica delle strutture vascolari, che porteranno

Formazione degli annessi embrionali (sezioni sagittali di uovo intero)

1<sup>a</sup> incubazione



2<sup>a</sup> incubazione



3<sup>a</sup> incubazione

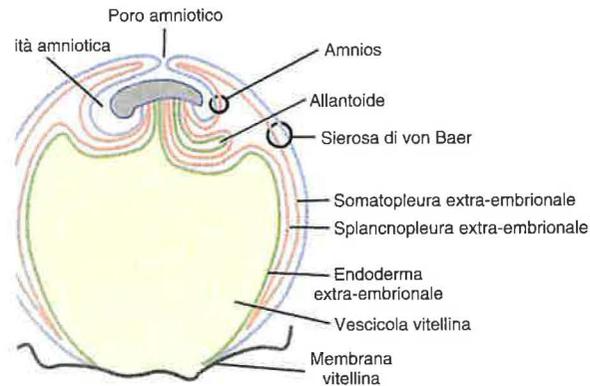
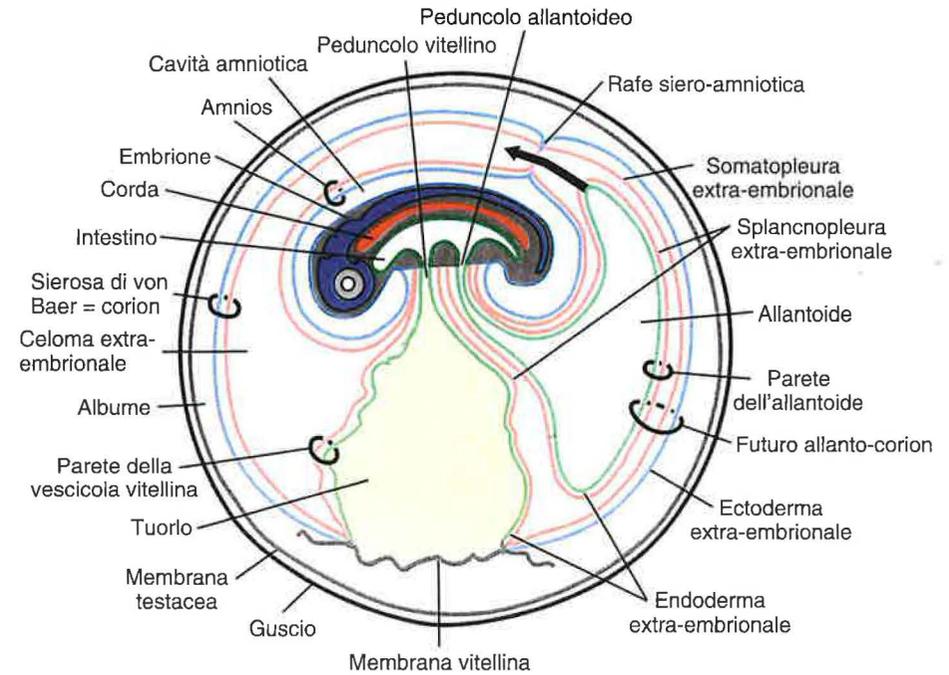


Fig. 9.13: Schema dell'organizzazione di un embrione a 96 ore di incubazione



allo sviluppo di una ricca vascolarizzazione dell'allanto-corion. Infine, a causa della considerevole espansione dell'allantoide, l'albumine è spinto a spostarsi progressivamente verso la estremità acuta dell'uovo.

Le caratteristiche della formazione di questo annesso lo rendono competente a svolgere diverse funzioni, di cui quattro sono riportate di seguito:

1. **Ruolo respiratorio:** gli scambi respiratori avvengono a livello dell'allanto-corion, riccamente vascolarizzato, e sono resi possibili per il passaggio di gas attraverso il guscio poroso.
2. **Ruolo nella mineralizzazione dello scheletro dell'embrione:** i contatti stretti stabiliti tra l'allanto-corion vascolarizzato e la membrana testacea del guscio permettono una mobilizzazione di calcio dal guscio all'embrione per la costruzione del suo scheletro. Parallelamente si osserva una fragilità del guscio, che renderà così più facile la schiusa.

3. **Ruolo digerente:** l'albumine, spostato a causa dell'espansione dell'allantoide, entra in contatto diretto con l'allanto-corion, dove avviene un assorbimento di acqua e di prodotti di digestione dell'albumine, che porta ad una progressiva riduzione del bianco. Questo processo diventa più marcato a partire dall'11° giorno circa, quando si stabiliscono dei contatti diretti tra l'albumine e la cavità amniotica, attraverso un orifizio presente nell'amnios.

4. **Ruolo di accumulo dei rifiuti:** l'allantoide costituisce un organo di accumulo dei residui del metabolismo azotato provenienti dall'escrezione renale dell'embrione. Questi residui sono costituiti da urati e sono eliminati sotto forma di cristalli alla schiusa, insieme con l'allantoide. Questi cristalli si formano in seguito a disidratazione del contenuto dell'allantoide conseguente alla richiesta di acqua da parte dell'embrione.

## Sviluppo dei Mammiferi

L'embriogenesi della maggior parte dei Mammiferi presenta delle caratteristiche particolari rispetto ad altri Vertebrati in relazione alle limitazioni dipendenti dalla viviparità. Di conseguenza le differenti specie che costituiscono questo taxon manifestano, per quanto concerne il loro sviluppo, una graduale diversità nelle relazioni nutrizionali che si instaurano tra l'organismo materno e l'embrione.

I Mammiferi primitivi ovipari, ovvero i *Prototeri* o *Monotremi*, hanno uno sviluppo simile a quello osservato nei Sauropsidi, a differenza di quanto avviene nelle specie vivipare. In queste infatti l'assenza di sostanze di riserva nell'ovocita comporta la necessità di un apporto di metaboliti all'embrione durante tutto il suo sviluppo. Questa necessità trova la soluzione più completa nei Mammiferi Euteri con la formazione della placenta.

Per illustrare lo sviluppo dei Mammiferi nei capitoli seguenti viene descritto lo sviluppo di due specie, il topo e l'uomo. Infatti il topo, specie largamente utilizzata come modello di studio, per alcune peculiarità della sua embriogenesi non può essere considerato rappresentativo dello sviluppo dei Mammiferi in generale.

Rispettando una logica taxonomica, lo sviluppo del topo è presentato prima di quello dell'uomo, ma tenuto conto di alcuni aspetti complessi presentati da quest'ultimo, didatticamente può anche essere descritto lo sviluppo dei Mammiferi nell'ordine inverso a quello qui seguito. Inoltre per le due specie considerate sono qui descritti solo gli eventi e le tappe principali del loro sviluppo, tenuto conto dell'elevato livello organizzativo e della notevole complessità dei processi organogenetici che caratterizzano entrambe le specie.

Infine, data l'importanza degli annessi embrionali nei Mammiferi, si è ritenuto opportuno aggiungere o riportare anche una presentazione comparativa di questi ultimi in un capitolo successivo a quelli dedicati alla descrizione dello sviluppo del topo e dell'uomo, riservando una attenzione particolare alla placentazione.

# Sviluppo di un Mammifero: *Mus musculus*

# 10

Per un lungo periodo, a causa delle difficoltà relative al loro sviluppo, i Mammiferi superiori non hanno ricevuto l'attenzione necessaria per lo studio e la descrizione dettagliata dei loro processi morfogenetici.

Lo sviluppo *in utero* costituisce in effetti un handicap per l'osservazione diretta dell'evolversi dell'embrione e, fino a 20 anni fa, i mezzi sperimentali a disposizione degli embriologi risultavano insufficienti per studiare in modo soddisfacente le modalità dello sviluppo precoce nei Mammiferi. La messa a punto di tecniche più avanzate e i progressi sulla sperimentazione *in vitro* (es. fecondazione), insieme con la possibilità di utilizzare alcuni strumenti della Biologia molecolare correntemente utilizzati per altre specie animali, hanno permesso di superare molti ostacoli.

Di conseguenza il modello del topo ha acquistato importanza poiché si è constatato che il suo sviluppo, almeno per gli stadi più precoci, è molto vicino a quello dell'uomo; d'altra parte questa specie, di cui è ben conosciuta la genetica, può essere utilizzata per l'osservazione di anomalie dei processi ontogenetici derivanti da esperimenti di mutagenesi diretta.

Inoltre, questa specie può essere facilmente allevata e presenta un ciclo riproduttivo breve. La cronologia delle principali tappe del suo sviluppo è riportata nella *Tabella 10.1*. Quindi, malgrado alcune limitazioni nello studio del suo sviluppo (come ad esempio le difficoltà di osservazione e di sperimentazione) e l'esistenza di un'embriogenesi con qualche caratteristica atipica rispetto agli altri Mammiferi, il topo costituisce un modello di elezione per studiare lo sviluppo dei Mammiferi.

## 10.1 L'uovo indiviso

Nella femmina di topo sessualmente matura, il completamento della follicologenesi che porta alla formazione di una decina di follicoli maturi, i follicoli di Graaf, avviene ogni quattro giorni, al termine quindi di un ciclo estremamente corto e sotto una dipendenza ormonale altamente regolata. Al momento della ovulazione, la prima divisione meiotica è completata e il primo globulo polare è stato emesso. L'ovulo corri-

sponde, come negli altri Mammiferi, con delle rare eccezioni (cane, volpe), ad un ovocita II bloccato in metafase della seconda divisione meiotica. L'uovo non fecondato è raccolto nel padiglione della tuba di Falloppio, la parte superiore dell'ovidutto, dove generalmente avviene la fecondazione. Esso è di tipo alecittico, vale a dire senza tuorlo, ed è di dimensioni ridotte (100  $\mu\text{m}$  circa). Alcuni costituenti glicoproteici formano la zona pellucida, struttura addossata alla membrana dell'uovo, che svolge un ruolo importante nel processo di riconoscimento specie-specifico degli spermatozoi e che attiva in questi ultimi la reazione acrosomiale. La zona pellucida è a sua volta ricoperta da uno strato di cellule follicolari, la corona radiata, che sono già presenti durante la maturazione del follicolo.

La fecondazione porta al completamento della meiosi ed è seguita dall'espulsione del secondo globulo polare. I due nuclei diventati pronuclei (il pronucleo maschile con un volume circa due volte superiore a quello del pronucleo femminile), in seguito si fonderanno.

## 10.2 La segmentazione

Contrariamente a quanto osservato nelle specie dei Vertebrati precedentemente descritti, la segmentazione si svolge più lentamente. La prima divisione di segmentazione si completa 16-18 ore dopo la fecondazione e lo stadio di 8 blastomeri è raggiunto non prima di due giorni. Le prime divisioni diventano ben presto asincrone e interessano tutto l'uovo (segmentazione oloblastica). La prima divisione si effettua secondo un piano di segmentazione meridiano, seguito da un secondo piano di divisione che presenta una particolarità segnalata nel capitolo introduttivo, da cui deriva la definizione di segmentazione rotazionale. In effetti, nella seconda divisione, uno dei due blastomeri si divide secondo un piano meridiano, mentre l'altro presenta un piano di divisione equatoriale. A causa della leggera asincronia delle divisioni che comincia a manifestarsi precocemente, l'embrione talvolta presenta un numero dispari di blastomeri. Questi ultimi sono sferici, ben individualizzati e contigui.

Allo stadio di 8 blastomeri, si osserva il fenomeno della "compattazione", che è peculiare dei Mammiferi.

Tab. 10.1: Cronologia dello sviluppo di *Mus musculus*

Tempi	Tappe
0 h	Fecondazione
16-18 h	2 cellule
36 h	8 cellule
3,5 giorni	Giovane blastocisti
4,5-5 giorni	Blastocisti libera, impianto
6,5 giorni	Inizio della gastrulazione, formazione della linea primitiva
7-8 giorni	Comparsa della piastra neurale e dei primi somiti
9,5 giorni	Comparsa degli abbozzi degli arti anteriori
10,5 giorni	Comparsa degli abbozzi degli arti posteriori
12,5 giorni	Completamento delle principali fasi dell'organogenesi
12,5-20 giorni	Sviluppo fetale
20-21 giorni	Nascita

(da Dyban *et al.*, 1989)

Nella compattazione i blastomeri si addossano strettamente l'uno contro l'altro e formano un ammasso cellulare compatto di forma sferica. I confini cellulari diventano difficilmente riconoscibili, i blastomeri si avvicinano strettamente per una larga parte della loro superficie stabilendo dei contatti stretti. La formazione di giunzioni specializzate, sia strette (tra le cellule disposte verso l'esterno dell'embrione) che comunicanti (tra le cellule localizzate nella parte più interna dell'embrione), assicura rispettivamente sia la stabilizzazione e la coesione meccanica dell'embrione, che la cooperazione metabolica dei blastomeri tra di loro. Durante questo processo, i blastomeri acquisiscono una polarità morfo-funzionale, il cui orientamento è dipendente dai contatti intercellulari, e che avrà un ruolo fondamentale nello svolgimento delle successive fasi della segmentazione. Infatti, a seconda dell'orientamento dei piani di divisione, successivamente alla compattazione emergono due popolazioni distinte di cellule, i cui destini saranno divergenti. Questa separazione di destino embriogenetico si manifesta allo stadio di 16 blastomeri, corrispondente alla formazione della morula. Le cellule provenienti da divisioni perpendicolari all'asse di polarità, e situate al centro dell'embrione, vanno a formare la **massa cellulare interna**, mentre tutte le altre cellule, in posizione esterna, vanno a formare una struttura epiteliale appiattita.

Nei successivi due cicli di divisione, si forma al centro dell'embrione il blastocele, il quale contiene un liquido, che si accumula nella cavità per la presenza di un gradiente osmotico tra ambiente esterno ed interno.

Allo stadio di 64 cellule, la suddivisione descritta precedentemente in due categorie di blastomeri porta alla formazione di una **blastocisti primaria** (di sovente indicata con il solo termine di **blastocisti**). Questa è costituita da uno strato di cellule epiteliali esterne, il **trofoblasto**, che, come indica il suo nome, svolge una funzione trofica e non partecipa alla formazione dell'embrione. Esso assicurerà l'impianto dell'embrione nella parete uterina e parteciperà alla formazione della porzione embrionale della placenta, dando origine al **corion**. La popolazione cellulare che costituisce la massa cellulare interna forma un ammasso eccentrico protrudente nella cavità blastocelica. Questo ammasso cellulare corrisponde al **bottono embrionale**, da cui deriveranno i territori che formeranno le strutture dell'embrione, ma anche una parte dei territori extra-embriionali.

L'insieme delle differenti tappe descritte è illustrato nella *Figura 10.1*.

La segmentazione, che nel topo ha una durata totale di 4,5 giorni, ha luogo durante il passaggio dell'uovo nell'ovidutto, cioè nella fase detta di pre-impianto. Nel corso di questa fase, lo strato cellulare che costituisce la

corona radiata si disgrega rapidamente e alla fine della segmentazione, quando l'embrione arriva nella cavità uterina, la blastocisti si libera del rivestimento costituito dalla zona pellucida (*Fig. 10.2a*; osservazione di un embrione di ratto).

### 10.3 L'evoluzione della blastocisti

#### 10.3.1 L'impianto in utero

Il proseguimento dello sviluppo embrionale potrà avvenire solo dopo che si sia realizzato l'impianto della blastocisti nella parete uterina, processo indicato con il termine di **annidamento** (*Fig. 10.2b*). L'impianto avviene tramite le cellule del trofoblasto, le quali a contatto con la parete uterina si trasformano in cellule giganti del trofoblasto. Nell'embrione le cellule trofoectodermiche, inizialmente adiacenti al bottono embrionale, proliferano rapidamente e vanno a formare il **cono ectoplacentare** o **ectocoriale**, che costituirà la parte trofoblastica della placenta di tipo allanto-coriale (§ 12.2.2).

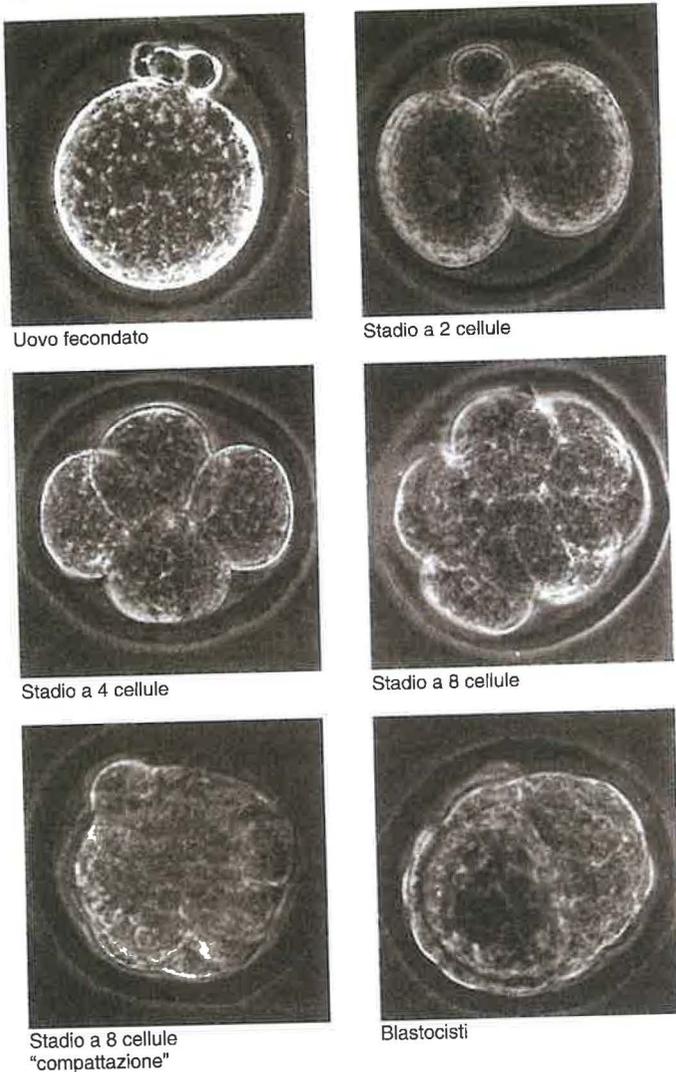
Dopo l'impianto l'embrione di topo si sviluppa con modalità diverse rispetto ad altri Mammiferi: soprattutto a causa di costrizioni meccaniche dovute al contatto e all'impianto nella parete uterina, esso si presenta allungato e di forma ovoidale. Poiché il solo spazio disponibile è rappresentato dalla cavità del blastocele, le strutture embrionali si sviluppano dando origine a una struttura cilindrica, simile al battaglio di una campana, che si allunga nel blastocele (*Fig. 10.2c*; *Fig. 10.3*).

Nella massa cellulare interna si crea una cavità, la **cavità pro-amniotica**, che si estende in seguito nel cono ectoplacentare. Parallelamente, il bottono embrionale si organizza in un doppio strato epiteliale, costituito dall'**epiblasto** sul versante della cavità pro-amniotica e dall'**endoblasto** (chiamato anche **endoderma primario** o **ipoblasto**) sul versante del blastocele. L'endoblasto progressivamente si estende e tappezza la parete interna del blastocele, formando così l'**endoderma parietale** distinto dall'**endoderma viscerale** il quale rimane in contatto con l'epiblasto (*Fig. 10.3a*). In seguito alla formazione dell'endoblasto il blastocele diviene il **lecitocele**, struttura tipica di una blastocisti avanzata chiamata anche blastocisti secondaria. Effettuato l'impianto, le cellule trofoblastiche invadono la mucosa uterina, perdono il loro contatto iniziale con le cellule dell'endoderma parietale e lasciano quest'ultime associate alla membrana basale fortemente ispessita, la **membrana di Reichert**.

#### 10.3.2 L'amniogenesi

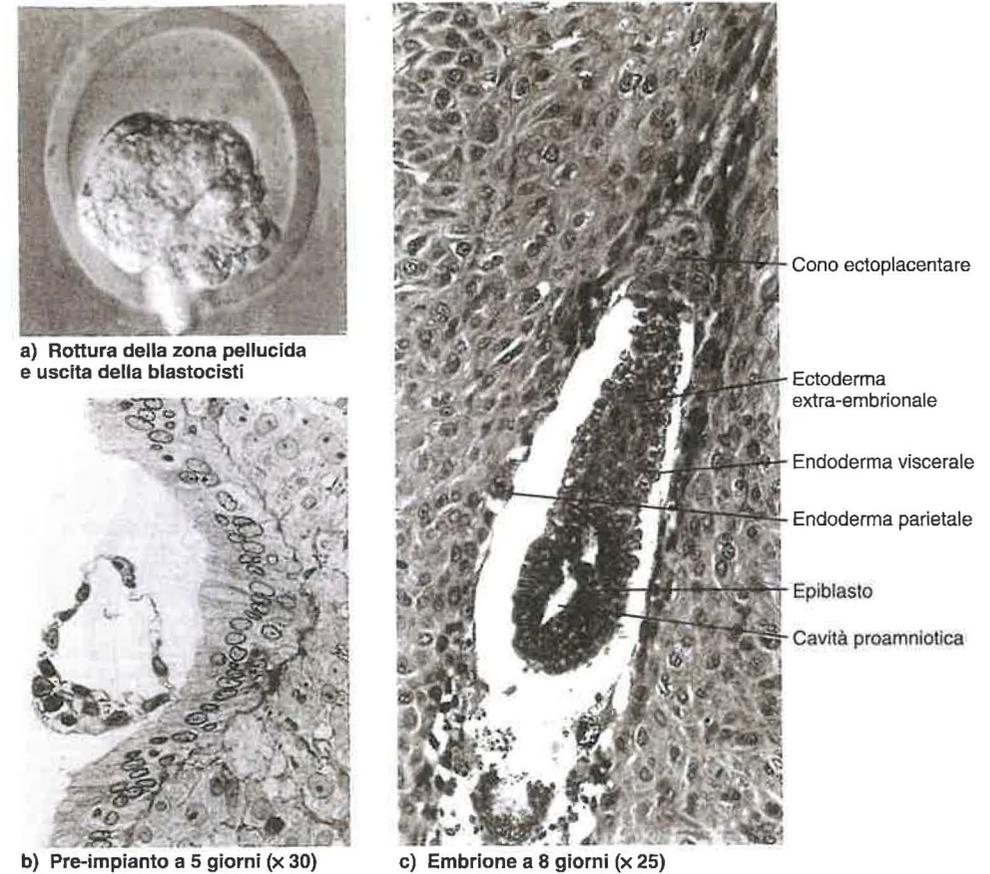
La formazione della cavità amniotica può essere considerata di tipo misto nei Roditori Muridi, poiché essa presenta contemporaneamente caratteristiche dell'am-

Fig. 10.1: Prime tappe della segmentazione dell'embrione di *Mus musculus* (x 60)



(da Dyban *et al.*, 1989)

Fig. 10.2: Impianto della blastocisti nel ratto



(da Hebel e Stromberg, 1986)

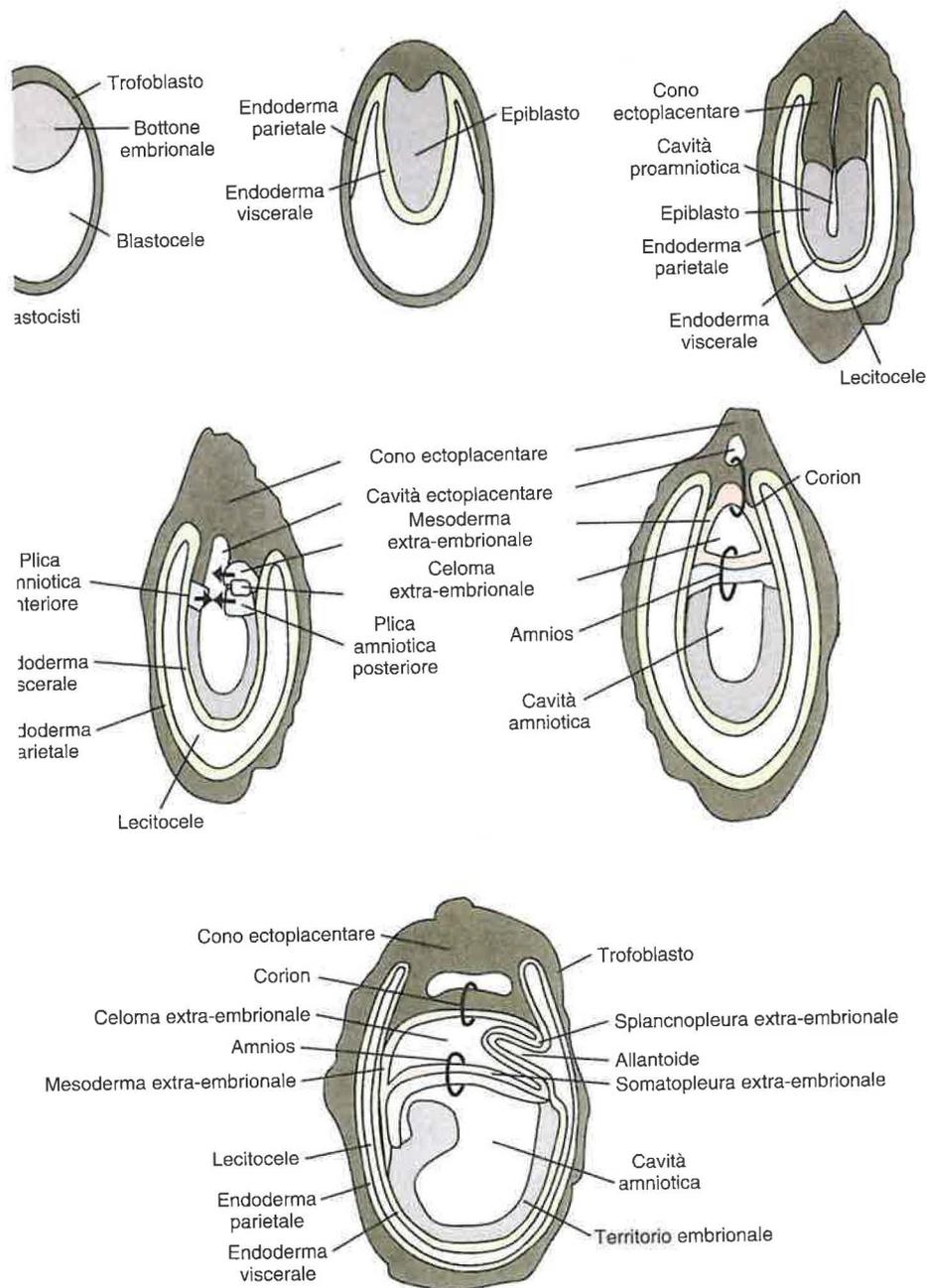
niogenesi per cavitazione, osservata soprattutto in molti dei Primati (tra cui la specie umana), e dell'amniogenesi per pliche, presente nella maggior parte degli altri Mammiferi (§ 12.1).

Successivamente alla formazione della cavità proamniotica (vedi sopra), dalle sue pareti si estendono nella cavità delle pliche amniotiche, che la attraversano e formano una suddivisione trasversale. Si vengono così a formare due cavità sovrapposte, una cavità ectoplacentare, di durata transitoria, a livello del cono ectoplacentare, e la cavità amniotica a livello del bot-

tone embrionale. Parallelamente alla riduzione della cavità ectoplacentare, per cavitazione delle pliche amniotiche, si forma una ulteriore cavità corrispondente al celoma extra-embriionale (Fig. 10.3b).

A questo stadio di sviluppo, sono dunque presenti 4 cavità nell'insieme dell'embrione: la cavità ectoplacentare che è destinata a scomparire rapidamente, la cavità celomatica extra-embriionale, la cavità amniotica e il lecitocèle (Fig. 10.3c); quest'ultimo può essere considerato come la struttura omologa della vescicola vitellina (o sacco vitellino) dei Sauropsidi.

## Sviluppo precoce dell'embrione di topo, veduta in sezioni sagittali



## 10.3.3 La gastrulazione

La blastocisti dopo l'impianto presenta dei territori extra-embionali ed embrionali ben individuati e distribuiti lungo un asse prossimo-distale; il cono ectocoriale si trova al polo prossimale, mentre nella zona distale sono localizzati i territori organogenetici dell'embrione propriamente detto. Sei giorni dopo la fecondazione, l'embrione si presenta con una organizzazione tissutale di-dermica, con una regione dorsale costituita dall'epiblasto, che a sua volta costituisce il pavimento della cavità amniotica, e una regione ventrale costituita dallo strato endodermico viscerale orientato verso il lecitocelo (Fig. 10.3c).

Immediatamente prima della comparsa della linea primitiva che caratterizza la gastrulazione, l'epiblasto può essere grossolanamente suddiviso in differenti domini, precursori dei tre foglietti embrionali (ecto-, meso-, endoderma). La mappa dei territori presuntivi, individuata nell'epiblasto a uno stadio precoce della gastrulazione, è schematicamente illustrata nella Fig. 10.4. In questi domini si osservano delle zone di sovrapposizione, ad indicare che le cellule localizzate in questi punti partecipano alla formazione di più linee tissutali. Questa caratteristica è schematizzata nella Tabella 10.2, che riassume la discendenza dei territori che progressivamente si evidenzia nel corso dell'embriogenesi, in particolare durante la gastrulazione. A causa della parziale sovrapposizione delle zone organogenetiche dell'epiblasto e della loro distribuzione lungo gli assi prossimo-distale e dorso-ventrale, lo svolgimento di questa tappa dello sviluppo risulta complesso e sarà descritto solo in linea generale e non nei suoi dettagli.

La gastrulazione ha inizio a partire dal sesto giorno e mezzo, con la comparsa della linea primitiva a livello della unione dell'ectoderma extra-embriionale, che forma il cono ectoplacentare, e la regione posteriore dell'epiblasto, che contiene i territori precursori del mesoderma extra-embriionale. Quindi durante le prime 12 ore della gastrulazione emerge il mesoderma extra-embriionale, che si inserisce tra lo strato epiblastico e l'endoderma viscerale. Nelle ore successive, la linea primitiva continua ad allungarsi, raggiungendo a sette giorni e mezzo la zona distale dell'embrione situata nella parte terminale della struttura embrionale allungata. Nello stesso tempo, si osserva un aumento globale di volume dei territori embrionali, le cui dimensioni passano da 200  $\mu\text{m}$  a 600  $\mu\text{m}$  e da 120  $\mu\text{m}$  a 250  $\mu\text{m}$ , rispettivamente lungo gli assi prossimo-distale e antero-posteriore.

Nella progressione prossimo-distale della linea primitiva, dopo lo spostamento dei territori del mesoderma extra-embriionale, vengono reclutati nell'invaginazione i territori presuntivi del mesoderma e dell'endoderma embrionale. L'ordine con cui si effettua il reclutamento dei territori cellulari verso la zona di

invaginazione riflette la loro distribuzione lungo l'asse antero-posteriore: i territori localizzati in posizione posteriore lungo la linea primitiva sono reclutati prima di quelli situati lateralmente, e questi precedono le zone situate nella regione anteriore. Nel corso di questo processo, i movimenti cellulari sono complessi: poiché alcuni territori mesodermici situati nella regione epiblastica laterale sono distribuiti lungo l'asse antero-posteriore in un ordine inverso a quello che occuperanno nell'organizzazione finale antero-posteriore dell'embrione, le cellule che li costituiscono devono riposizionarsi man mano che si invaginano. Analogamente, il materiale embrionale endodermico durante la sua invaginazione si intercala nel pre-esistente endoderma viscerale e progressivamente respinge quest'ultimo in direzione anteriore e prossimale verso la parete del lecitocelo.

Al completamento della gastrulazione, l'insieme dei territori mesodermici si è inserito tra l'ectoderma e l'endoderma, conferendo all'embrione propriamente detto una struttura tri-dermica. Solo le estremità anteriore e posteriore sono prive del foglietto mesodermico e costituiscono le zone in cui si apriranno gli orifici boccale e anale del futuro tubo digerente.

## 10.4 L'organogenesi

Una settimana dopo la fecondazione, mentre la gastrulazione è in corso di svolgimento con la linea primitiva che comincia a regredire, inizia la formazione dei principali organi. I primi segni della neurulazione si manifestano nella regione posteriore del futuro encefalo e progressivamente si formano le altre parti del tubo neurale sia nella regione più anteriore che in quella più caudale. Allo stesso tempo si forma l'abbozzo primario del cuore in posizione ventrale, i primi somiti e il mesoderma intermedio. Dal materiale mesodermico delle lamine laterali si origina il celoma, che è rivestito dalla splancopleura e dalla somatopleura extra-embriionale. Infine, in questo stesso periodo avviene la migrazione delle cellule germinali primordiali: le cellule germinali inizialmente compaiono alla base del diverticolo allantoideo, che si è formato all'estremità posteriore dell'embrione sporgendo nel celoma extra-embriionale (Fig. 10.3c), e raggiungono le creste genitali dopo aver migrato nel mesentero dorsale situato in corrispondenza della parte posteriore del tubo digerente.

A otto giorni e mezzo, l'embrione, che fino ad ora si è presentato curvato in modo paradossale, con una forte concavità sul lato dorsale diretta verso la cavità amniotica, subisce una brusca inversione dovuta soprattutto ad una accelerazione della crescita (Fig. 10.5a). In seguito al complesso svolgimento di questo fenomeno, l'embrione si trova ad essere completamente avvolto dalla cavità

Mapa semplificata dei territori presuntivi della gastrula precoce di topo

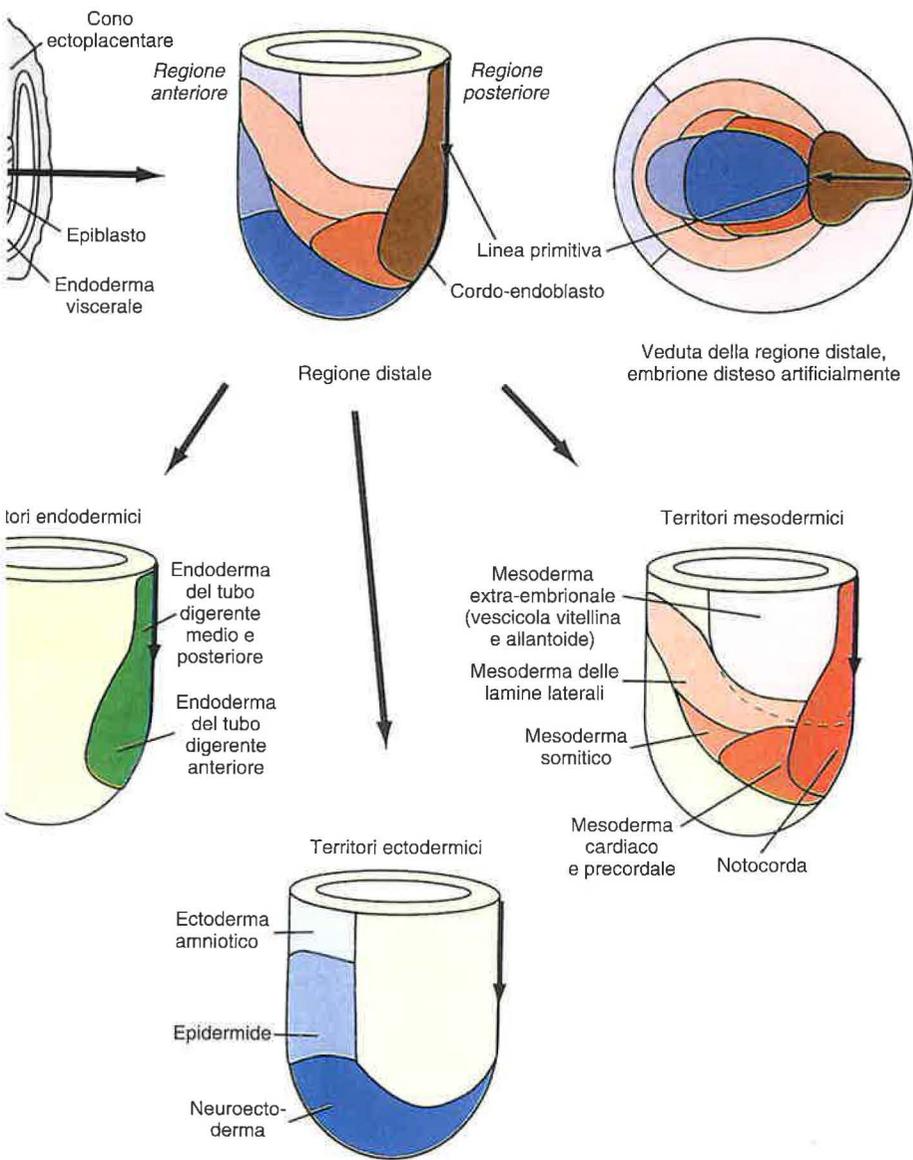
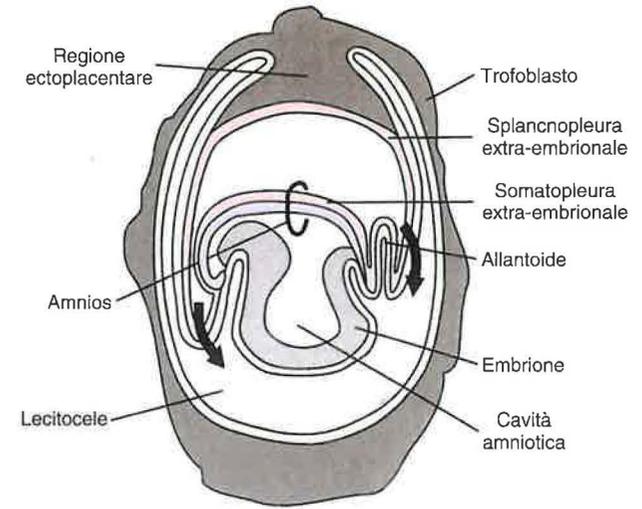
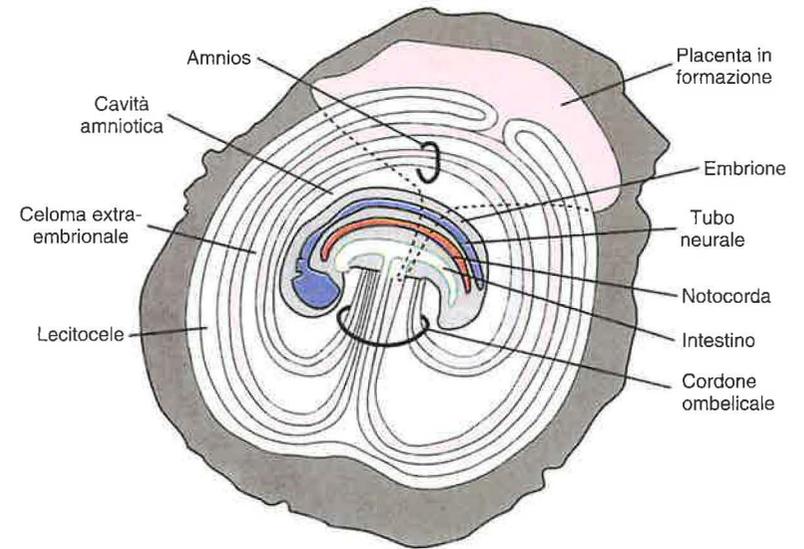


Fig. 10.5: Inversione della curvatura dell'embrione

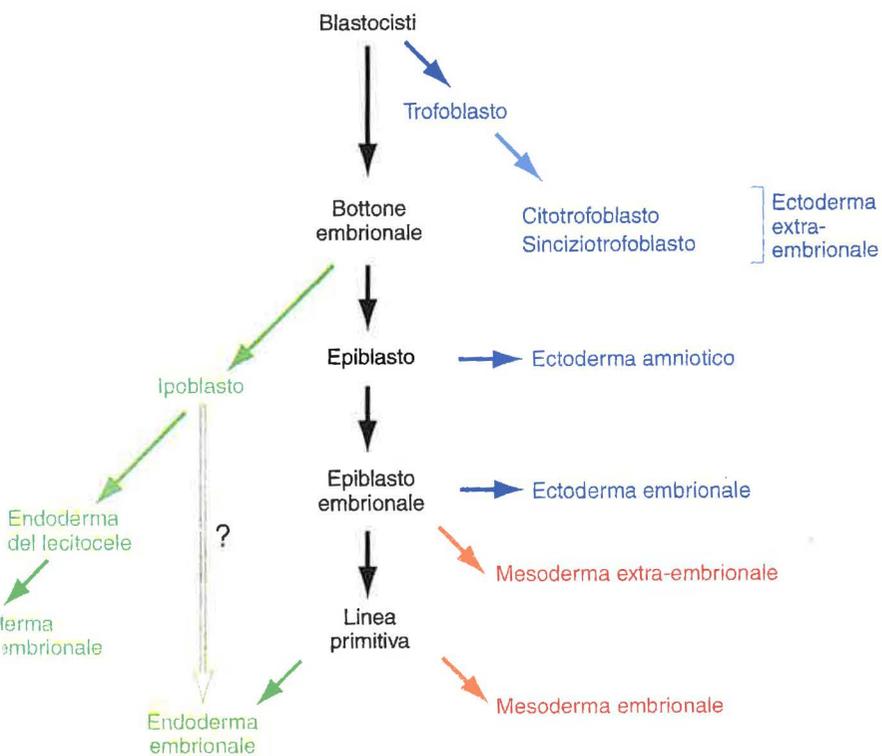
a)



b)



Discendenza dei territori nell'embrione di topo



la sua volta circondata dal celoma extra-embrionale in posizione più esterna dal lecitocoele (Fig. 11.1a). A partire da questo momento, gli eventi principali della organogenesi possono essere sinteticamente riassunti come segue:

• **Giorni 8-10:** 8-10 somiti, sistema circolatorio che comincia a funzionare (con una vascularizzazione mista, embrionale ed extra-embryonale), cellule del sangue originate dal sacco vitellino.

• **Giorni 12-14:** 12-14 somiti, modellamento del corpo con distinzione delle regioni cefalica, del tronco e caudale, tubo neurale ancora aperto nella regione posteriore, formazione del setto trasverso.

• **Giorni 15-20:** 15-20 somiti, abbozzo degli arti anteriori.

• **Giorni 20-25:** 20-25 somiti, formazione del fegato a parità del setto trasverso, dell'endoderma e del sistema

venoso vitellino (organo embrionale più voluminoso con funzione ematopoietica), chiusura del neuroporo posteriore.

- **10,5 giorni:** 30 somiti circa, modellamento della testa (con archi faringei, placodi sensoriali), neuroporo posteriore chiuso, formazione dei gangli spinali nella regione del tronco, abbozzo degli arti posteriori.
- **Tra 10,5 e 12,5 giorni:** comparsa dei derivati endodermici (polmoni, ghiandole salivari), formazione dei denti, differenziazione delle gonadi.

A partire da 12 giorni e mezzo, l'organogenesi è in gran parte completata. Durante la settimana che segue e che precede la nascita al 20° giorno dopo la fecondazione, si realizza lo sviluppo fetale essenzialmente caratterizzato dall'accrescimento.

# Sviluppo di un Mammifero: *Homo sapiens*

# 11

La specie umana presenta, con i suoi tratti biologici e fisiologici, diverse caratteristiche comuni agli altri rappresentanti del mondo animale ai vari livelli della scala zoologica. Le evidenti similitudini osservate a proposito dello sviluppo umano e dell'ontogenesi di un gran numero di specie animali appartenenti ai Vertebrati rappresentano una delle prove più significative della teoria dell'Evoluzione.

Per lungo tempo considerato come un tabù, poi come un dominio riservato alle discipline mediche, lo studio dello sviluppo umano deve essere considerato in una visione più complessiva integrato nella prospettiva di una conoscenza globale del mondo animale. Nonostante gli sforzi compiuti dall'uomo per migliorare la conoscenza dello sviluppo della specie umana, permangono ancora molte difficoltà per lo studio di questo complesso processo e, malgrado i numerosi mezzi di indagine scientifica e medica, sussistono ancora aspetti non chiariti sulle tappe precoci dello sviluppo umano. Infatti le difficoltà di osservazione dovute allo sviluppo *in utero* e motivi etici non hanno permesso la utilizzazione di alcuni approcci scientifici e soprattutto una sperimentazione diretta, come nel caso di altre specie.

## 11.1 L'uovo indiviso

Nella donna, alla conclusione della vita fetale, tutti gli ovociti contenuti nell'ovaio sono bloccati allo stadio di diplotene della prima profase meiotica e solo alla pubertà alcuni ovociti proseguono la loro maturazione prima dell'ovulazione. La rottura della parete di un follicolo di Graaf maturo, attraverso la lisi di una sporgenza della parete dell'ovaio, libera il gamete femminile. L'ovulo raccolto dal padiglione della tuba di Falloppio, come in quasi tutti i Vertebrati, è un ovocita II bloccato in metafase della II divisione meiotica. Di piccole dimensioni (100 µm circa, dimensione simile a quella dell'uovo di riccio di mare), l'ovulo di tipo alecittico è circondato dalla zona pellucida e dalle cellule della corona radiata (Fig. 11.1a). La fecondazione, che può avere luogo entro le 24 ore successive alla ovulazione, si realizzerà nell'ampolla della tuba e attiverà il completamento della seconda divisione meiotica con l'emissione del secondo globulo polare.

## 11.2 La segmentazione

Come negli altri Mammiferi, malgrado l'assenza di riserve vitelline, le prime divisioni di segmentazione che si svolgono nell'ovidutto sono estremamente lente, asincrone e interessano tutto l'uovo (segmentazione di tipo oloblastico). I due primi cicli di divisione di segmentazione si realizzano rispettivamente alla trentesima e alla quarantesima-cinquantesima ora dopo la fecondazione. Lo stadio di 8 blastomeri, nel quale si manifesta il fenomeno della "compattazione" (§ 10.2), si raggiunge dopo 60 ore e gli stadi 12/16 blastomeri, corrispondenti alla formazione di una morula, sono raggiunti solo 4 giorni dopo la fecondazione. A questo stadio, all'interno dell'embrione, per la confluenza degli spazi intercellulari, si forma una unica cavità, il blastocoele (o più precisamente cavità della blastocisti). Nello stesso periodo l'embrione ha percorso l'ovidutto e raggiunge l'utero, dove si impianterà.

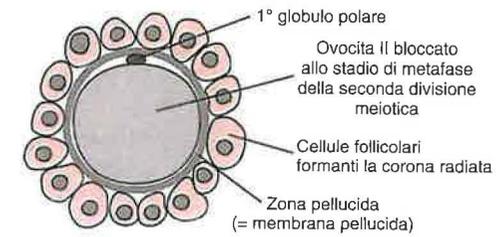
I 32 blastomeri che derivano dal quinto ciclo della segmentazione formano una blastocisti nella quale si osserva una separazione tra due sottopopolazioni cellulari, l'una costituente il trofoblasto, strato cellulare esterno che presenta una tipica organizza-

Tab. 11.1: Cronologia dello sviluppo di Homo sapiens

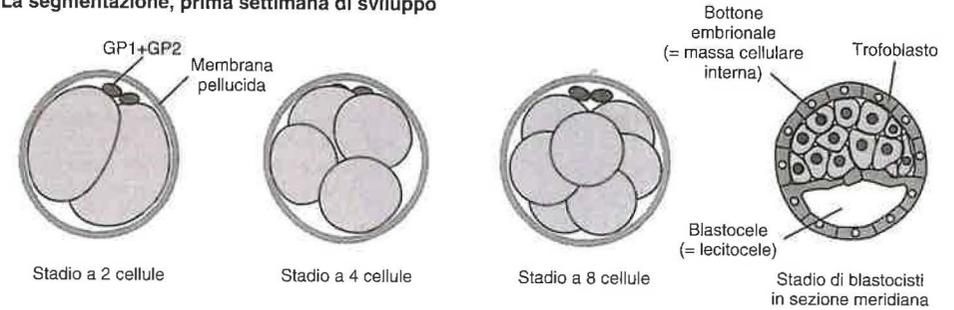
Tempi	Tappe
0 h	Fecondazione
30 h	2 cellule
40-50 h	4 cellule
60 h	8 cellule
4 giorni	12-16 cellule
5 giorni	Blastocisti libera
6-7 giorni	Impianto
12-13 giorni	Completamento dell'annidamento
13-14 giorni	Inizio della gastrulazione, formazione della linea primitiva
16 giorni	Formazione della notocorda
18 giorni	Comparsa della piastra neurale
20-21 giorni	Chiusura del tubo neurale
26-27 giorni	Comparsa degli abbozzi degli arti anteriori
28-30 giorni	Comparsa degli abbozzi degli arti posteriori
40-49 giorni	Modellamento della testa
50-56 giorni	Completamento del modellamento degli arti
90-266 giorni	Sviluppo fetale
± 266 giorni	Nascita

Fig. 11.1: Sviluppo dell'embrione umano

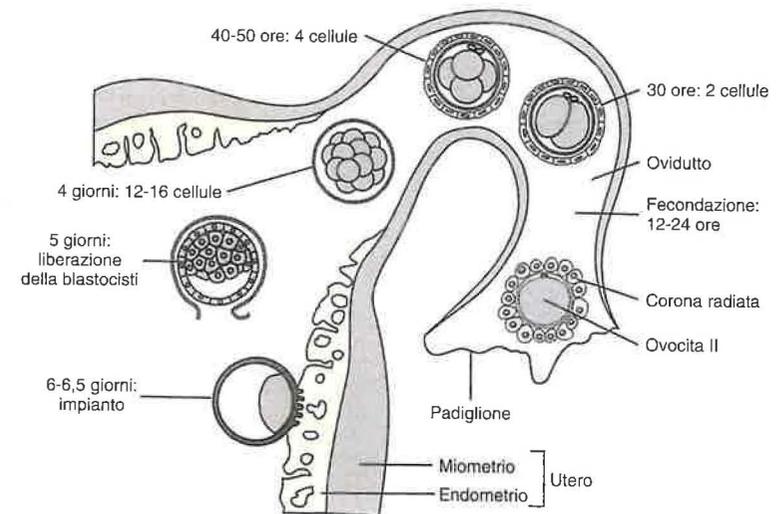
a) L'uovo maturo



b) La segmentazione, prima settimana di sviluppo



c) Spostamento dell'embrione nell'utero materno



itelliale, l'altra formante la **massa cellulare** in cui cellule daranno origine al futuro embrione. Questo ammasso cellulare, indicato anche con il nome di **bottone embrionale**, è localizzato in maniera eccentrica sotto una regione del trofoblasto, il polo **polare**, che effettuerà l'impianto della blastocisti nella parete uterina (Fig. 11.1b). A differenza di ciò che avviene nel topo, il bottone embrionale si protende nella cavità blastocelica ma non forma di una massa cellulare schiacciata del trofoblasto polare.

Questo stadio dello sviluppo ha luogo la specificazione degli assi che definiscono la polarità dell'embrione. La sua specificazione dipende dalla disposizione delle cellule nel bottone embrionale. In seguito, le cellule del bottone embrionale a contatto con il polo polare daranno territori situati nella futura regione dorsale, mentre quelle situate verso il blastocelo daranno i territori della futura regione ventrale.

Nei primi giorni, la blastocisti si libera della zona pellucida e l'ha fino ad ora circondata. L'insieme delle cellule che si svolgono nel corso della prima settimana di sviluppo è illustrato nella Figura 11.1c.

## Evoluzione della blastocisti

### 1.1 Annidamento

L'influenza ormonale, l'endometrio si è modificando adatto a permettere l'impianto della blastocisti. Questo si realizza verso il sesto giorno dopo la fecondazione e, come già descritto precedentemente, si realizza nella zona del trofoblasto polare. Dopo una semplice apposizione tra la blastocisti e l'epitelio uterino, la liberazione di enzimi litici da parte delle cellule trofoblastiche provoca una corrosione dei tessuti uterini. Le cellule trofoblastiche si moltiplicano attivamente e differenziano, a partire dal settimo giorno, in due strati distinti che formano i due strati trofoblastici. Sono distinguibili uno strato cellulare interno, il **citotrofoblasto**, che provvede a rivestire direttamente la cavità blastocelica, e un strato esterno, il **sinciziotrofoblasto**, in cui si osservano fenomeni di fusione cellulare che portano alla formazione di una struttura sinciziale spessa di consistenza gelatinosa per la presenza di lacune, che saranno in comunicazione con il sangue materno a partire dal 10° giorno. In queste fasi iniziali dell'impianto in utero, dopo l'attacco detto d'apposizione, le cellule del sinciziotrofoblasto emettono dei filopodi che si insinuano tra le cellule epiteliali uterine, liberano degli enzimi proteolitici che provocano così la lisi dell'epitelio uterino. La lacuna, lasciata inizialmente intatta, viene poi digerita dal tessuto connettivo uterino, venuto così a contatto con il sinciziotrofoblasto, viene a sua volta

corrosivo, permettendo il progressivo insinuarsi dell'embrione nella parete uterina, che termina con l'impianto di quest'ultimo nella mucosa uterina. Questo impianto per erosione dell'epitelio uterino è detto **interstiziale**, ed esiste solo in un limitato numero di specie (es. istrice, cavia, alcuni Chiroteri e nei Primati superiori).

### 11.3.2 Amniogenesi e formazione del lecitocelo (o vescicola vitellina)

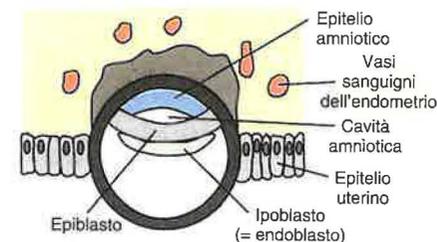
A partire dall'ottavo giorno dopo la fecondazione, nella massa cellulare interna appaiono delle cavità che progressivamente si fondono portando alla formazione di una cavità unica, la **cavità amniotica**, piena di liquido (Fig. 11.2a). Questa **amniogenesi per cavitazione** è osservabile nei Primati superiori, nei Chiroteri e in alcuni Insettivori (§ 12.1).

In seguito alla formazione della cavità amniotica, il bottone embrionale si divide in due parti, l'una superiore che forma la volta della cavità ed è costituita da uno strato epiteliale sottile, l'**epitelio amniotico**, l'altra inferiore, spessa, corrispondente al disco embrionale. In quest'ultimo si individuano due territori: l'uno costituisce l'**epiblasto** (o **ectoblasto**) a contatto con la cavità amniotica, mentre l'altro, situato sopra il blastocelo, corrisponde all'**ipoblasto** (o **endoblasto** o **endoderma primario**). A partire da questi due territori si formerà l'embrione propriamente detto che può essere considerato, a questo stadio dello sviluppo, bi-stratificato. Verso il decimo giorno, il foglietto ipoblastico si estende e gradualmente tappezza l'interno della cavità derivata dal blastocelo iniziale, il **lecitocelo primario**, delimitato in questo periodo da una struttura cellulare appiattita provvisoria di origine citotrofoblastica, la **membrana di Heuser** (Fig. 11.2b). Al 14° giorno lo strato ipoblastico proliferando forma un rivestimento continuo divenendo in questo modo la parete interna della cavità direttamente derivata dal lecitocelo primario, il **lecitocelo secondario**, struttura omologa alla vescicola vitellina.

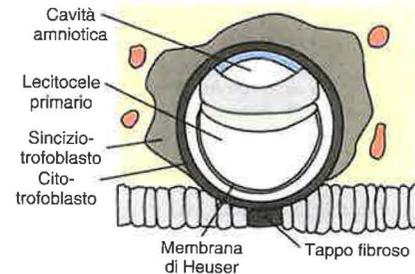
Contemporaneamente tra il citotrofoblasto e il lecitocelo primario compare un tessuto mesenchimatico lasso, corrispondente al **mesoderma extra-embriionale**. Al centro di questo mesenchima appaiono delle ampie cavità che, confluendo, formano la **cavità celomatica extra-embriionale**. Una parte del mesenchima condensato si organizza a formare le pareti di questa cavità e costituisce sia la **splancopteleura extra-embriionale** che circonda il lecitocelo, sia la **somatopleura extra-embriionale** che tappezza la faccia interna del citotrofoblasto e ricopre l'epitelio amniotico; l'associazione di epitelio amniotico e somatopleura extra-embriionale dà origine all'**amnios** (Fig. 11.2c). Il celoma extra-embriionale si ingrandisce considerevolmente fino a circondare il lecitocelo e la cavità amniotica, lasciando solo una zona mesodermica di ricongiungimento al citotrofoblasto, il **peduncolo embrionale**. Sarà quest'ultimo

Fig. 11.2: Seconda settimana di sviluppo

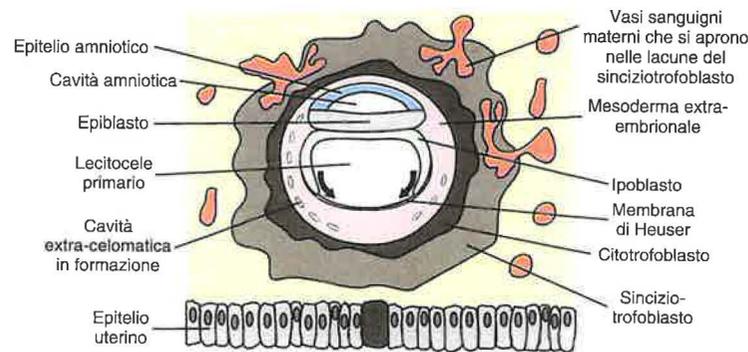
a) 8° giorno



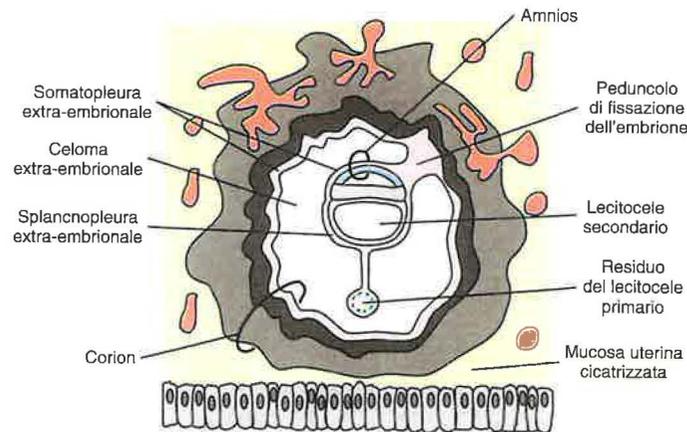
b) 10° giorno



c) 12° giorno



c) 13° giorno



seguito formerà il cordone ombelicale nel modello della formazione di una vascolarizzazione fetale.

so la fine della seconda settimana, l'impianto si sarà completato. Il disco embrionale misura circa 1 mm per una dimensione globale dell'embrione im-

### 3.3 La gastrulazione

sta fase fondamentale dell'embriogenesi si realizza durante la terza settimana dello sviluppo. Come nei rospidi, essa si manifesta morfologicamente con la presenza di una **linea primitiva** sulla superficie del blasto. Fin dal 13° giorno comincia ad evidenziarsi la linea primitiva che diventa ben visibile nell'embrione a partire da 15 giorni. Essa si estende in posizione mediana per la metà della lunghezza del disco embrionale nella futura regione posteriore dell'embrione.

All'estremità anteriore del solco che corrisponde alla zona di penetrazione del materiale cellulare mesodermico embrionale, si distingue il **nodo di Hensen** (Fig. 11.3a). Anteriormente a quest'ultimo si trova il **movimento di convergenza** del materiale cordale e tra l'epiblasto e l'ipoblasto, secondo il movimento indicato con il n. 1 nella figura (vedi sotto). I movimenti di divergenza 2 e 3 permettono la formazione del materiale mesodermico laterale. In ciascuna estremità dell'asse antero-posteriore del disco embrionale si trova una zona priva di materiale mesodermico. Queste regioni corrispondono all'area delle membrane faringea e cloacale.

La parte del materiale invaginato, inserendosi nel tubo e spostando quest'ultimo, è all'origine del **mesoderma embrionale**. Quanto alla parte epiblastica, essa si invagina, essa costituisce l'**ectoderma embrionale**. Complessivamente, la formazione di questi tre foglietti porta ad un embrione tri-dermico (Fig. 11.3b). La Figura 11.4 schematizza le tappe della formazione dei tre foglietti embrionali, tappe alle quali hanno inizio alcuni processi di organo-

grandi tratti la gastrulazione nella specie umana è paragonata a quella osservata nei Vertebrati soprattutto negli altri Mammiferi, essa presenta, in particolare riguardo alla formazione della linea primitiva, che si rivela complessa (Fig. 11.5).

La formazione della notocorda inizia al 16° giorno e si presenta inizialmente sotto forma di una struttura tubolare. In seguito, il **canale cordale**, che si invagina a partire dal nodo di Hensen e nella regione anteriore è l'equivalente del prolungamento cefalico di quello precedentemente. Al 17° giorno nella regione anteriore si forma una **placca cordale**, in se-

guito alla fusione del canale cordale con l'ipoblasto sottostante. Infine, quando le cellule endodermiche si inseriscono nell'ipoblasto, le cellule cordomesodermiche proliferano e si staccano dall'ipoblasto per costituire la notocorda definitiva sotto forma di un tubo pieno (Fig. 11.5). Questo tipo di evoluzione interessa l'insieme del materiale mesodermico cordale e conduce alla formazione progressiva della notocorda definitiva attraverso un allungamento di questa dalla regione anteriore verso la regione posteriore. Man mano che si realizza questo processo, il nodo di Hensen si sposta in posizione posteriore, riducendo la lunghezza della linea primitiva, che scompare intorno al 22° giorno.

La formazione del mesoderma embrionale assiale avviene parallelamente al differenziamento e alla organizzazione del mesoderma parassiale e delle lamine laterali. La metamerizzazione dei somiti inizia al 20° giorno nella regione cervicale dell'embrione e prosegue verso la regione posteriore con la formazione di circa 3 somiti al giorno. Il mesoderma delle lamine laterali alla periferia del disco embrionale entra in contatto con il mesoderma extra-embriale con cui si salda. A partire dal 18° giorno tra le lamine laterali si creano delle cavità che, fondendosi, formano il celoma embrionale che sarà in comunicazione con il celoma extra-embriale, ai lati dell'embrione.

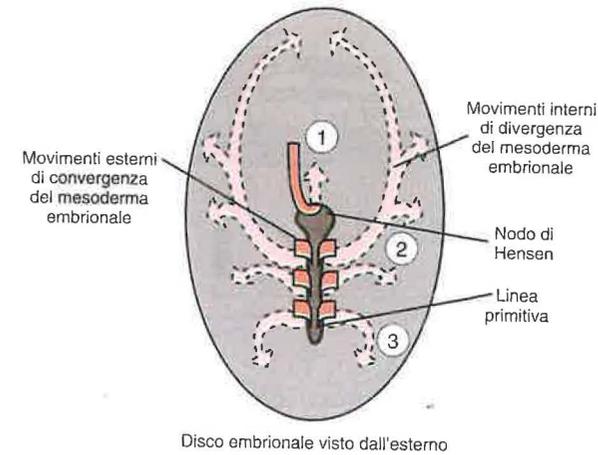
L'endoderma, in continuità con lo strato ipoblastico della parete della vescicola vitellina (lecitocoele secondario), comincia a subire un ripiegamento laterale corrispondente all'inizio della formazione del tubo digerente embrionale (vedi sotto), che in questo periodo dello sviluppo resta ancora in larga comunicazione con la vescicola vitellina. Intorno al 16° giorno, posteriormente alla membrana cloacale, nella regione superiore della parete posteriore del lecitocoele si estroflette un diverticolo, l'**allantoide**, che si inserisce nella base del peduncolo embrionale.

### 11.4 L'organogenesi

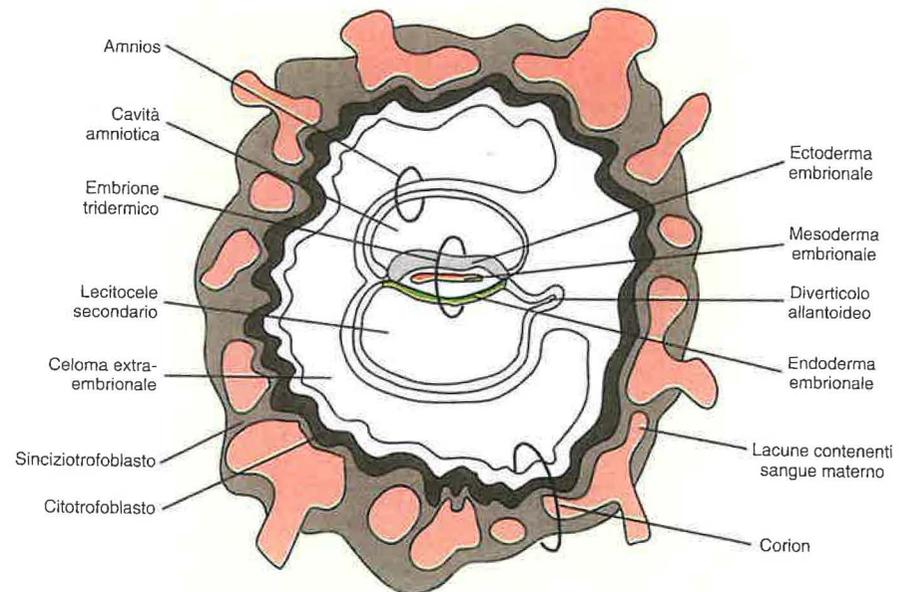
A 21 giorni, l'embrione, che misura circa 2,5 mm, è tridermico; da questo momento fino alla fine del 2° mese di gestazione avrà luogo la formazione dei suoi organi con un conseguente modellamento della forma del corpo sempre più definito. Tuttavia alcuni organi hanno iniziato già la formazione mentre la gastrulazione era ancora in atto. Infatti la piastra neurale è evidente nella regione anteriore dell'embrione dal 18° giorno e si estende posteriormente nei giorni successivi. Dal 20° giorno, la piastra neurale si suddivide, a livello della sua parte encefalica, in tre regioni (prosencefalo, mesencefalo e rombencefalo). La chiusura della doccia neurale si manifesta al 21° giorno all'altezza del tronco e procede più rapidamente verso la regione cefalica che verso la regione caudale. Durante la sua formazione, il tubo

Fig. 11.3: Terza settimana di sviluppo

#### a) I movimenti della gastrulazione

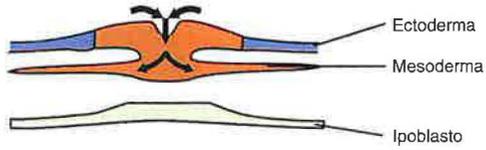


#### b) Embrione in una veduta sagittale

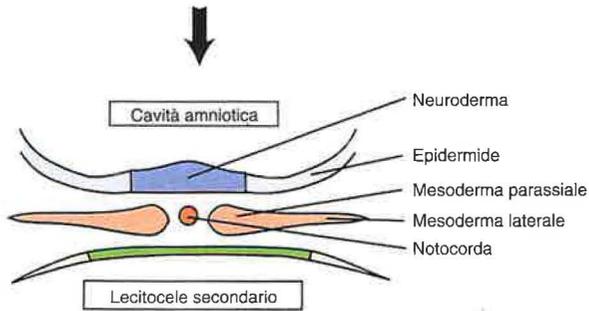


Fine della gastrulazione e della neurulazione (terza e quarta settimana).  
 è rappresentato in sezioni allo stesso livello

giorni: formazione della linea primitiva,  
 il mesoderma



giorni: notocorda,  
 la formazione della piastra neurale  
 (11.5)



giorni: differenziazione del mesoderma  
 e formazione della doccia neurale

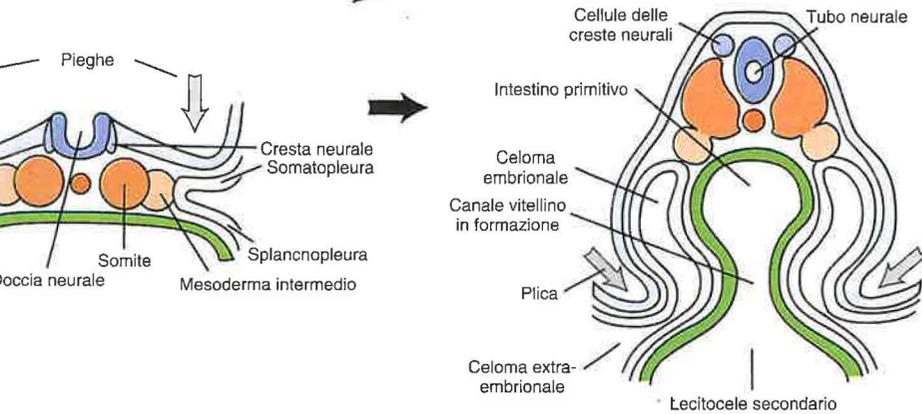
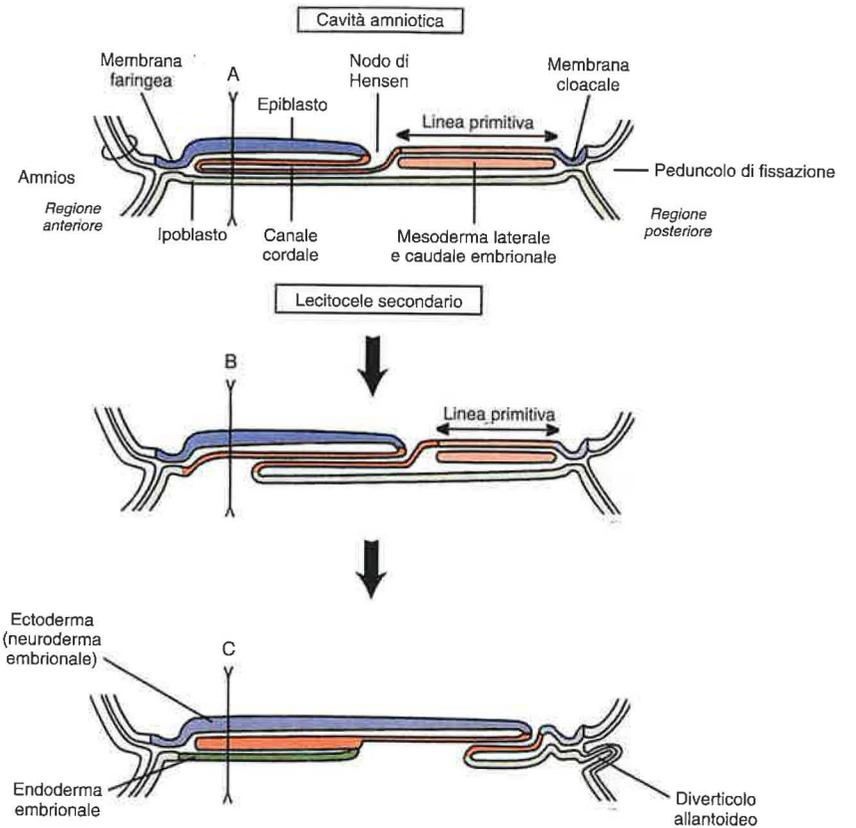
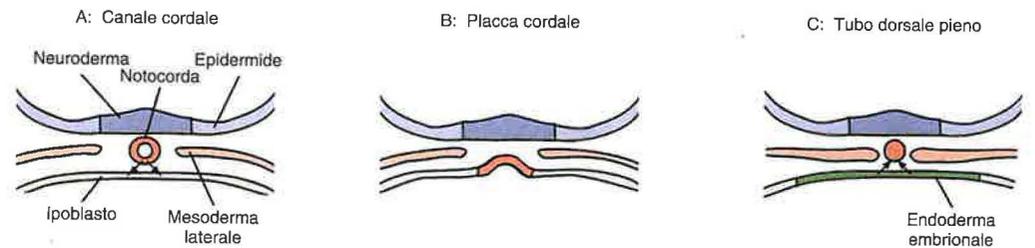


Fig. 11.5: **Formazione della corda (processo cordale, 17-19 giorni)**

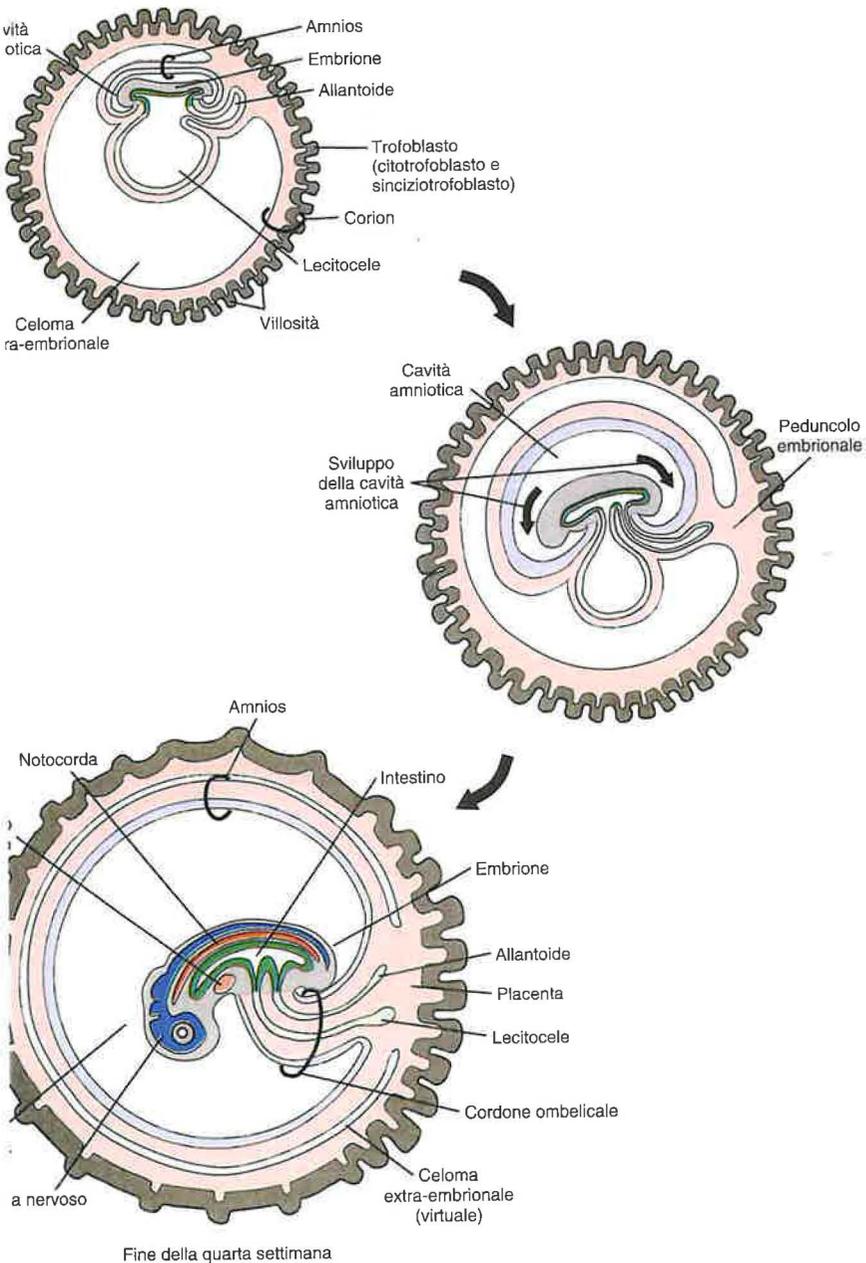
Sezioni sagittali



Sezioni trasversali



## Quarta settimana di sviluppo, veduta in sezioni sagittali



neurale comunica con la cavità amniotica attraverso **neuropori** situati a ciascuna delle sue estremità; quello anteriore si chiude nel corso del 26° giorno e il posteriore 2 giorni dopo.

Tra gli eventi precoci che caratterizzano lo sviluppo dell'embrione tra la fine della terza settimana e durante la settimana successiva è rilevante il fenomeno della **delimitazione della struttura embrionale**. L'embrione, che fino ad allora si presentava sotto forma di un disco allungato secondo l'asse cefalo-caudale, inizia a subire dei movimenti di flessione (o **ripiegamenti**) laterale e cefalo-caudale, che hanno come conseguenza di isolarlo progressivamente dal contatto diretto con i suoi annessi. Le pieghe laterali si realizzano per un ripiegamento dei bordi laterali del disco embrionale in direzione ventrale (Fig. 11.5c), come conseguenza di una rapida crescita dei somiti. A causa di questo movimento, la parte superiore del lecitocoele è incorporata nell'embrione e l'intestino in formazione resta in continuità con la vescicola vitellina residua, indicata come **vescicola ombelicale**, attraverso il canale vitellino. Il ripiegamento cefalo-caudale è dovuto essenzialmente all'accrescimento in lunghezza del tubo neurale. Lo sviluppo dell'encefalo, associato ad uno spostamento in posizione ventrale dell'abbozzo cardiaco, accentua la curvatura cefalica, e determina la formazione della parte anteriore dell'intestino che, fino all'inizio della quarta settimana, è obliterata alla sua estremità dalla membrana faringea. Analogamente, nella regione posteriore si produce una curvatura, conseguente alla flessione ventrale del peduncolo ombelicale contenente l'allantoide e i vasi placentari; il ripiegamento dell'embrione che ne consegue conduce alla formazione del tubo digerente posteriore, chiuso all'estremità dalla membrana cloacale; tale chiusura sparirà durante la nona settimana.

Alla fine, l'embrione, fortemente incurvato, è immerso nella cavità amniotica divenuta voluminosa a discapito del celoma extra-embryonale, e resta attaccato agli altri suoi annessi solo attraverso il cordone ombelicale, derivato dal peduncolo embrionale (Fig. 11.6).

Prima di trattare brevemente le principali tappe dell'organogenesi che si svolgono durante la fine del primo mese e durante tutto il secondo mese di gestazione, occorre notare che, oltre alla formazione del tessuto nervoso, si realizzano in maniera relativamente precoce al-

tre due eventi fondamentali. Infatti fin dalla metà della terza settimana compare una vascolarizzazione extra-embryonale con la comparsa delle prime cellule sanguigne nella parete vitellina; questa si collega alla vascolarizzazione embrionale che appare intorno al 19° giorno. Inoltre all'inizio della quarta settimana, si osserva la differenziazione dei gonociti primordiali nella parete del lecitocoele, in prossimità del diverticolo allantoideo. I gonociti migrano successivamente lungo l'intestino posteriore e, verso la quinta settimana, attraverso il mesentere dorsale, raggiungono e colonizzano le creste genitali formate dorsalmente nell'epitelio celomatico.

A partire dalla fine della terza settimana si osserva:

- 22-23° giorno:** 4-12 somiti; modellamento del cuore la cui formazione iniziale è avvenuta al 18-20° giorno; abbozzo del diverticolo epatico e dei polmoni.
- 24-25° giorno:** 13-20 somiti; formazione del mesonefro a partire da un blastema generato dal mesoderma intermedio; formazione della vescicola ottica; migrazione dei gonociti primordiali.
- 26° giorno:** 25 somiti circa; inizio della circolazione embrionale; differenziamento dell'epitelio digerente e delle ghiandole annesse; comparsa degli abbozzi degli arti anteriori.
- 28° giorno:** 30 somiti; scambi sanguigni con la circolazione materna; formazione del cordone ombelicale con inizio di un riassorbimento graduale dell'allantoide e del sacco vitellino; comparsa degli abbozzi degli arti posteriori.
- 32° giorno:** differenziazione del metanefro; formazione delle 5 vescicole cefaliche.
- 40-50° giorno:** modellamento della testa, soprattutto della faccia; separazione delle cavità cardiache; abbozzo delle mani e dei piedi.
- Fine del 2° mese:** consolidamento delle strutture in formazione; apertura degli occhi; la testa è arrotondata; il corpo e gli arti sono formati.

A 2 mesi l'embrione misura circa 30 mm e presenta una morfologia quasi definitiva. Inizia da questo momento una fase di crescita e di maturazione funzionale progressiva dei diversi organi formati nel corso dell'embriogenesi. Questo nuovo periodo, che si estende dalla fine del 2° mese di gestazione fino alla nascita, costituisce lo sviluppo fetale.

In quanto Vertebrati superiori, i Mammiferi, come i Sauropsidi, sviluppano degli annessi embrionali (§ 9.5) che permettono loro di assicurare condizioni favorevoli affinché lo sviluppo avvenga totalmente in un ambiente di tipo terrestre (es. presenza dell'amnios). Tuttavia, ad eccezione dei Prototeri, in cui l'embriogenesi è fortemente paragonabile a quella dei Sauropsidi, gli altri Mammiferi posseggono delle uova alecitiche (Tabella 1.3), e l'assenza di sostanze di riserva di origine materna comporta la messa in opera di una strategia particolare per sopperire *in utero* alla mancanza di apporti nutritivi nell'uovo e soddisfare i bisogni trofici immediati dell'embrione. La placentazione rappresenta, per i Mammiferi Euteri, la risposta a queste esigenze.

In questo capitolo saranno affrontate le differenti modalità osservate a seconda delle specie nel momento della formazione di ciascuno dei due annessi embrionali fondamentali, amnios e placenta. Gli altri due annessi embrionali, che sono la vescicola vitellina e l'allantoide, saranno considerati essenzialmente a proposito del loro ruolo nella formazione della placenta.

## 12.1 L'amniogenesi

L'amnios è l'annesso embrionale la cui comparsa determina una differenza sostanziale tra i Vertebrati che lo posseggono e quelli che ne sono privi, in quanto garantisce la capacità di sviluppo indipendentemente dall'ambiente acquatico (§ 9.5.2). Esso presenta nei Mammiferi tre principali modalità di formazione. Due sono state già trattate nei due capitoli precedenti.

Il primo tipo è l'amniogenesi per pieghe (o pliche) che si osserva nella maggior parte dei Mammiferi (Carnivori, Ungulati, Lagomorfi, molti Insettivori, alcuni Roditori e Primati primitivi). In questo caso, successivamente all'apertura di una cavità prossimale nel bottone embrionale, si formano delle pliche amniotiche, analogamente a quanto avviene nei Sauropsidi (§ 9.5.2), la cui fusione porterà alla formazione della cavità amniotica (Fig. 12.1a).

L'amniogenesi per cavitazione (o schizocelia) rappresenta l'alternativa principale alla tipologia precedentemente citata. Descritta a proposito dello sviluppo

umano (§ 11.3.2), questa modalità di formazione è osservata nella maggior parte dei Primati, dei Chiroteri e di qualche Insettivoro come il toporagno e il riccio. La cavità amniotica si forma direttamente a partire dalla comparsa nella massa cellulare interna (il bottone embrionale) di cavità multiple che progressivamente confluiscono a formare una cavità unica (Fig. 12.1 b).

Infine, in particolar modo, nei Roditori Muridi (topo, ratto) si osserva un terzo tipo di amniogenesi denominata *mista* o *per cisti ectocoriale*. Infatti, in queste specie, alla formazione della cavità amniotica contribuiscono sia il sollevamento di pliche che il processo di cavitazione (§ 10.3.2 a proposito dello sviluppo del topo).

## 12.2 La placentazione

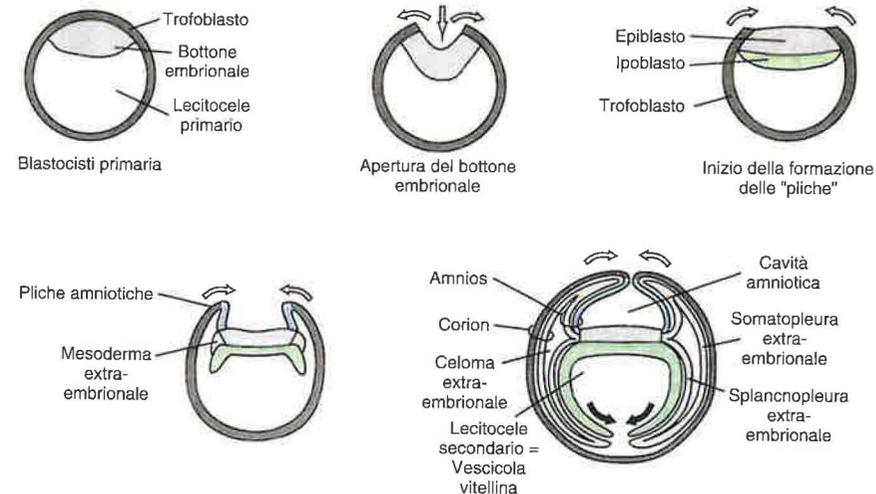
La placentazione assicura non solo l'ancoraggio del feto alla parete delle vie genitali materne, ma permette anche gli scambi nutritivi tra la madre e il feto. Complessivamente, la placenta è una struttura mista costituita da parti provenienti contemporaneamente dall'embrione e dalla madre. Il contributo materno è dato dalla mucosa uterina che è ipertrofica e riccamente vascolarizzata. Questa mucosa corrisponde all'endometrio costituito dall'epitelio uterino, che può essere più o meno corroso, e dal connettivo sottostante. La parte embrionale è rappresentata dal corion, inizialmente formato dal trofoblasto e dalla somatopleura extra-embriionale. Dal corion si formano numerose villosità, la cui struttura e il cui numero evolvono secondo i tempi di gestazione e secondo le specie. Inoltre, la partecipazione più o meno importante di ciascuno dei tre annessi (vescicola vitellina, allantoide, amnios) alla formazione della placenta, permette di distinguere tipi differenti di placentazione secondo le specie.

### 12.2.1 I villi placentari

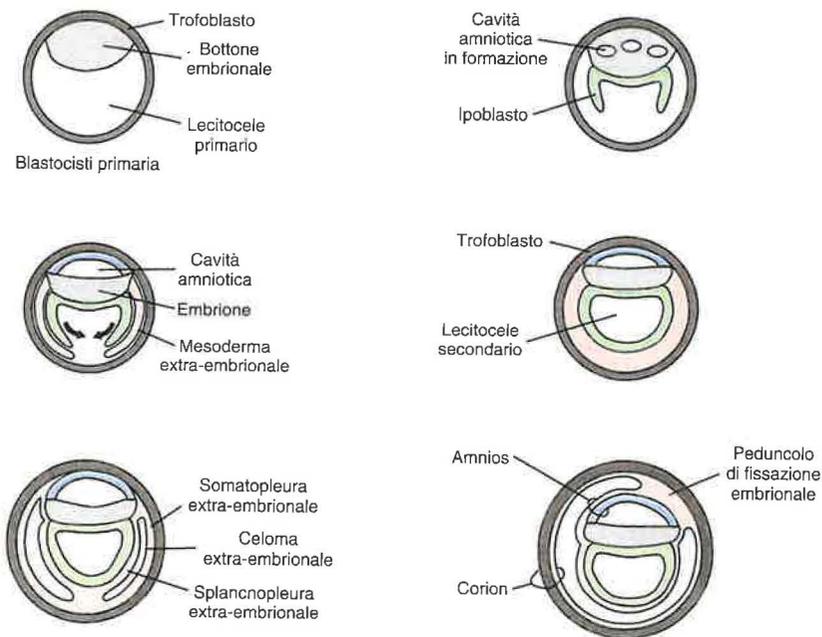
Il trofoblasto è costituito da due strati, uno esterno di struttura sinciziale, il sinciziotrofoblasto, in contatto diretto con l'endometrio uterino che racchiude numerose lacune sanguigne alimentate dal sangue materno, e l'altro interno, il citotrofoblasto, la cui faccia interna è rivestita dalla somatopleura extra-embriionale (§ 11.3.1-2).

1: Tipi di amniogenesi

**logenesi per pliche:** Lagomorfi; Carnivori, Ongulati, Insettivori, Primati primitivi, qualche Roditore.



**logenesi per cavitazione:** Primati (scimmie, uomo), Chiroterri e qualche Insettivoro (porcospino, toporagno)



b) L'allantoide

Nei Prototerri, l'allantoide, che non entra in contatto con il corion, è essenzialmente ridotta ad un ruolo di accumulo degli scarti del metabolismo azotato e non interviene negli scambi respiratori.

Nei Marsupiali, l'allantoide presenta una dimensione analoga a quella della vescicola vitellina ed entrando in contatto con il corion può, in alcune specie quali quelle del genere *Perameles*, essere all'origine di una placentazione mista, una placentazione **allanto-vitellino-coriale**, che rappresenta una forma di transizione riscontrabile per un periodo più o meno lungo di gestazione in alcuni Mammiferi Placentati.

Negli Euteri, alcuni *taxa* quali i Carnivori, i Cetacei, gli Insettivori, i Ruminanti, i Primati primitivi presentano un'allantoide largamente sviluppata che tappezza la parete interna del corion. Tale annesso, invece, è più o meno ridotto nei Chiroterri, nei Lagomorfi, nei Primati, quasi assente nei Roditori. Tuttavia, in tutti i casi (§ 12.2.1) partecipa in tutto o in parte alla vascolarizzazione corionica, e la **placentazione allanto-coriale** costituisce una caratteristica dei Mammiferi Euteri (Fig. 12.3b).

c) L'amnios

Nei Mammiferi ovipari e vivipari aplacentati, l'amnios non entra in contatto con il corion. Diverso è il caso degli Euteri come illustrato nella *Figura 12.3b* riferita ai Ruminanti e della specie umana (Fig. 11.6), dove l'amnios è in contatto con il corion liscio. Generalmente, questo annesso non vascolarizzato non partecipa alla formazione della placenta.

Nella specie umana, all'inizio della terza settimana di gestazione, appaiono dei villi a partire da queste differenti strutture.

Inizialmente si differenziano i **villi primari**, costituiti semplicemente da un asse citotrofoblastico circondato da materiale cellulare sinciziotrofoblastico (Fig. 12.2a). Entro questi assi si infila rapidamente del materiale mesenchimatico derivato dal mesoderma extra-embriionale, dando così origine ai **villi secondari** (Fig. 12.2b). Alla fine della terza settimana, si forma un'ultima generazione di villi, corrispondenti ai villi placentari definitivi, i **villi terziari** (Fig. 12.2c). Questi ultimi si caratterizzano per la formazione, a partire dal mesenchima assiale, di una rete capillare sanguigna che si mette in relazione con un sistema vascolare generato dalla splancoopleura allantoidea, connesso con il sistema circolatorio embrionale. Occorre ricordare che la vascolarizzazione del corion avviene successivamente, in conseguenza di una colonizzazione della somatopleura extra-embriionale da parte di elementi vascolari originati sia dalla vescicola vitellina, sia dall'allantoide (§ 12.2.2). La vascolarizzazione di origine vitellina si incontra essenzialmente nei Metateri (**placenta vitellino-coriale**), mentre la vascolarizzazione allantoidea del corion è osservata in tutti gli Euteri, come è stato già descritto precedentemente a proposito della specie umana (**placenta allanto-coriale**). Tuttavia, in alcuni Euteri può essere osservata una placentazione mista, in funzione dei tempi di gestazione (vedi sotto).

12.2.2 L'importanza dei differenti annessi

a) La vescicola vitellina

Molto sviluppata nei Mammiferi Prototerri, la sua presenza implica, per le specie considerate, uno sviluppo analogo a quello dei Saurapsidi con assenza di placentazione.

Nei Mammiferi Metateri, la vescicola è ancora relativamente sviluppata e determina, nella maggior parte dei casi, un contatto tra corion e vescicola vitellina che termina con una **placentazione vitellino-coriale**, il cui ruolo resta limitato (Fig. 12.3a).

Nella maggior parte degli Euteri, questo annesso, ridotto ad una forma vestigiale, non interviene nella formazione della placenta. Tuttavia, in alcune specie (Insettivori, alcuni Chiroterri, molti Roditori) la vescicola vitellina resta sviluppata e può, in maniera transitoria, giocare un ruolo nella formazione della placenta ed essere all'origine di una parte della vascolarizzazione corionica (§ 12.2.1). Invece, nei Carnivori, anche se il sacco vitellino occupa un volume non trascurabile, esso non entra in contatto con il corion.

Oltre a questo primo tipo di distinzione riguardante la placentazione, in relazione alla partecipazione dei diversi annessi embrionali è possibile effettuare nei Mammiferi Euteri altre suddivisioni, da una parte in relazione al grado di **partecipazione** della mucosa uterina materna nella formazione della placenta, e dall'altra in funzione della disposizione dei villi placentari.

12.2.3 I differenti tipi di placenta nei Mammiferi Euteri

Secondo il grado di interazione del corion a livello della mucosa uterina e la maggiore o minore corrosione di quest'ultima ad opera del tessuto trofoblastico, al momento del parto una parte della mucosa può essere eliminata, accompagnata o no da un processo emorragico. Si indicano con il termine di **placentazione deciduata** o **adeciduata** le placente che danno luogo rispettivamente a una emorragia o no al momento del parto (Fig. 12.4a).

1.2: Evoluzione dei villi placentari nell'uomo

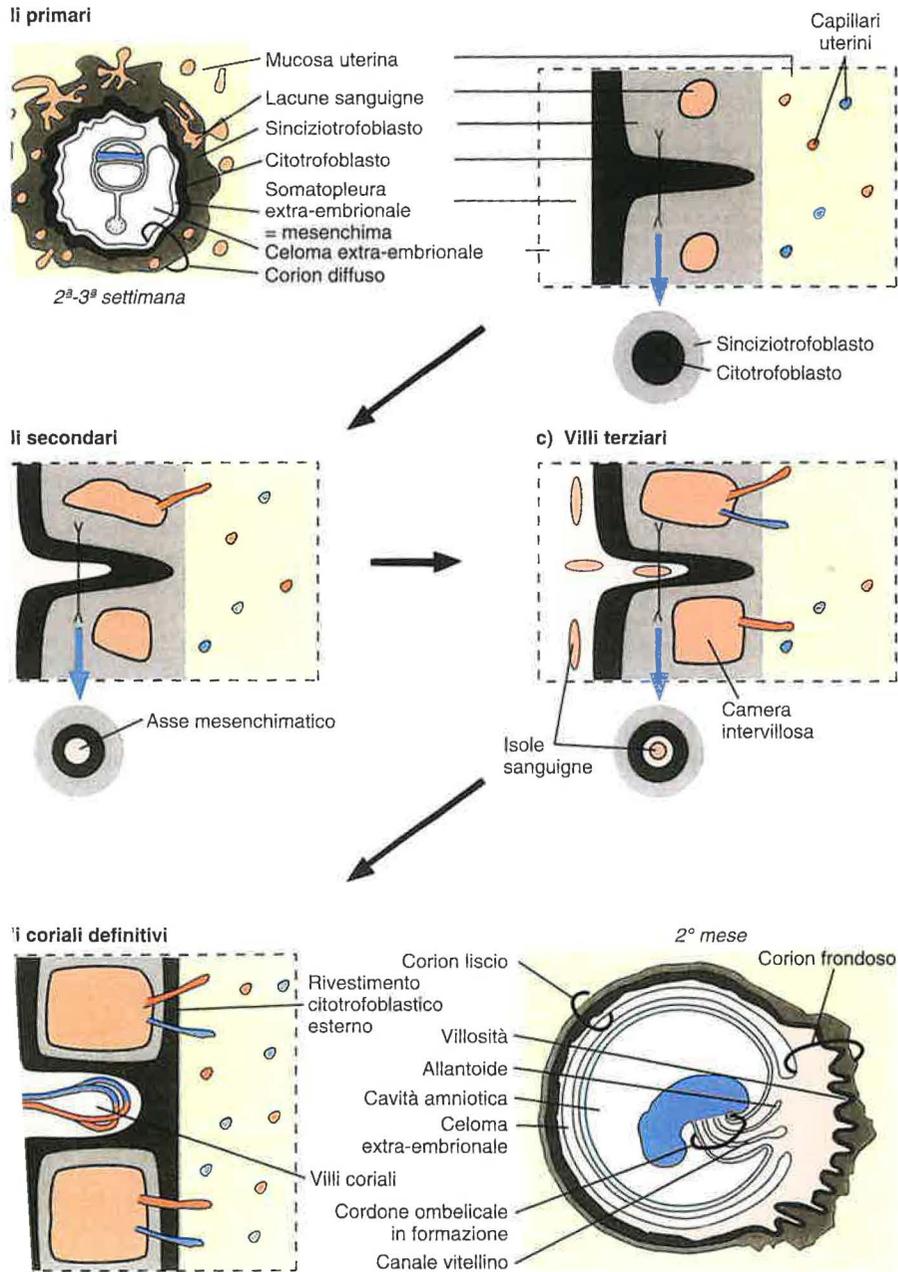
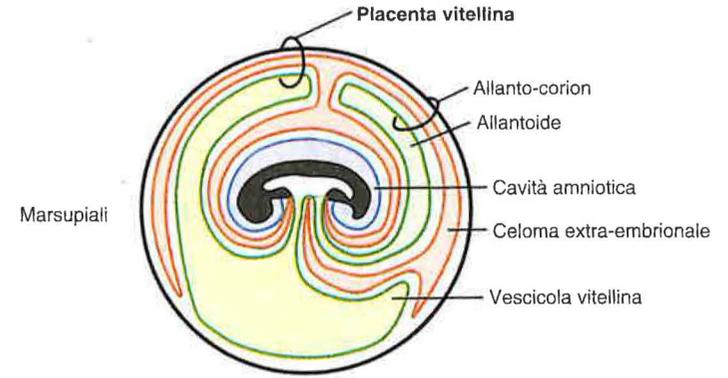
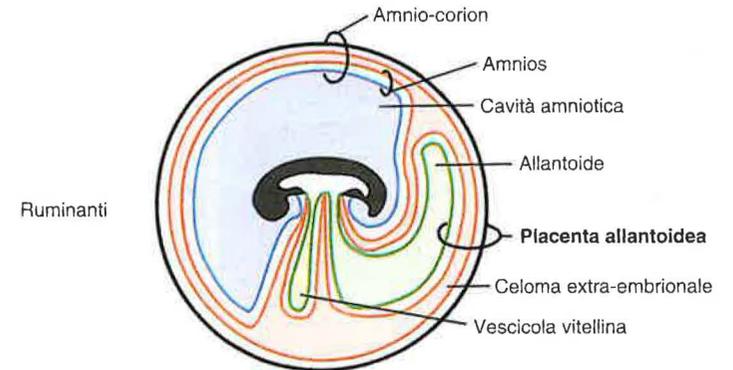
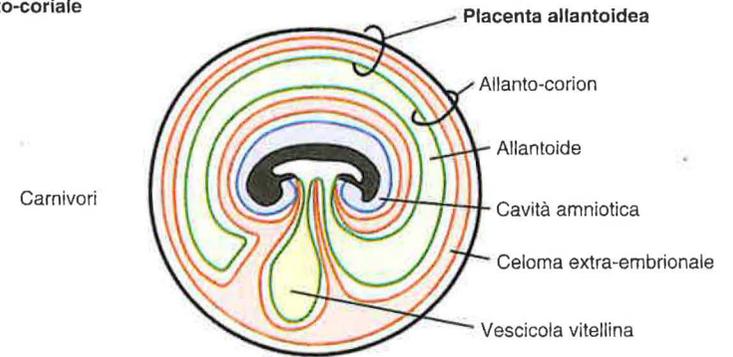


Fig. 12.3: Partecipazione degli annessi embrionali nella formazione della placenta

a) Placenta vitellino-coriale

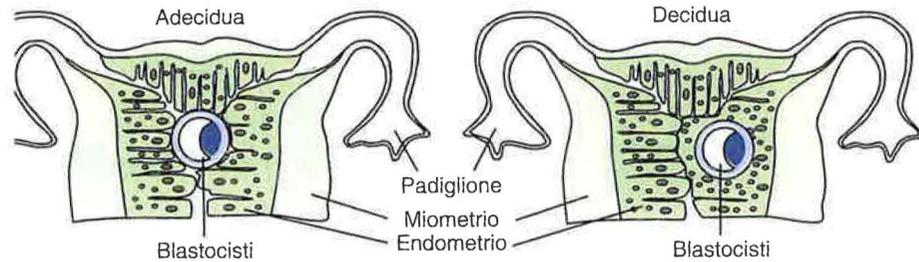


b) Placenta allanto-coriale



4: Impianti e tipi di placenta

pianto



ti di placenta

	Endometrio uterino	Corion embrionale = Villi della placenta fetale		
dua	Capillari Connettivo Epitelio	Trofoblasto Mesenchima extra-embriionale Capillari allantoidei	Placenta diffusa	Pachidermi Cetacei Equidi Suini
			Placenta cotiledonare	Ruminanti
ua			Placenta zonale	Carnivori
			Placenta discoidale	Insettivori Chiroterri Roditori Primati

Labels at the bottom: Capillari, Lacune, Mucosa sanguigne uterina materna, Mesenchima embrionale, Sincizio coriale, Endometrio uterino, Corion embrionale = Villi della placenta fetale.

a) Placente adecidue

Nessuna emorragia si produce con l'espulsione della placenta al momento del parto. In questo tipo di placentazione, la corrosione del tessuto uterino, se questa si è prodotta, non danneggia alcuna struttura vascolare materna.

Entrano in questa categoria di placentazione due tipi di placente (Fig. 12.4b1).

- **Placenta di tipo epitelio-coriale.** È possibile osservarla negli Equidi, nei Suidi, nei Cetacei, nei Pachidermi e in alcuni Ruminanti. Questo tipo di placenta, considerata primitiva, risulta da una semplice apposizione tra le strutture uterine ed embrionali, senza lesioni a livello del tessuto materno. Nello spazio che separa i due tessuti viene secreto il "latte uterino", che viene assorbito dal corion.

I villi sono presenti su tutta la superficie trofoblastica giustificando così il termine di diffusa per indicare questo tipo di placenta.

- **Placenta connettivo-coriale.** Questo tipo di placenta, designata a volte con il termine di sindesmo-coriale, si osserva nei Ruminanti. Essa si caratterizza per il fatto che l'epitelio uterino è corroso in maniera discontinua e ciò causa, a differenza del caso precedente, degli scambi più intimi tra i tessuti messi a contatto. Inoltre, un epitelio misto sotto forma sinciziale può formarsi a seguito della fusione tra le cellule uterine e quelle corioniche. I vasi del tessuto materno non sono direttamente in contatto con il tessuto trofoblastico.

I villi sono raggruppati in piccole aree, designate con il termine di cotiledoni. Questo tipo di placenta è detta cotiledonare.

b) Placente decidue

Contrariamente ai casi trattati precedentemente, il

tessuto trofoblastico si inserisce profondamente nella mucosa uterina provocando un danno più o meno spinto del sistema vascolare uterino. Al momento del parto, una parte dell'endometrio viene distrutto o espulso dall'organismo materno. In questo caso, si indica con il termine di *caduca* o *decidua* la parte placentare, corrispondente alla mucosa uterina, così eliminata. Inoltre, si distinguono, secondo l'entità del danno causato al sistema vascolare materno, due tipi di placente legate alla categoria delle placentazioni decidue (Fig. 12.4b2).

- **Placenta endotelio-coriale.** Questo tipo è presente nei Carnivori ma anche in alcuni Chiroterri o Insettivori (talpa). Il sinciziotrofoblasto corionico, molto sviluppato, corode il connettivo senza danneggiare i vasi materni con i quali si trova in contatto diretto. Al momento del parto, questi vasi subiscono una parziale lesione causando una limitata emorragia.

In questo tipo di placenta i villi sono disposti in maniera circolare e tale placenta prende il nome di zonale.

- **Placenta emo-coriale.** In questo tipo di placenta, il corion ha maggiormente corroso il tessuto materno in quanto i villi coriali hanno attaccato le pareti dei vasi materni, creando così delle lacune sanguigne in seno al sinciziotrofoblasto. Se la barriera endoteliale di origine materna scompare a livello di queste lacune, non è lo stesso nel caso delle pareti vascolari dei villi. Così, anche nei casi più estremi di corrosione della mucosa uterina, non si osserva mai il mescolamento delle due circolazioni sanguigne, fetale e materna. Queste caratteristiche placentari sono osservabili nei Roditori, negli Insettivori, nei Chiroterri e nella quasi totalità dei Primati.

I villi sono abitualmente distribuiti in una o due zone discoidali. Questa disposizione definisce *discoidale* il tipo di placenta. Nella specie umana, questa zona discoidale è suddivisa in sotto-regioni formanti degli pseudo-cotiledoni.