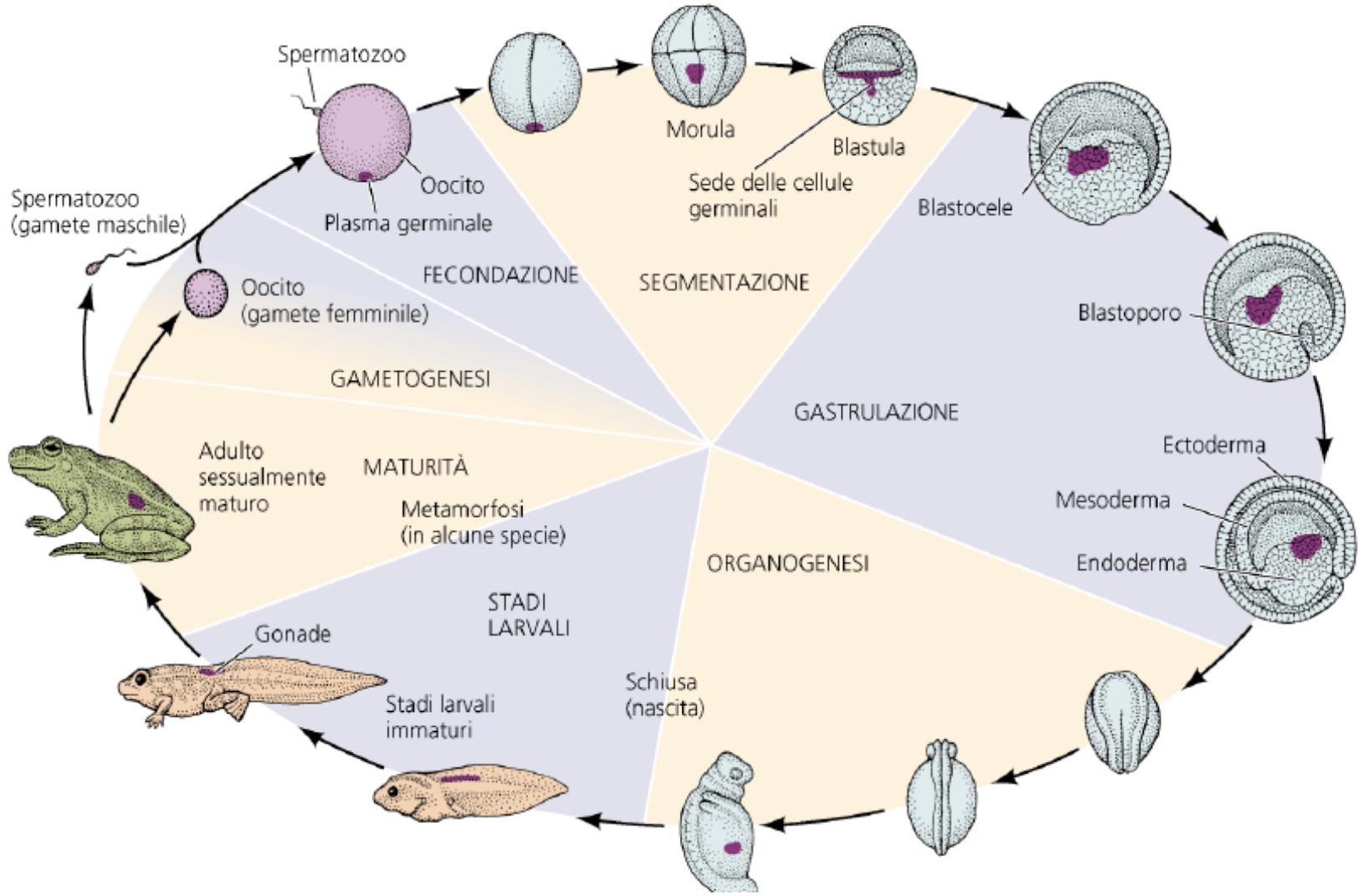


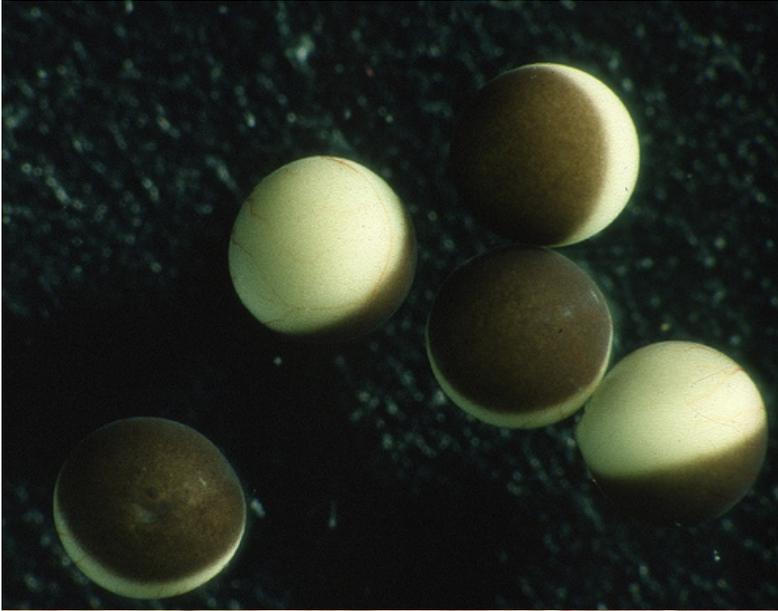
# anfibi



# Anfibi

Gli studi sugli anfibi sono stati fondamentali per chiarire la formazione degli assi corporei e le capacità induttive del mesoderma

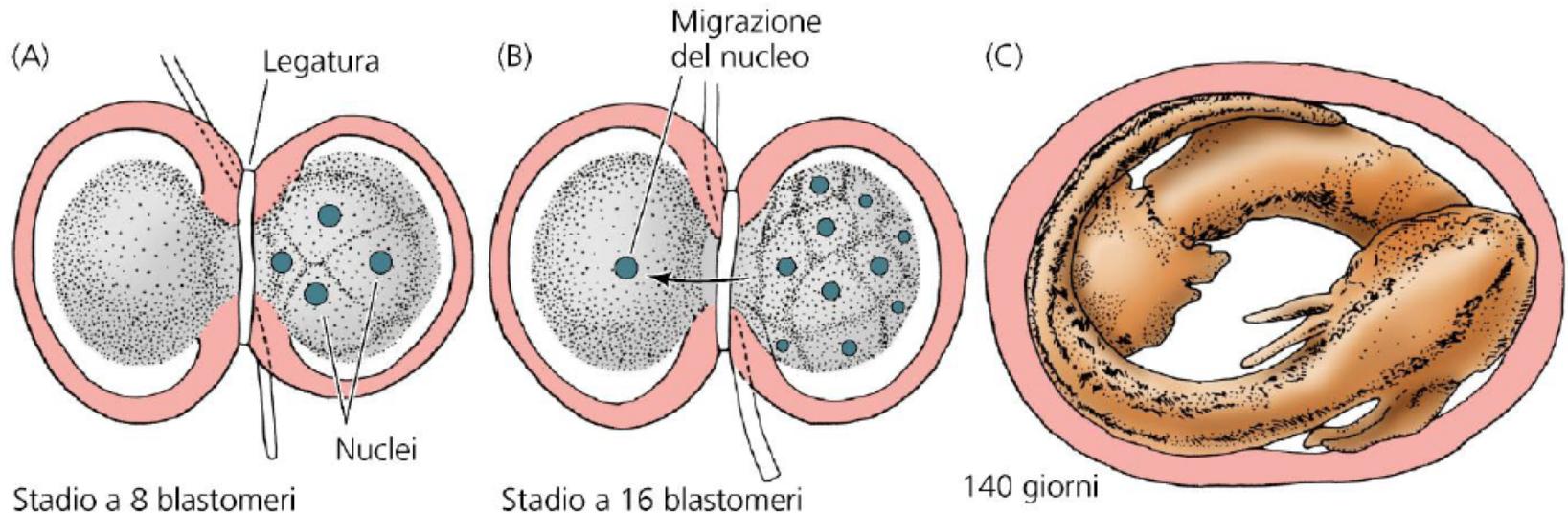
# anfibi



- Facili da mantenere
- Iniezione di ormone
- Uova grosse e manipolabili
- Sviluppo embrionale piuttosto rapido

# Tappe storiche della sperimentazione sugli Anfibi

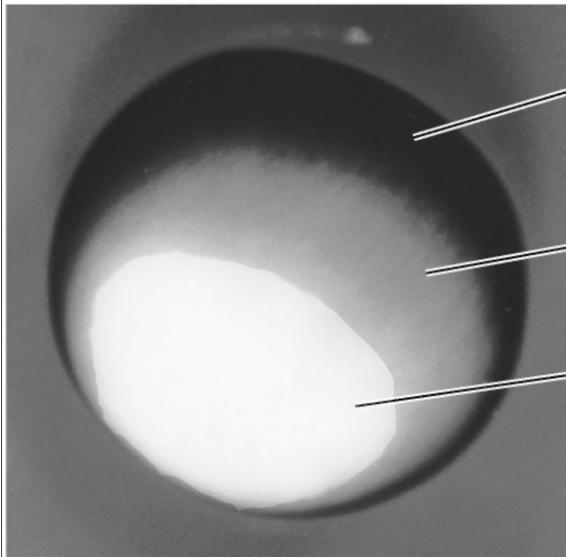
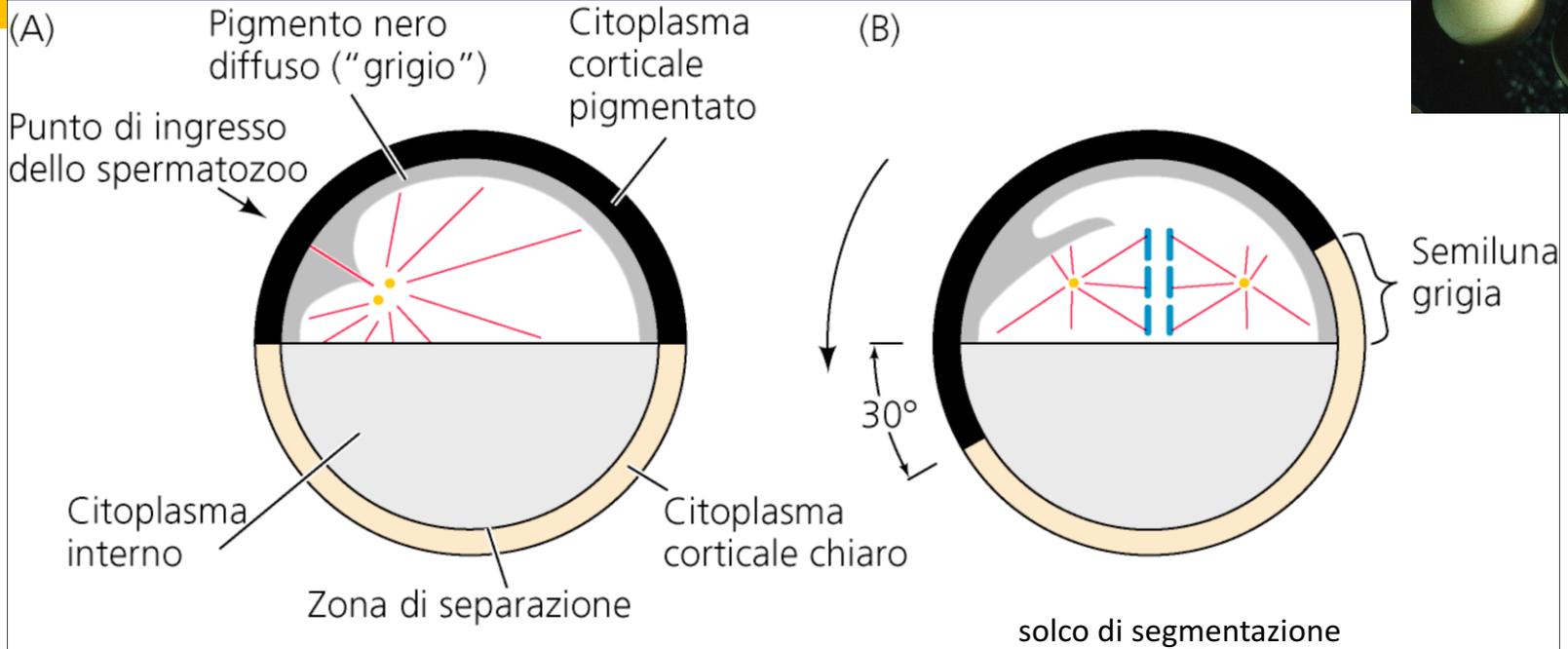
- Spemann-Mangold (1903-1924)
- Nieuwkoop-Nakamura (1969-1977)
- Gimlich-Gerhart (1984-1989)
- Dale-Slack (1987)
- Smith-Harland (1992-2001)



# **Anfibi**

Già all'atto della fecondazione si viene a determinare l'asse dorso-ventrale dell'embrione e l'asse di simmetria bilaterale

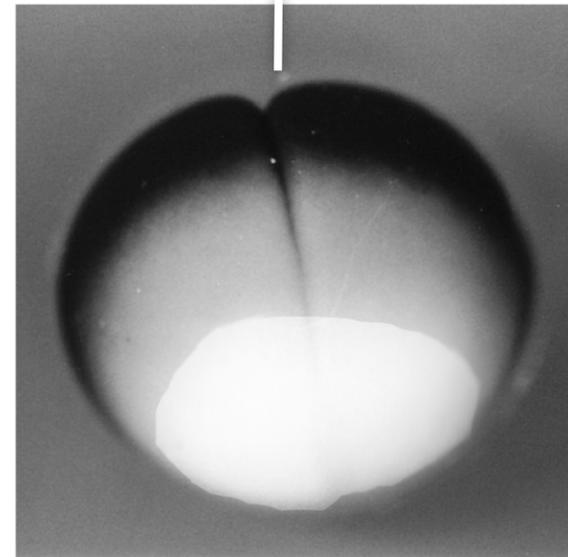
# Semiluna grigia



Regione animale pigmentata

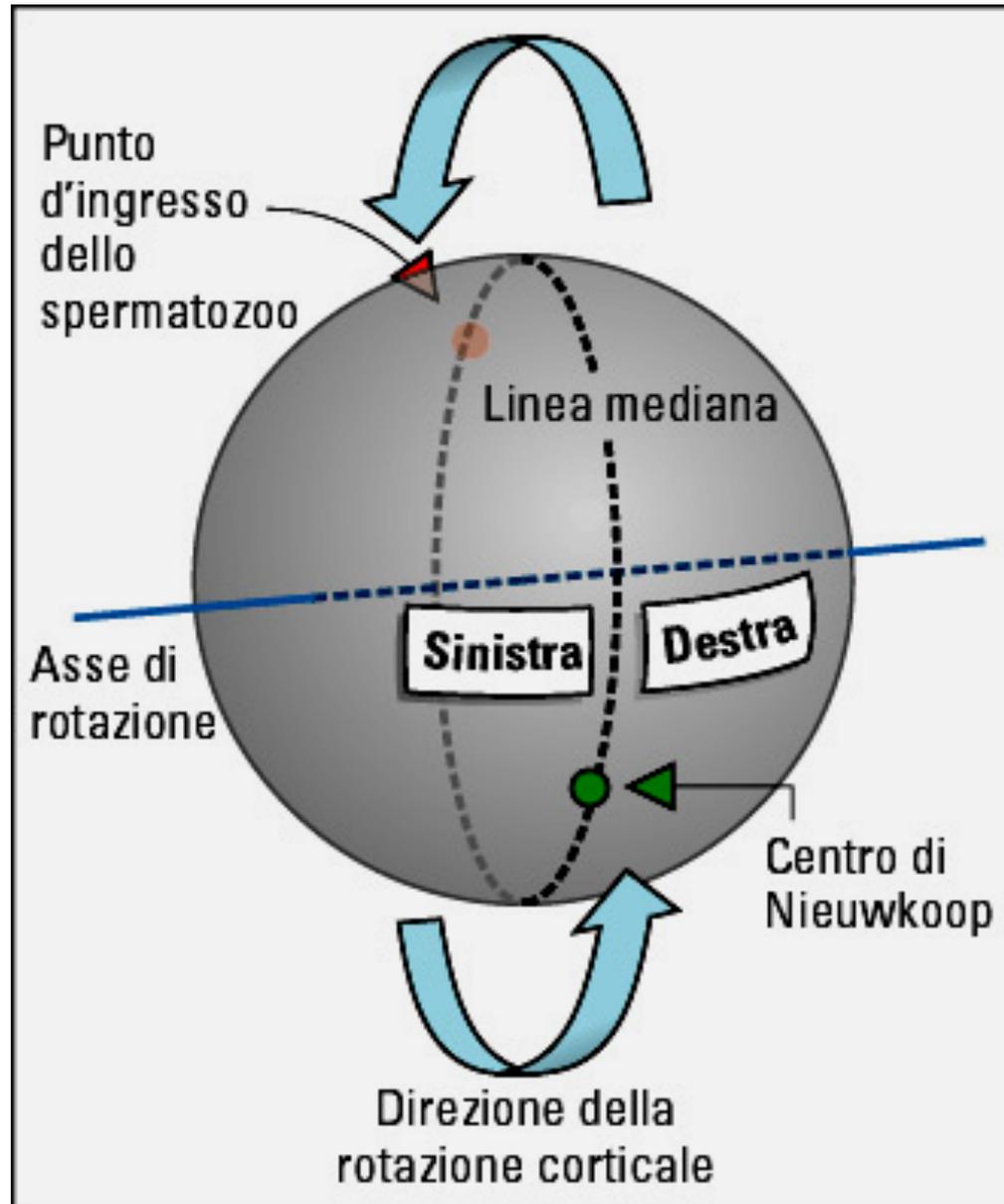
Semiluna grigia

Regione vegetativa



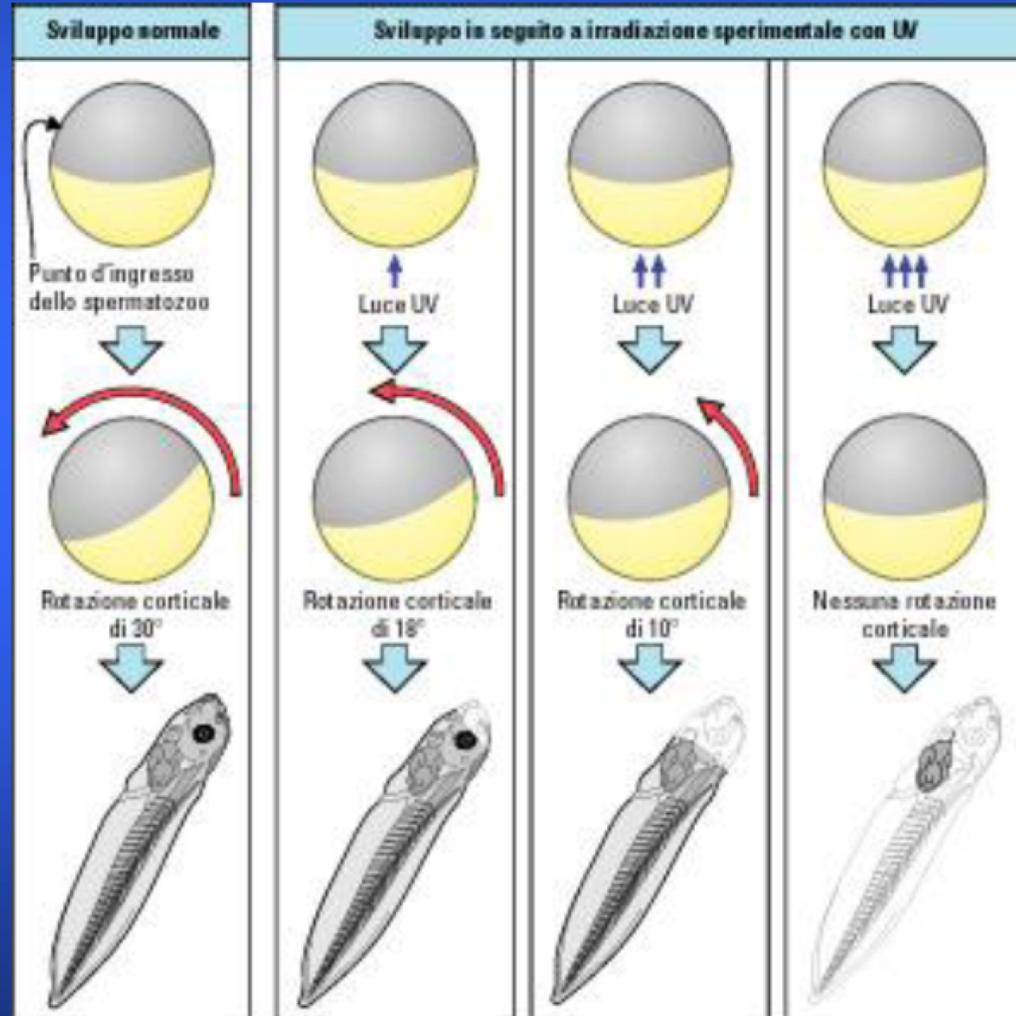
solco di segmentazione

# Schema del movimento di rotazione corticale



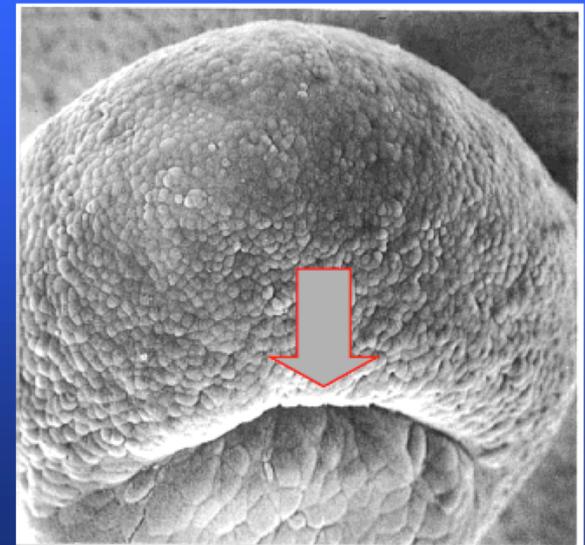
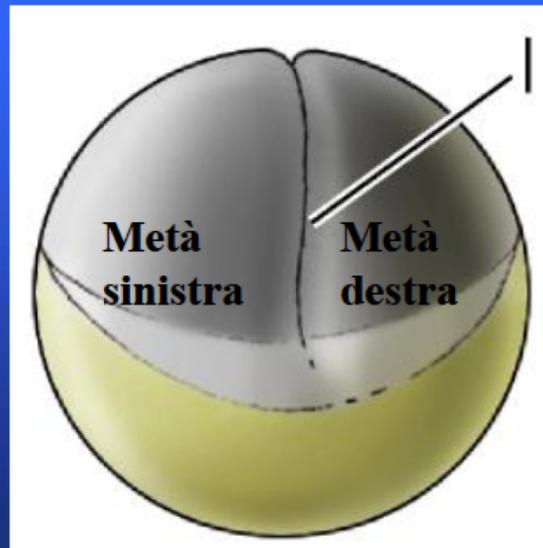
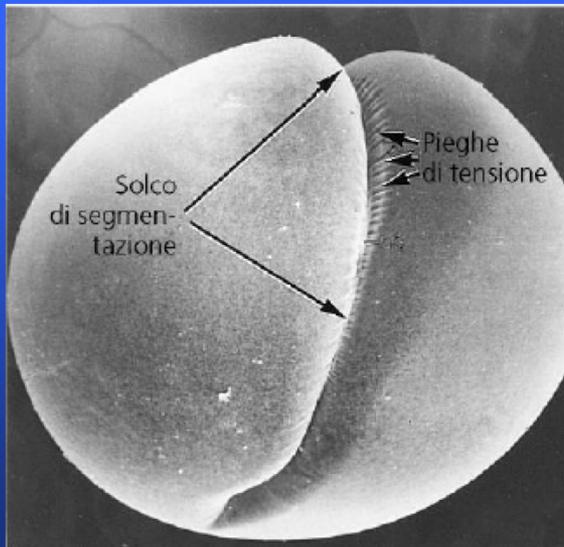
# Meccanismo della rotazione

- Lo spermatozoo provoca un riarrangiamento del citoscheletro, mediato dal centriolo
- Il sistema di microtubuli sposta il citoplasma corticale vegetativo verso il polo animale, permettendo l'interazione con questo
- Se si blocca la rotazione corticale non si ha sviluppo delle strutture dorsali

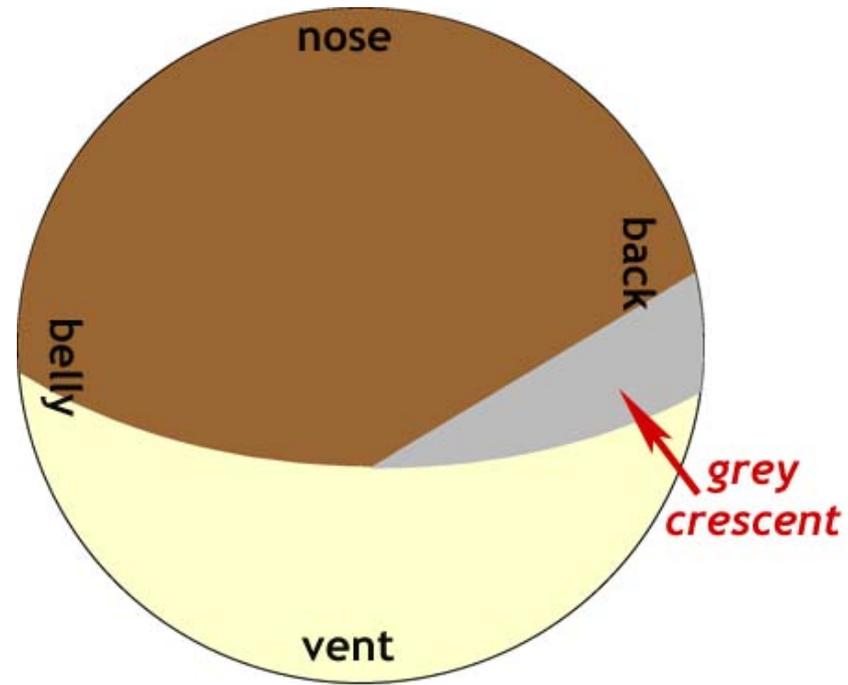
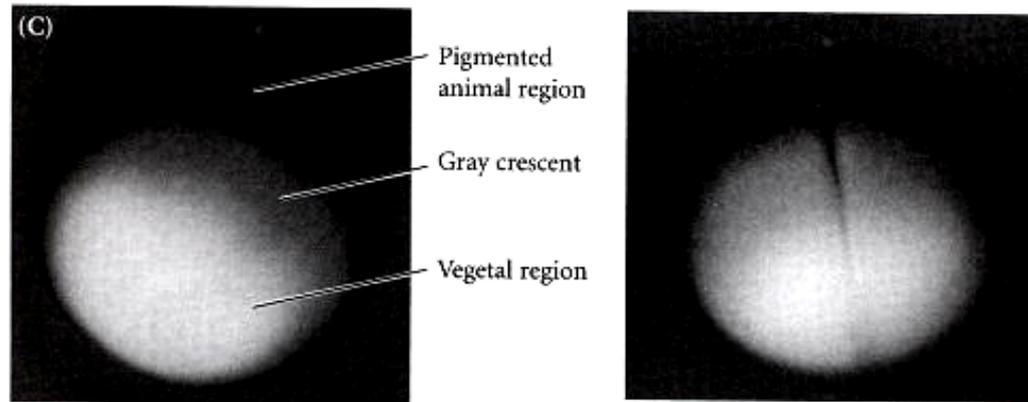
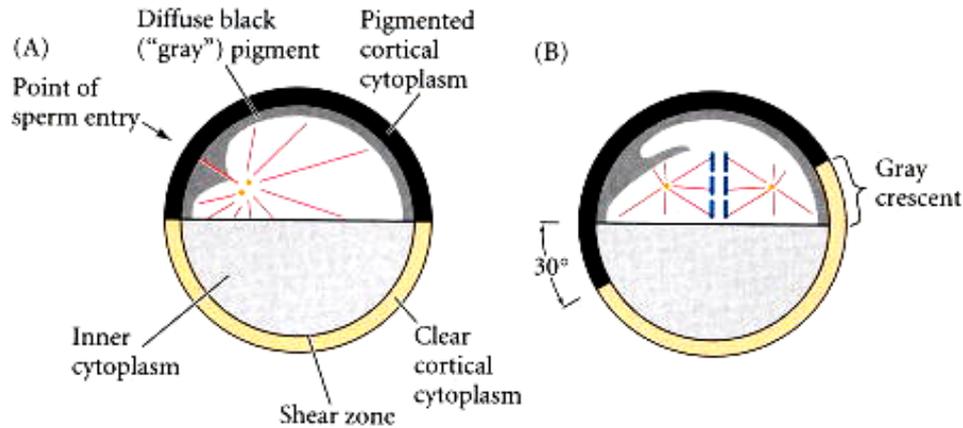


# Semiluna grigia e sviluppo dell'embrione

- La semiluna grigia individua il futuro lato dorsale dell'embrione
- Il primo piano di segmentazione divide a metà la semiluna grigia
- La semiluna grigia segna l'area in cui ha inizio la gastrulazione

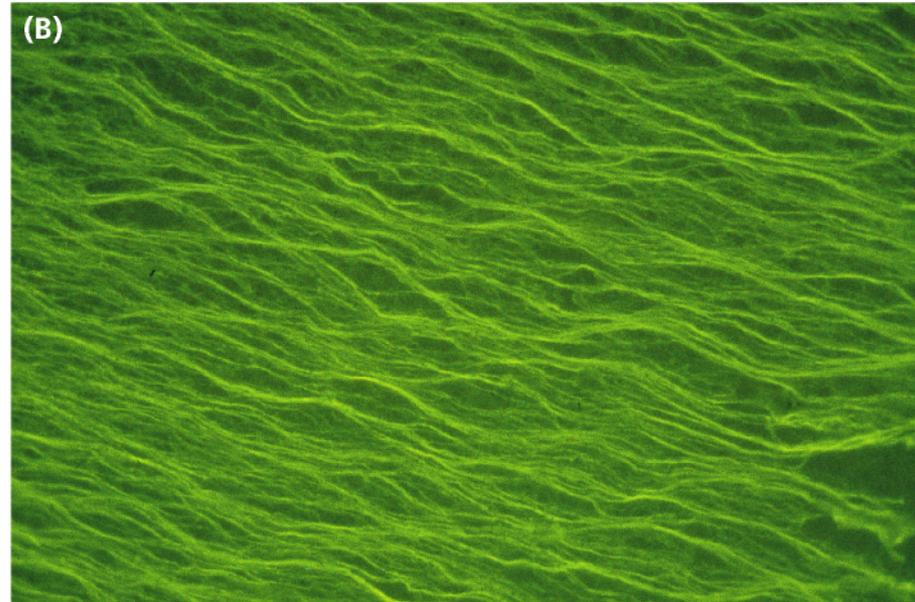
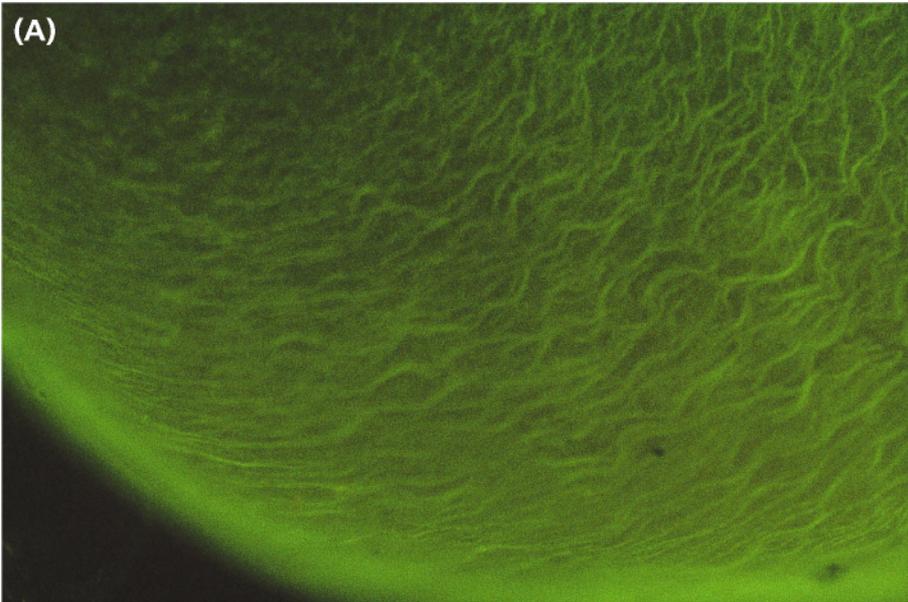


# Schema della fecondazione e rotazione corticale negli Anfibi

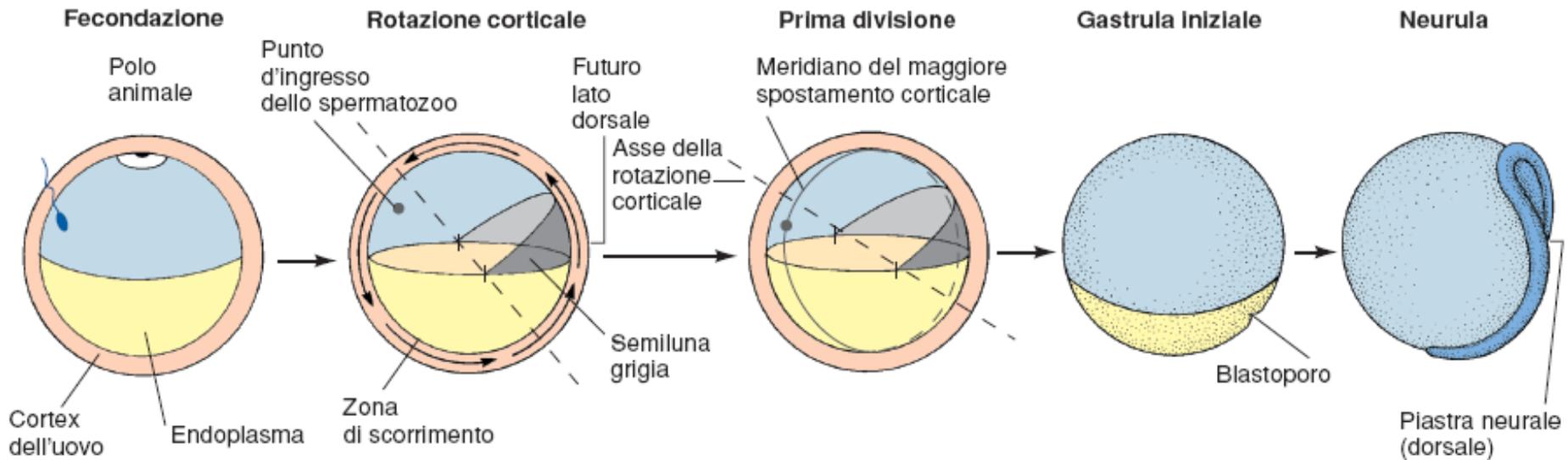


# Rotazione corticale negli Anfibi

Il citoplasma ruota grazie alla presenza di un apparato di microtubuli che si forma, al polo vegetativo, tra il citoplasma **corticale** e quello **interno**. Tale apparato compare appena prima della rotazione e scompare subito dopo.



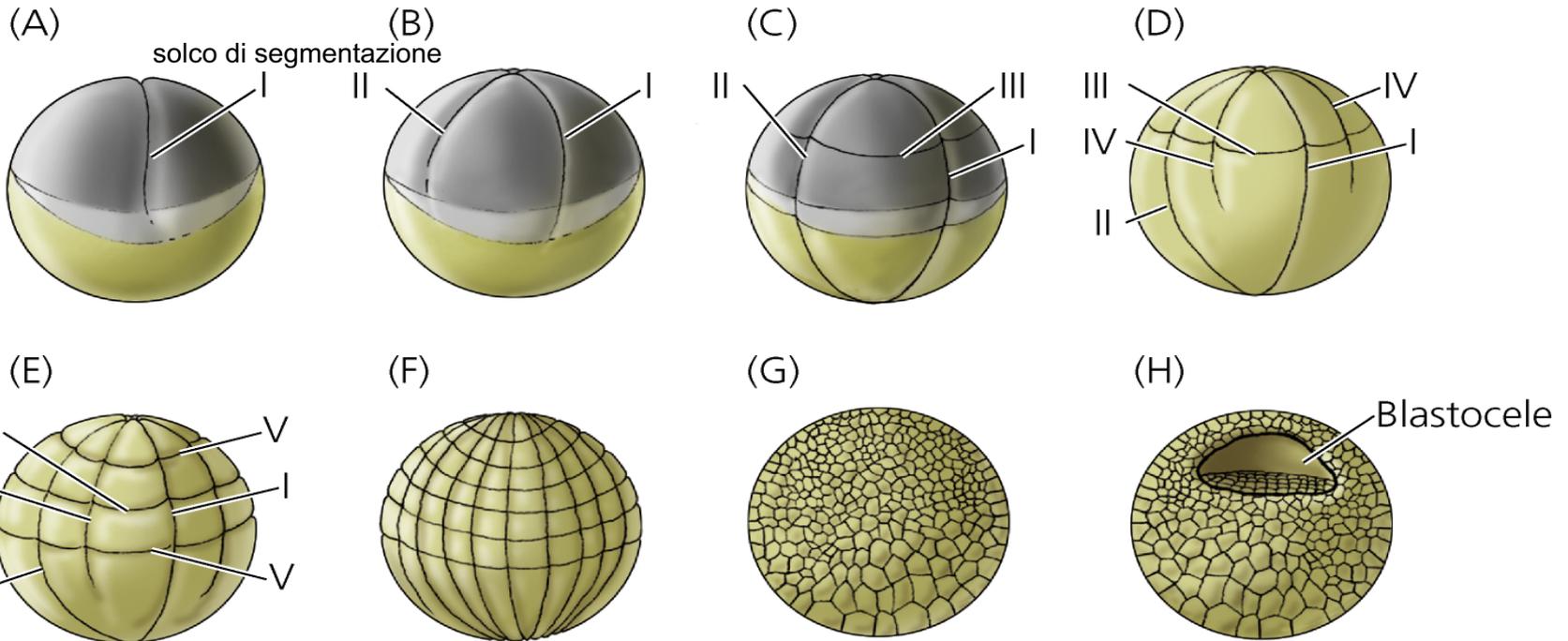
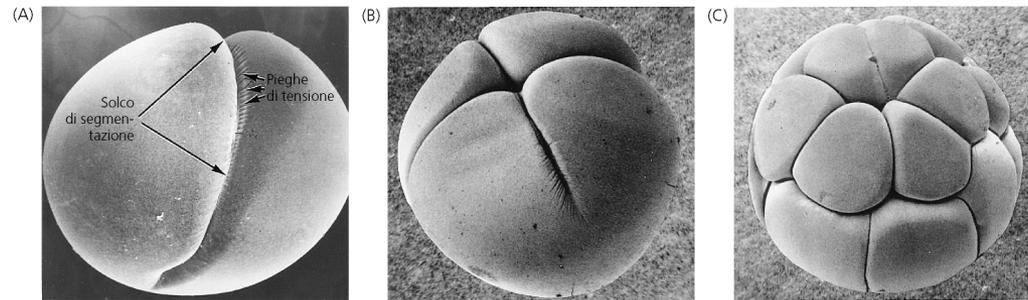
# Schema della fecondazione e rotazione corticale negli Anfibi



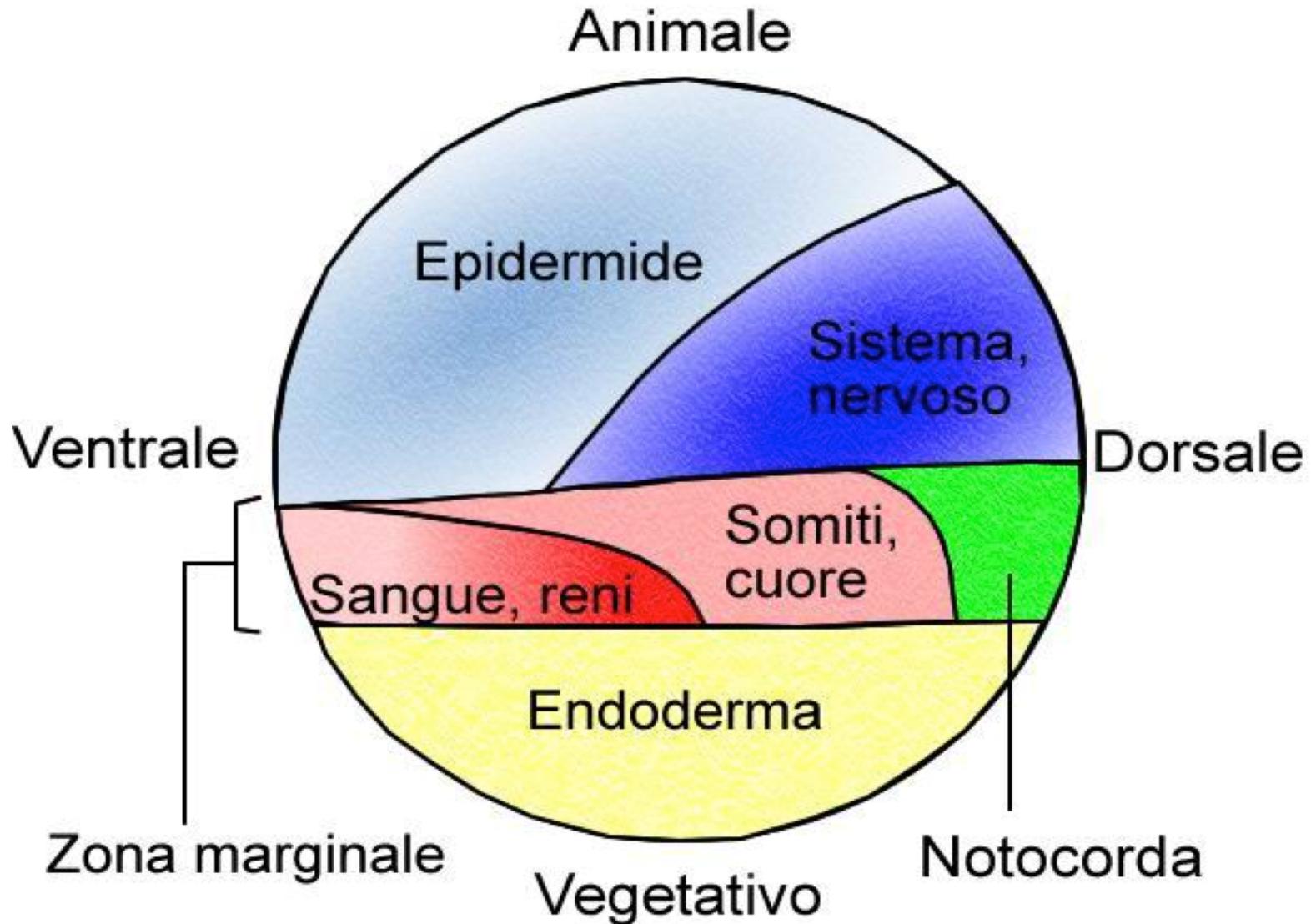
**Figura 9.7** Relazione tra la fecondazione, la rotazione corticale, la formazione della semiluna grigia e lo stabilirsi dell'asse dorso-ventrale nelle uova di anfibio. Nelle figure il polo animale è posizionato in alto, il punto di ingresso dello spermatozoo è a sinistra. Il cortex delle uova è mostrato come uno strato che avvolge il citoplasma profondo (*endoplasma*). (Lo spessore del cortex in questo disegno è stato volutamente aumentato; in realtà, esso caratterizza l'1,5% del diametro, vedi Figura 9.8 b). La rotazione corticale (freccie) fa perno su un asse (linea tratteggiata) che è perpendicolare all'asse animale-vegetativo; una zona di scorrimento segna il confine tra il cortex superficiale che ruota e l'endoplasma che non ruota. In molte specie di anfibio si forma una semiluna grigia in prossimità dell'equatore dell'uovo nella parte opposta al punto di ingresso dello spermatozoo (Figura 9.9). La semiluna grigia segna il futuro lato dorsale dell'embrione, dove si origineranno il blastoporo e successivamente la piastra neurale. Il piano che taglia a metà la semiluna grigia rappresenta la linea lungo la quale la rotazione corticale mostra la maggiore ampiezza. Questo piano corrisponde al futuro piano di simmetria bilaterale.

# anfibi - segmentazione

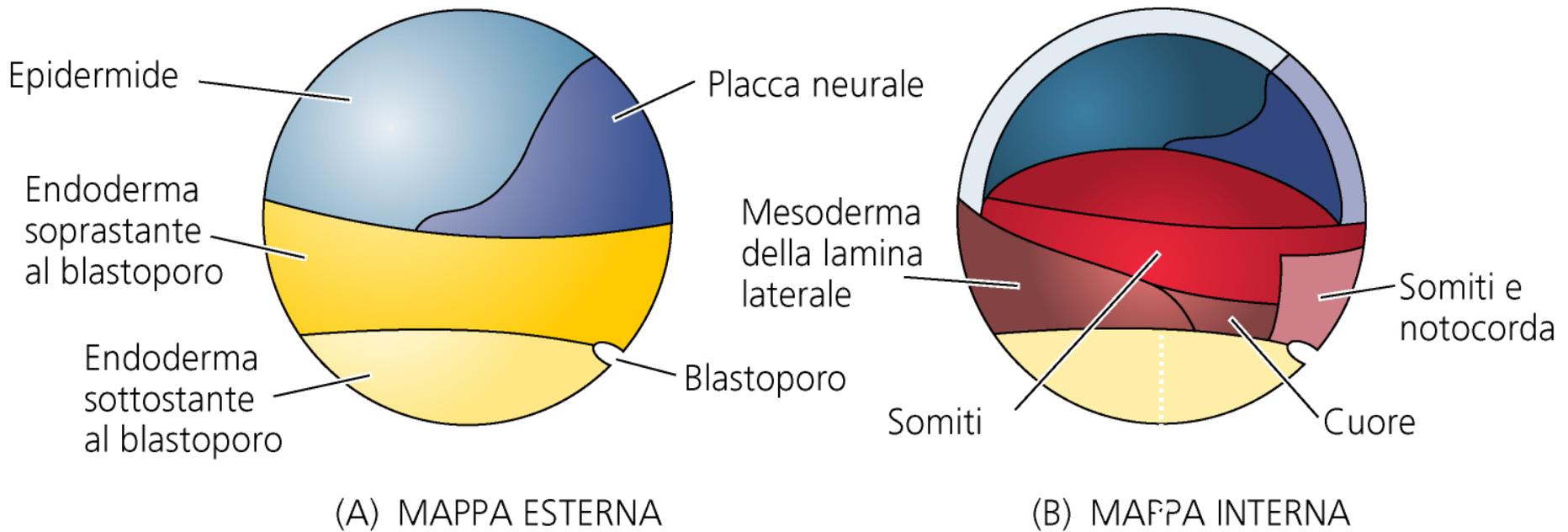
Uova mesolecitiche (quantità modesta di vitello al polo vegetativo), segmentazione oloblastica (totale) ineguale con simmetria radiale



# Mappa dei territori presuntivi negli Anfibi



# Mappa dei territori presuntivi negli Anfibi



# anfibi - segmentazione

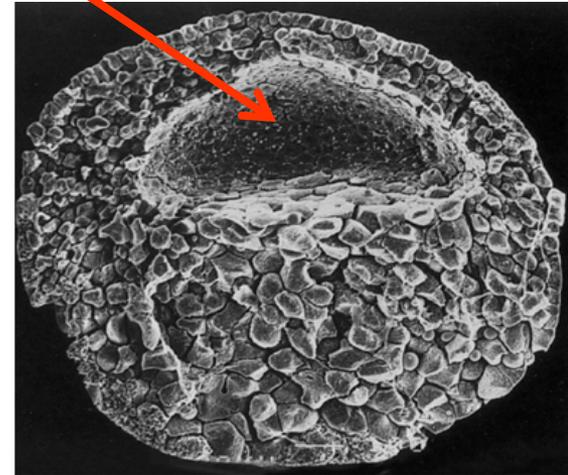
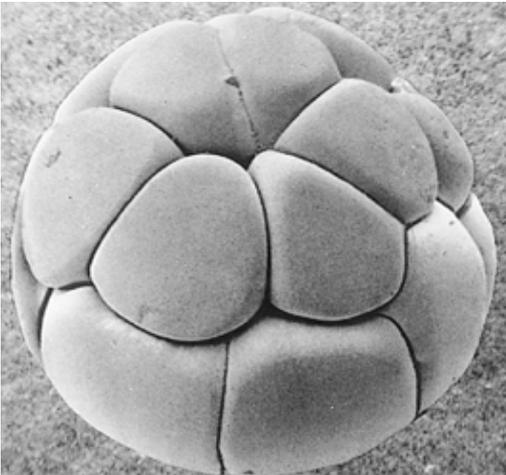
**1. Permette la migrazione cellulare durante i massivi movimenti della gastrulazione**

**2. Impedisce il contatto - quindi l'interazione - tra le cellule.**

**Morula** (16-64 cellule)

**Blastocele** (cavità)

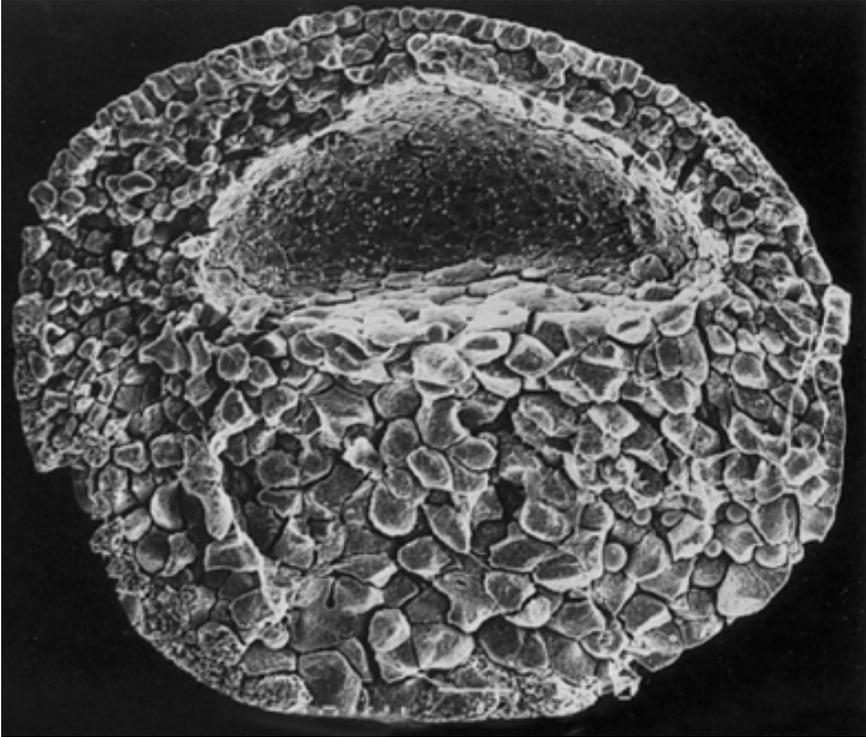
**Blastula** (128 cellule)



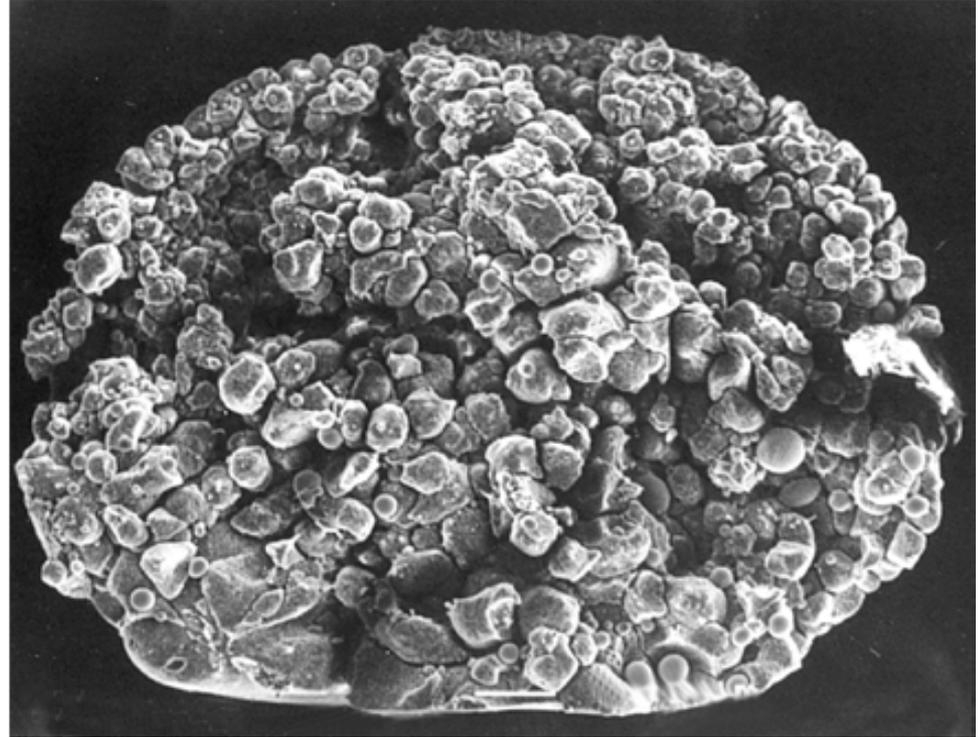
Il blastocele si forma grazie all'accumulo di fluido, richiamato per osmosi dalle cellule circostanti; nel fluido sono immessi attivamente ioni  $\text{Na}^+$ ; la fuoriuscita del liquido è impedita da giunzioni strette tra le cellule che tappezzano la cavità, formate dalla proteina E-caderina.

# blastocelle

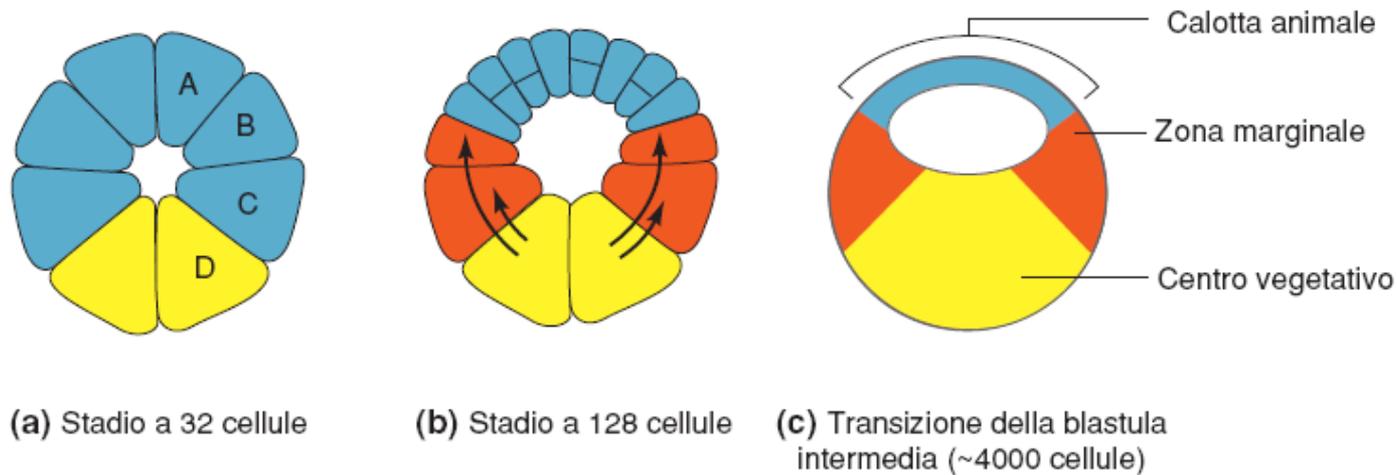
controllo



oligonucleotidi antisenso anti-EP-caderina



Heasman *et al*, 1994



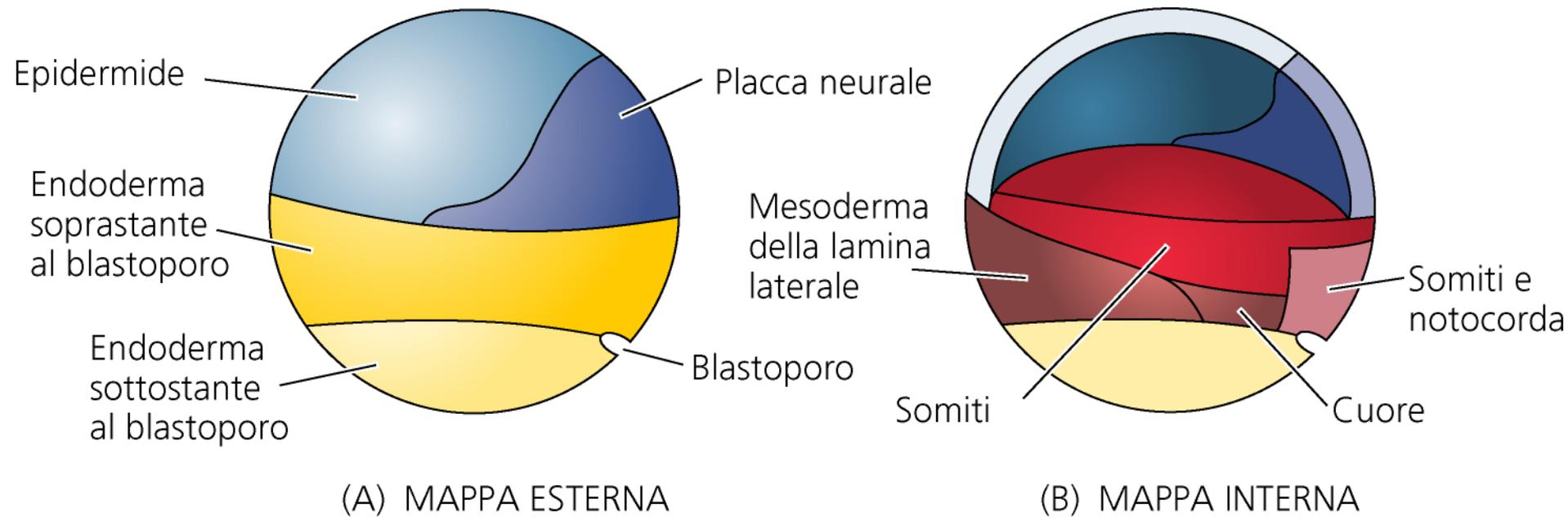
**Figura 9.4** Sviluppo di fila di blastomeri in *Xenopus*. **(a)** Allo stadio di 32 cellule la fila di blastomeri animali (A) e la fila isolata di blastomeri vegetativi (D) si sviluppano in accordo con la mappa presuntiva, con i blastomeri A che daranno origine all'ectoderma e i blastomeri D all'endoderma. I blastomeri delle file intermedie (B e C) invece non si sviluppano secondo la mappa presuntiva: anziché contribuire alla formazione del mesoderma, come fanno normalmente (vedi Figura 1.11), essi, se isolati in fasi precoci dello sviluppo, formano l'ectoderma. **(b)** Allo stadio di 128 cellule i discendenti dalla fila C contribuiscono alla formazione del mesoderma, come durante uno sviluppo normale. Questa osservazione suggerisce che in questa fase dello sviluppo tra i discendenti di C (rosso) si sia verificato un ulteriore processo di determinazione. Esperimenti successivi (vedi Figura 9.5) dimostrano che questo cambiamento è dovuto a segnali induttivi (freccia) dei blastomeri vegetativi nei confronti dei loro vicini blastomeri equatoriali. **(c)** Il processo di induzione continua e porta alla formazione di una fascia di cellule di mesoderma prospettico nota come *zona marginale*.

-Le cellule acquisiscono la capacità di muoversi dopo la 12° divisione, allo stadio di **Mid-Blastula Transition (MBT), Transizione di Medio-blastula o della Blastula Intermedia.**

-La MBT è caratterizzata dalla demetilazione dei promotori dei geni che vanno ad attivarsi, che vengono così resi disponibili per l'interazione con fattori trascrizionali.

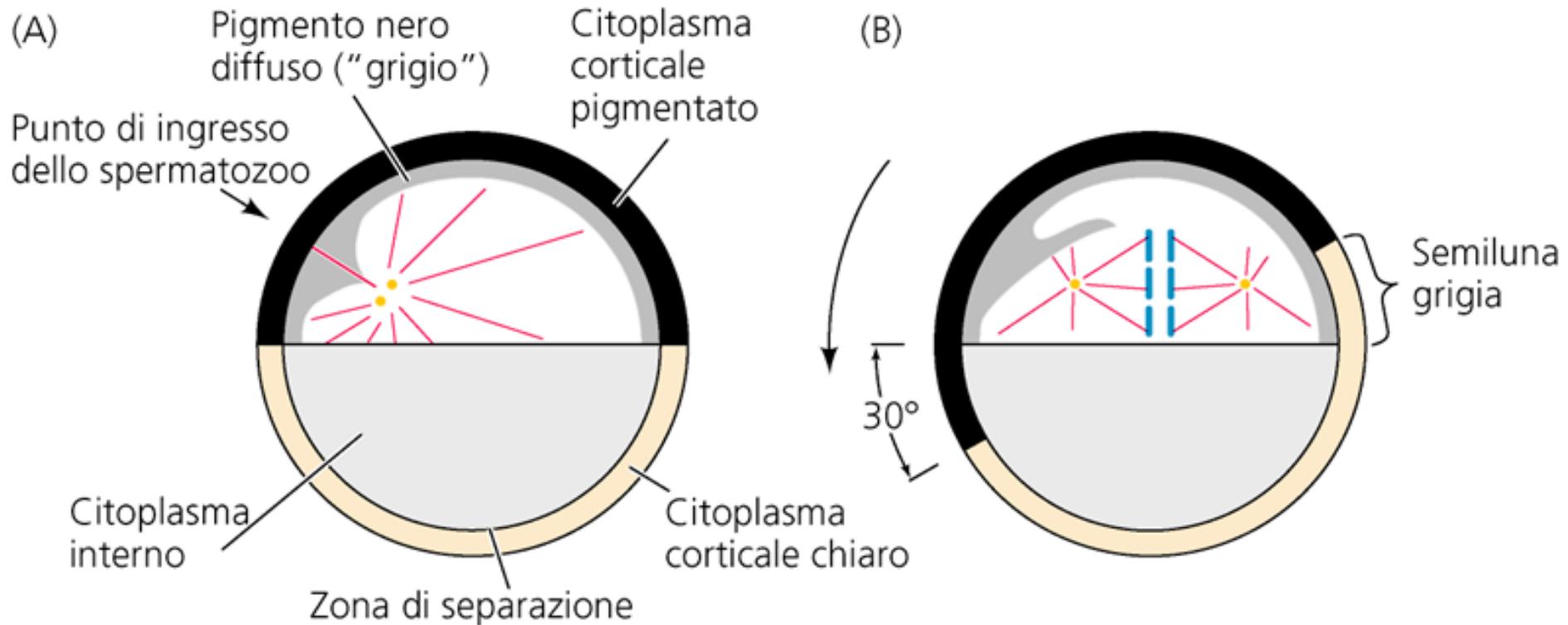
# gastrulazione

La blastula deve ridistribuire le cellule/aree in modo tale da portare verso l'interno quelle (cellule/aree) che daranno origine alle strutture endodermiche, verso l'esterno quelle che origineranno il rivestimento dell'organismo e interporre a questi due "blocchi" le cellule/aree con destino mesodermico.



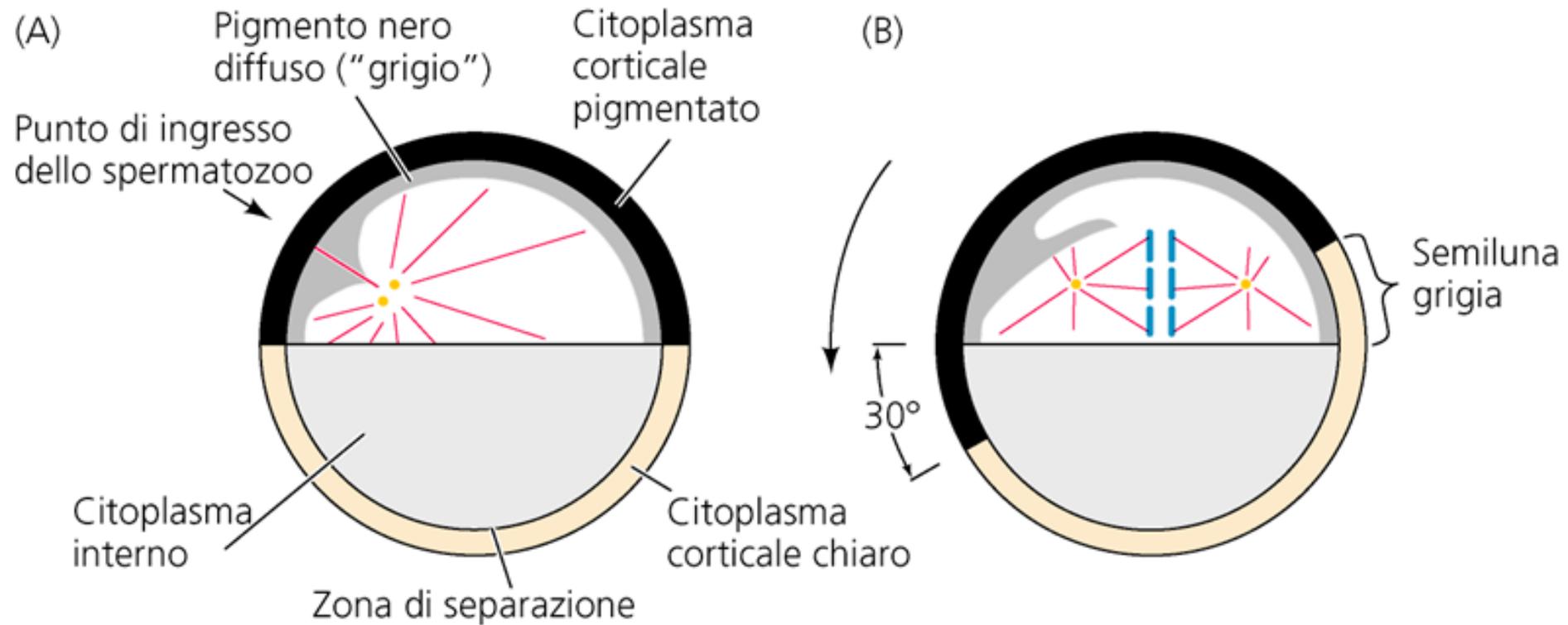
# gastrulazione

La gastrulazione in *Xenopus* ha inizio nella regione della **semiluna grigia** (futuro **lato dorsale** dell'embrione) ➔



Lo spermatozoo è importante nel determinare non il movimento in sé, quanto il senso della rotazione del citoplasma corticale. Un uovo artificialmente attivato ruota ancora il suo citoplasma, ma in direzione non prevedibile.

La semiluna grigia è riconoscibile dall'esterno perché viene lasciata scoperta una porzione di citoplasma animale interno più chiaro

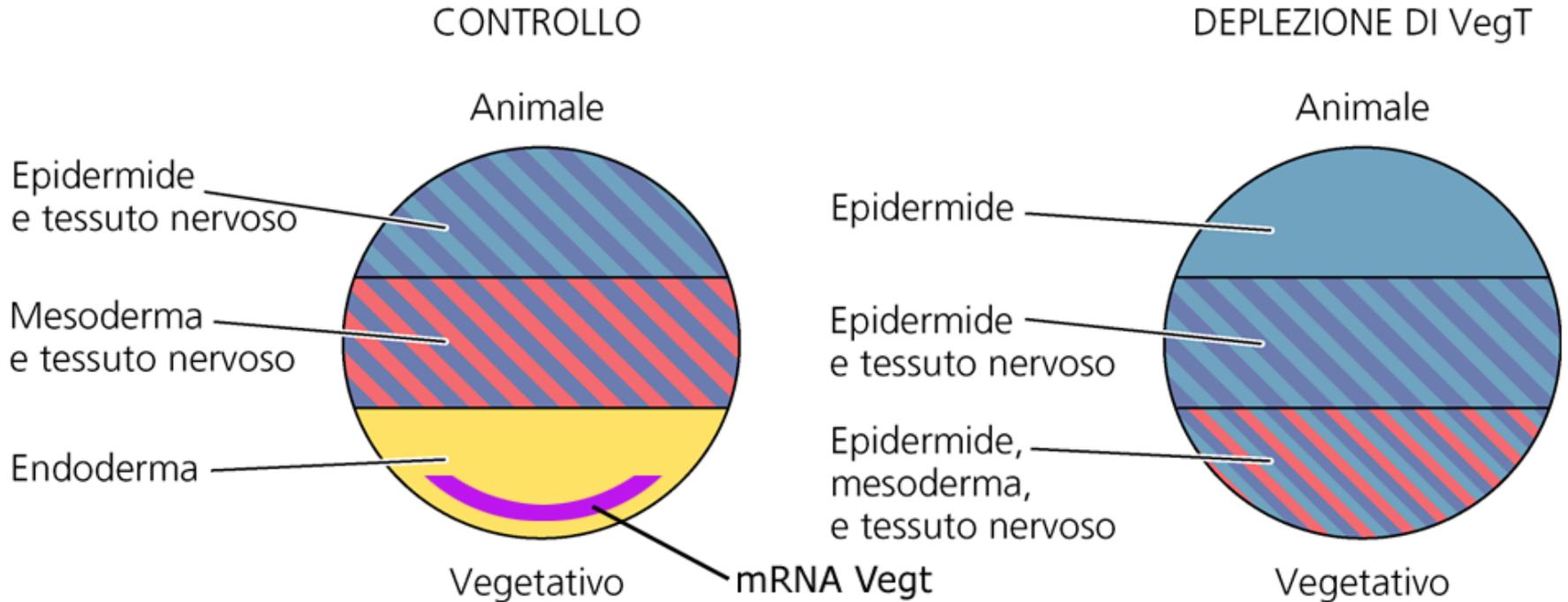


## Arrangiamenti citoplasmatici

- In seguito alla fecondazione negli embrioni degli anfibi, c'è un movimento del citoplasma corticale.  
Si osserva anche un riarrangiamento del citoplasma più interno.
- Questo movimento sposta i determinanti morfogenetici verso specifiche regioni dell'embrione che saranno importanti più tardi per stabilire il futuro asse dorso-ventrale durante lo sviluppo
- 1h e 10 minuti dopo la fecondazione l'uovo acquista la simmetria, indicata dalla comparsa della semiluna grigia che corrisponderà alla superficie dorsale

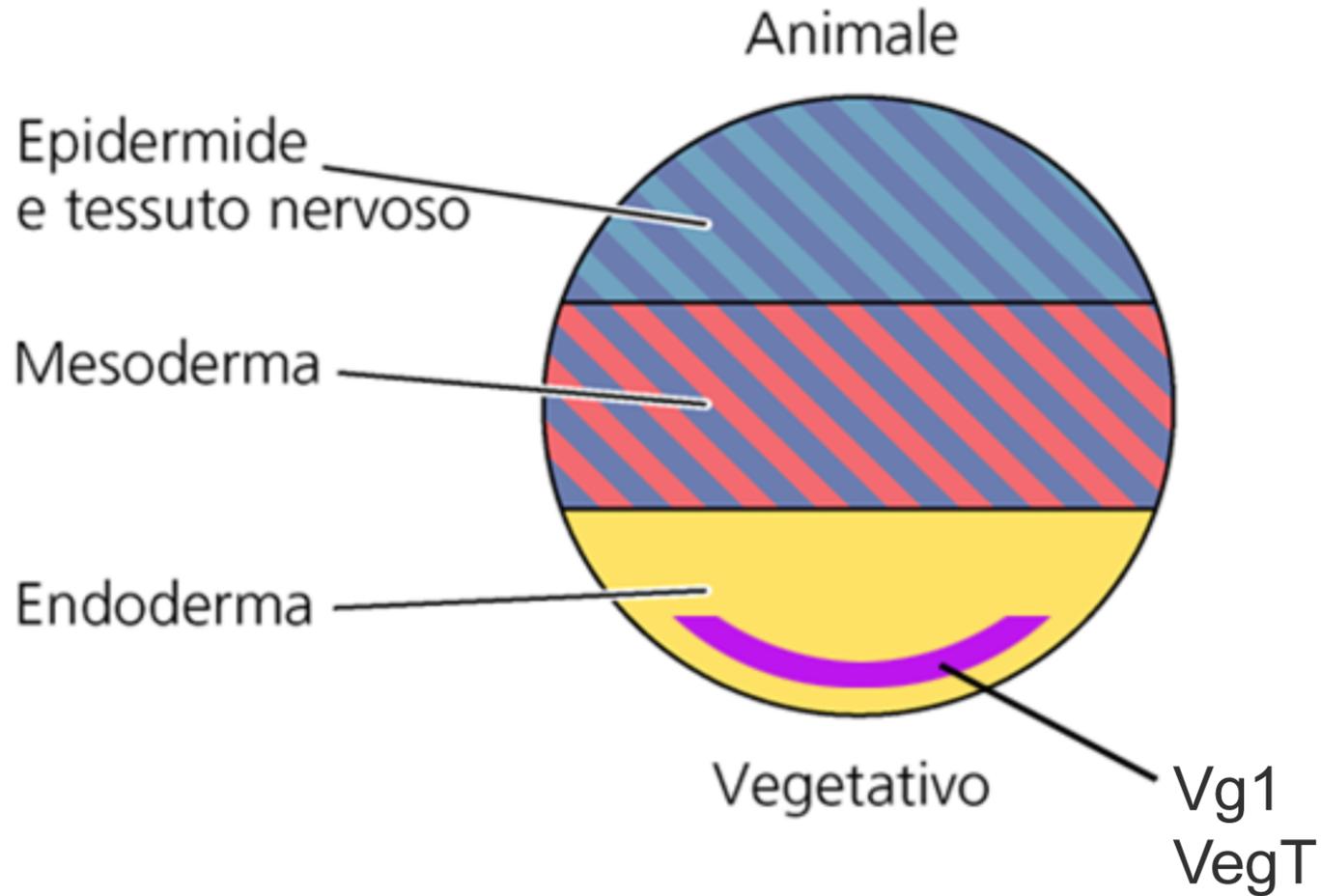
# polarità dell'uovo

La prova sperimentale dell'imposizione di una polarità all'uovo di *Xenopus* da parte di determinanti citoplasmatici viene dall'ablazione dei mRNA codificanti per tali determinanti, VegT (Zhang *et al*, 1998) e Vg1 (Joseph & Melton, 1998).



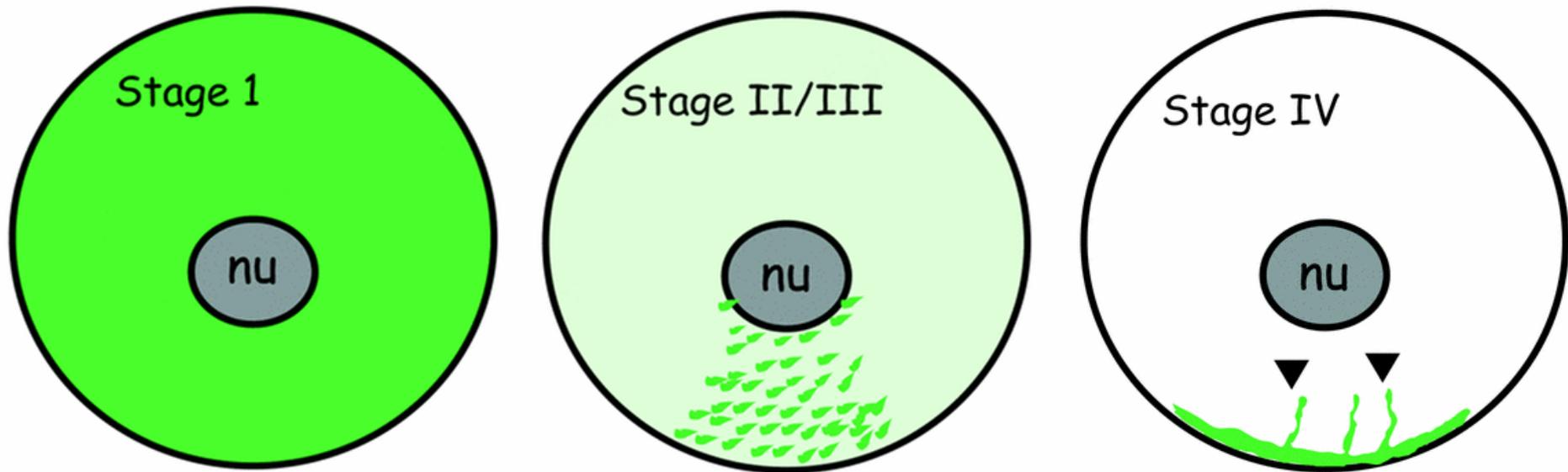
La mancanza di VegT e Vg1 altera la distribuzione delle cellule nei tre foglietti embrionali.

# anfibi



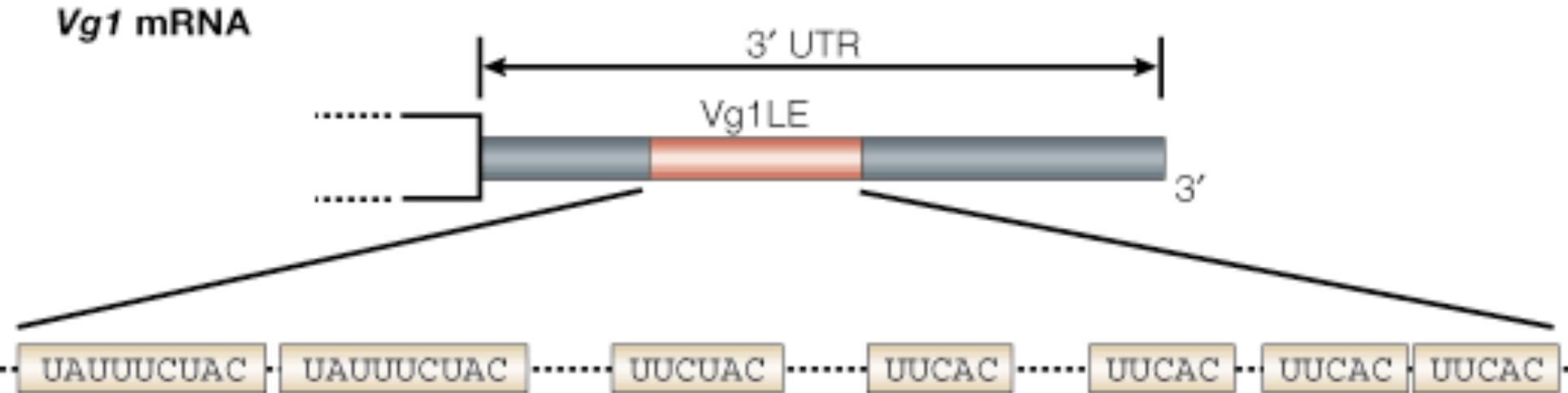
# localizzazione RNA materni

*Vg1 (vegetal1)* mRNA



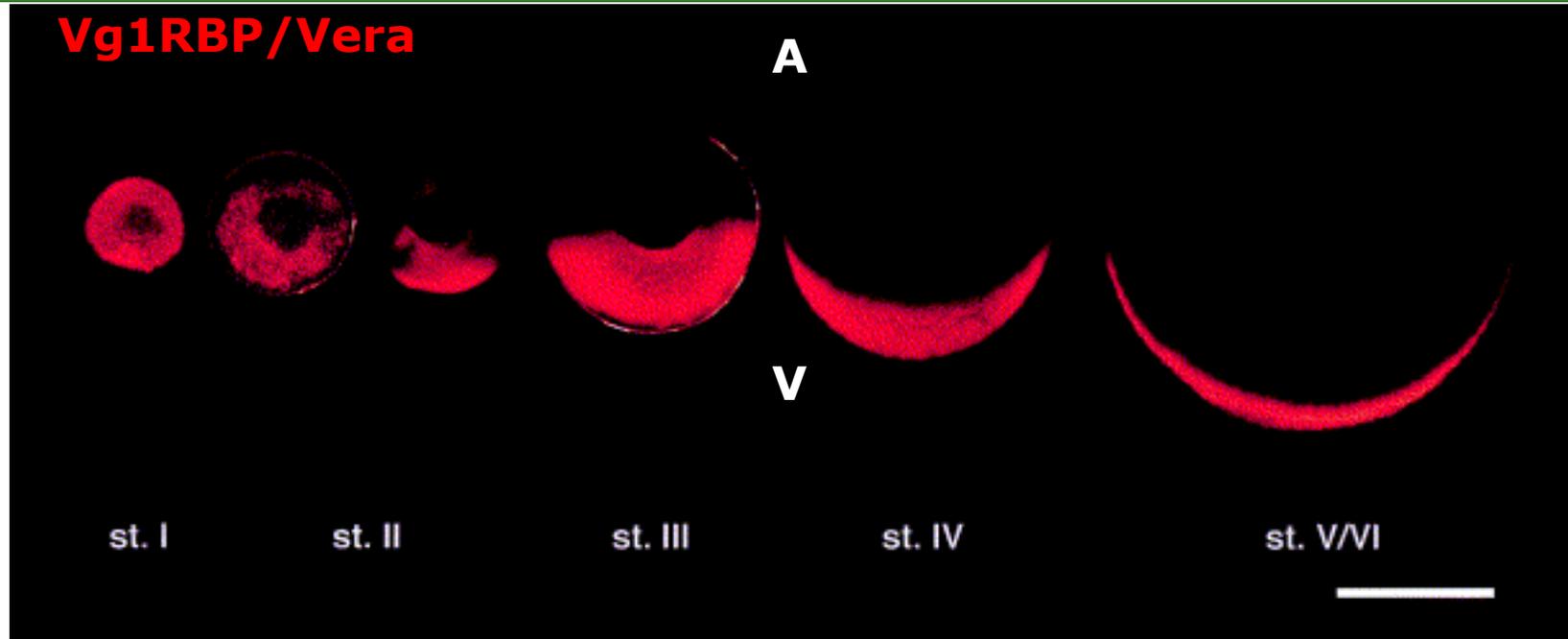
1. l'mRNA deve essere trasportato al polo vegetativo.
2. l'mRNA deve essere ancorato al polo vegetativo.

# localizzazione RNA materni



Vg1LE (Vg1 localization element), una sequenza di circa 350 nucleotidi localizzata nella regione 3'UTR (untranslated region) dell'mRNA di *Vg1* mRNA, necessaria affinché il messaggero localizzi al polo vegetativo dell'uovo. Vg1LE viene complessata da almeno 6 proteine, 2 sole delle quali note, Vg1RBP/Vera e VgRBP60. Omologhi di Vera funzionano come localizzatori di mRNA anche in altri sistemi (es. pollo).

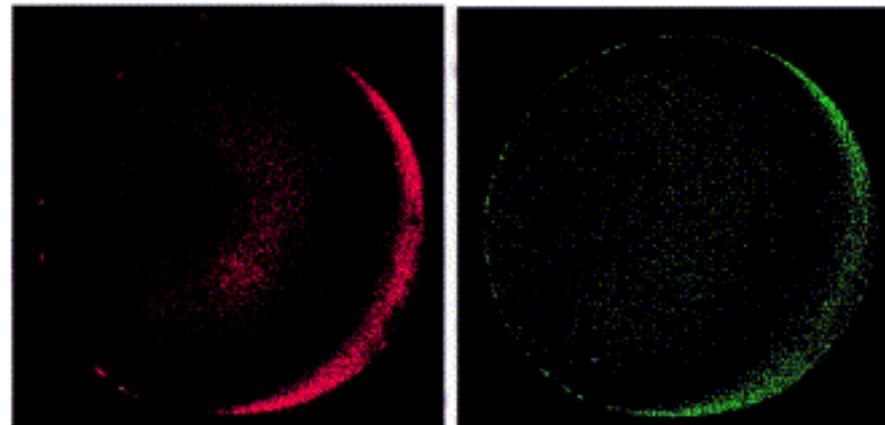
# localizzazione RNA materni



**A**

Vg1RBP/Vera colocalizza con il mRNA di *Vg1* ed è necessario per la sua corretta localizzazione al polo vegetativo dell'uovo

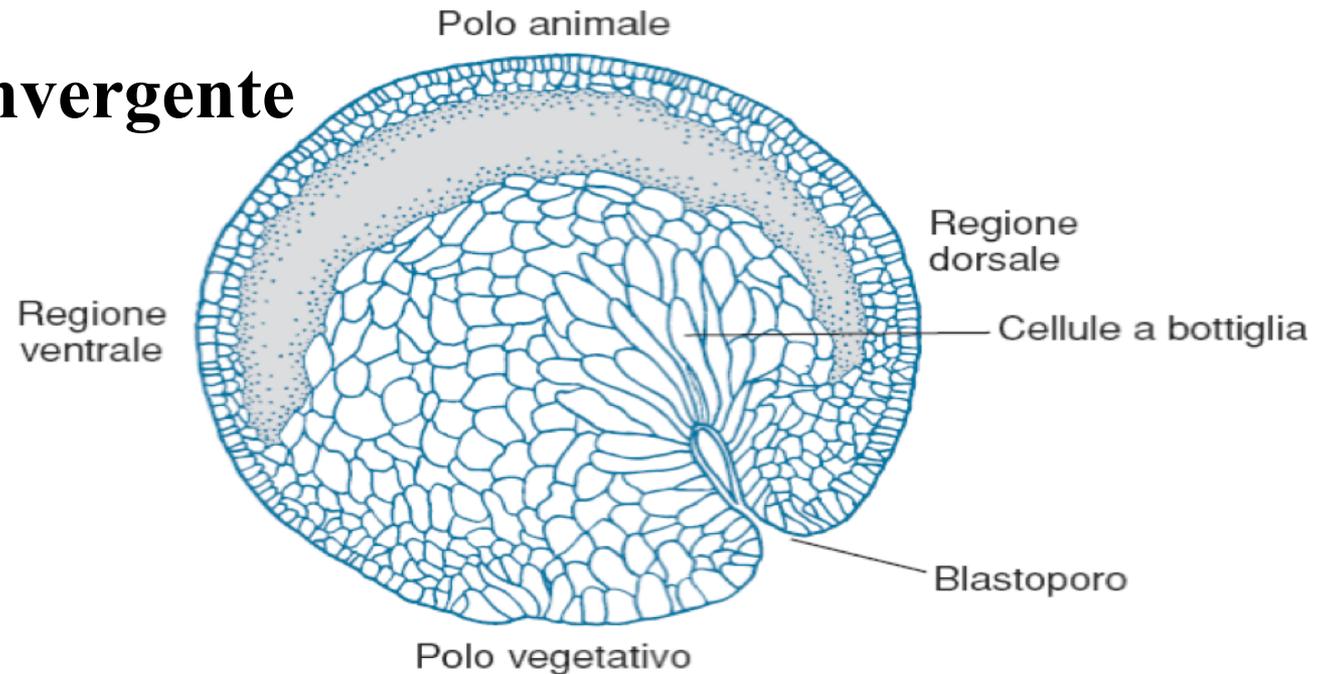
**B**



Vg1 RNA

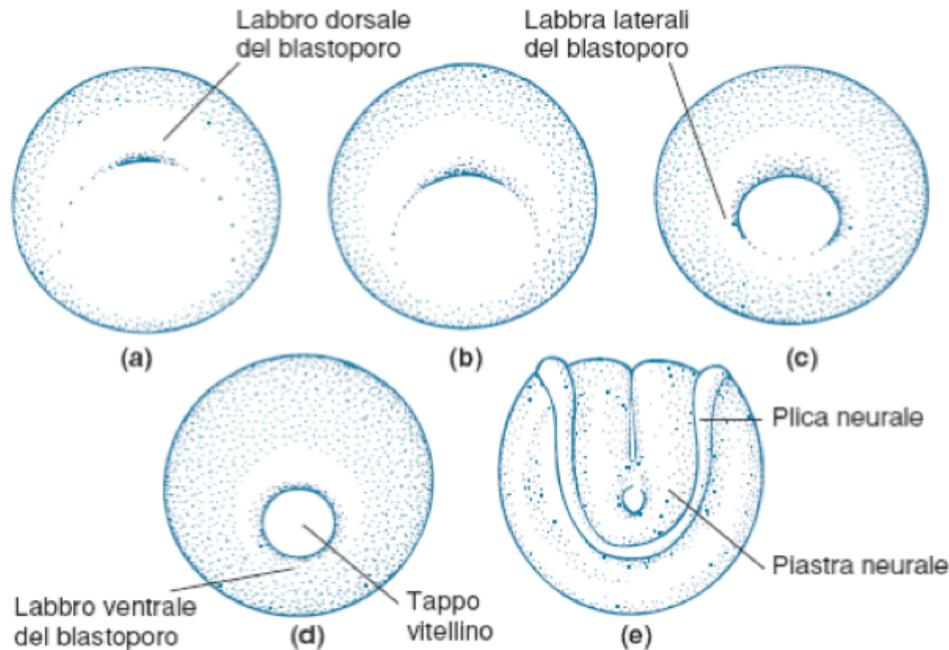
Vg1 RBP

- La gastrulazione avviene per:**
- 1-rotazione vegetativa (cellule dell'endoderma faringeo)**
  - 2-invaginazione**
  - 3-involuzione**
  - 4-estensione convergente**
  - 5-epibolia**



**Figura 10.15** Schema di gastrula iniziale di anfibio in sezione sagittale. Il movimento delle cellule a bottiglia dà inizio alla formazione del blastoporo.

# Formazione del blastoporo



**Figura 10.16** La formazione del blastoporo negli anfi. L'embrione è visto dalla regione dorsale. Notare che il blastoporo circonda le cellule endodermiche dell'emisfero vegetativo. **(a)** All'inizio il blastoporo ha la forma di una fessura (labbro dorsale del blastoporo), che poi **(b, c)** si estende lateralmente (labbra laterali) e infine **(d)** si chiude a cerchio (labbro ventrale). La porzione dell'emisfero vegetativo che protrude dal blastoporo è chiamata tappo vitellino. **(e)** Dopo il completamento del blastoporo, la superficie dorsale dell'embrione si appiattisce e inizia la neurulazione.

# ANFIBI

## MOVIMENTI DELLA GASTRULAZIONE

- Invaginazione di endoderma e mesoderma
- Scorrimento del mesoderma lungo la superficie interna dell'ectoderma
- Epibolia dell'ectoderma

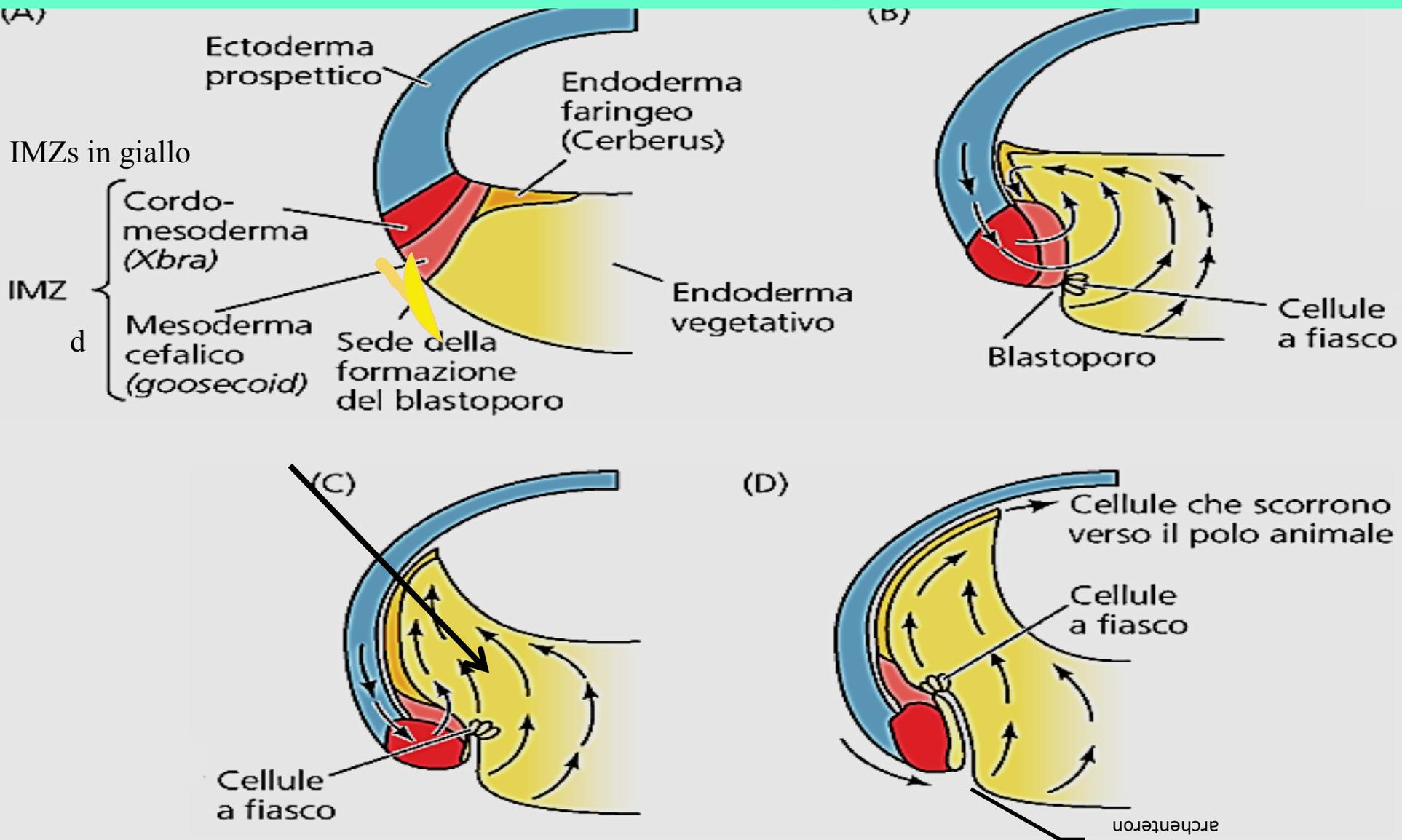
## MECCANISMI

Secrezione da parte dell'ectoderma di matrice ricca di fibronectina, riconosciuta dalle cellule mesodermiche

# 1-Rotazione vegetativa

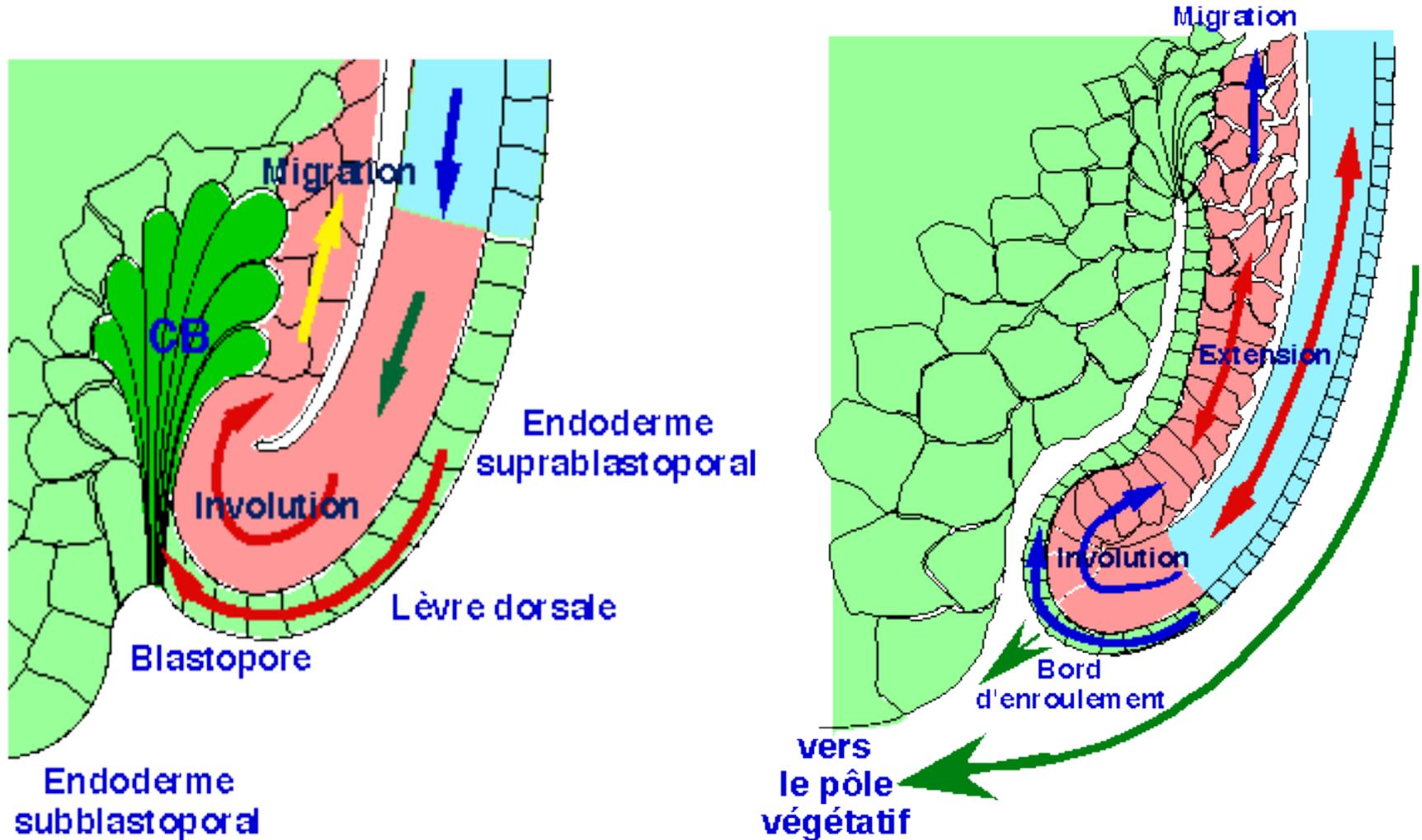
## 2-Invaginazione delle cellule a bottiglia

Il labbro dorsale del blastoporo si forma per invaginazione di cellule a destino endodermico che si trasformano in cellule a bottiglia

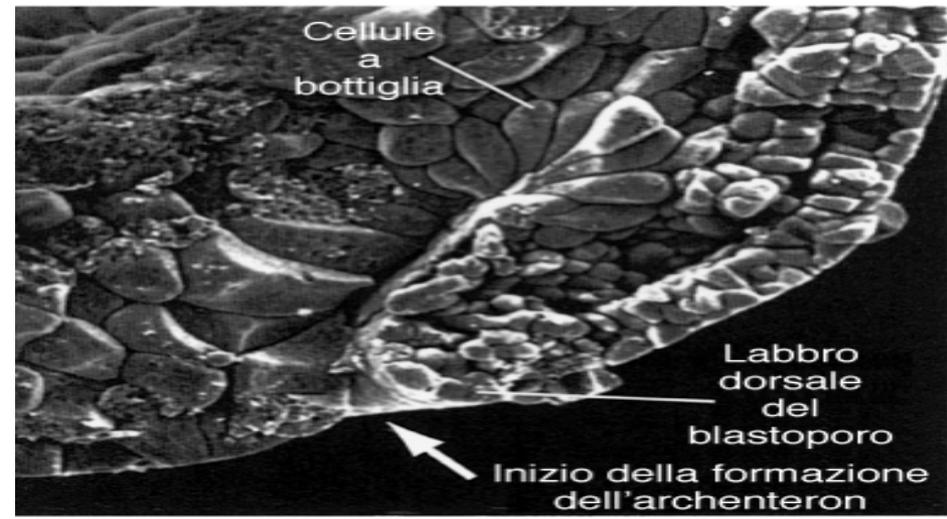
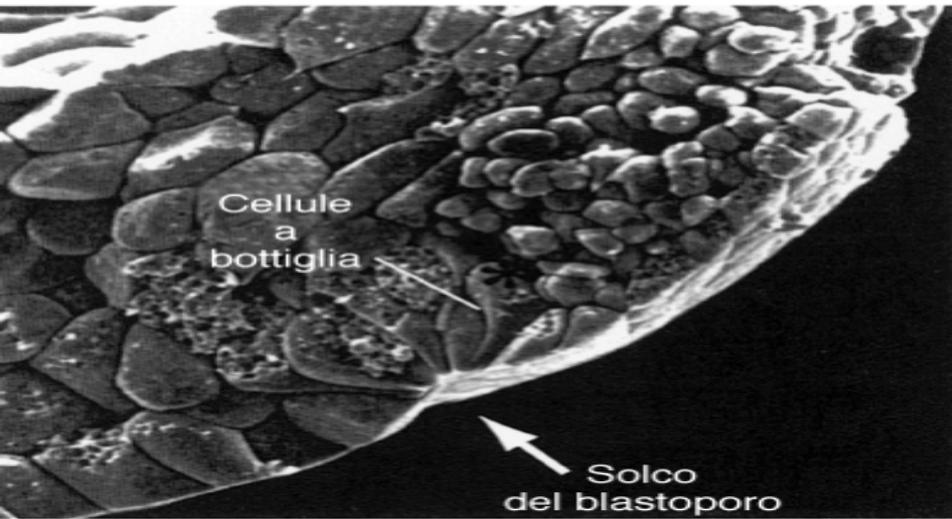


# Blastoporo ed invaginazione dei blastomeri

Le cellule a bottiglia (CB) si formano per restringimento della parte apicale e slargamento della basale



a) Microfotografie del solco blastoporale di Xe ( $\times 150$ )

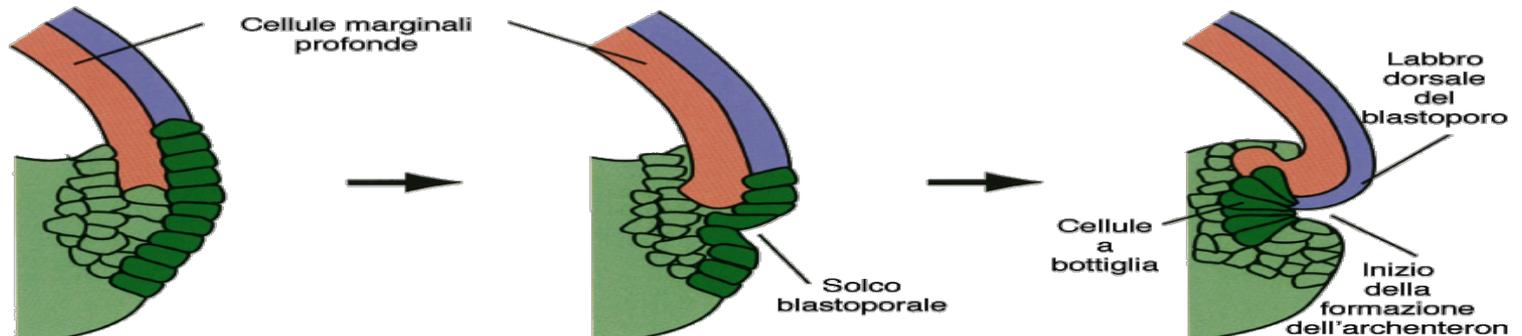


Le cellule a bottiglia si formano per restringimento della parte apicale e slargamento della basale

b) Formazione delle cellule a bottiglia



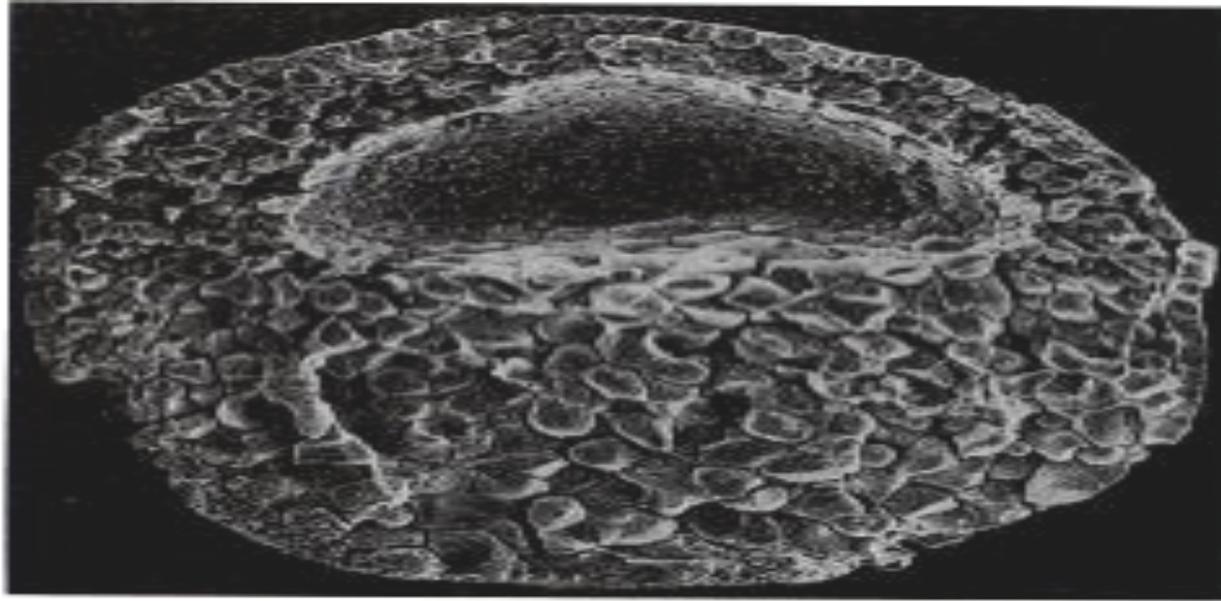
c) Schema di formazione dell'archenteron



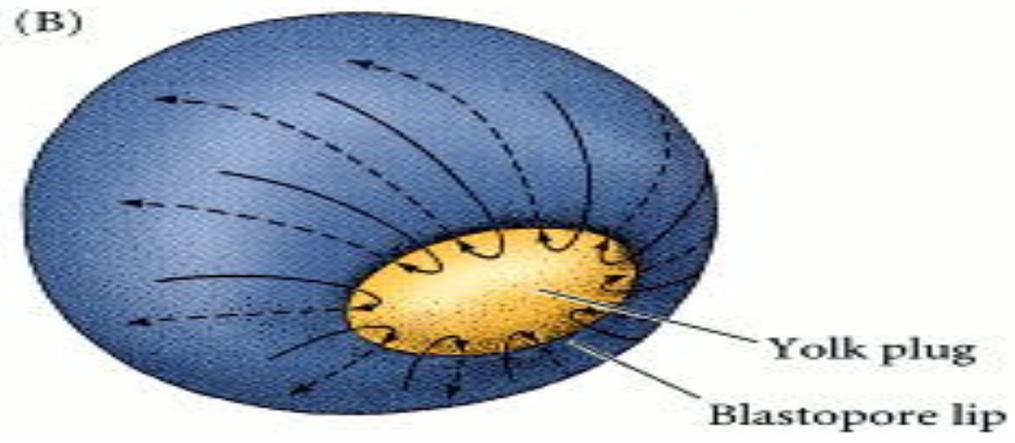
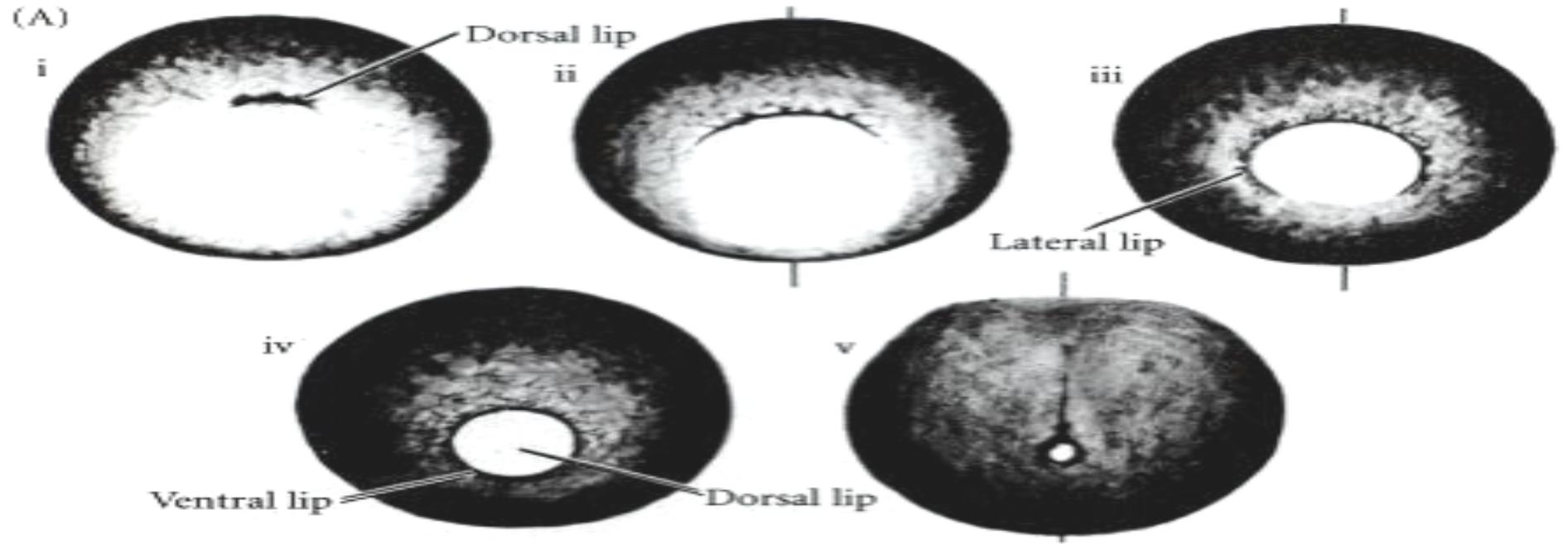
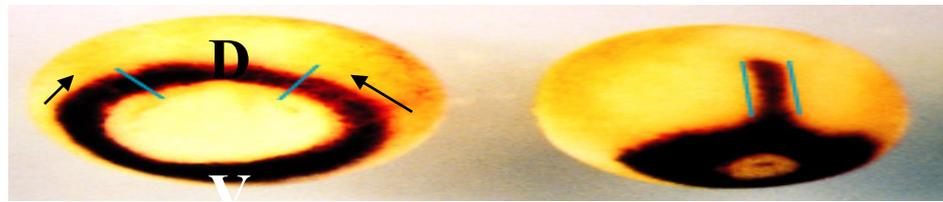
# ANFIBI

## ARCHENTERON (*Xenopus*)

- L'invaginazione porta alla formazione dell'archenteron
- La cavità archenterica si espande progressivamente a spese del blastocele, che viene spostato ventralmente

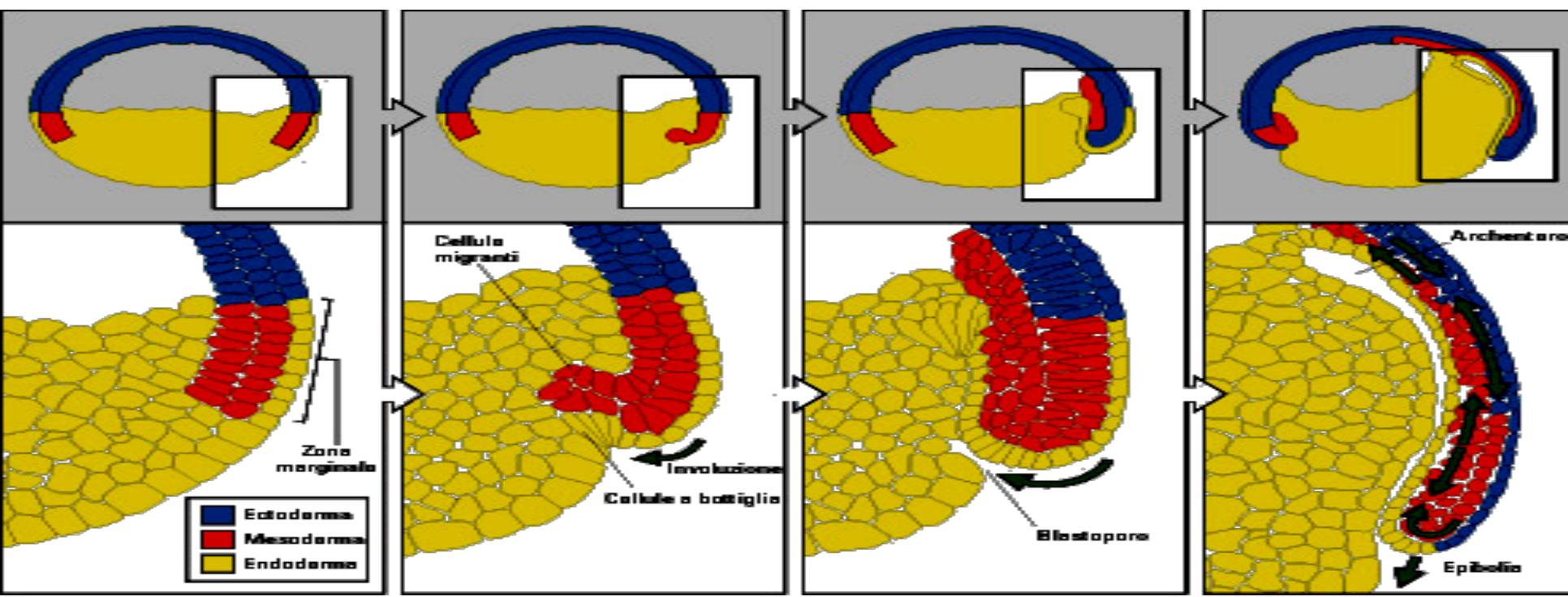


Labbro  
dorsale del  
blasto-  
poro

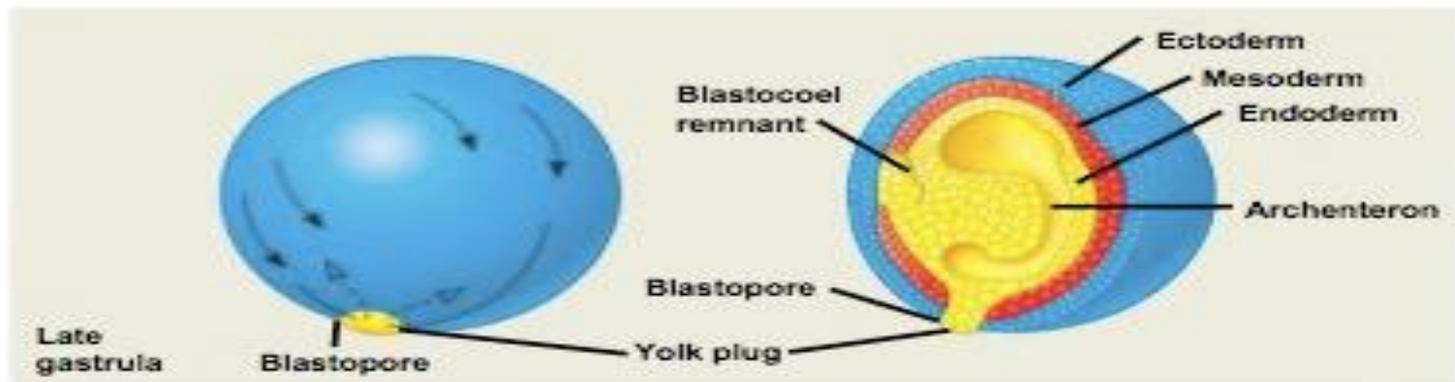
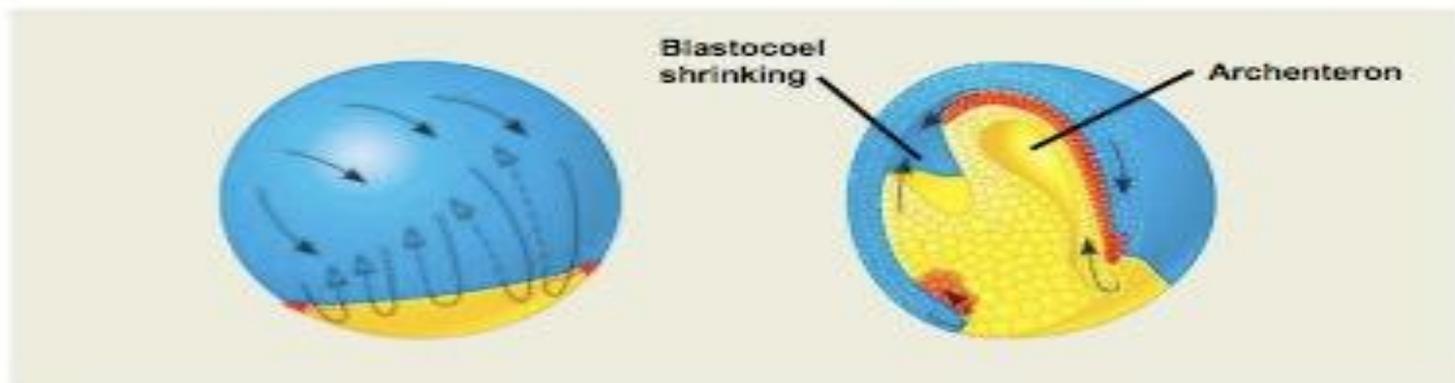
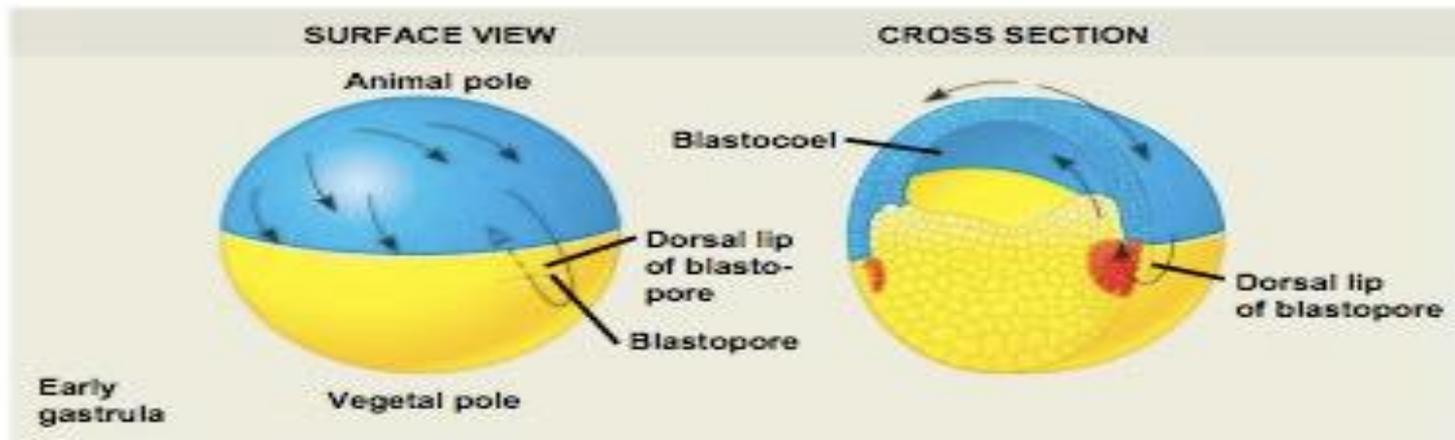


**Il blastoporo è pigmentato perché la costrizione apicale aggrega i granuli di pigmento**

### 3-L'involuzione avviene per rotazione delle cellule a destino meso ed endodermico intorno al labbro dorsale del blastoporo e scorrimento sul versante interno dell'ectoderma in direzione del PA

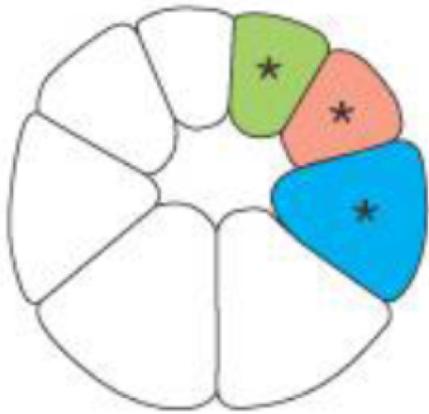


La migrazione delle cellule del mesoderma è resa possibile dalla **FIBRONECTINA** (una glicoproteina dimerica) responsabile del collegamento tra la matrice extracellulare e la superficie cellulare. Presenta un'alta affinità per le Integrine, una famiglia di proteine recettoriali intrinseche di membrana. Risulta implicata nella migrazione verso il PA delle cellule che attuano l'involuzione che 'seguono' la trama di fibrille di fibronectina secreta dall'ectoderma presuntivo del tetto del blastocele.



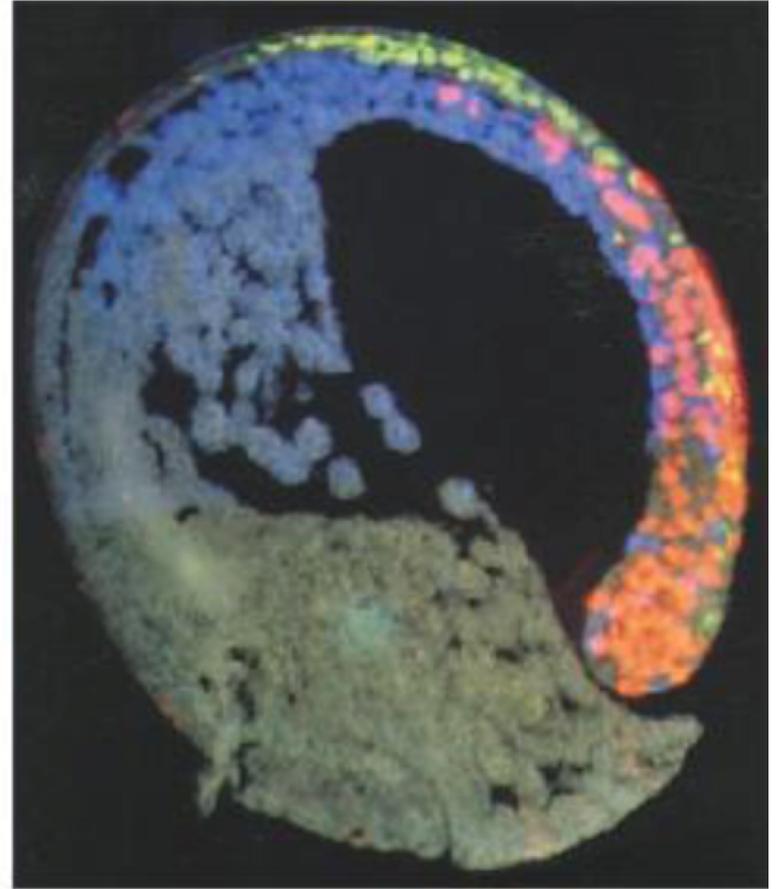
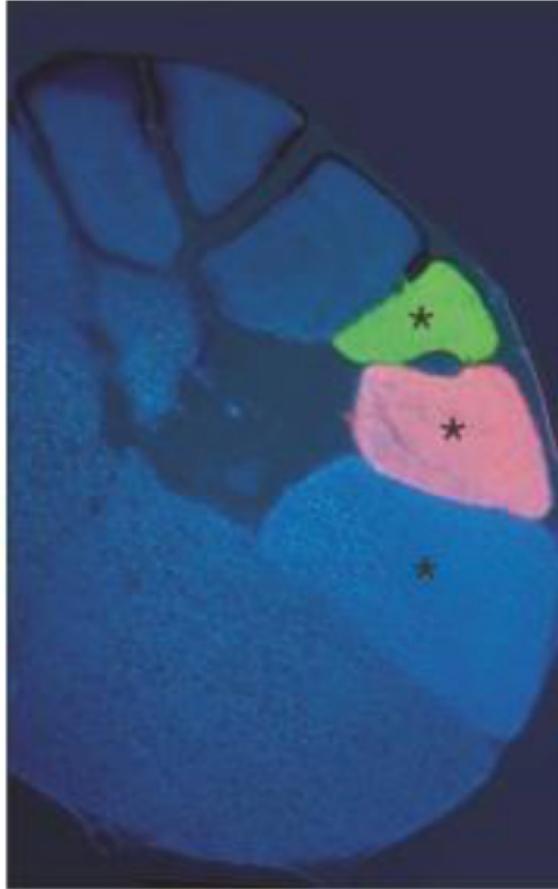
**Key**

- Future ectoderm
- Future mesoderm
- Future endoderm



sezione di embrione  
precoce di rana

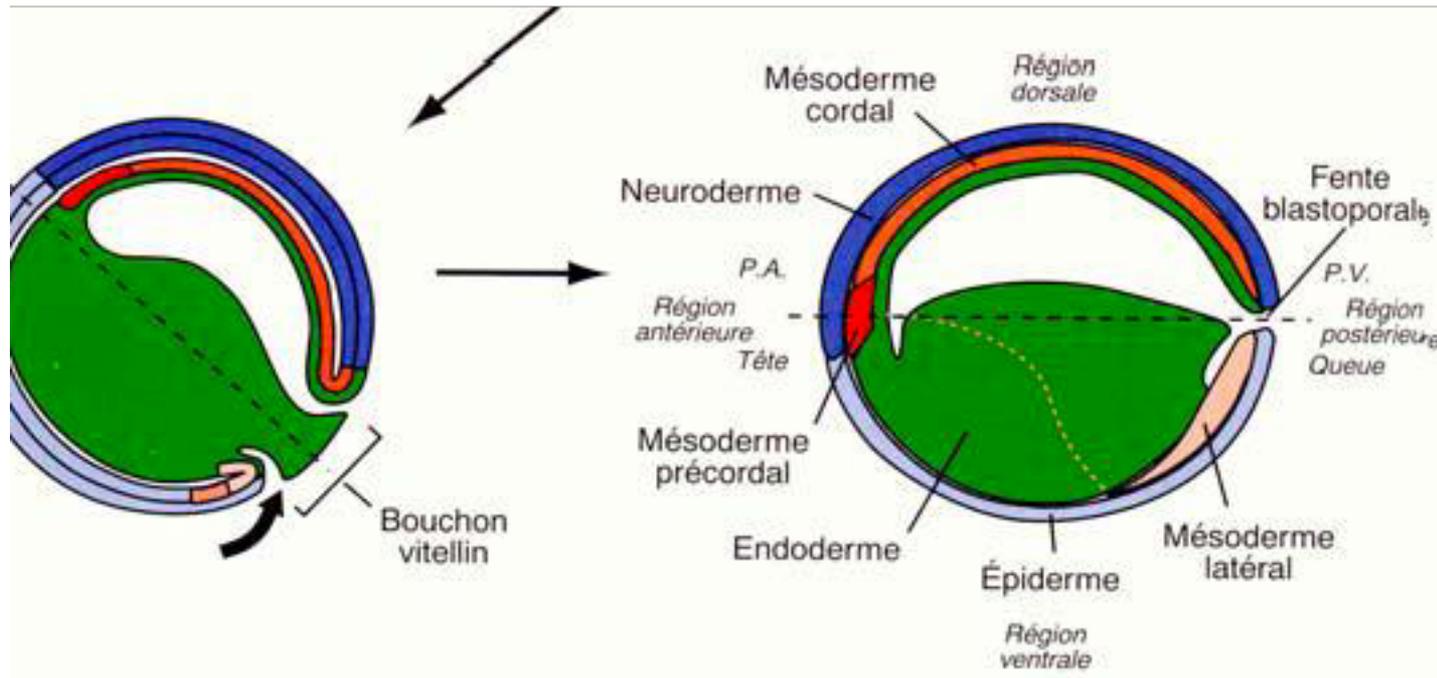
stadio a 32 cellule



10 ore dopo,  
circa 50 000 cellule

0,2 mm

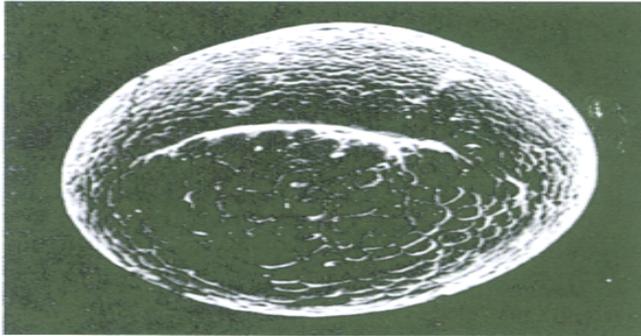
- Il solco blastoporale si espande ulteriormente, con la formazione del **labbro ventrale**
- Il blastoporo assume forma circolare
- La massa di cellule vegetative circondata dal blastoporo è detta **tappo vitellino**



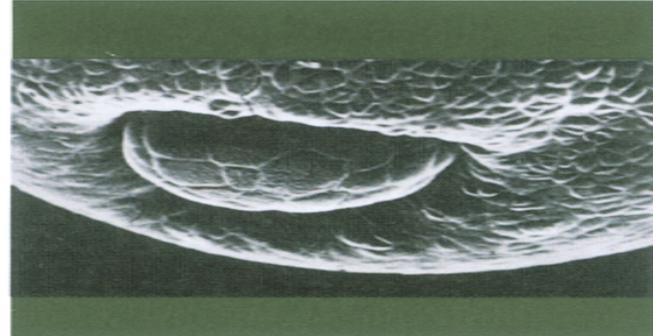
**Fig. 8.8:** *Microfotografie della gastrulazione e della neurulazione nello Xenopus*

**a) La gastrulazione**

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



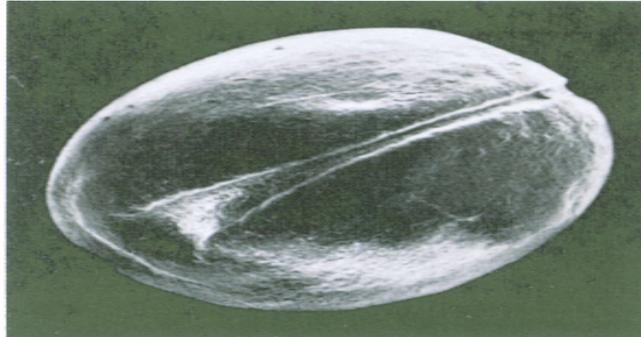
Giovane gastrula, una visione dorsale, allo stadio di solco blastoporale



Gastrula allo stadio di tappo vitellino

**b) La neurulazione**

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



Giovane neurula allo stadio di doccia neurale

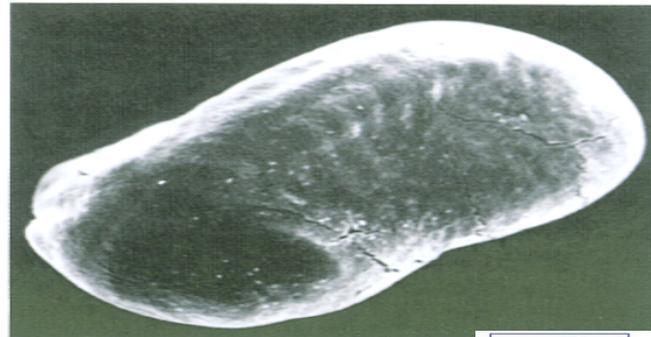


Medio-neurula, la doccia neurale è chiusa nella regione del tronco

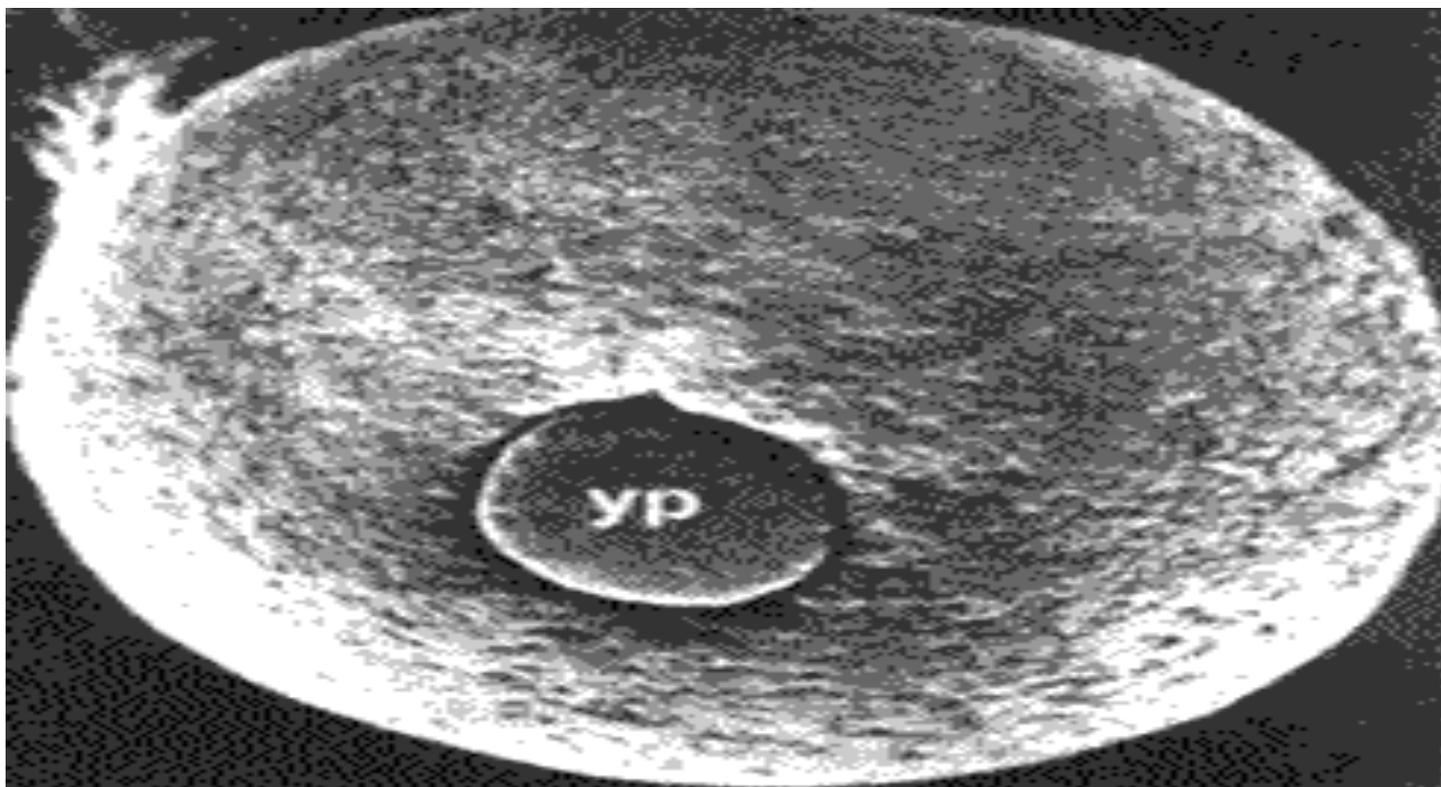


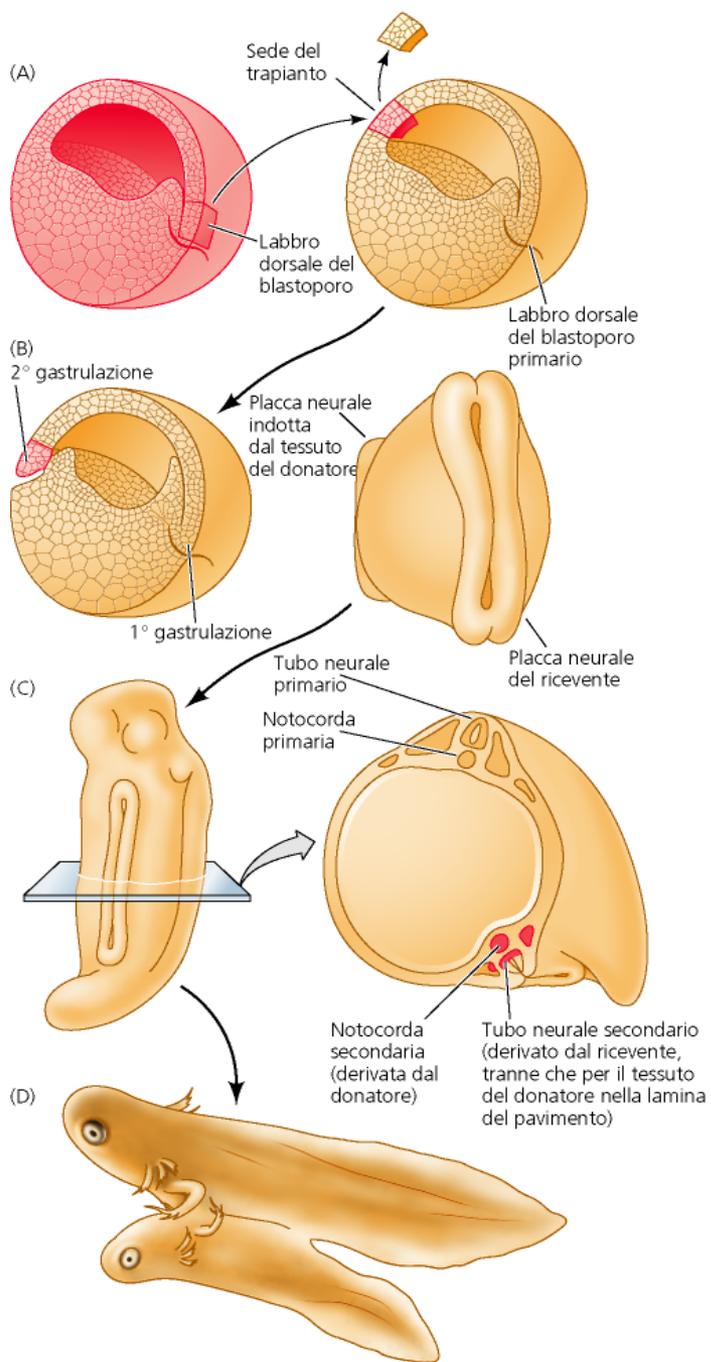
Neurula tardiva

(da De Vos e Van Gansen, 1980)



Bottone caudale





Spemann e Mangold dimostrano che, di tutti i tessuti della gastrula a stadi iniziali, solo *il labbro dorsale del blastoporo* (derivato dalla semiluna grigia) *ha un destino predeterminato*.

Il labbro dorsale di una gastrula iniziale di *Triturus taeniatus* (pigmentazione scura, ●) veniva impiantato in una gastrula iniziale di *Triturus cristatus* (non pigmentato, ●) in corrispondenza della regione destinata a divenire epidermide ventrale. Il tessuto del donatore origina tutte le strutture mesodermiche che si formano solitamente dal labbro dorsale del blastoporo (*Hans Spemann, Hinge Mangold, 1924*).

Spemann (1938) definisce il labbro dorsale e i derivati (notocorda, mesoderma precordale) come **ORGANIZZATORE**.

L'organizzatore induce la formazione dei tessuti mesodermici dorsali e del tubo neurale; tale fenomeno di **INDUZIONE** è detto **INDUZIONE PRIMARIA**.

# Induzione embrionale primaria

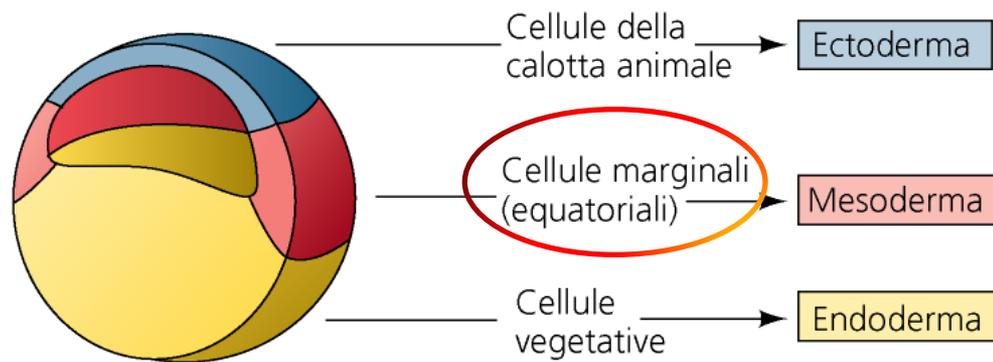
Labbro dorsale del blastoporo

- In grado di indurre tubo neurale e mesoderma dorsale
- In grado di organizzare un embrione secondario dotato di assi antero-posteriore e dorso-ventrale

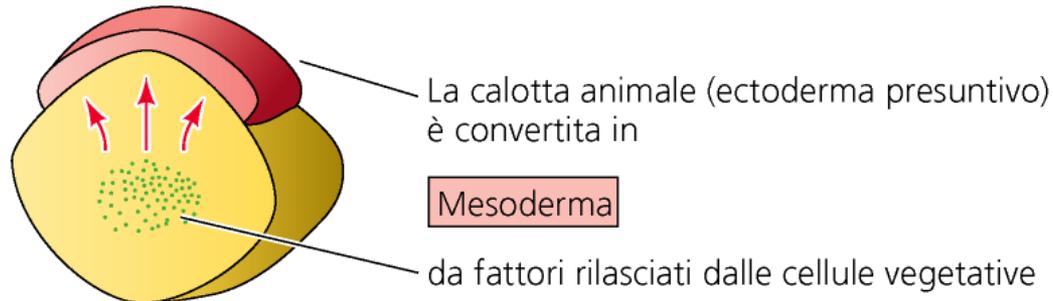


***ORGANIZZATORE***

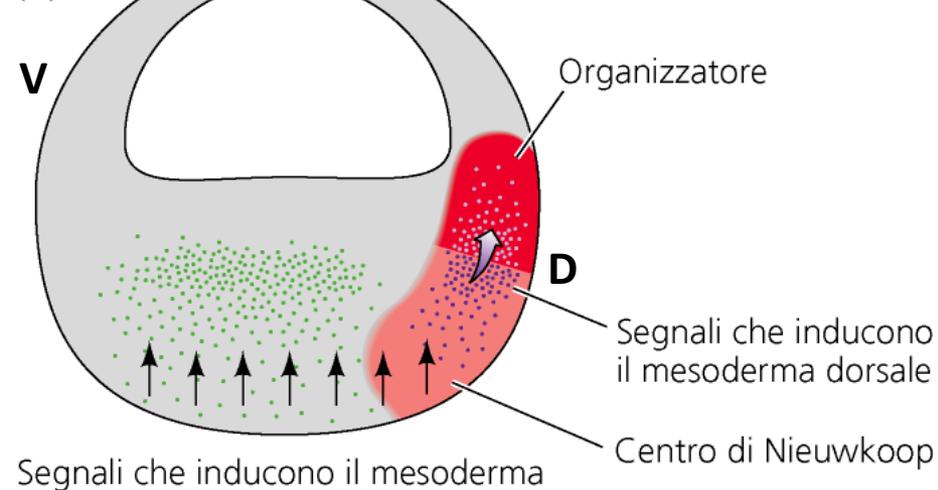
(A) Frammenti di blastula sezionata danno origine in coltura a tessuti differenti:



(B) Frammenti animali e vegetativi danno origine a mesoderma



(C)

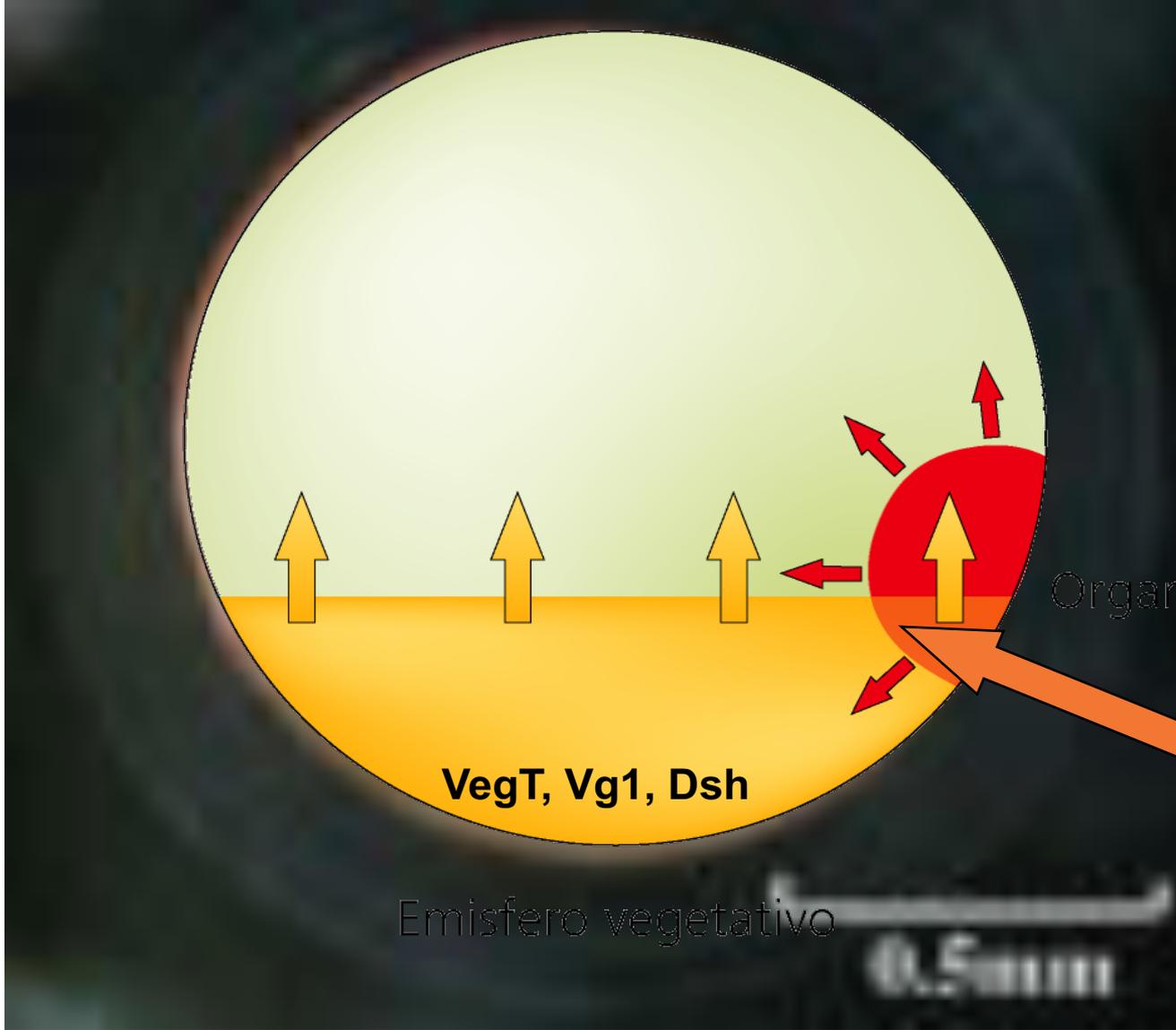


**Nieuwkoop** dimostra che le proprietà dell'organizzatore erano indotte dall'endoderma presuntivo sottostante (cellule vegetative).

Né la calotta animale (ectoderma presuntivo) né quella vegetativa (endoderma presuntivo) sono in grado, se isolate, di formare tessuto mesodermico.

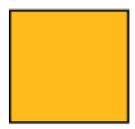
Ma se le calotte vengono unite, quella animale viene indotta a formare strutture mesodermiche (notocorda, muscoli, sangue, ecc).

Le cellule vegetative più **dorsali** specificano mesoderma dorsale (notocorda, somiti), compreso l'organizzatore; tali cellule vengono indicate come **Centro di Nieuwkoop**.

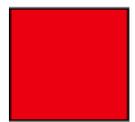


Cosa fa  
comportare così  
il centro di  
Nieuwkoop?

Centro di  
Nieuwkoop

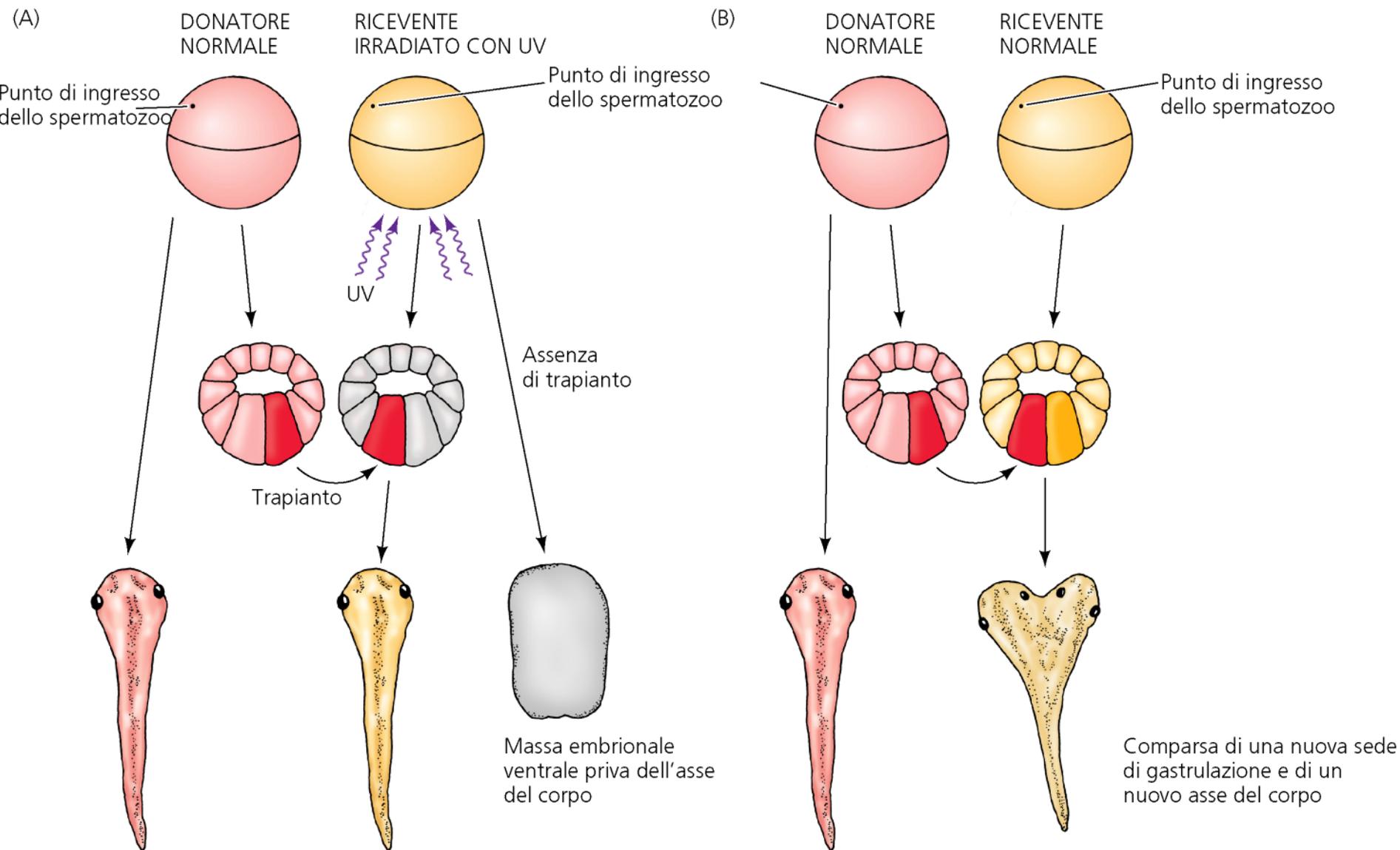


Emette segnali di induzione del mesoderma



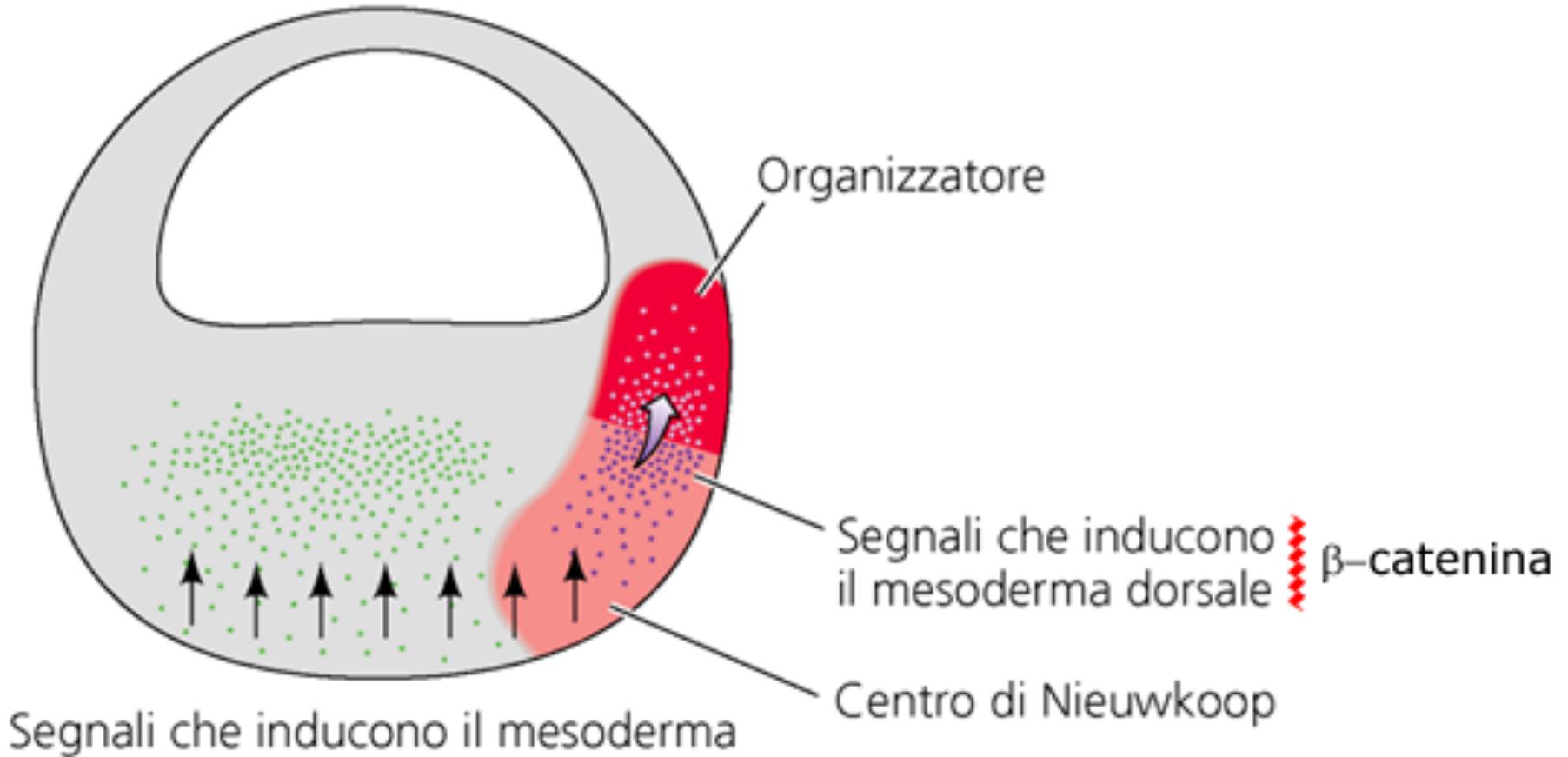
Emette segnali di dorsalizzazione

# Blastule di *Xenopus* a 64 blastomeri



(Gimiich & Gernart, 1984)

# centro di Nieuwkoop



Deplezione sperimentale mediante oligonucleotidi antisenso dell'mRNA codificante la  $\beta$ -catenina "cancella" le strutture dorsali; viceversa, iniezione di  $\beta$ -catenina nel lato ventrale dell'embrione determina l'insorgenza di un secondo asse.

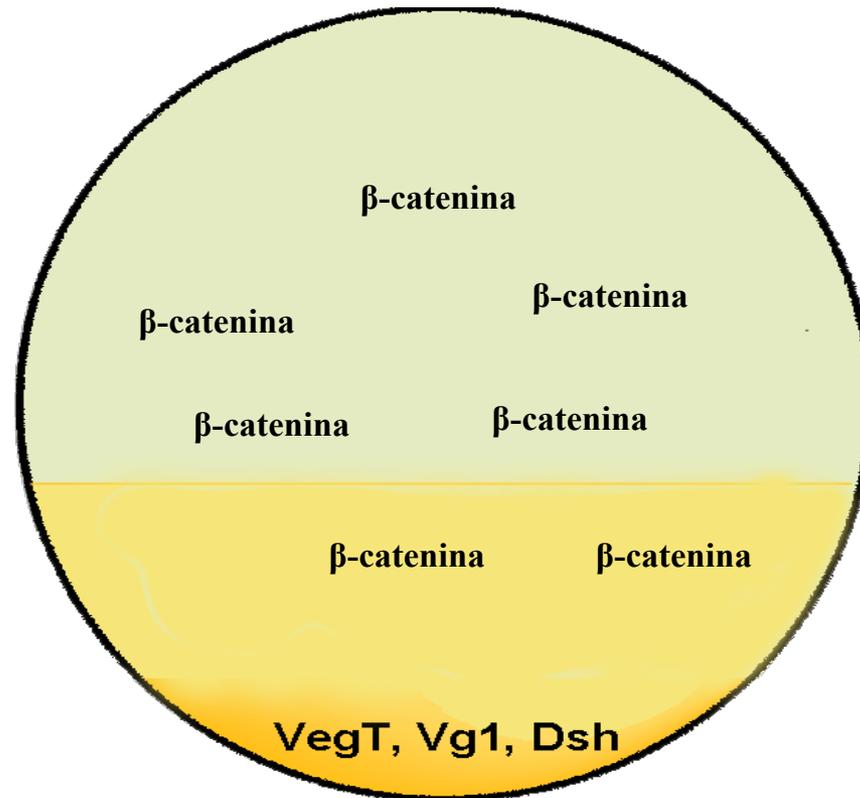
GSK-3 "blocca" le funzioni della  $\beta$ -catenina; GSK-3 attivata reprime il destino dorsale; viceversa, l'assenza della funzione di GSK-3 determina l'insorgenza di un secondo asse.

# Il centro di Nieuwkoop

- Le cellule vegetative più dorsali della blastula, capaci di indurre l'organizzatore sono state definite "centro di Nieuwkoop"
- Molecole chiave del centro di Nieuwkoop :
  - VegT (fattore di trascrizione)
  - Vg1 (fattore paracrino della superfamiglia TGF $\beta$ )
  - Nodal-related (fattore della superfamiglia TGF $\beta$ )
  - Brachyury
  - $\beta$ -catenina

**Inizialmente la  $\beta$ -catenina si ritrova in tutto l'uovo, poi comincia ad accumularsi sul lato dorsale**

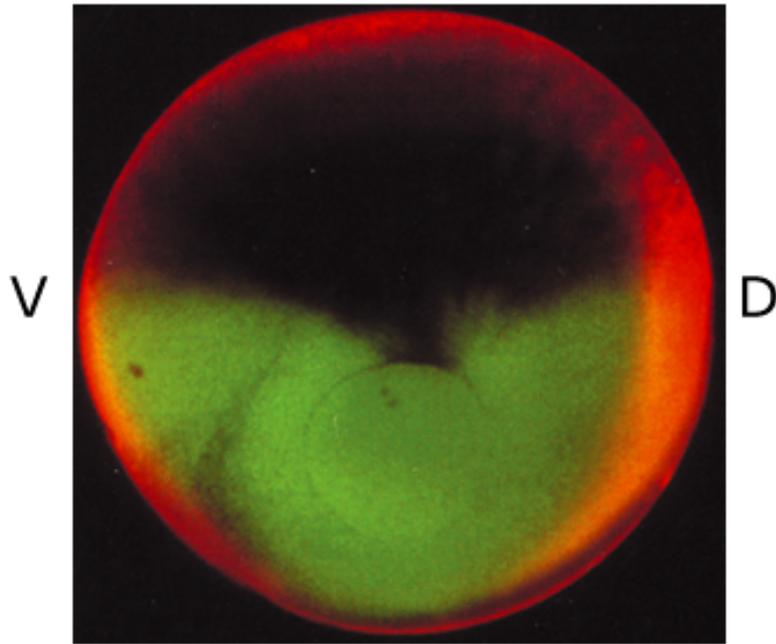
Emisfero animale



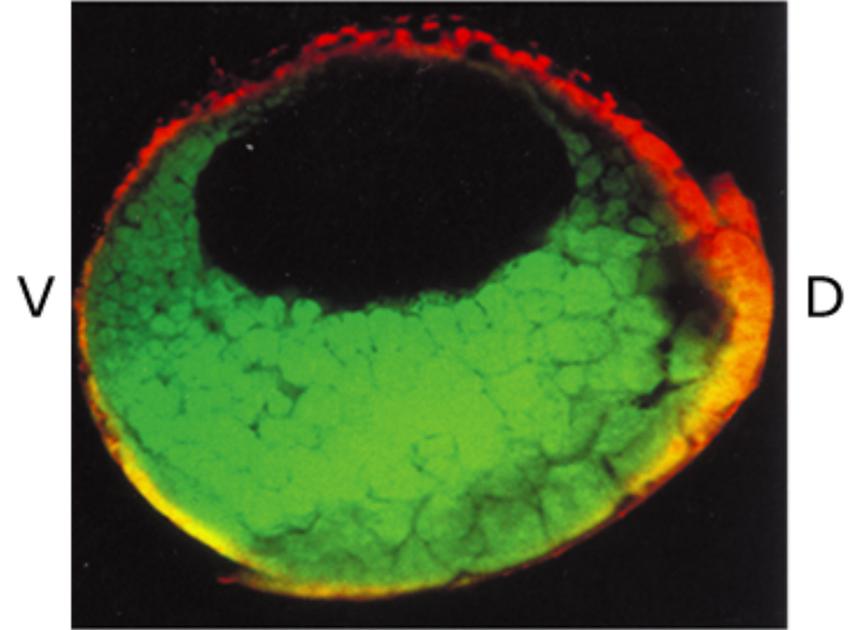
Emisfero vegetativo

# localizzazione $\beta$ -catenina

*Xenopus*; 2 blastomeri

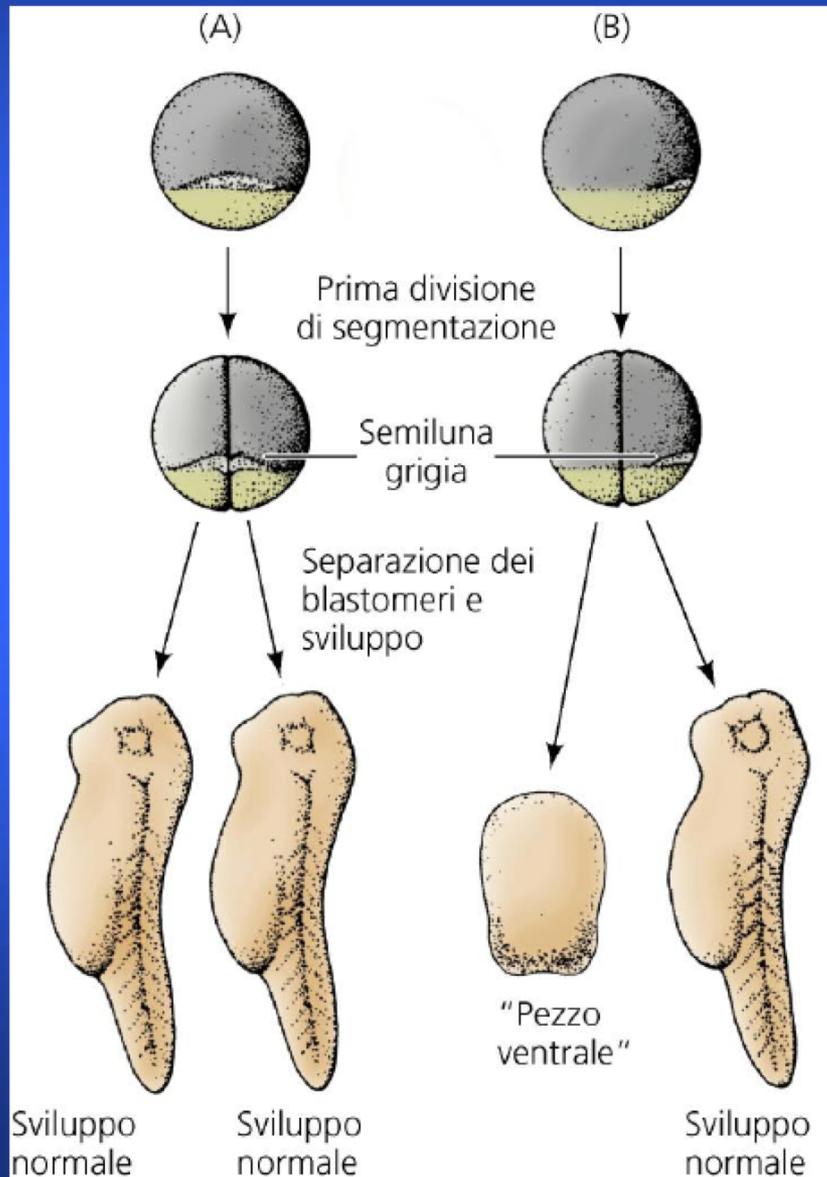


*Xenopus*; gastrula



La  $\beta$ -catenina (in rosso) viene sintetizzata a partire da mRNA materni in tutto l'embrione, quindi accumulata preferenzialmente al lato dorsale (D).

# Esperimenti di Spemann (1938)



Isolamento di blastomeri  
contenenti **o no** la  
semiluna grigia



Sviluppo larve normali **o**  
**aberranti**

*La semiluna grigia è  
incorporata nelle cellule che  
iniziano la gastrulazione*

# Esperimenti di Spemann-Mangold

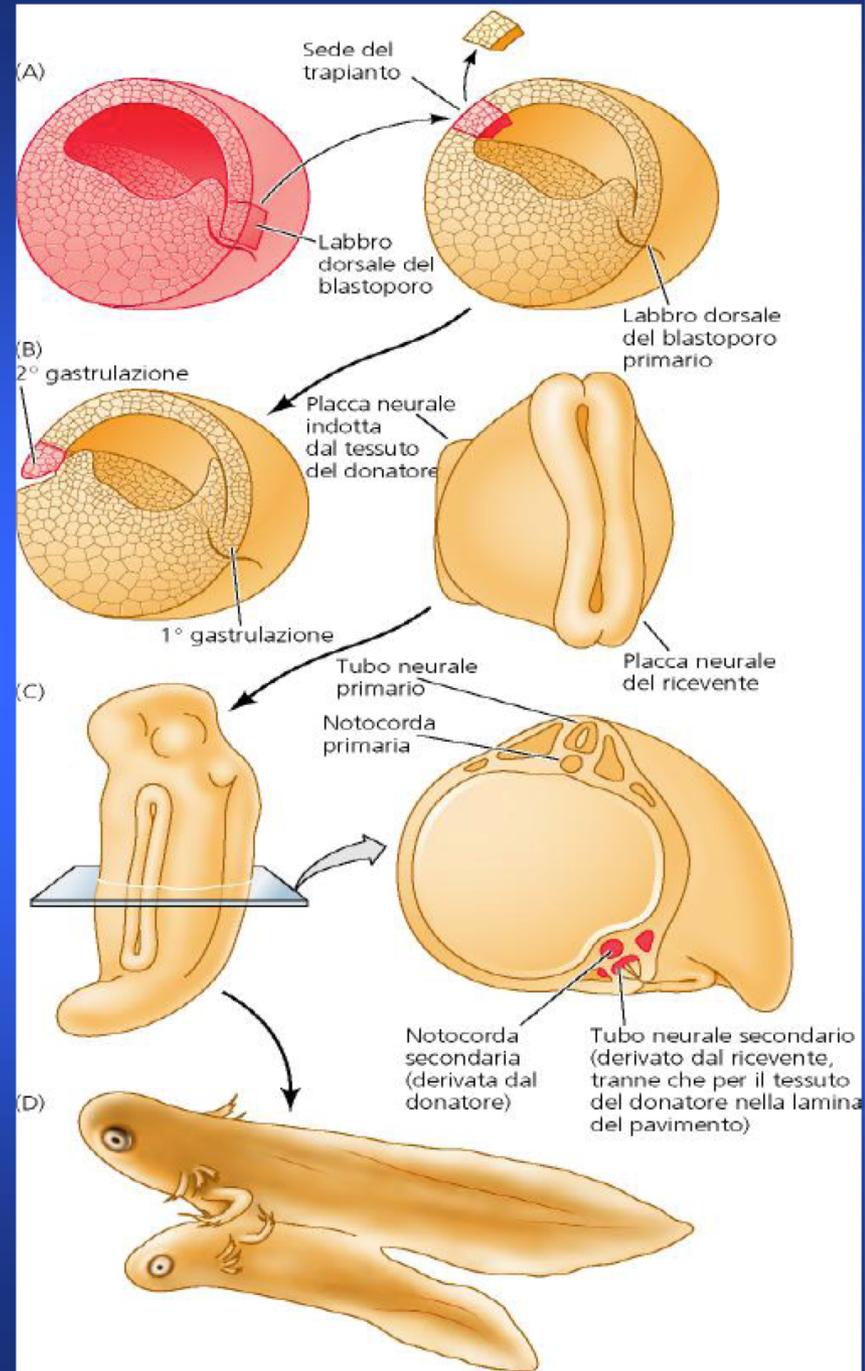
Trapianto del labbro dorsale del blastoporo



II sito di gastrulazione

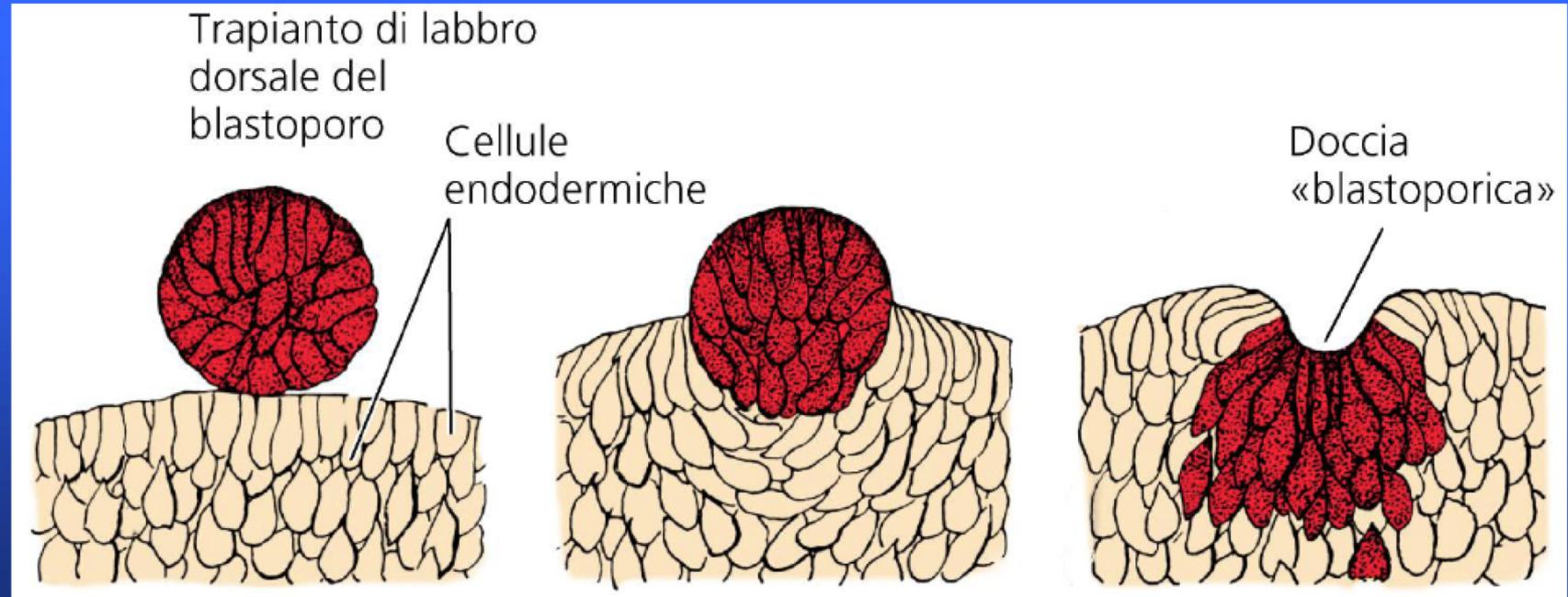


II embrione con II asse corporeo



# Le cellule dell'area marginale dorsale sono in grado di invaginarsi anche *in vitro*

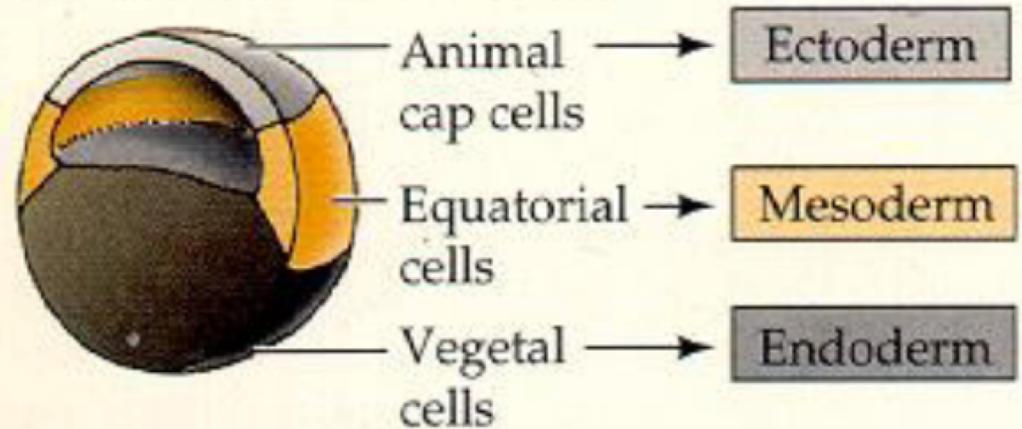
## Esperimenti di Holtfreter



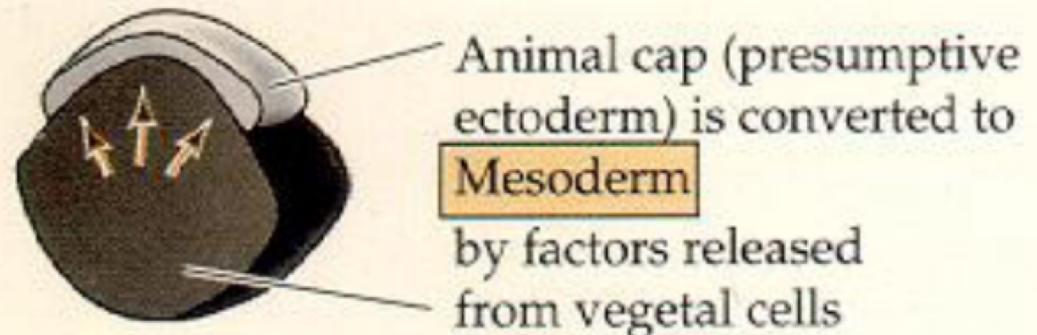
# Esperimenti di Nieuwkoop

Rimozione  
cellule  
equatoriali e  
ricombinazione  
calotta animale  
e vegetativa  
→ strutture  
mesodermiche

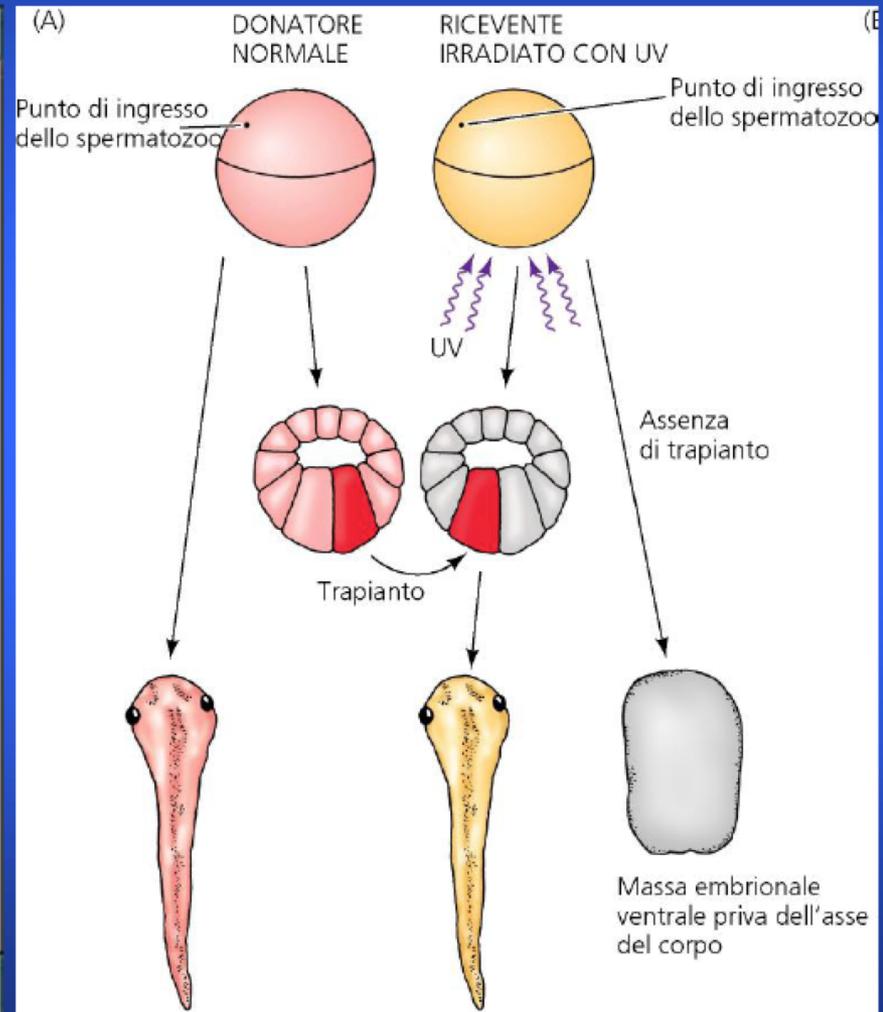
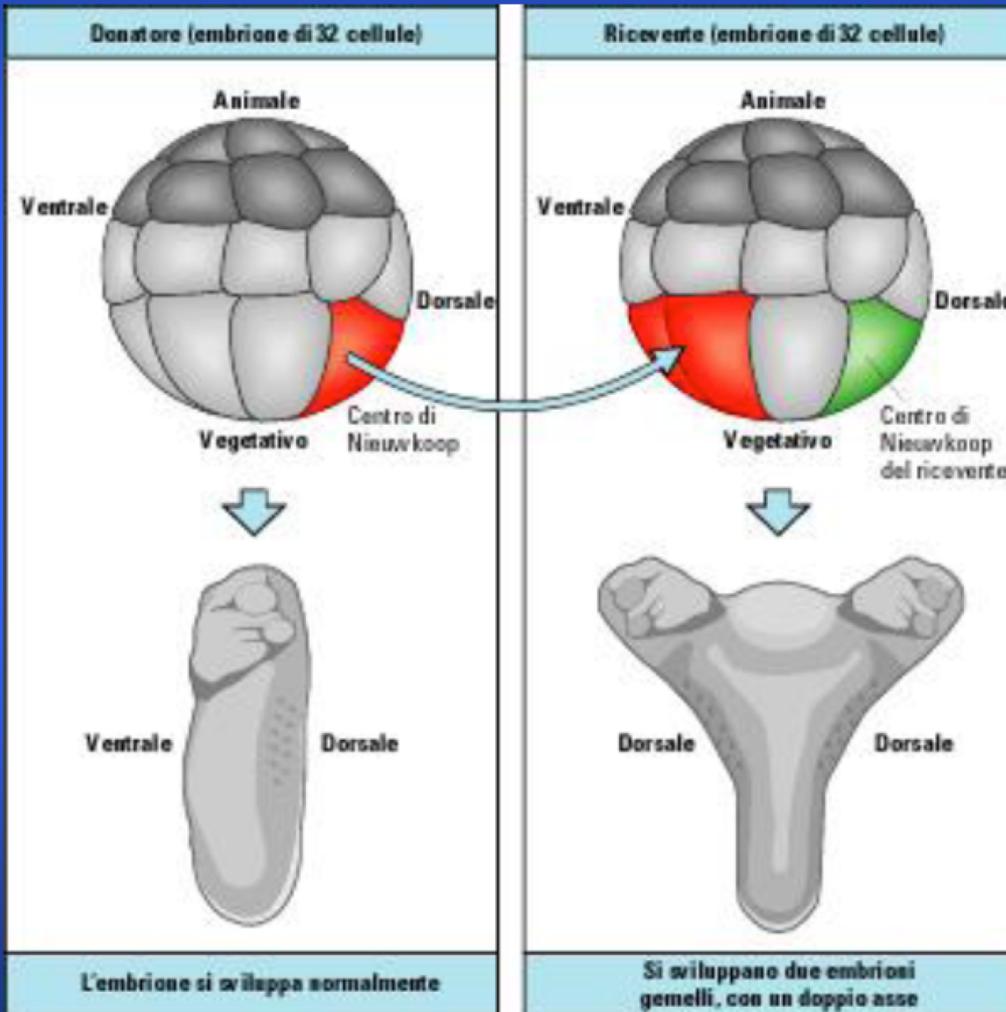
Dissected blastula fragments give rise to different tissue in culture:

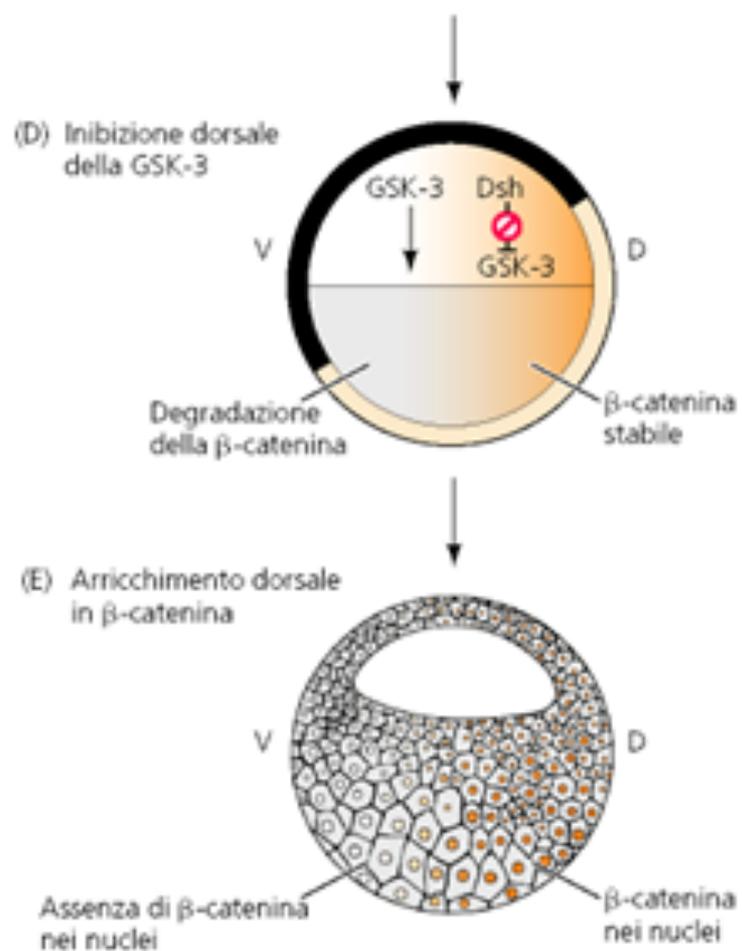
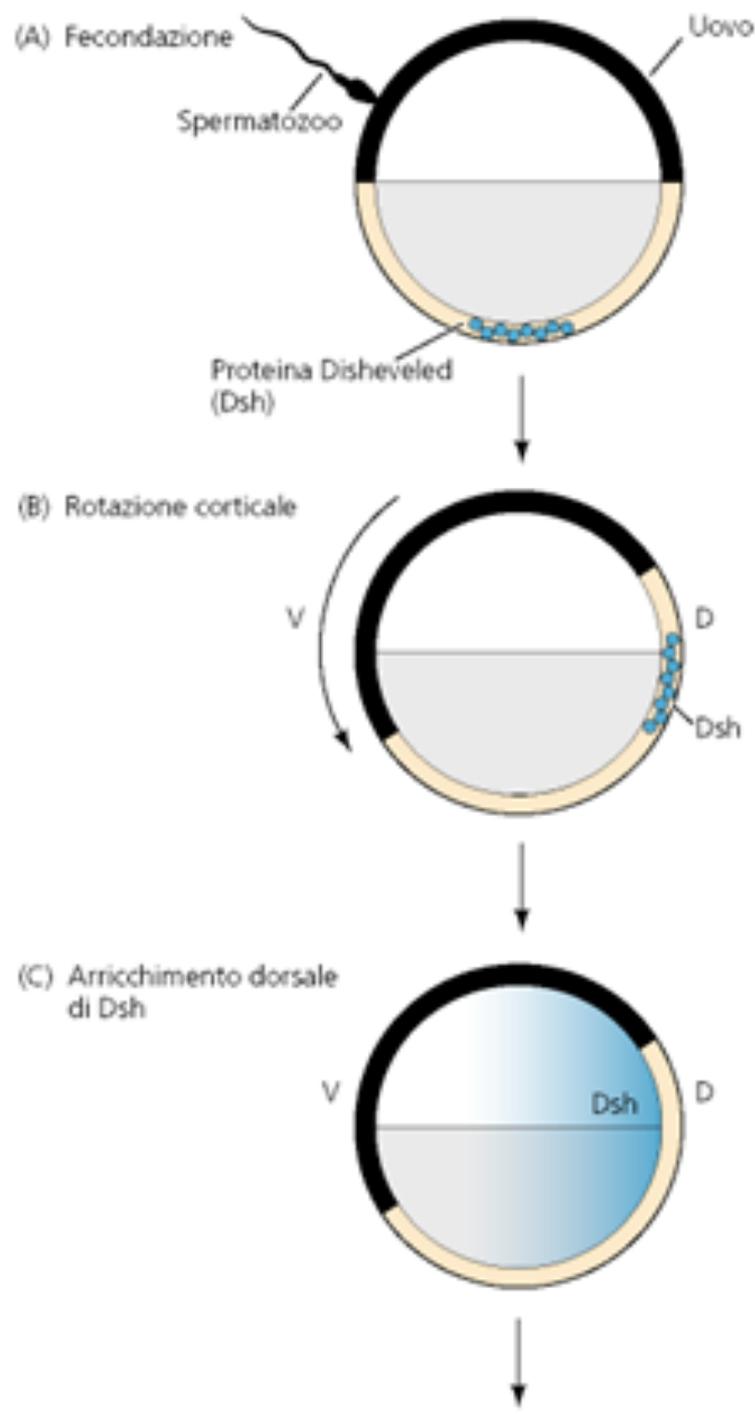


Animal and vegetal fragments give mesoderm



# Esperimenti di Gimlich e Gerhart

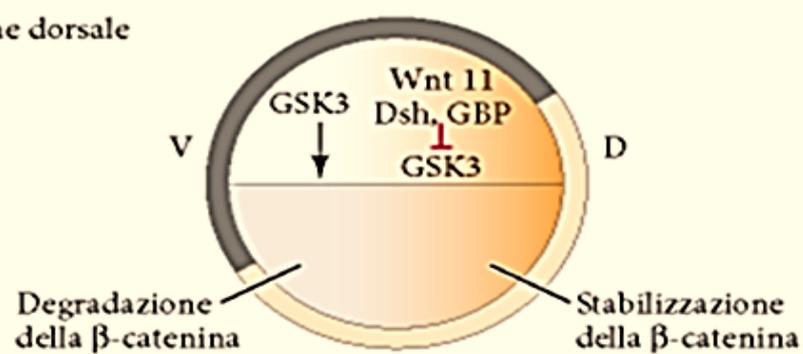




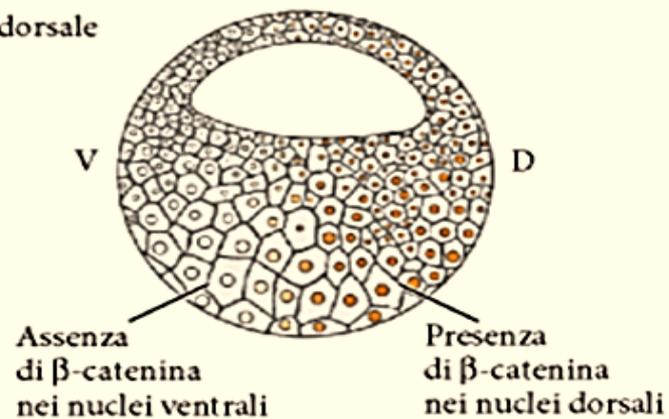
(C) Arricchimento dorsale di Dsh e GBP

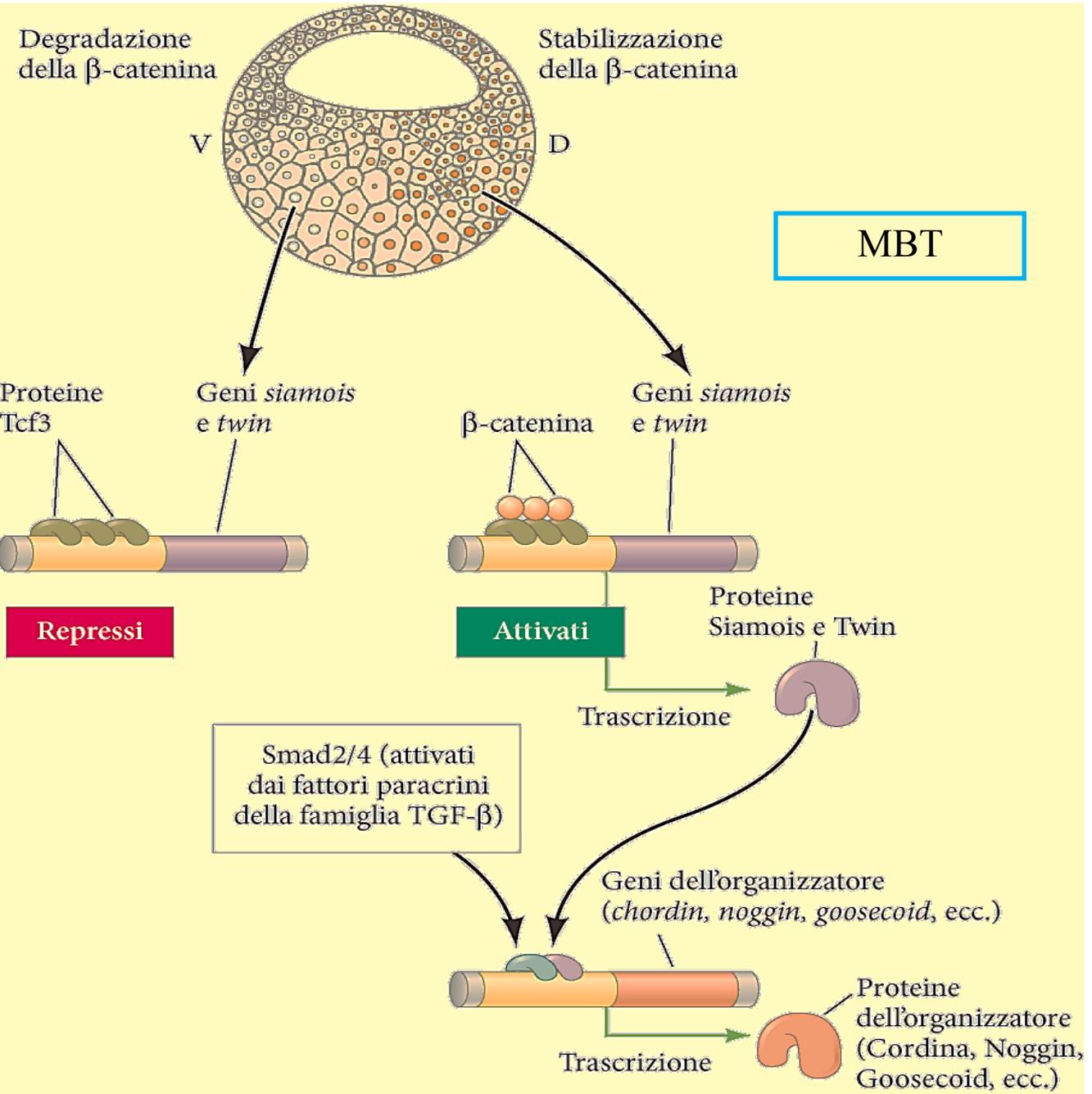


(D) Inibizione dorsale di GSK3



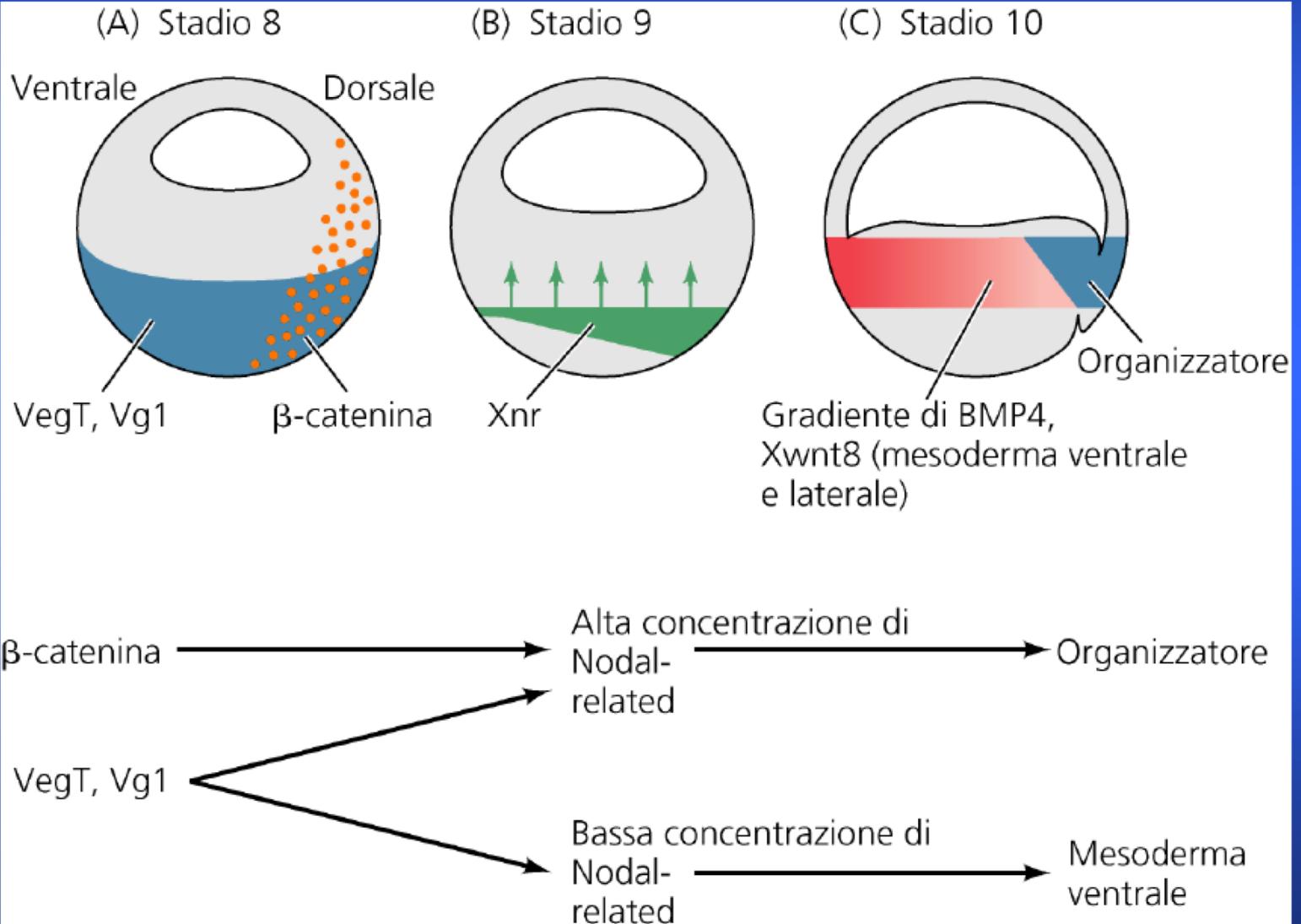
(E) Arricchimento dorsale di  $\beta$ -catenina





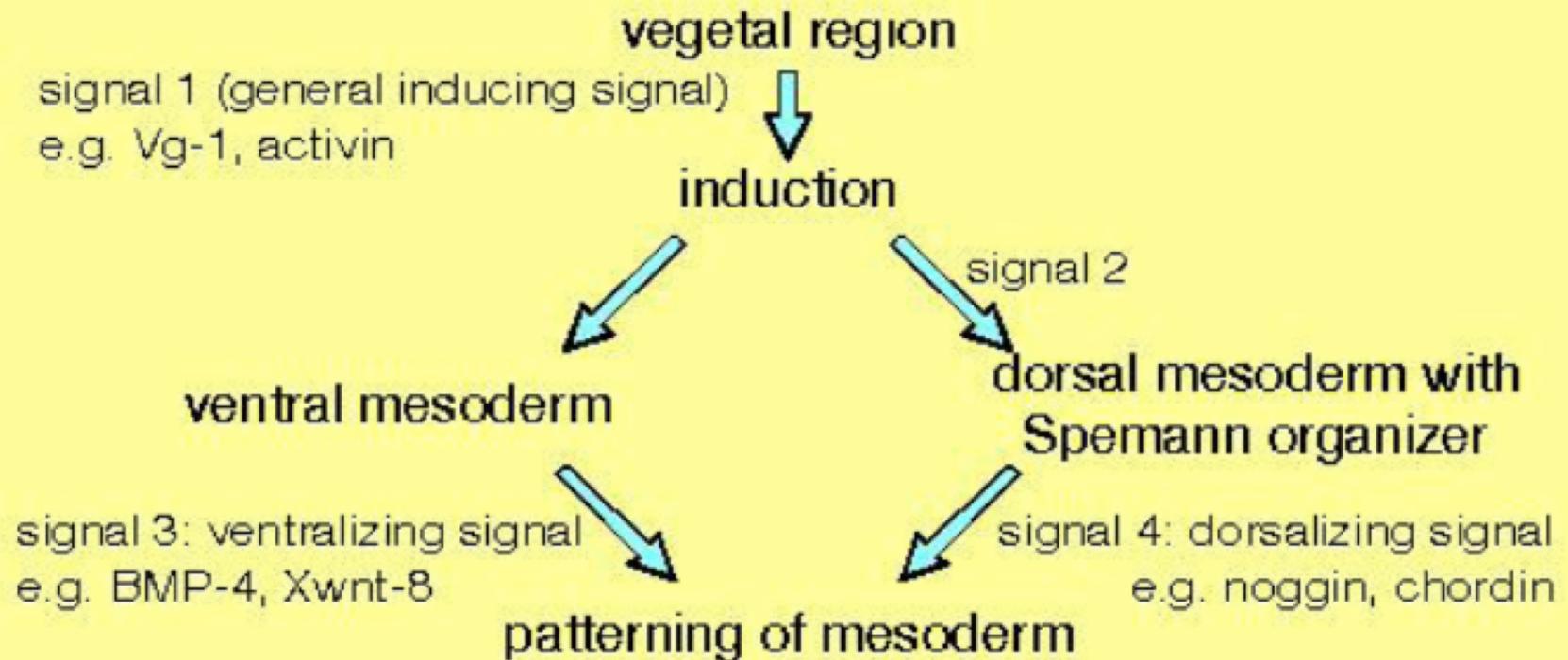
Gsc attiva le proprietà di migrazione delle cellule del labbro dorsale del blastoporo (embolia ed estensione convergente) ed attiva geni fondamentali per la formazione del mesoderma anteriore ed ectoderma encefalico presuntivo.

# Induzione del mesoderma



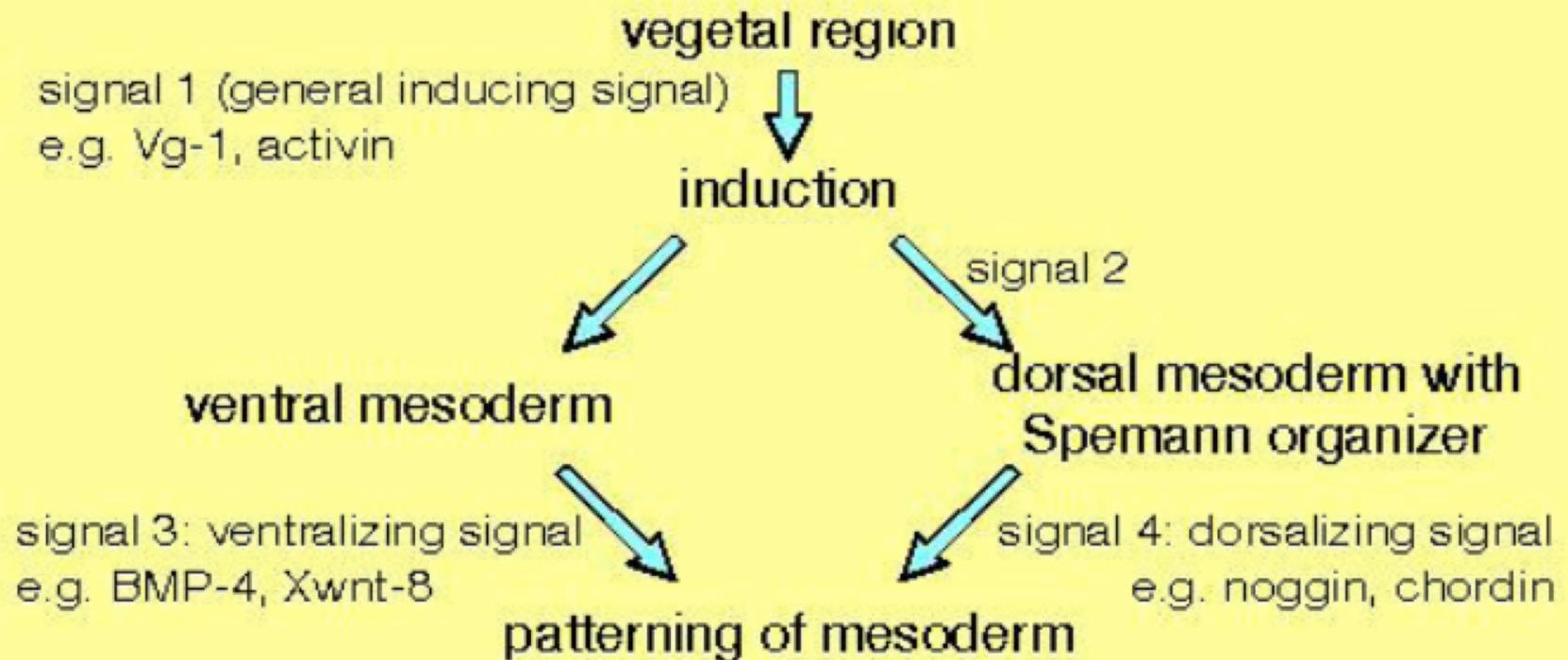
# Induzione del mesoderma

## Summary: mesoderm induction in Xenopus

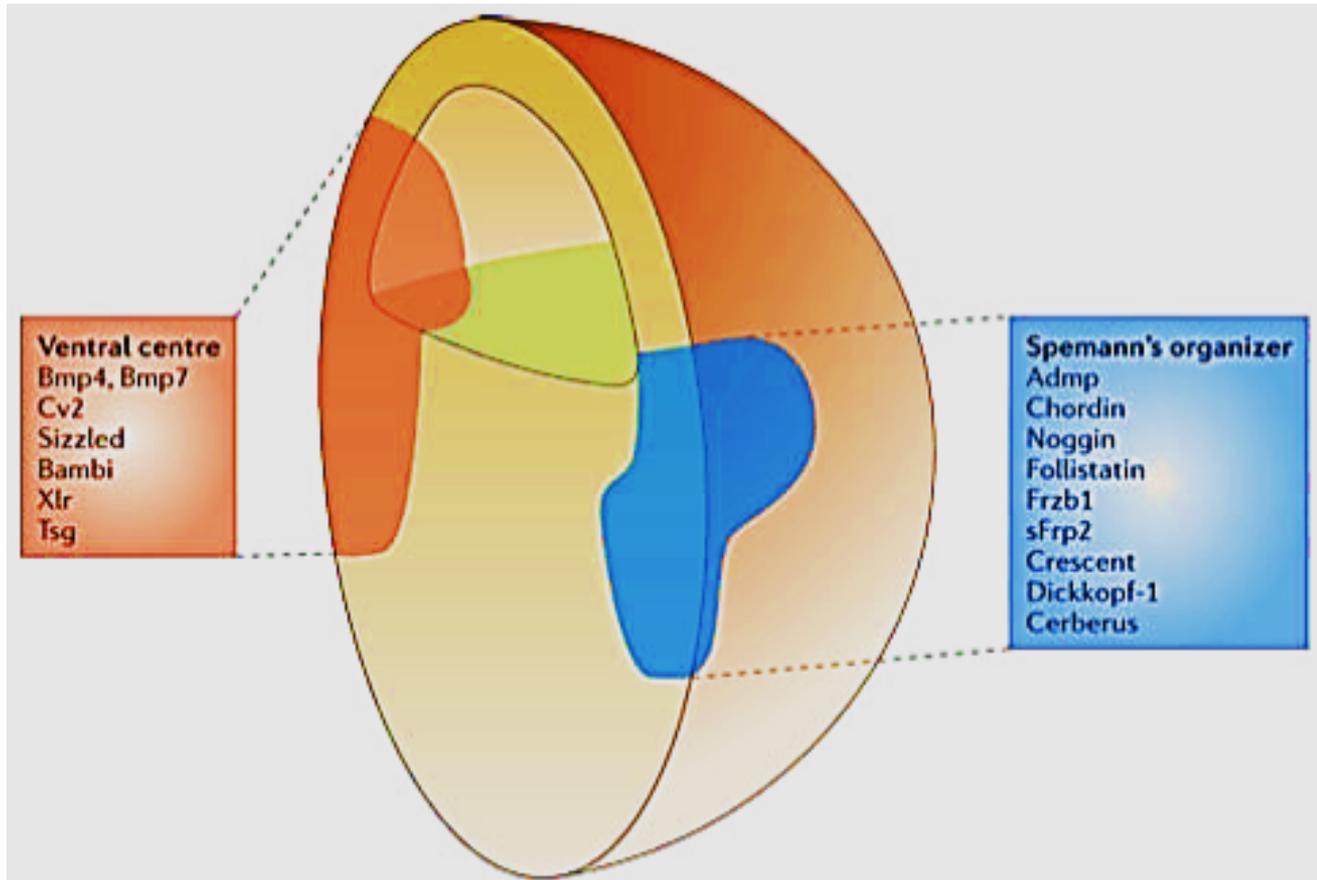


# Induzione del mesoderma

## Summary: mesoderm induction in Xenopus

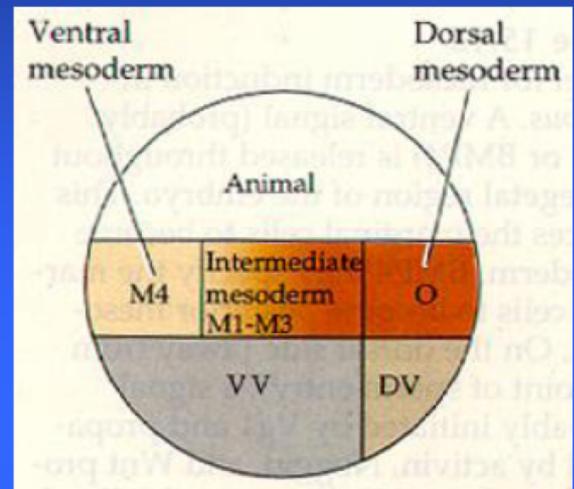
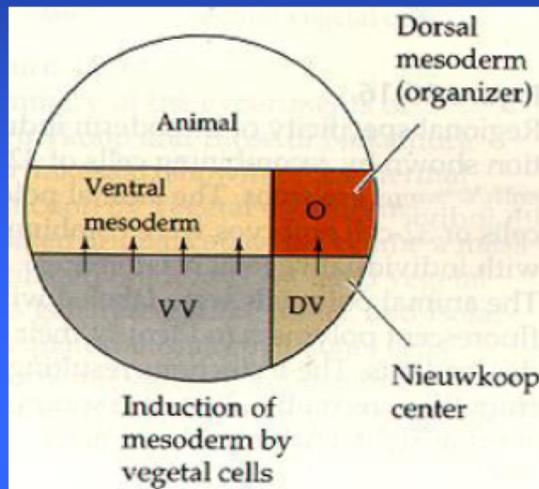
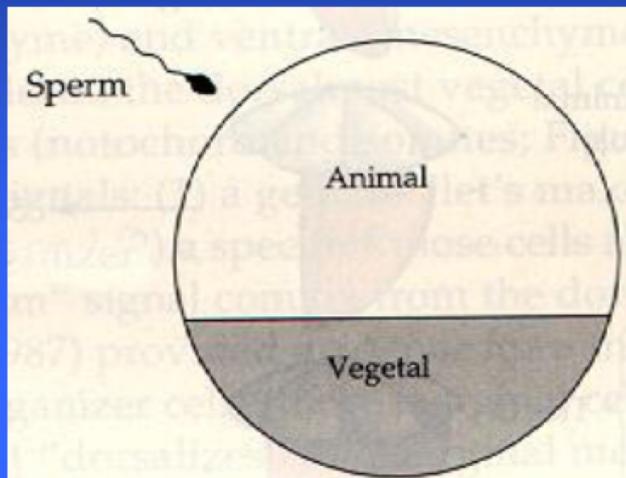


# Proteine secrete dai centri di segnalazione dorsali e ventrali nella gastrula di *Xenopus*



# Funzioni dell'organizzatore

- Autodifferenziamento in mesoderma dorsale (precordale, cordale)
- Induzione del mesoderma parassiale (somiti)
- Induzione dell'ectoderma dorsale (neurale)
- Avvio della gastrulazione



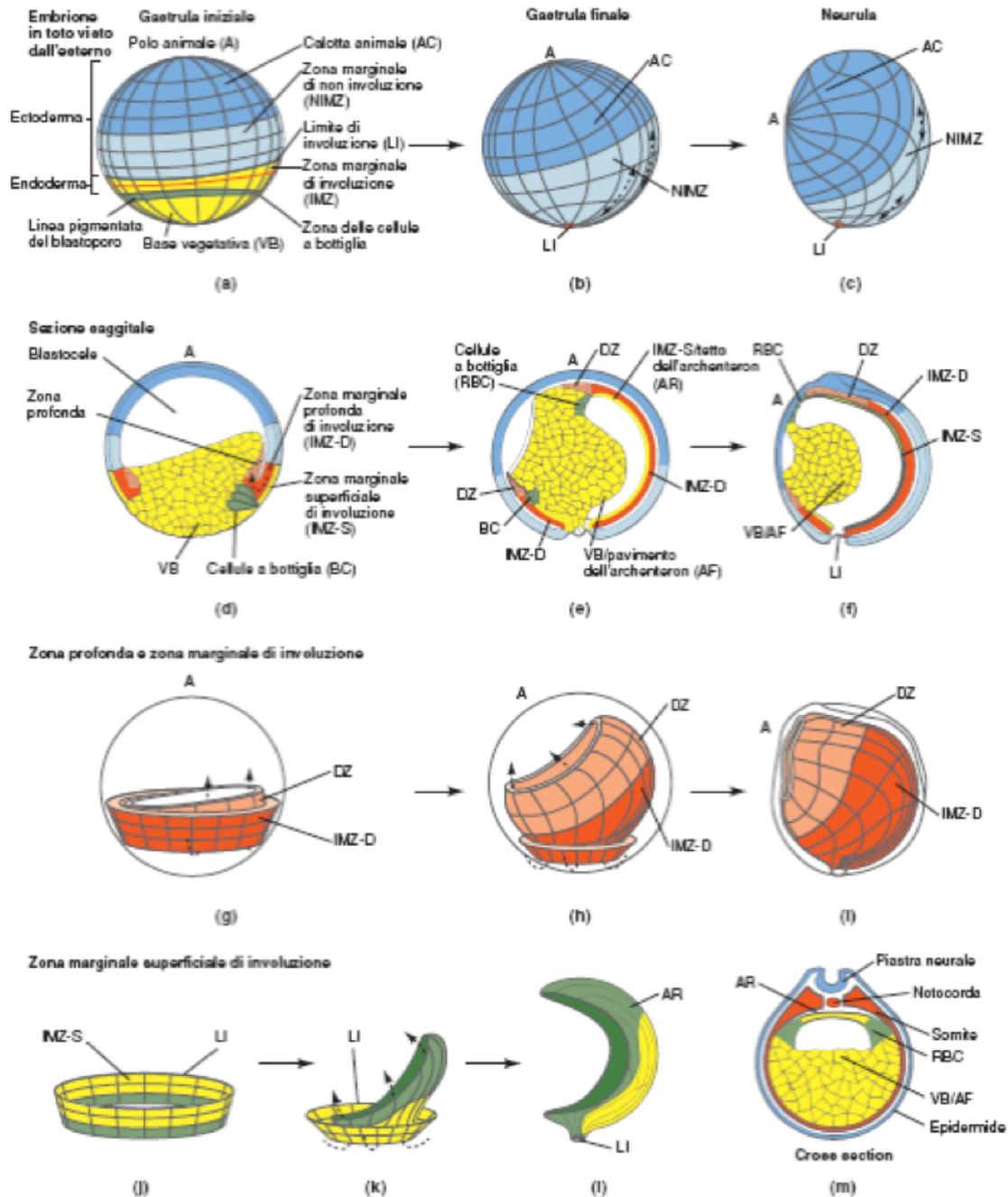
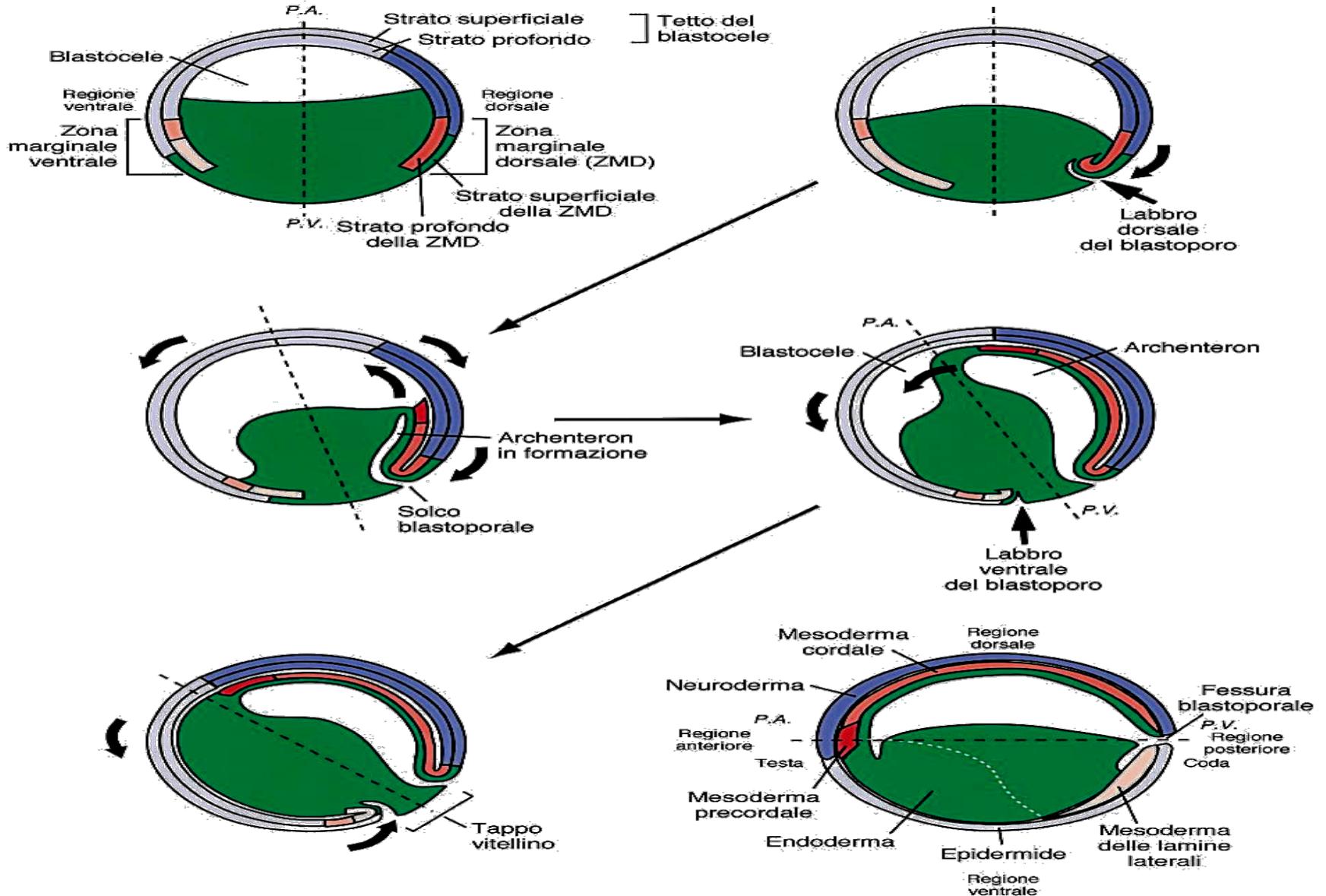


Figura 10.14 Gastrulazione in *Xenopus laevis*; a destra la visione dorsale, il polo animale è in alto. Le frecce indicano la direzione dei movimenti.

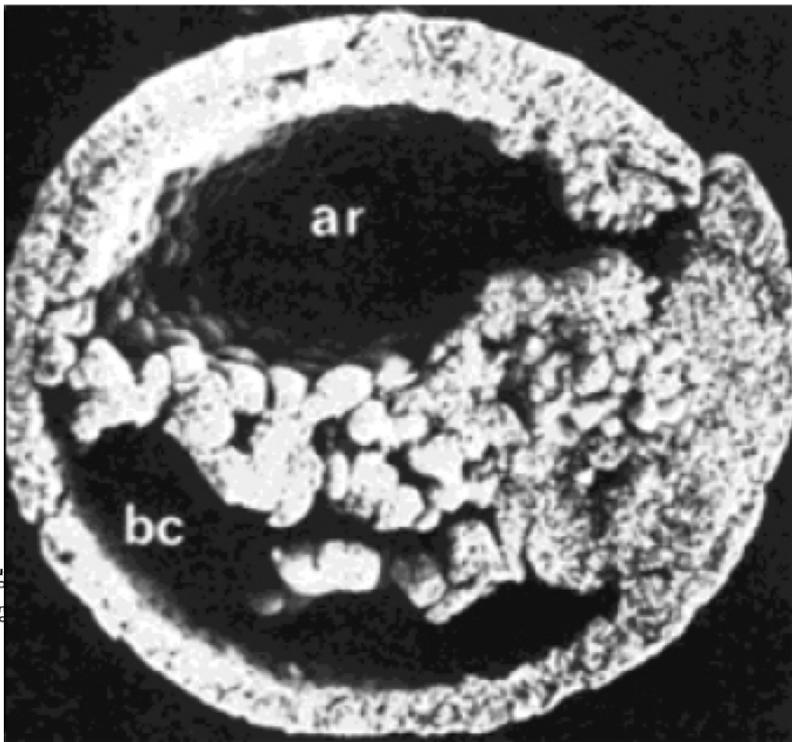
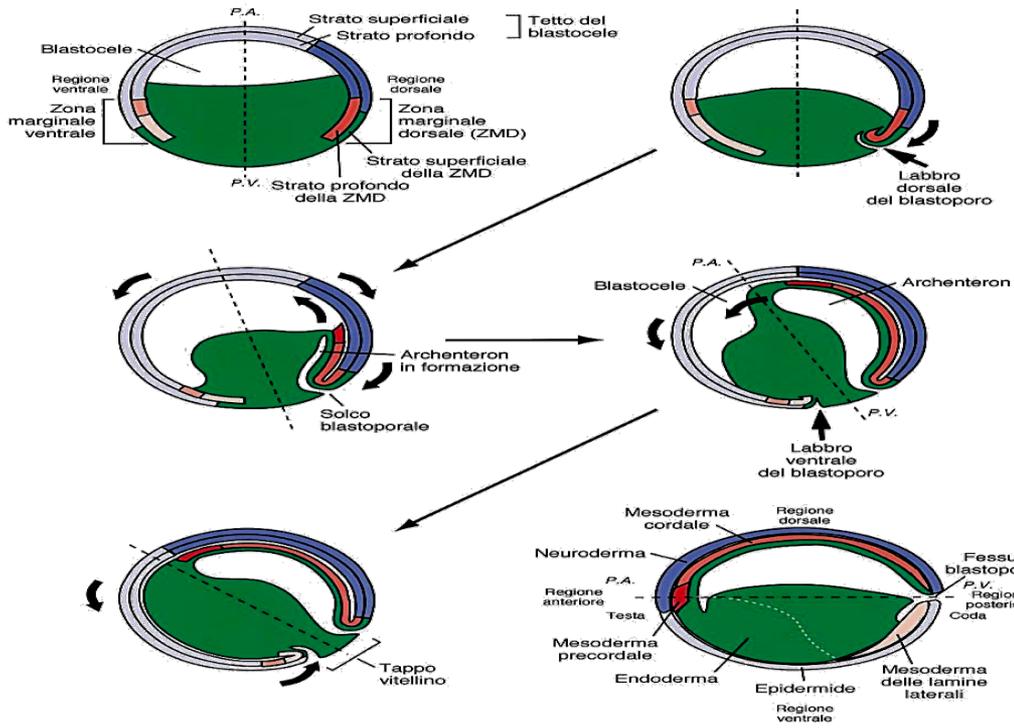
Endoderma in verde; mesoderma cefalico rosso, dorsale rosa, ventrale rosa chiaro; ectoderma dorsale blu, ventrale celeste

Fig. 8.5: Gastrulazione dello *Xenopus* (vista in sezioni sagittali)

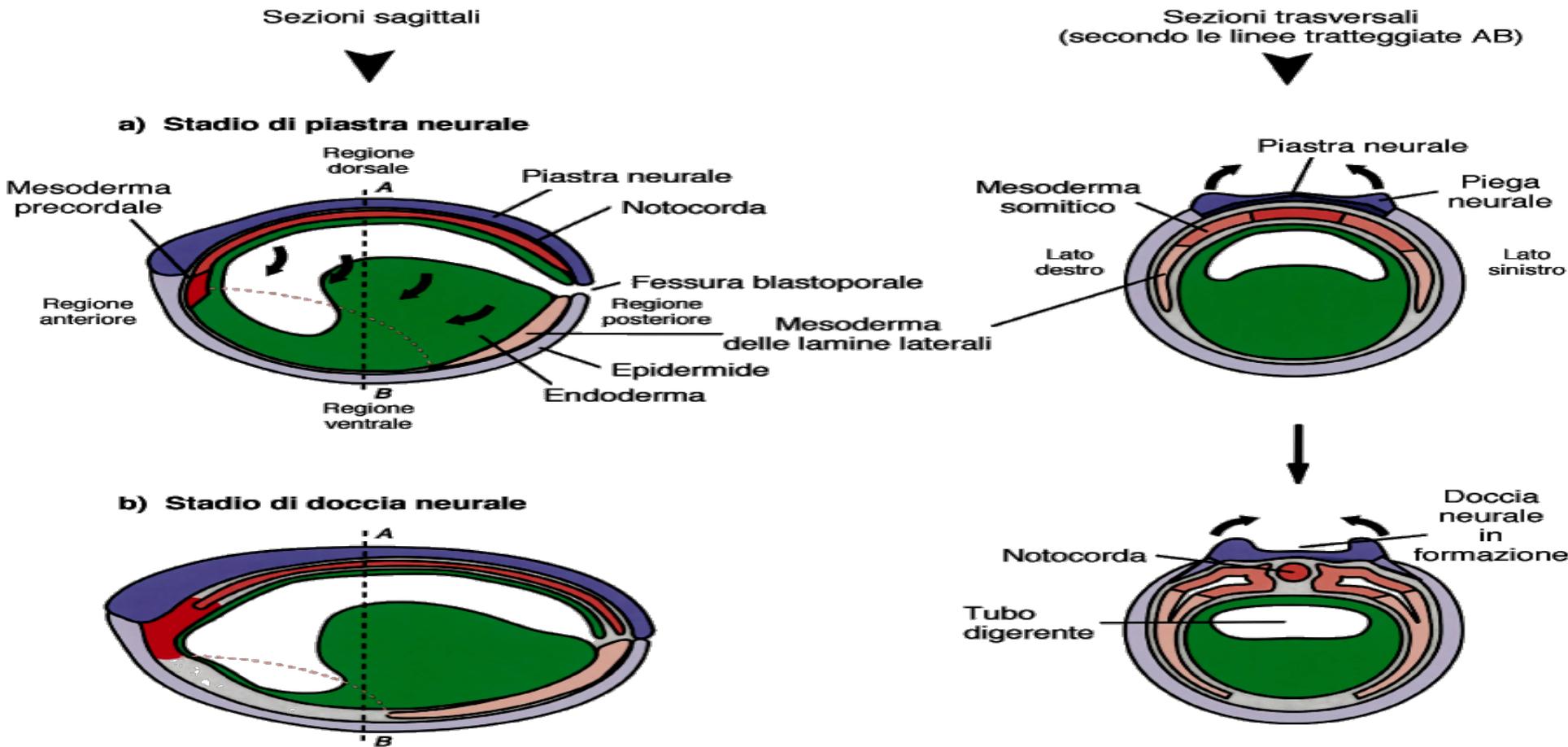


Endoderma in verde; mesoderma cefalico rosso, dorsale rosa, ventrale rosa chiaro; ectoderma dorsale blu, ventrale celeste

Fig. 8.5: Gastrulazione dello *Xenopus* (vista in sezioni sagittali)

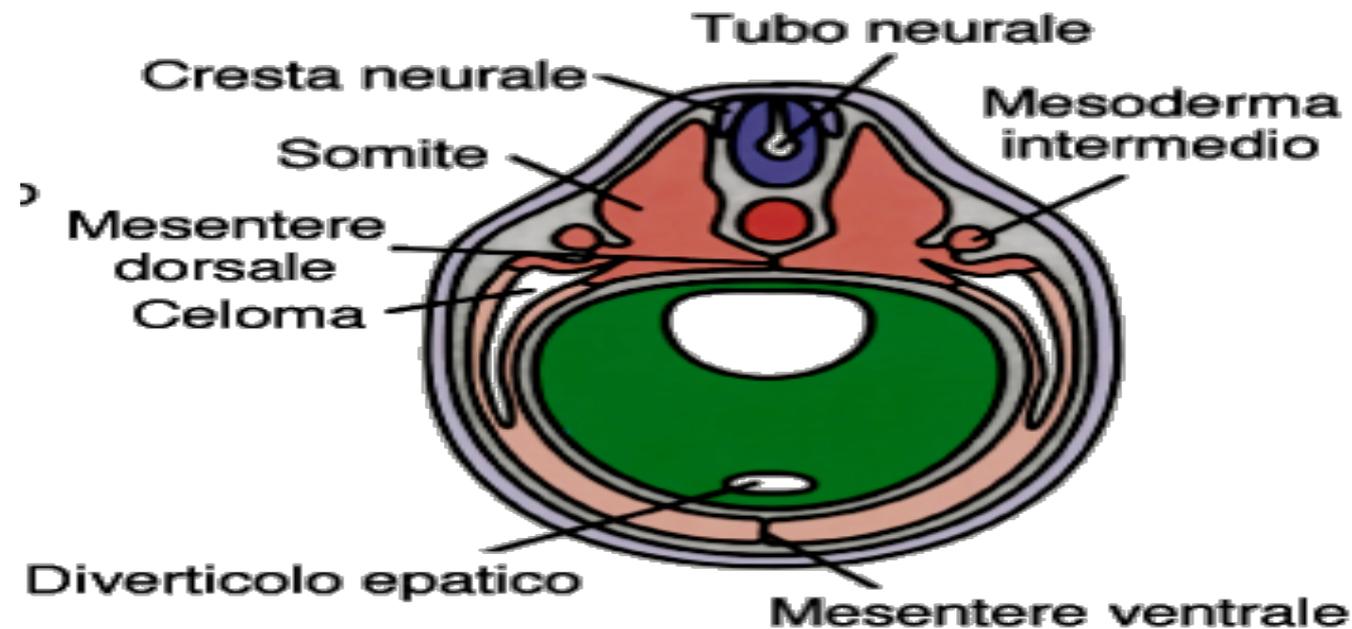
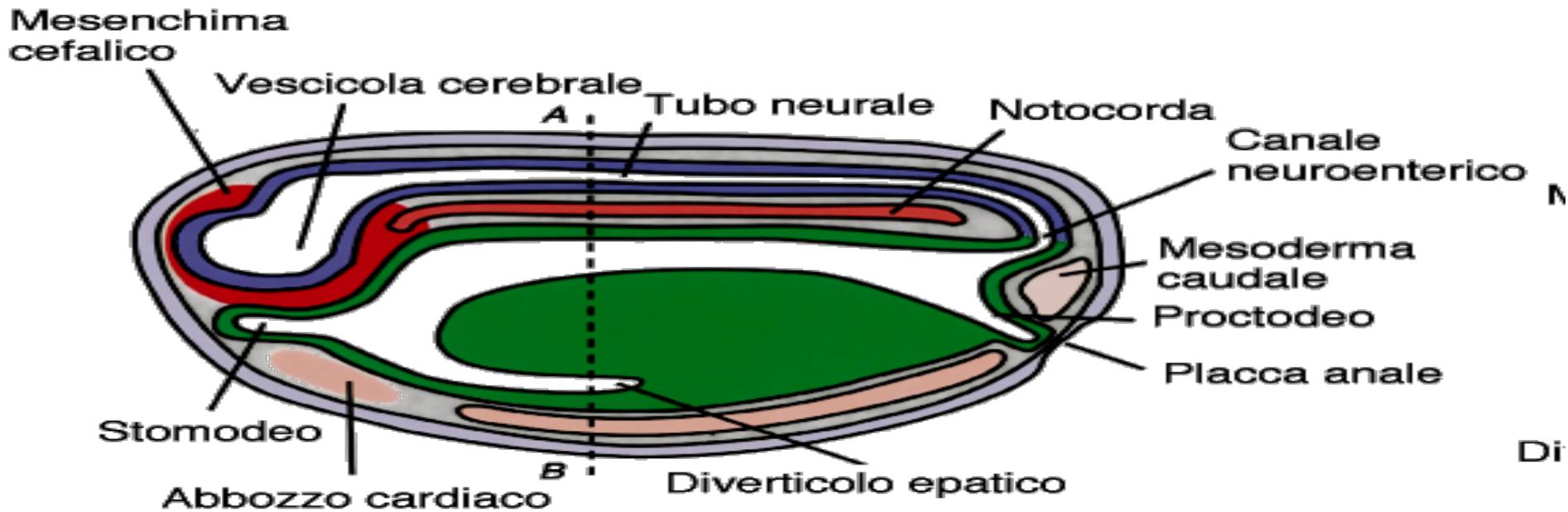


**Fig. 8.7: La neurulazione**



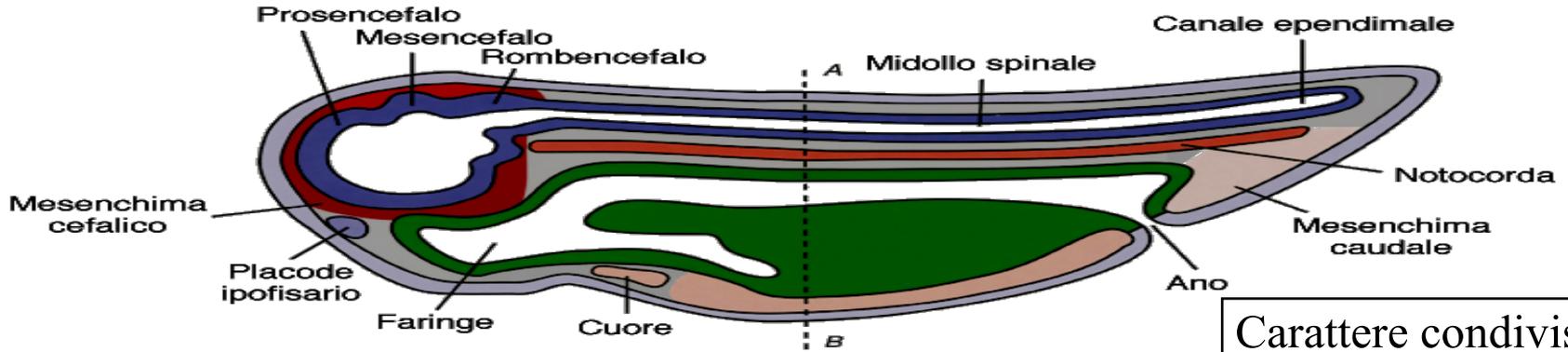
Ectoderma dorsale blu, ventrale celeste; mesoderma cefalico rosso, assiale rosa intenso, parassiale rosa, ventrale rosa chiaro; endoderma verde

### c) Stadio di tubo neurale



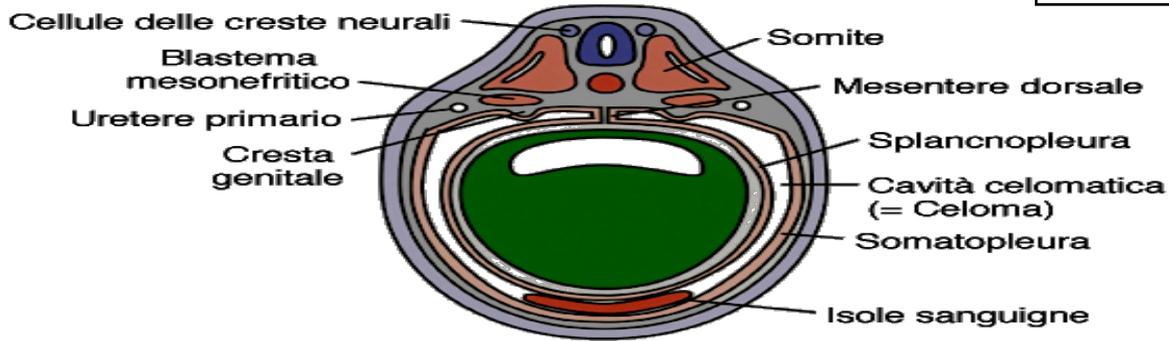
**Fig. 8.9: Bottone caudale**

**a) Sezione sagittale**

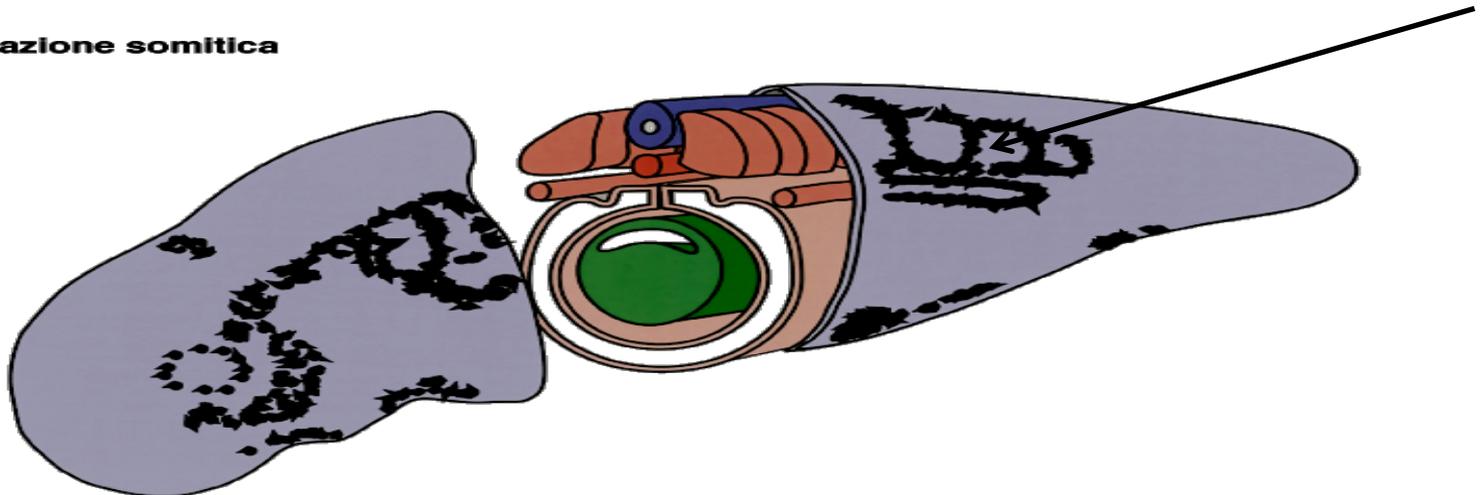


Carattere condiviso da tutti i vertebrati

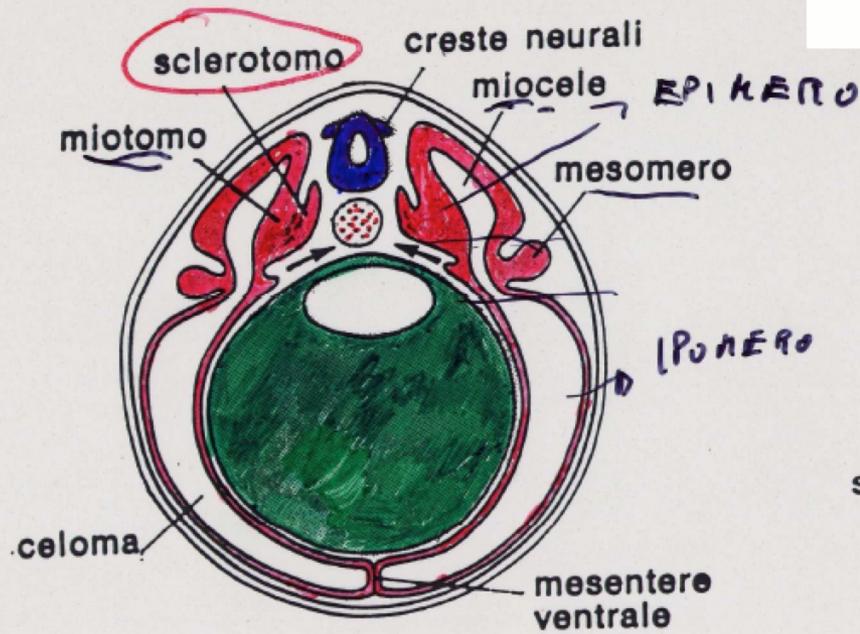
**b) Sezione trasversale lungo AB**



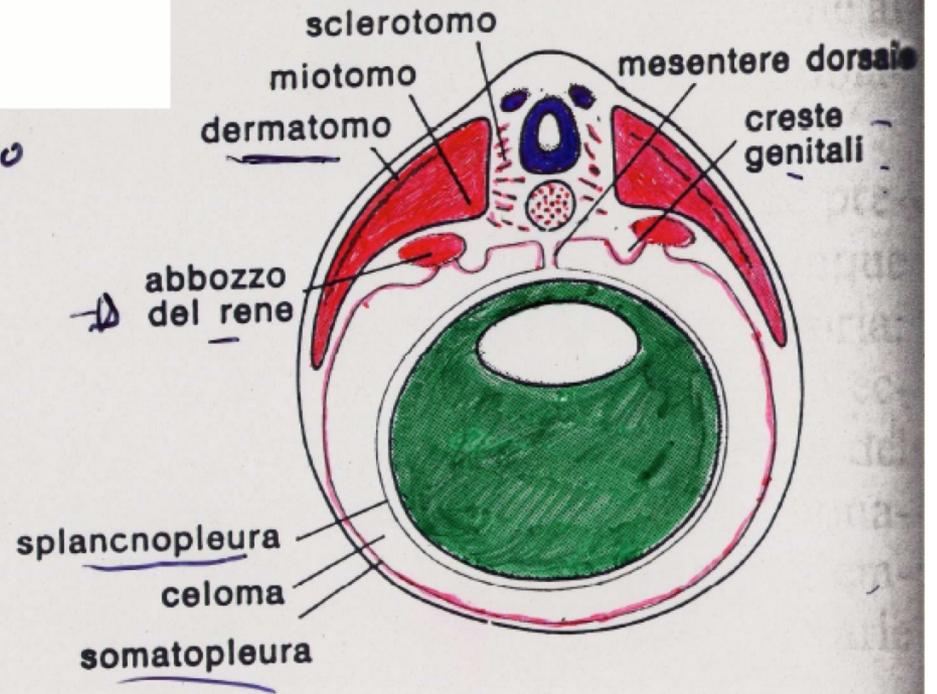
**c) Metamerizzazione somitica**



cavità primaria (fig. 2.16).

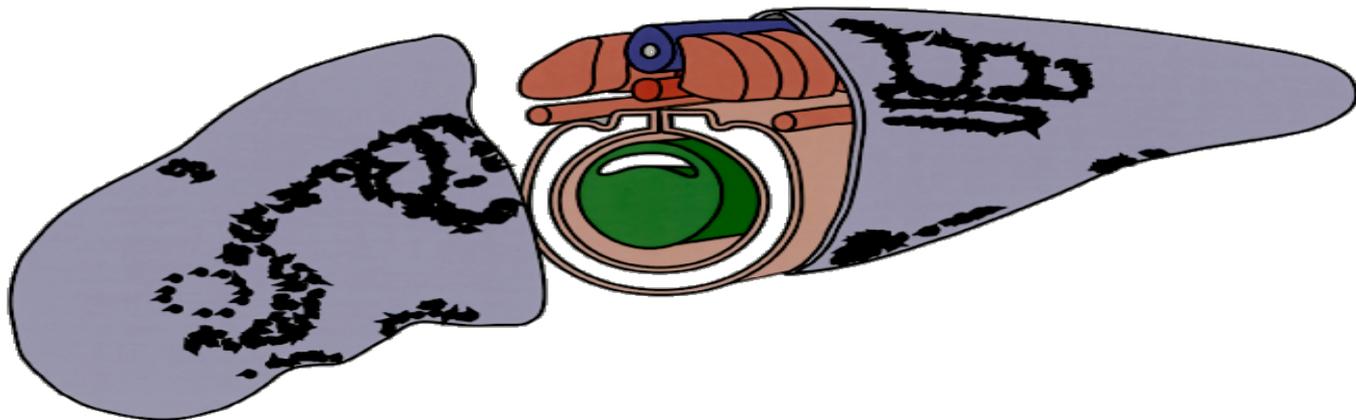


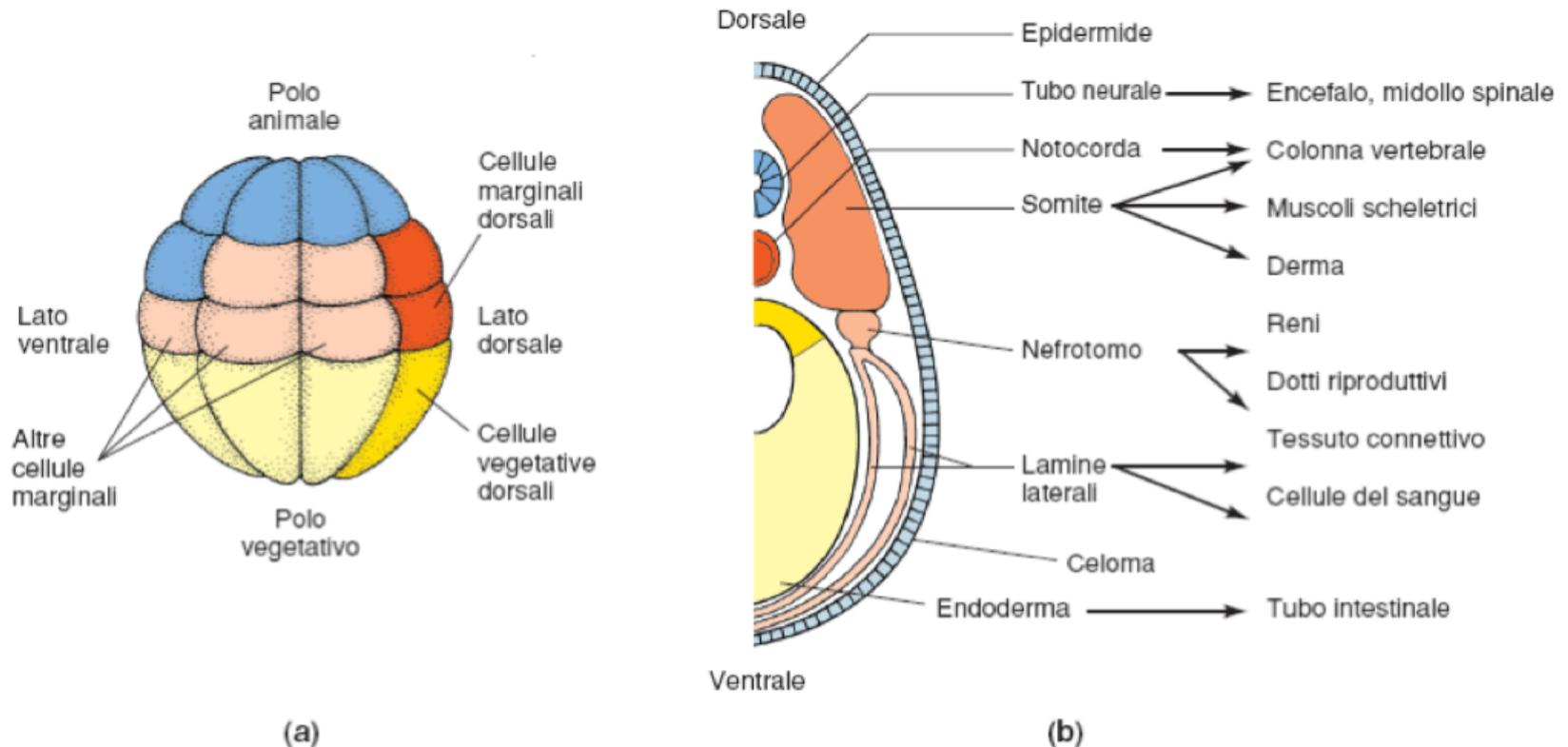
# SOMITI



Evoluzione dei somiti.

## c) Metamerizzazione somitica

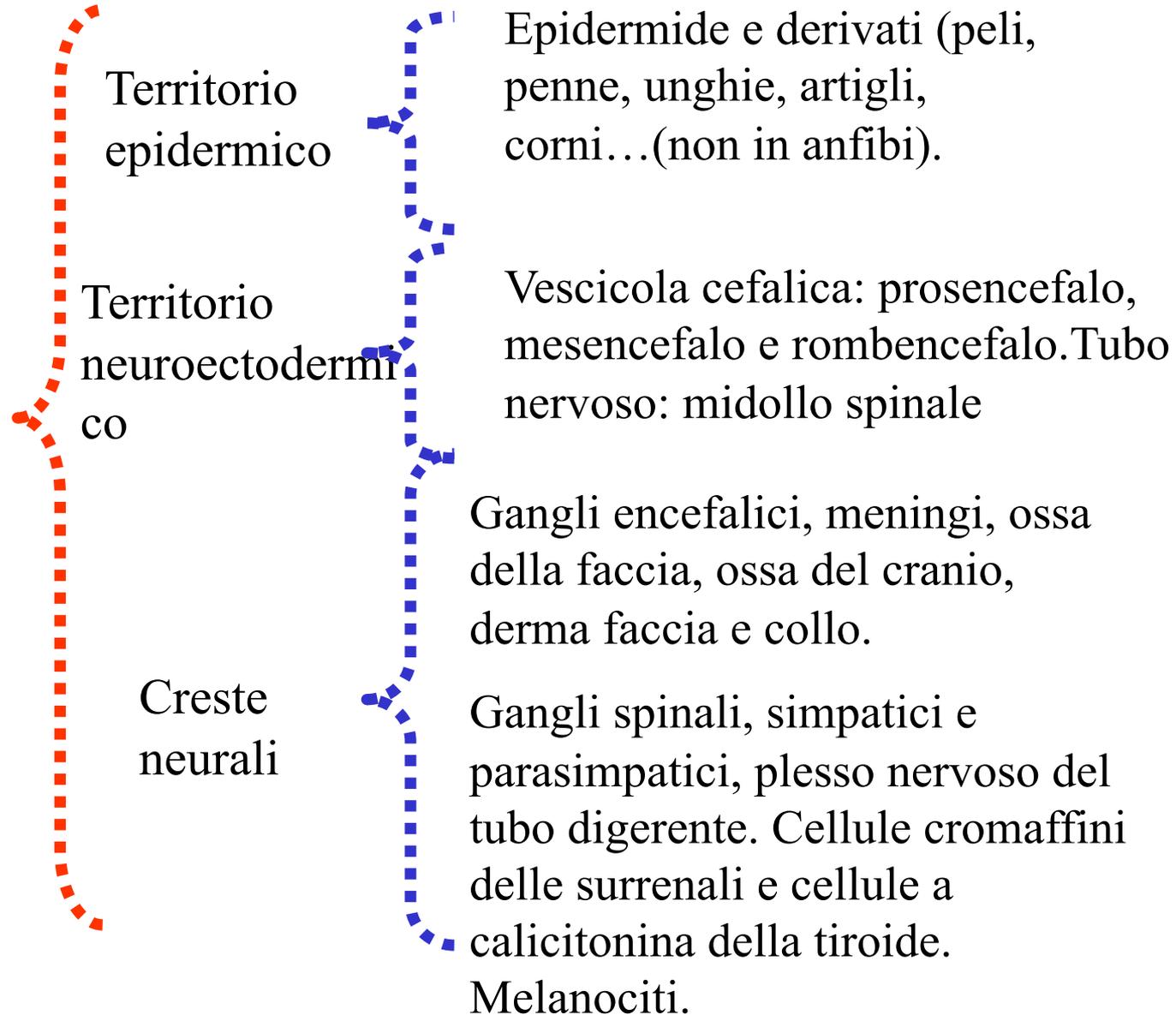




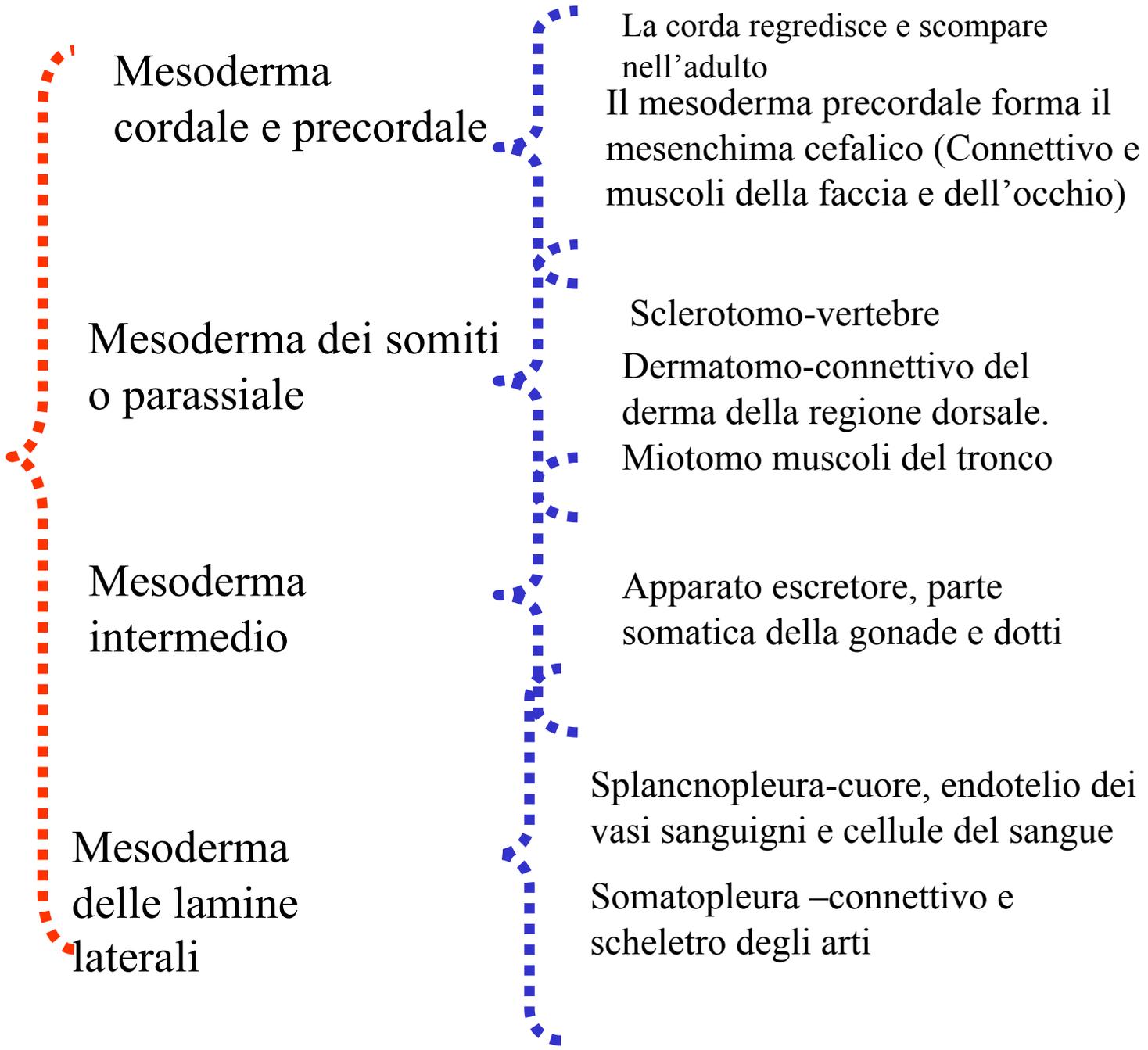
**Figura 9.15** Sviluppo del pattern mesodermico dorso-ventrale in embrioni di *Xenopus*. **(a)** Visione laterale allo stadio di 32 cellule. Gli esperimenti di isolamento e induzione (Figura 9.13) mostrano solo due tipi di mesoderma, uno a livello delle cellule marginali dorsali e l'altro in tutte le altre cellule marginali. **(b)** Sezione trasversale di un embrione di anfibio che corrisponde allo stadio filotipico dei vertebrati. Il mesoderma presenta un'organizzazione complessa in cui sono riconoscibili, procedendo dalla regione dorsale verso la regione ventrale, la notocorda, i somiti, il mesoderma intermedio (nefrotomi) e le lamine laterali (somatopleura esterna e splancopleura interna).

# Evoluzione dei foglietti embrionali

## ECTODERMA



**MESODERMA**



## **ENDODERMA**



Epitelio del tubo digerente e  
ghiandole annesse,

Epitelio dei polmoni e vescica