

Embriologia

ANATOMIA COMPARATA E BIOLOGIA DELLO SVILUPPO 029SV

Gabriele Baj gbaj@units.it

Giulia Romano giulia.romano@units.it

Dipartimento di Scienze della Vita

Via Licio Giorgieri, 5

Edificio Q, 2p, st.214

TRIESTE

040-5588676

Indice Contenuti

Parte 1 - Segmentazione & Blastulazione

- Definizioni e approcci storici (Preformismo vs Epigenesi, Leggi di von Baer, Clessidra dello Sviluppo)
- Leggi di Hertwig — orientamento del fuso e posizione del nucleo
- Tipi di uova e distribuzione del vitello (oligolecitale, mesolecitale, telolecitale, centrolecitale)
- Pattern di segmentazione comparati nei tre modelli
- Blastulazione: meccanismo molecolare e funzione del blastocele
- Fate map comparata: Xenopus · Gallus · Sus scrofa

Parte 2 - Gastrulazione

- Movimenti morfogenetici (involuzione, epibolia, EMT, convergenza-estensione)
- Xenopus: blastoporo, labbro dorsale, organizzatore di Spemann-Mangold
- Gradienti molecolari: Nodal, BMP4, Wnt, FGF
- Gallus: stria primitiva, nodo di Hensen, staging HH
- Sus scrofa: blastocisti, allungamento filamentoso, nodo primitivo
- Confronto molecolare comparato dei tre modelli

Parte 3 - Neurulazione & Creste Neurali

- Induzione della placca neurale (Shh, BMP, FGF — gradiente D-V)
- Pieghe neurali, chiusura del tubo neurale, convergenza-estensione (Wnt/PCP)
- Difetti del tubo neurale (DTN): spina bifida, anencefalia, acido folico
- Creste neurali: specificazione, EMT, vie di migrazione
- Destini delle creste: SNP, melanociti, scheletro cranio-facciale, sistema enterico
- Neurocristopatie: Waardenburg, DiGeorge, Hirschsprung, melanoma

Parte 4 - Organogenesi & Annessi Embrionali

- Derivati principali dei tre foglietti germinativi
- Somitogenesi e clock molecolare Notch/Wnt/FGF (modello Cooke-Zeeman)
- Codice Hox — identità dell'asse antero-posteriore
- Organogenesi rapida: vescicole cerebrali, occhio, cuore, rene
- Annessi embrionali comparati nei tre modelli
- Placenta: classificazione di Grosser — epiteliochoriale (Sus scrofa) vs emocoriale (umano)
- Riepilogo e concetti trasversali del corso

Obiettivi

*Al termine di questo modulo, lo studente sarà in grado di descrivere, confrontare e interpretare i principali eventi dello sviluppo embrionale nei vertebrati, con riferimento costante ai tre modelli: *Xenopus laevis*, *Gallus gallus* e *Sus scrofa*.*

1. Conoscenza delle fasi — Descrivere le fasi dello sviluppo embrionale (segmentazione, gastrulazione, neurulazione, organogenesi) e i processi chiave di ciascuna.

2. Segmentazione comparata — Mettere in relazione il tipo di uovo con il pattern di segmentazione nei tre modelli.

3. Gastrulazione e organizzatori — Spiegare i movimenti morfogenetici e identificare strutture omologhe: blastoporo \equiv stria primitiva; organizzatore di Spemann \equiv nodo di Hensen \equiv nodo primitivo.

4. Neurulazione e creste neurali — Descrivere l'induzione della placca neurale, la chiusura del tubo neurale, le vie migratorie delle creste neurali e i principali destini cellulari.

5. Organogenesi e geni Hox — Illustrare la somitogenesi, il clock molecolare e il codice Hox; ricondurre i foglietti germinativi ai principali organi.

6. Annessi embrionali e laboratorio — Riconoscere gli annessi embrionali nei tre modelli e identificare strutture embrionali chiave nei preparati istologici del laboratorio pratico.

Embriologia

È lo studio dello sviluppo animale dallo zigote alla nascita

Definizioni

Sviluppo: processo relativamente lento di cambiamento progressivo, negli organismi multicellulari.

Zigote: singola cellula, l'uovo fertilizzato, che si divide mitoticamente per produrre tutte le cellule dell'organismo.

Ontogenesi: sviluppo embrionale del singolo individuo.

Filogenesi: cambiamenti evolutive nel tempo.

Teratogenesi: errori dello sviluppo che possono originare malformazioni.

L'approccio anatomico

Preformismo ed Epigenesi: due visioni opposte sull'origine della forma

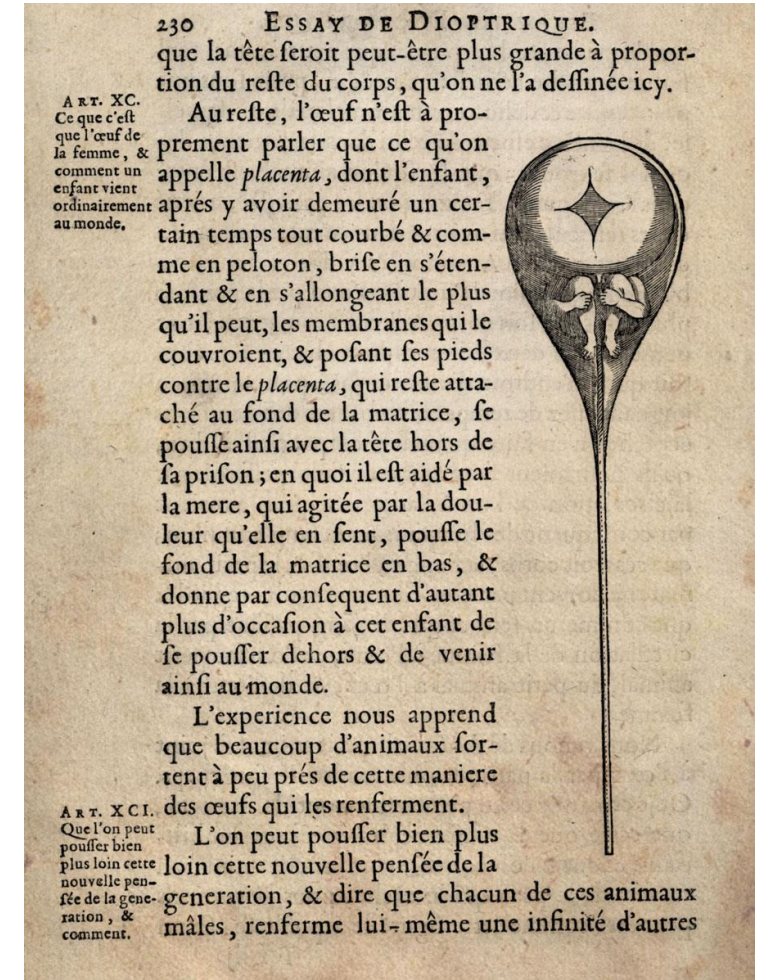
PREFORMISMO (XVII–XVIII sec.)

- L'organismo adulto è **già preformato** nell'uovo o nello spermatozoo — lo sviluppo è solo *dispiegamento* di una struttura preesistente
- Il concetto di **homunculus**: un piccolo essere già formato nello spermatozoo (Hartsoeker, 1695)
- Esponenti: **Malpighi, Swammerdam, Bonnet** — osservatori attenti, interpretazione errata

EPIGENESI

- La forma si **costruisce progressivamente** — la complessità *emerge* durante lo sviluppo da un uovo inizialmente omogeneo
- **Aristotele** (*De Generatione Animalium*): osservò la formazione progressiva degli organi nell'embrione di pollo
- **Karl Ernst von Baer (1792–1876)**: le caratteristiche generali compaiono prima di quelle specifiche — visione **vincente**, confermata dalla biologia molecolare

Ontogenesi: sviluppo dell'organismo *Filogenesi*: storia evolutiva della specie



Hartsoeker, 1695

L'*homunculus* nello spermatozoo

Approccio embriologico-comparato

I vertebrati attraversano stadi embrionali simili, per poi in seguito divergere

LEGGI DI VON BAER

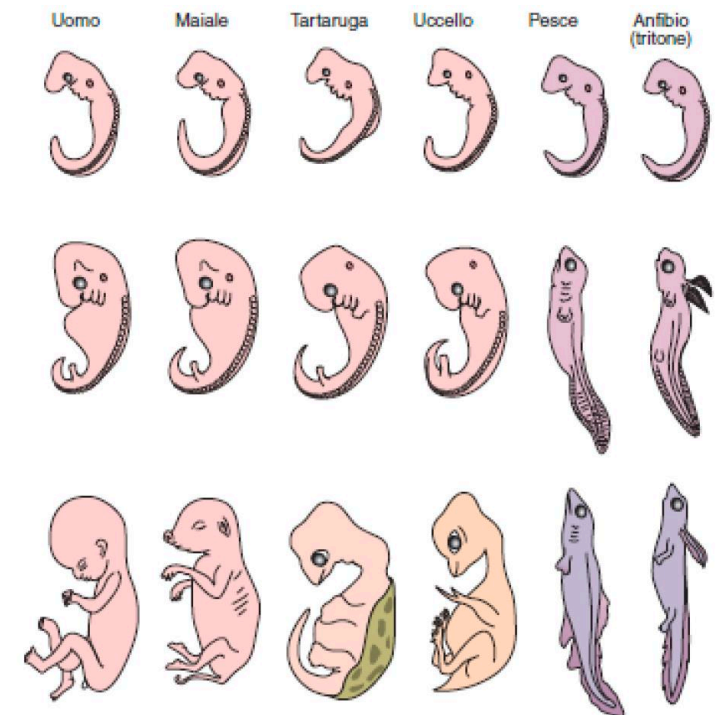
- Nell'embrione le caratteristiche **generali** compaiono più precocemente di quelle specifiche
- I caratteri meno generali si sviluppano da quelli più generali
- L'embrione di una specie più evoluta assomiglia all'embrione di specie meno evolute, piuttosto che all'**adulto**

Ontogenesi: sviluppo dell'organismo *Filogenesi: storia evolutiva della specie*

- Lo sviluppo è un processo tendenzialmente **conservativo** e le variazioni si risolvono spesso in un fallimento
- L'ontogenesi ripercorre tappe dello sviluppo di forme ancestrali, per cui compaiono **abbozzi di strutture** che non raggiungono la maturità

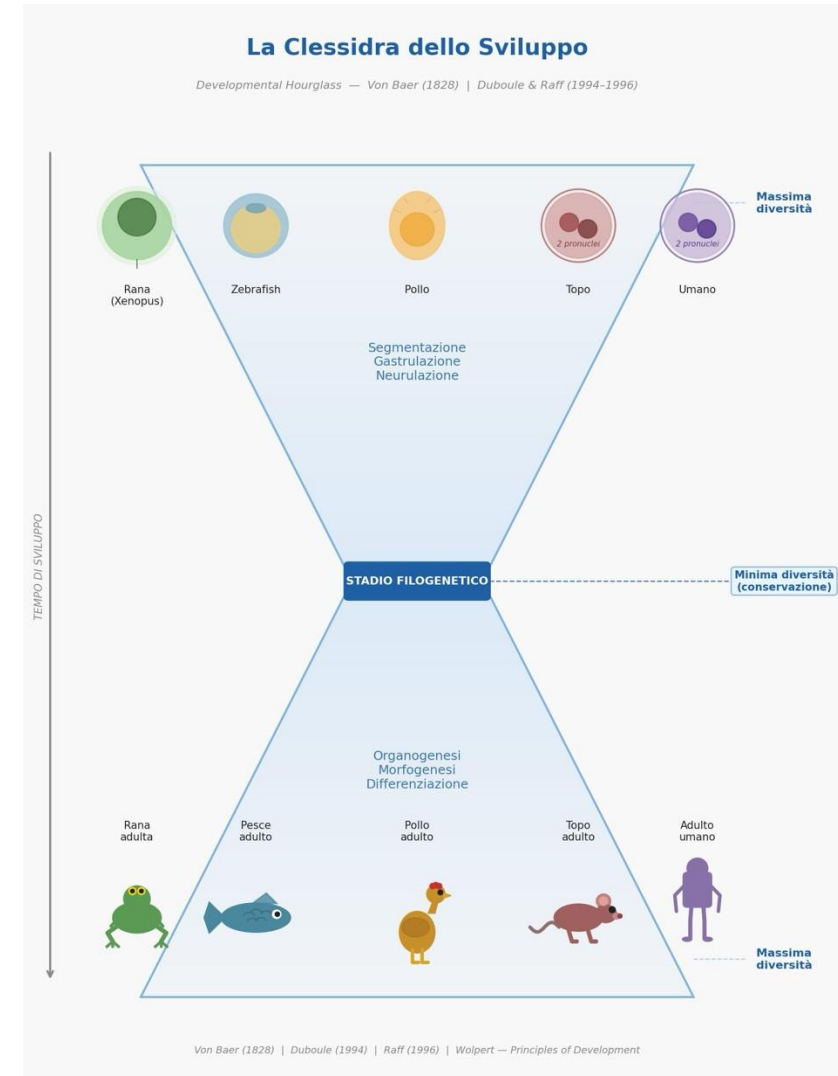
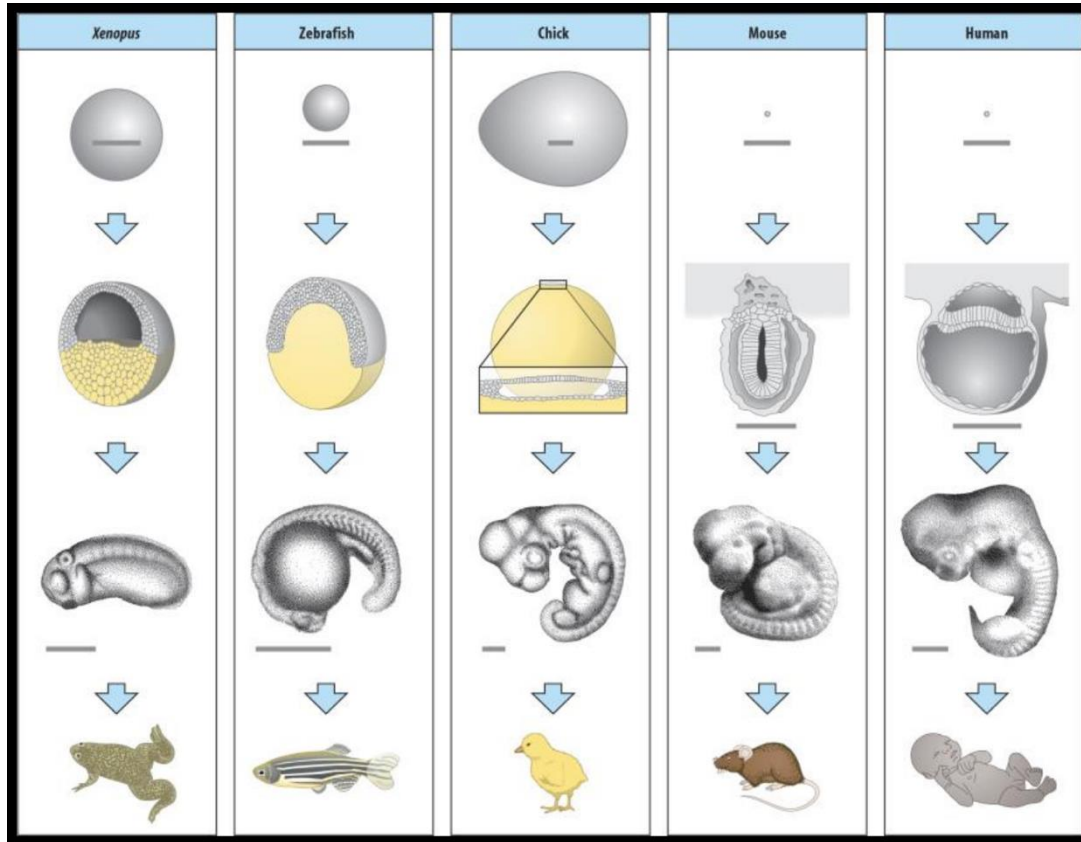


Karl Ernst von Baer
(1792–1876)



Approccio embriologico-comparato

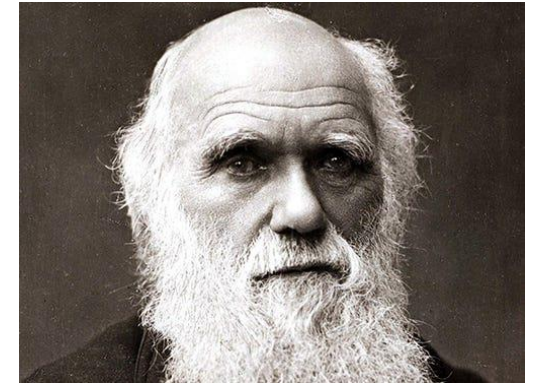
I vertebrati attraversano stadi embrionali simili, per poi in seguito divergere



L'approccio evoluzionistico: lo sviluppo come chiave per comprendere l'evoluzione

DARWIN E L'EMBRIOLOGIA (1859)

- *On the Origin of Species*: Darwin riconosce che le somiglianze embrionali tra specie diverse sono la più forte evidenza di discendenza comune
- Gli embrioni rivelano l'antenato comune più di quanto non faccia la morfologia adulta — il piano corporeo si conserva nelle fasi precoci
- La selezione naturale agisce preferenzialmente sulle fasi tardive dello sviluppo — le fasi precoci sono più vincolate e conservate



Charles Robert Darwin
(1809-1882)

L'approccio evolucionistico: lo sviluppo come chiave per comprendere l'evoluzione

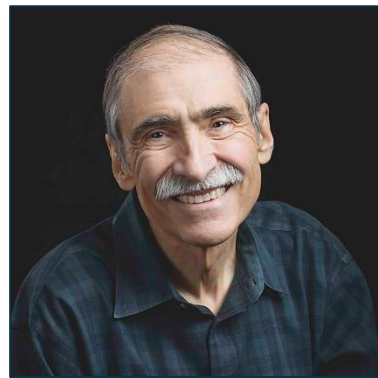
EVO-DEVO — BIOLOGIA EVOLUTIVA DELLO SVILUPPO

- Piccole variazioni nei geni regolatori dello sviluppo (es. geni Hox, Pax, Wnt) generano grandi differenze morfologiche tra specie
- Concetto di *eterocronia*: variazione nei tempi relativi dello sviluppo come meccanismo evolutivo (es. neotenia)
- Concetto di *eteropiàsia*: variazione nel luogo di espressione genica — stessa molecola, funzione diversa in contesti diversi

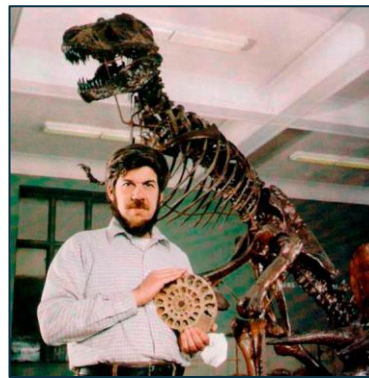
“Non sono stati inventati nuovi geni per fare nuove forme — sono stati riutilizzati gli stessi geni regolatori in tempi, luoghi e combinazioni diverse.”



Walter Jakob Gehring
(1939-2014)



Rudolf Albert Raff
(1941-2019)



Stephen Jay Gould
(1941-2002)



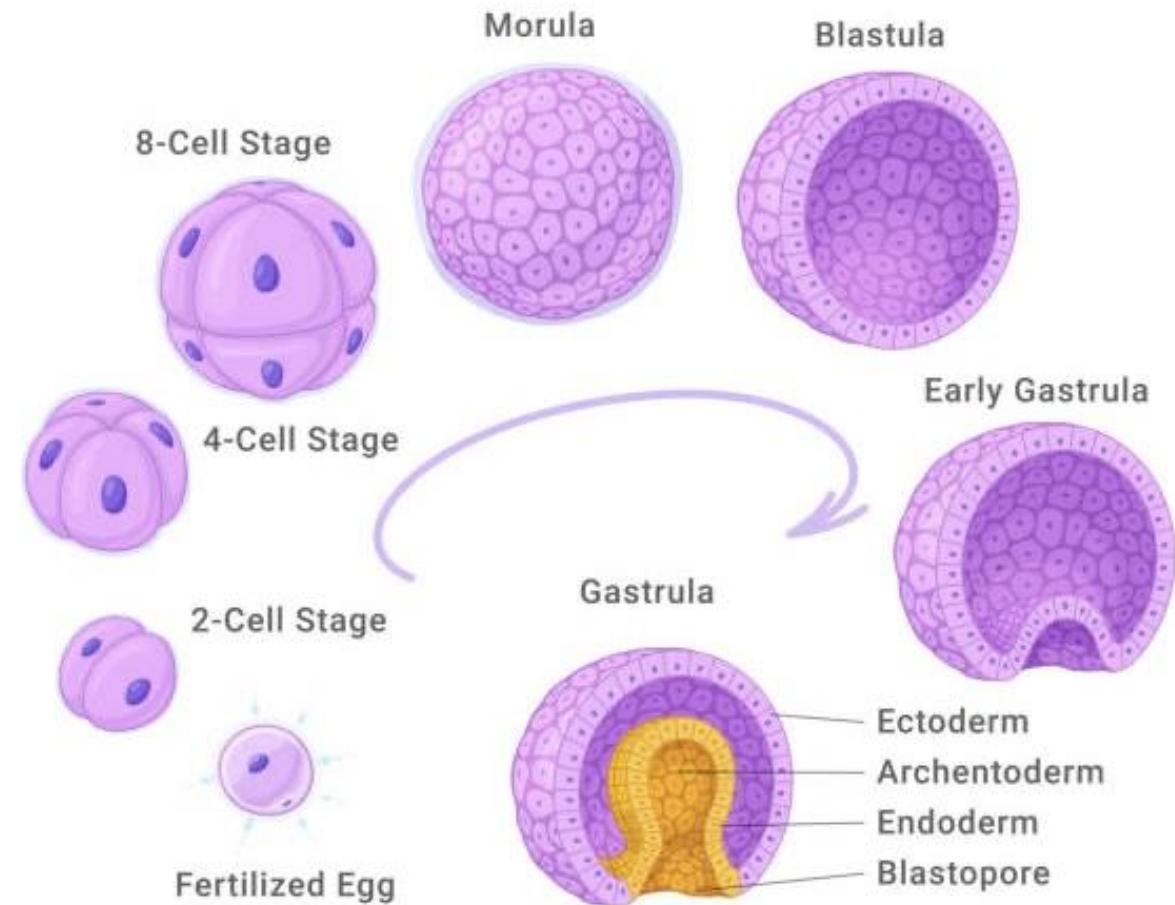
Denis Duboule
(1955-)



Sean Carroll
(1960-)

Fasi dello Sviluppo Embrionale dei Vertebrati

- 1) Fecondazione** ---> Zigote
(uovo fecondato)
- 2) Segmentazione** ---> Morula
(struttura solida multicellulare)
Blastula (struttura cava
costituita da un unico foglietto)
- 3) Gastrulazione** ---> Gastrula
(formazione di tre foglietti e
di una cavità, l' archenteron)
- 4) Neurulazione** ---> Neurula
(formazione del tubo neurale e metamerizzazione)
- 5) Organogenesi** ---> Embrione
(evoluzione dei foglietti in tessuti, organi e apparati)

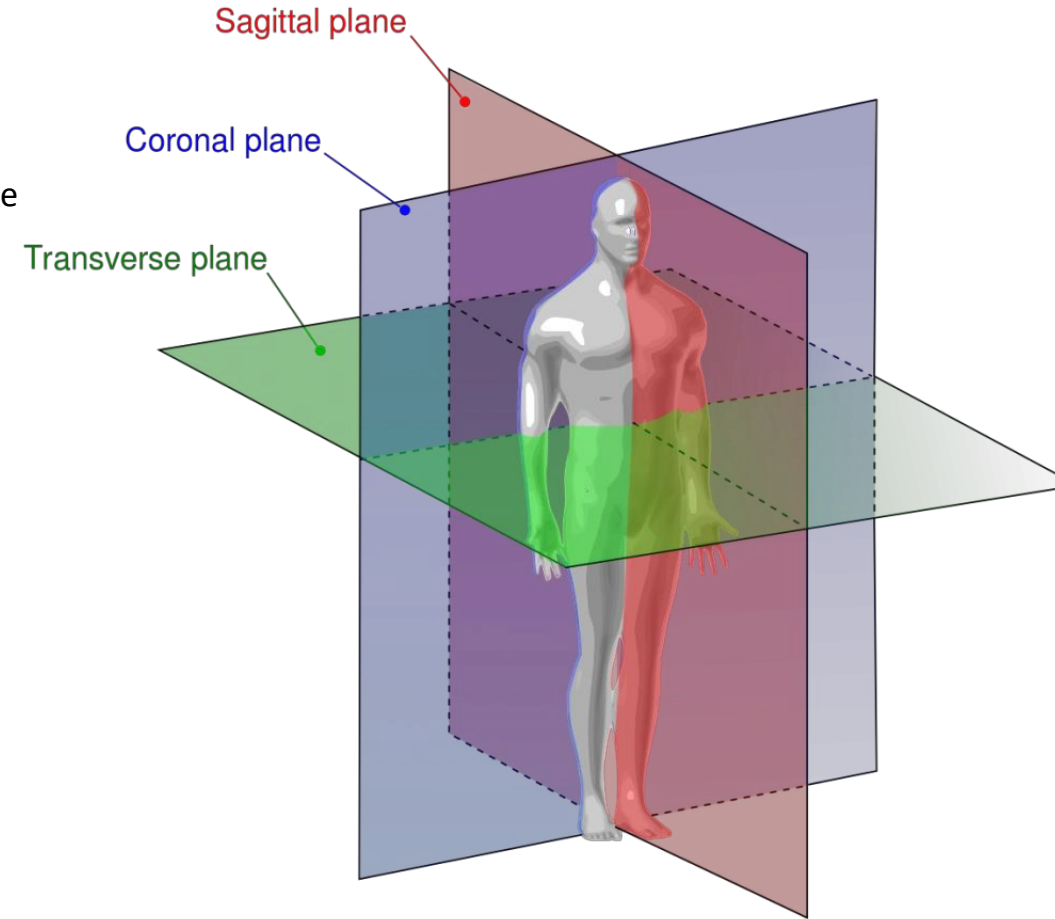


Termini di posizione

- **Piano sagittale**: divide il corpo in metà destra e sinistra.
- **Piano frontale (o coronale)**: divide il corpo in una parte anteriore (ventrale) e una posteriore (dorsale).
- **Piano trasversale (o assiale)**: divide il corpo in una parte superiore (craniale o cefalica) e una inferiore (caudale).

Termini di posizione relativi

- **Mediale**: vicino al piano mediano (la linea immaginaria che divide il corpo a metà).
- **Laterale**: lontano dal piano mediano.
- **Proximale**: vicino al punto di origine o di attacco di un arto.
- **Distale**: lontano dal punto di origine o di attacco di un arto.
- **Anteriore (o ventrale)**: verso la parte anteriore del corpo.
- **Posteriore (o dorsale)**: verso la parte posteriore del corpo.
- **Superiore (o craniale o cefalico)**: verso la testa.
- **Inferiore (o caudale)**: verso la coda o la parte inferiore del corpo.
- **Superficiale (o esterno)**: vicino alla superficie del corpo.
- **Profondo (o interno)**: lontano dalla superficie del corpo.

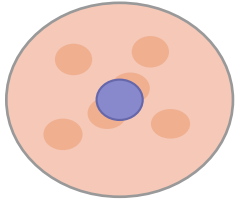


Tipi di Uova e Distribuzione del Vitello

Il contenuto e la distribuzione del vitello determinano il pattern di segmentazione

OLIGOLECITALE

Poco vitello
uniforme



TOTALE UGUALE

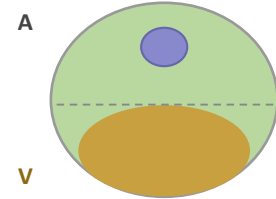
Blastomeri di dimensioni simili

- Fuso si orienta liberamente
- Divisioni simmetriche
- Blastula con blastocele ampio
- Es. topo: ciclo lento (12-24h)

Es: Riccio di mare, Anfiosso
Topo, Umano

MESOLECITALE

Vitello intermedio
polo animale/vegetativo



TOTALE INEGUALE

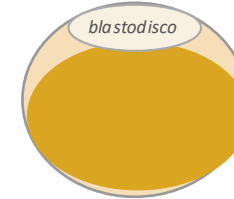
Micromeri (animale) e macromeri
(vegetativo)

- Nucleo eccentrico verso polo animale
- Polo animale: divisioni rapide
- Polo vegetativo: divisioni lente
- Blastocele spostato in alto

Es: Rana (*Xenopus*)
Tritone

TELOLECITALE

Molto vitello
concentrato al polo veg.



MEROBLASTICA DISCOIDALE

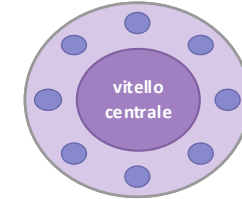
Solo il blastodisco si segmenta

- Vitello blocca la segmentazione
- Solo il blastodisco si divide
- Segmentazione superficiale
- Es. pollo: blastodisco ~3mm

Es: Pollo, Rettili
Pesci ossei

CENTROLECITALE

Vitello centrale
nucleo periferico



MEROBLASTICA SUPERFICIALE

Solo il citoplasma periferico si divide

- Vitello al centro, inerte
- Divisioni solo in periferia
- Sincizio → cellularizzazione
- Es. *Drosophila*: ~6000 nuclei prima

Es: Artropodi
Drosophila melanogaster

La Segmentazione (Cleavage): divisioni mitotiche rapide senza accrescimento

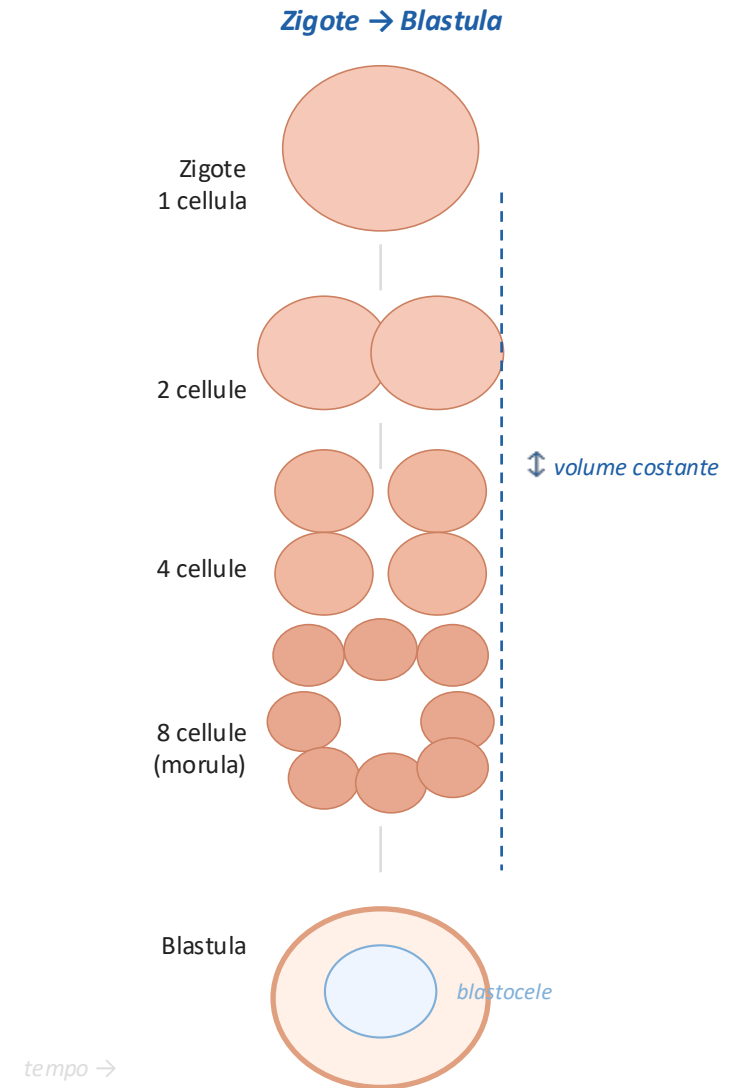
DEFINIZIONE

- Serie di **divisioni mitotiche rapide e successive** che suddividono lo zigote in cellule figlie sempre più piccole dette **blastomeri**
- Non vi è **accrescimento cellulare** tra una divisione e l'altra — il volume totale dell'embrione rimane uguale a quello dello zigote
- Risultato: aumento del numero di cellule con **riduzione progressiva del volume** di ciascun blastomero

CARATTERISTICHE PRINCIPALI

- **Fase S e M molto brevi**: mancano le fasi G1 e G2 del ciclo cellulare — le cellule passano direttamente da S a M
- **Rapporto nucleo/citoplasma**: aumenta progressivamente ad ogni divisione — è il **segnale molecolare** che arresta la segmentazione e avvia la gastrulazione (MBT — Mid-Blastula Transition)
- **Controllo materno**: le prime divisioni sono governate da mRNA e proteine **depositati dalla madre** nell'ovocita — il genoma zigote è silente

MBT (Mid-Blastula Transition): punto critico in cui inizia la trascrizione del genoma embrionale e le cellule acquisiscono mobilità — ben studiato in *Xenopus* e zebrafish



Le Leggi di Hertwig: orientamento del fuso e posizione del nucleo

PRIMA LEGGE — ORIENTAMENTO DEL FUSO

- Il fuso mitotico si orienta lungo l'**asse maggiore del citoplasma** — la cellula si divide perpendicolarmente al proprio asse più lungo
- Conseguenza: la forma della cellula **determina il piano di divisione** — cellule allungate si dividono trasversalmente, cellule sferiche in modo variabile

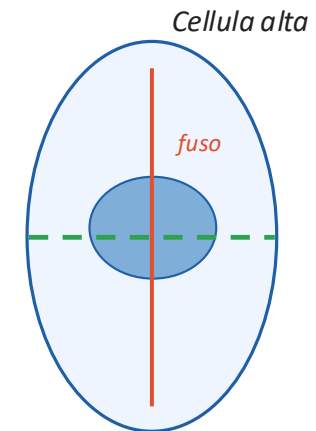
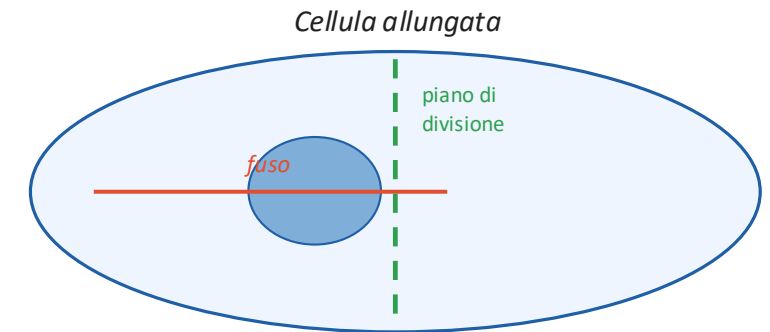
SECONDA LEGGE — POSIZIONE CENTRALE DEL NUCLEO

- Il nucleo tende a posizionarsi al **centro del citoplasma attivo** — la sua posizione riflette l'equilibrio delle forze esercitate dal citoplasma circostante
- Il vitello **sposta il nucleo** verso il polo animale — nelle uova ricche di vitello (es. rana, pollo) il nucleo è eccentrico perché il citoplasma attivo è concentrato al polo animale

ESEMPI COMPARATI

- **Riccio di mare**: uovo oligolecitale, nucleo centrale → segmentazione **totale uguale**
- **Rana**: uovo mesolecitale, nucleo eccentrico (polo animale) → segmentazione **totale ineguale**
- **Mammifero**: uovo oligolecitale, nucleo centrale → segmentazione **totale quasi uguale**, ma lenta

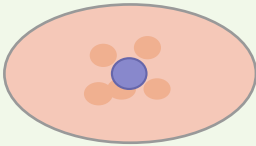
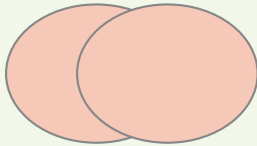

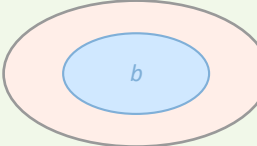
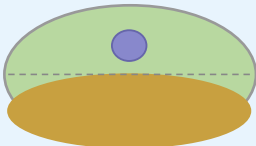

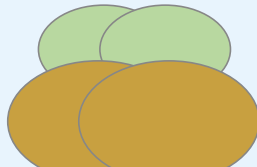
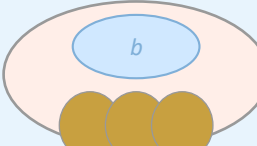
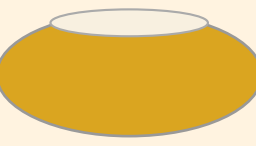
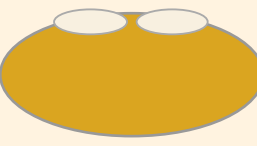
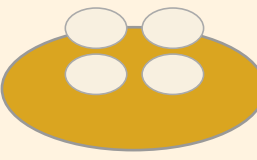

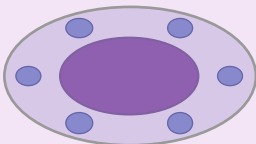
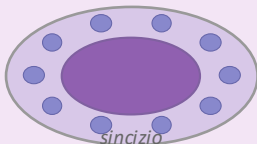
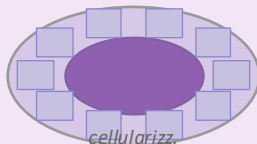
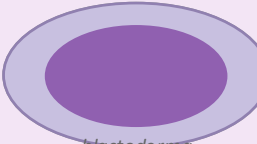
SCHEMA: ORIENTAMENTO DEL FUSO



- Asse del fuso mitotico
- - - Piano di divisione cellulare

Pattern di Segmentazione: dall'uovo alla blastula

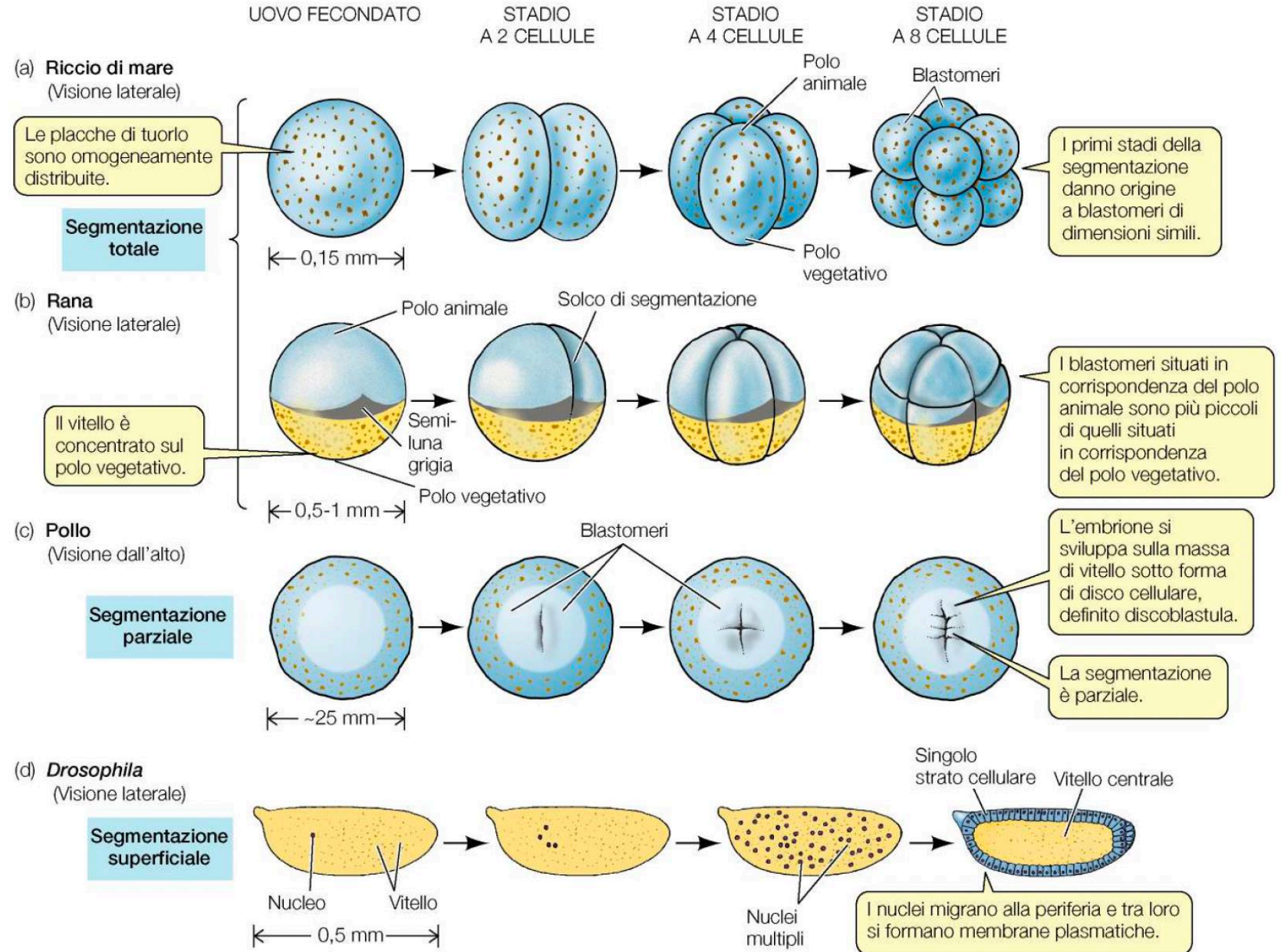
Il tipo di uovo determina il pattern di segmentazione — quattro strategie a confronto

	Uovo	2 cellule	4-8 cellule	Blastula	Note
TOTALE UGUALE <i>Oligolecitale</i> (riccio di mare, topo)	 <p>Uovo</p>	 <p>2 cell.</p>	 <p>4-8 cell.</p>	 <p>Blastula</p>	Blastomeri uguali Blastula sferica Blastocoele centrale ampio
TOTALE INEGUALE <i>Mesolecitale</i> (rana, Xenopus)	 <p>Uovo</p>	 <p>2 cell.</p>	 <p>4-8 cell.</p>	 <p>Blastula</p>	Micromeri (animale) Macromeri (vegetativo) Blastocoele spostato in alto
MEROBLASTICA DISCOIDALE <i>Telolecitale</i> (pollo, rettili)	 <p>Uovo</p>	 <p>2 cell.</p>	 <p>4-8 cell.</p>	 <p>Blastula</p>	Solo il blastodisco si segmenta Vitello indiviso
MEROBLASTICA SUPERFICIALE <i>Centrolecitale</i> (Drosophila, insetti)	 <p>Uovo</p>	 <p>2 cell. sincizio</p>	 <p>4-8 cell. cellularizz.</p>	 <p>Blastula blastoderma</p>	Nuclei si dividono in periferia Cellularizzazione tardiva

Legenda: Citoplasma attivo
 Vitello (lecitina)
 Nucleo
 Blastocoele
 Blastodisco / Blastoderma
 Cellule periferiche

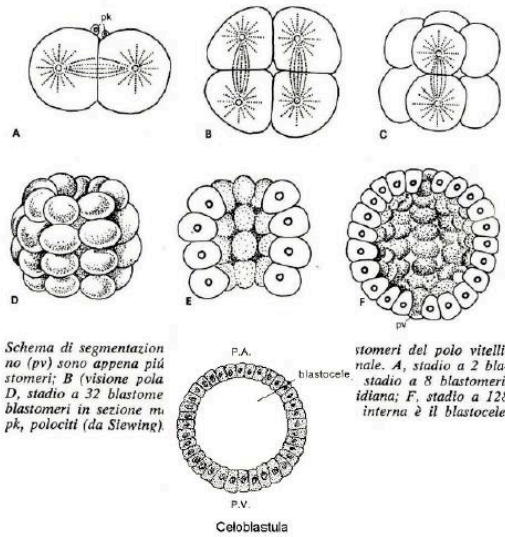
Segmentazione

Inizio delle prime divisioni mitotiche che formano i **Blastomeri**, con redistribuzione tra questi di tutto il materiale presente all'origine (non c'è accrescimento).



Tipi di Segmentazione

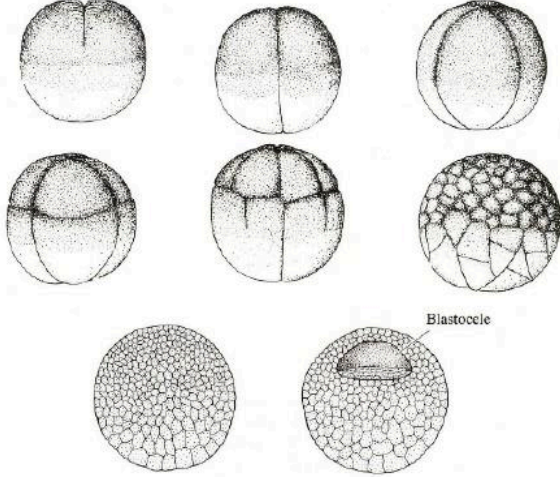
Segm. Totale (oligolecitiche)



Schema di segmentazione (pv) sono appena più stomeri; B (visione pola D, stadio a 32 blastome blastomeri in sezione nu pk, polociti (da Stewing)

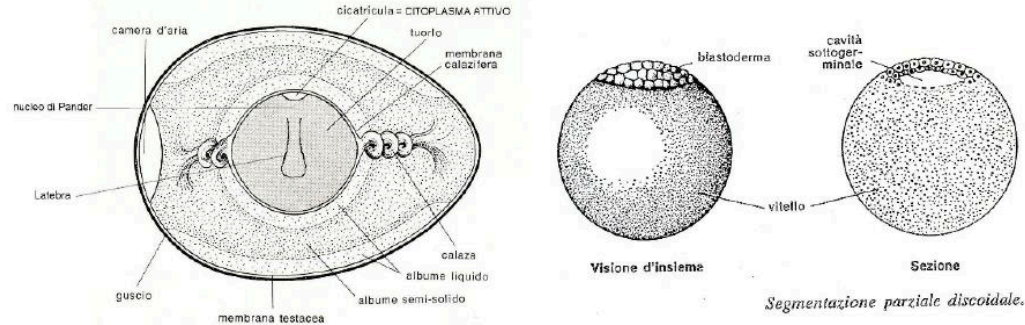
stomeri del polo vitellina. A, stadio a 2 blastomeri; B, stadio a 8 blastomeri; C, stadio a 16 blastomeri; D, stadio a 32 blastomeri; E, stadio a 64 blastomeri; F, stadio a 128 blastomeri. interna è il blastociste.

Segm. Totale Diseguale (mesolecitiche)



Blastociste

Segm. Parziale Discoidale (telolecitiche)

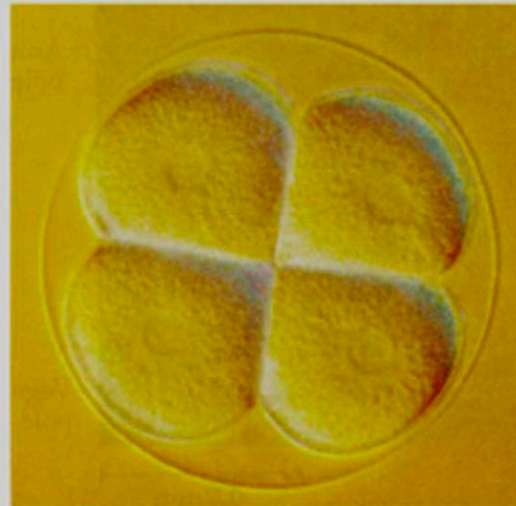


Segm. Totale - (oligolecitiche)

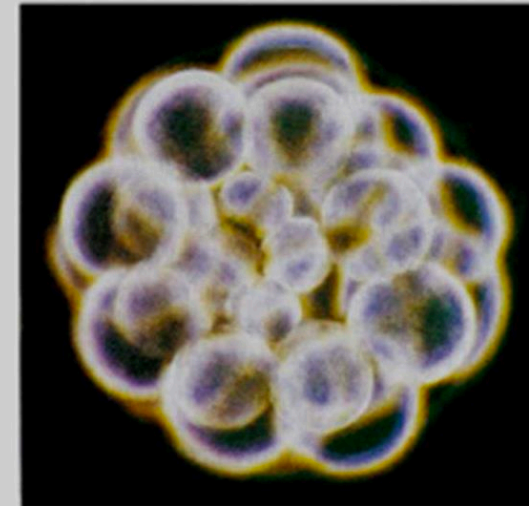
I primi due piani di divisione sono detti meridiani o meridionali, la terza segmentazione è perpendicolare alle prime due ed è latitudinale.



(a) Lo stadio a due cellule, che segue alla prima divisione di segmentazione, viene conseguito circa 45-90 minuti dopo l'ingresso del nucleo spermatico nell'uovo. Si noti che è ancora presente la membrana di fecondazione.

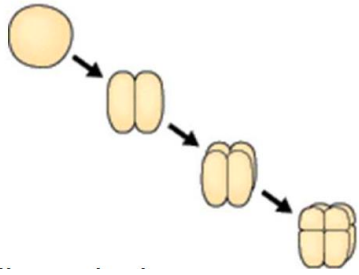


(b) Si osservi lo stadio a quattro cellule, che segue alla seconda divisione della segmentazione.

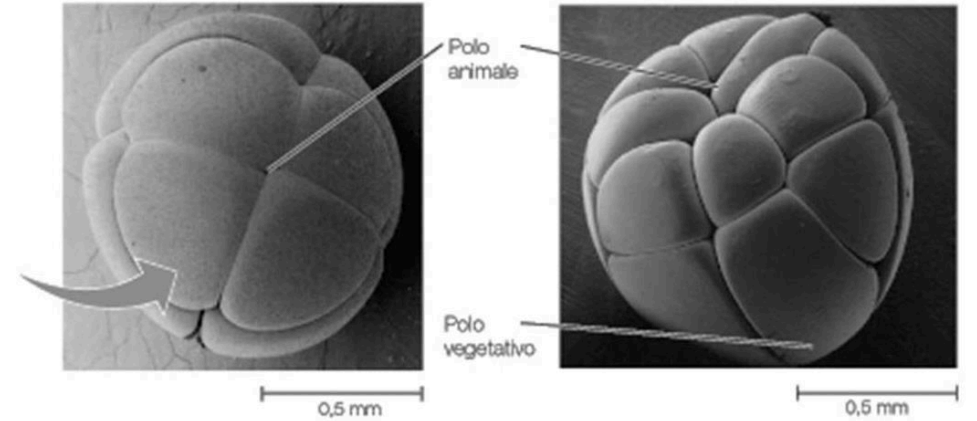


(c) Dopo alcune ore, le ripetute divisioni mitotiche hanno trasformato lo zigote in un ammasso pluricellulare di forma rotondeggiante. L'embrione è ancora circondato dalla membrana di fecondazione, della quale la larva, in grado di muoversi autonomamente, si libererà a sviluppo embrionale terminato.

Segm. Totale Diseguale (mesolecitiche)

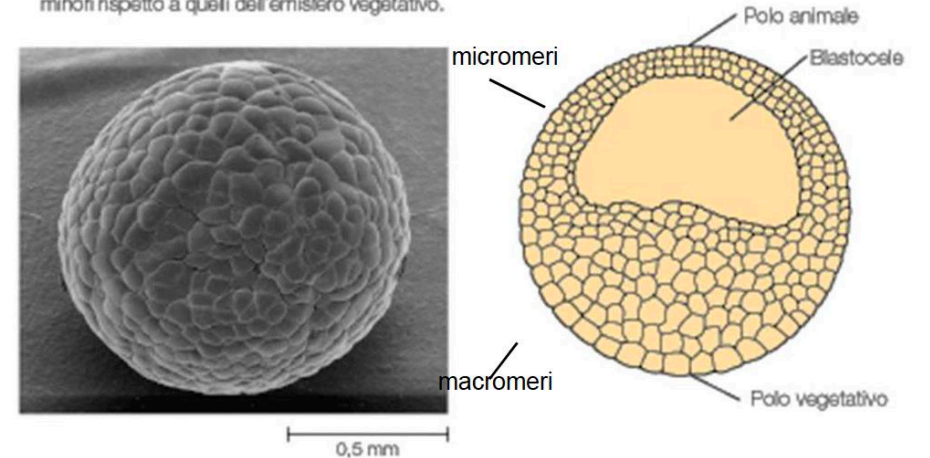


I **Blastomeri** hanno dimensioni diverse ai due poli della blastula. Le differenze di dimensione dei blastomeri dipendono dalla presenza del tuorlo a livello del polo vegetativo che rallenta la divisione cellulare. Finita la segmentazione si forma una cavità interna ripiena di liquido, il **Blastocele**.



(a) **Stadio a otto cellule.** Facendo seguito a due divisioni simmetriche passanti per i poli, il terzo piano di segmentazione risulta perpendicolare rispetto all'asse che unisce i poli ed è spostato verso quello animale. Di conseguenza, i quattro blastomeri localizzati in corrispondenza dell'emisfero animale risultano di dimensioni minori rispetto a quelli dell'emisfero vegetativo.

(b) **Stadio di morula (16-64 cellule).** Proseguendo nella segmentazione, le cellule situate in corrispondenza del polo animale si dividono più frequentemente rispetto a quelle colme di tuorlo localizzate al polo opposto.



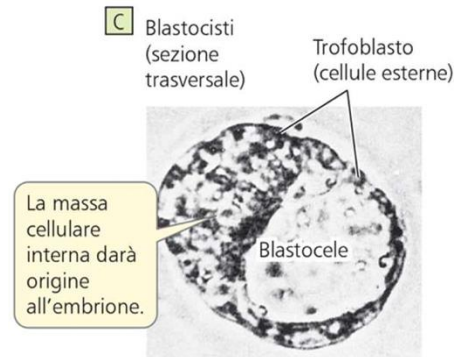
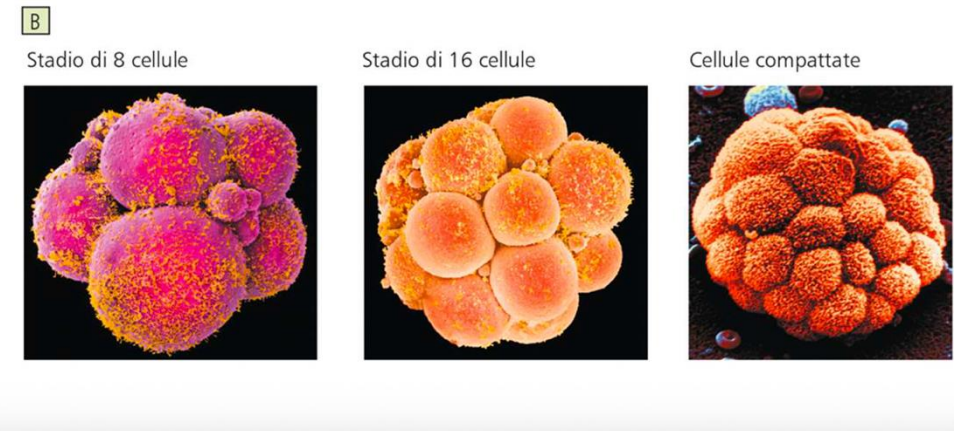
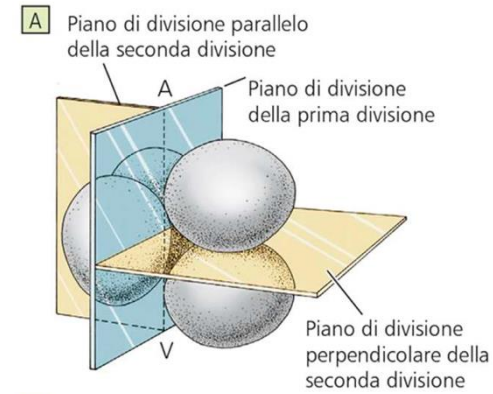
(c) **Stadio di blastula (circa 128 cellule).**

(d) **Sezione trasversale di blastula.** Il blastocele è localizzato nell'emisfero animale.

La Segmentazione nei mammiferi

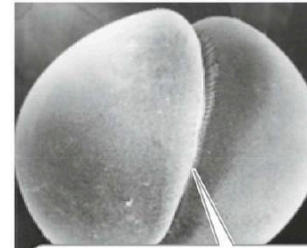
I mammiferi sono caratterizzati da una **segmentazione rotazionale** in cui il piano della prima divisione è parallelo all'asse polo animale-polo vegetativo. I piani della seconda divisione sono perpendicolari l'uno rispetto all'altro.

Alla fine dello stadio di 8 cellule l'embrione subisce un compattamento cellulare che dà origine alla **blastocisti**, massa di cellule all'apice del blastocele circondato dal **trofoblasto**.

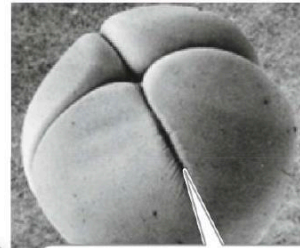


Altre immagini di segmentazione

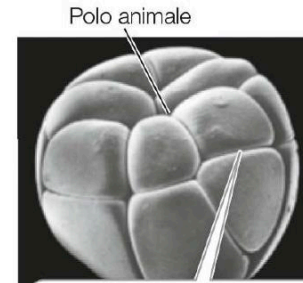
(A) Segmentazione totale (rana)



La prima **segmentazione** passa attraverso i poli e il sito di entrata dello spermatozoo e divide in due la semiluna grigia.



La seconda segmentazione è ad angolo retto rispetto alla prima.



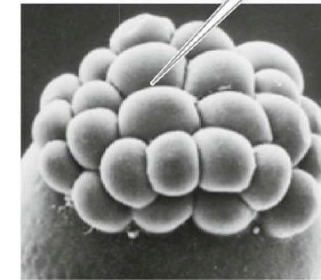
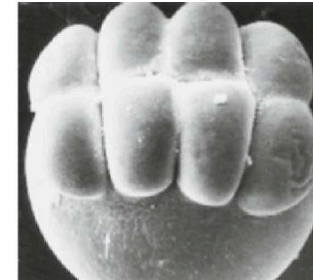
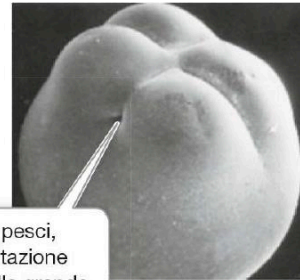
La terza segmentazione è ad angolo retto (orizzontale) rispetto alle prime due e divide gli emisferi animale e vegetale. Le cellule dell'emisfero vegetale sono più grandi.

L'embrione si forma come blastodisco sulla superficie della massa di tuorlo.

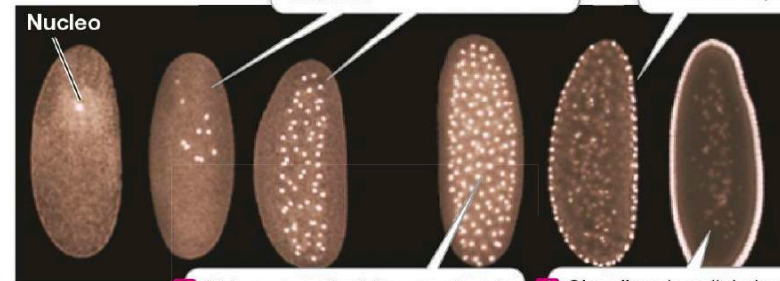
(B) Segmentazione parziale (pesce zebra)



Negli uccelli e nei pesci, i solchi di segmentazione non penetrano nella grande massa di tuorlo.



(C) Segmentazione superficiale (*Drosophila*)



1 La mitosi (divisione nucleare) non è seguita dalla divisione cellulare.

3 I nuclei migrano verso il versante interno della membrana plasmatica.

2 Si forma un **sincizio**, una singola cellula contenente molti nuclei.

4 Si realizza la cellularizzazione, che dà origine a un **blastoderma**.

Figura 43.3 Alcuni tipi di segmentazione

Le differenze nelle modalità dello sviluppo embrionale precoce riflettono differenze nell'organizzazione del citoplasma della cellula uovo. (A) La rana funge da organismo modello caratterizzato da segmentazione totale (microfotografie elettroniche a scansione [SEM]). (B) Le immagini SEM dell'embrione di pesce zebra illustrano la segmentazione parziale, in cui una voluminosa massa di tuorlo limita i piani di divisione cellulare. (C) La colorazione dei nuclei rivela l'organizzazione sinciziale caratteristica dell'embrione precoce del moscerino della frutta (*Drosophila*). I nuclei migrano verso la periferia e i solchi di segmentazione ripartiscono successivamente i nuclei in singole cellule, formando il blastoderma.

Blastulazione — 1/4

Meccanismo di Formazione del Blastocoele

DEFINIZIONE

- La blastulazione **non è solo divisione cellulare** — è un processo attivo di formazione di una cavità fluida (blastocoele) all'interno della massa cellulare

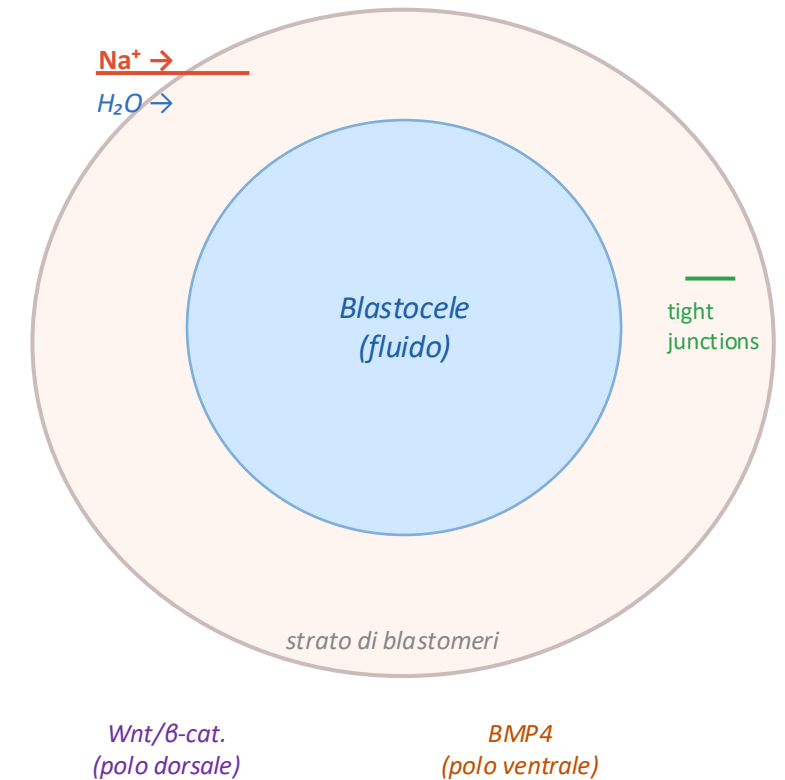
MECCANISMO MOLECOLARE

- **Na⁺/K⁺-ATPasi** sulla membrana basolaterale pompa Na⁺ verso la cavità — l'acqua segue per osmosi creando il blastocoele
- **Tight junctions (zonula occludens)** sigillano i blastomeri, impedendo la perdita di Na⁺ — mantengono la pressione osmotica interna
- **E-caderina + β-catenina**: mediano adesione cellula-cellula e polarità epiteliale — prerequisite per le tight junctions

SEGNALI MOLECOLARI

- **FGF**: favorisce proliferazione e polarizzazione epiteliale nel trofoblasto (mammiferi)
- **Wnt/β-catenina**: stabilisce l'asimmetria dorsale nel blastocoele di *Xenopus* — orienta la futura gastrulazione
- **Gradiente BMP4**: attivo al polo ventrale — opposto al futuro organizzatore di Spemann (polo dorsale)
- **Nodal/Activin**: nel fluido del blastocoele inducono mesoderma e endoderma nei blastomeri adiacenti

SCHEMA: FORMAZIONE DEL BLASTOCELE

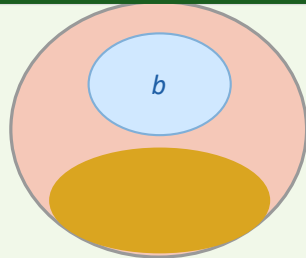


Blastulazione — 2/4

Morfologia Comparata della Blastula: Rana, Pollo, Maiale

RANA (*Xenopus*)

polo animale



polo vegetativo (vitello)

- Blastula sferica con **blastocoele eccentrico** spostato verso il polo animale — il vitello del polo vegetativo occupa la parte bassa
- ~128 cellule al momento della blastula matura (stadio 7–8 di Nieuwkoop & Faber)
- Strato esterno: **epitelio pigmentato** (polo animale); strato interno: cellule ricche di vitello
- **Wnt/ β -catenina** attiva dorsalmente → preparazione organizzatore di Spemann

*Blastocoele spostato
in alto (polo animale)
Vitello in basso*

POLLO (*Gallus*)



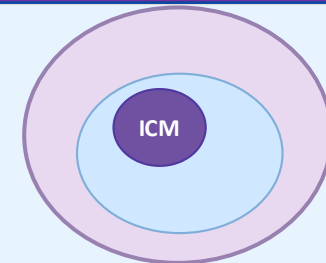
Vitello (indiviso)

- Non si forma una blastula sferica — si forma un **blastodisco bilamellare** sopra al vitello
- **Epiblasto** (strato superiore) + **Ipoblasto** (strato inferiore) separati dalla **cavità subgerminale**
- **FGF + BMP4** dal vitello inducono la separazione epiblasto/ipoblasto — gradiente A-P già presente
- **Equivalente funzionale** della blastula, ma morfologicamente un disco appiattito

*Struttura piatta
Epiblasto + Ipoblasto
Cavità subgerminale*

MAIALE (*Sus scrofa*)

ICM + blastocoele



Trofoectoderma

- Si forma una **blastocisti**: ICM (Inner Cell Mass) + trofoectoderma + blastocoele interno
- **ICM** → futuro embrione; **Trofoectoderma** → placenta e membrane extraembrionali
- **FGF4** (dall'ICM) + **FGF-R2** (nel trofoectoderma): segnale chiave per il mantenimento del trofoectoderma
- **Wnt + Hippo pathway**: determinano la distinzione ICM/trofoectoderma

*Blastocisti
ICM + Trofoectoderma
Blastocoele interno*

Blastulazione — 3/4

Significato Funzionale del Blastocele

IL BLASTOCELE NON È SOLO UNO SPAZIO VUOTO

- Il fluido del blastocele è **biochimicamente attivo**: contiene morfogeni, fattori di crescita e inibitori che pre-patternano i territori cellulari prima della gastrulazione

FUNZIONE 1 — SPAZIO FISICO PER LA GASTRULAZIONE

- Il blastocele fornisce **spazio meccanico** entro cui le cellule mesodermali e endodermali migrano durante la gastrulazione
- **Senza blastocele la gastrulazione è impossibile** — il collasso sperimentale del blastocele in *Xenopus* blocca l'invaginazione

FUNZIONE 2 — GRADIENTE DI MORFOGENI

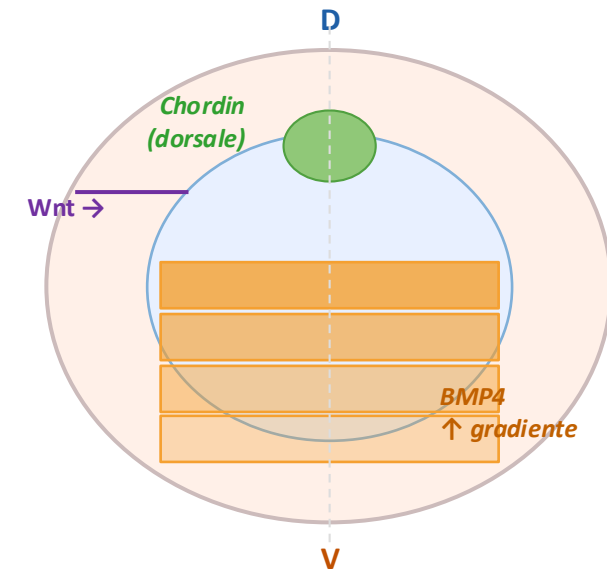
- **Gradiente BMP4/Chordin**: BMP4 diffonde dal polo ventrale — Chordin (dall'organizzatore dorsale) lo inibisce → gradiente D-V
- **Gradiente Wnt**: stabilisce l'asse A-P prima della gastrulazione — il blastocele è il mezzo di diffusione
- **Nodal/Activin**: segnali nel fluido inducono il mesoderma e l'endoderma nei blastomeri adiacenti

FUNZIONE 3 — SEPARAZIONE DEI TERRITORI

- Il blastocele separa fisicamente l'epiblasto (futuro embrione) dalle cellule vegetative — **primo atto di regionalizzazione**

In sintesi: il blastocele è il primo 'ambiente interno' — mezzo di diffusione dei morfogeni e spazio per la gastrulazione

GRADIENTE NEL BLASTOCELE



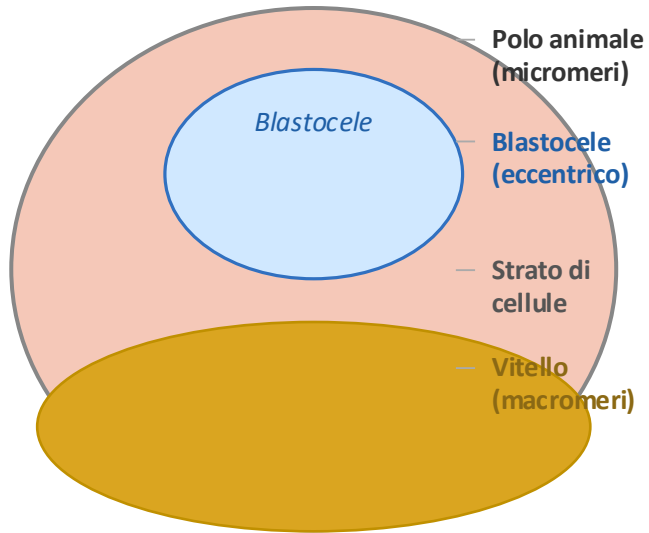
Blastulazione — 4/4

Schema Comparato: Blastula, Blastodisco, Blastocisti

Tre architetture diverse — un obiettivo comune: separare i territori cellulari e creare un gradiente di informazione posizionale

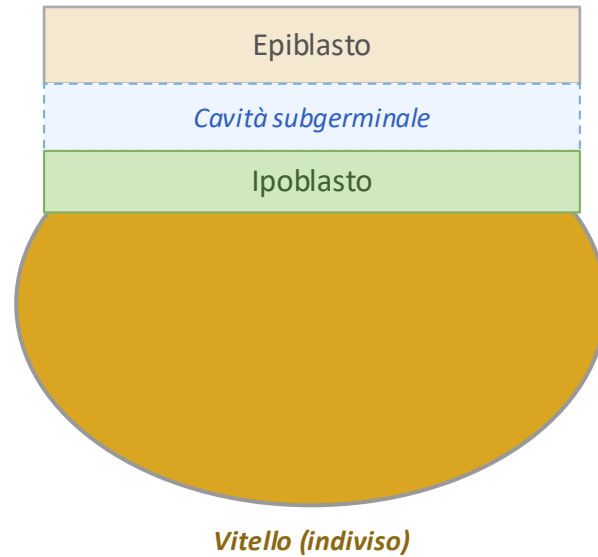
RANA (*Xenopus*)

Blastula



POLLO (*Gallus*)

Blastodisco

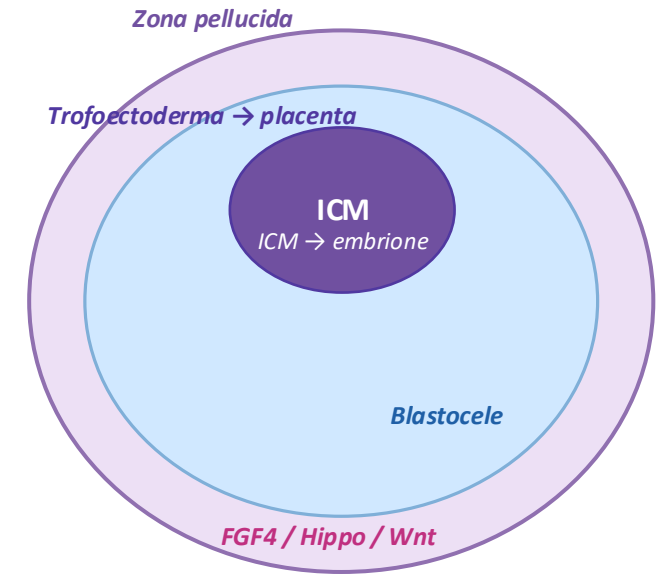


*FGF + BMP4
(dal vitello)*

*Gradiente
A-P già attivo*

MAIALE (*Sus scrofa*)

Blastocisti



Blastocele: eccentrico, spostato al polo animale

Equivalente: cavità subgerminale tra epiblasto e ipoblasto

Blastocele interno + ICM = organizzazione definitiva

L'Uovo di *Xenopus laevis*: struttura mesolecitale

TIPO DI UOVO

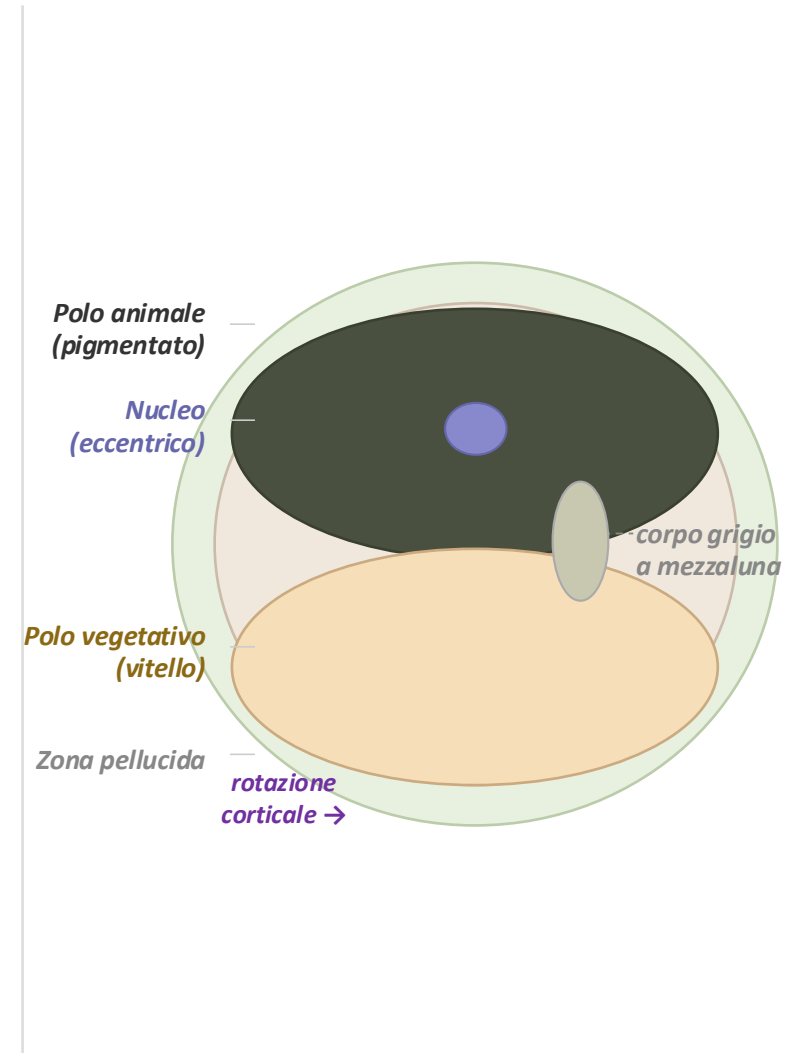
- Uovo **mesolecitale**: quantità intermedia di vitello (lecitina), distribuito in gradiente con concentrazione massima al **polo vegetativo**
- **Diametro**: ~1,2 mm — visibile ad occhio nudo. Uno degli uova più grandi tra i vertebrati da laboratorio

POLO ANIMALE E POLO VEGETATIVO

- **Polo animale**: pigmentato (melanina), citoplasma attivo, scarso vitello — darà ectoderma e parte del mesoderma
- **Polo vegetativo**: chiaro, ricco di vitello inerte — darà endoderma e parte del mesoderma ventrale
- **Nucleo**: eccentrico, spostato verso il polo animale — conseguenza diretta della Seconda Legge di Hertwig

ASIMMETRIA DORSALE — CORPO DI NIEUWKOOP

- Dopo la fecondazione il punto di entrata dello spermatozoo innesca una **rotazione corticale** di ~30° — la corteccia scivola rispetto al citoplasma interno
- Si forma il **corpo grigio a mezzaluna** (grey crescent) sul lato opposto all'entrata dello sperma — questo è il futuro lato **dorsale**
- **Wnt/Dishevelled**: traslocato dorsalmente durante la rotazione — stabilisce la simmetria D-V prima ancora della prima divisione



Segmentazione in Xenopus: i Piani di Divisione

I TRE PIANI DI CLIVAGGIO

- 1^a divisione — **meridionale**: verticale, passa per entrambi i poli → 2 blastomeri uguali (simmetria D-V non ancora stabilita morfologicamente)
- 2^a divisione — **meridionale perpendicolare**: verticale, a 90° dalla prima → 4 blastomeri uguali
- 3^a divisione — **latitudinale (equatoriale spostata)**: orizzontale eccentrica verso il polo animale → 4 micromeri (animale) + 4 macromeri (vegetativo)

RUOLO DEL VITELLO NEI PIANI DI DIVISIONE

- Il vitello è **fisicamente resistente** al clivaggio — il solco di segmentazione avanza lentamente nel polo vegetativo (ritardo di 10-20 minuti per divisione)
- **Dalla 4^a divisione in poi**: le divisioni diventano **asincrone** — il polo animale si divide più velocemente del vegetativo → differenza progressiva di dimensioni cellulari
- Il piano di ogni divisione rispetta la **Prima Legge di Hertwig**: il fuso si orienta sempre lungo l'asse maggiore del citoplasma attivo disponibile

TEMPISTICA (a 23°C)

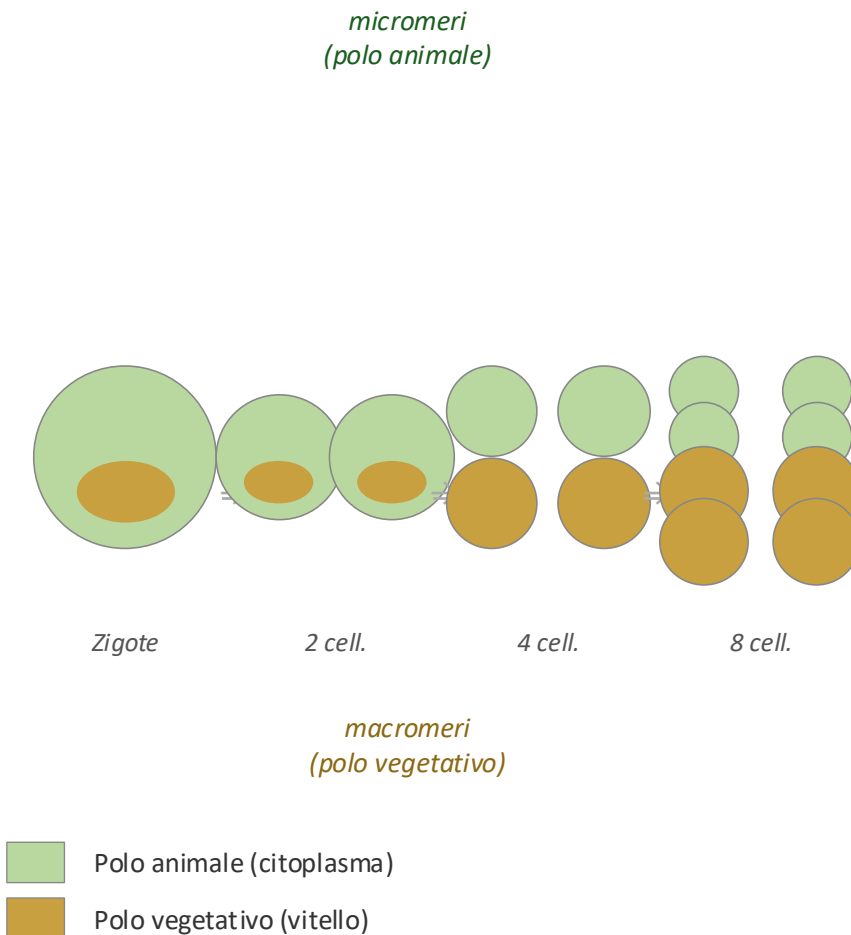
1^a divisione: ~90 min dalla fecondazione

2^a divisione: ~30 min dopo

3^a divisione: ~30 min dopo

Stadio 32 cellule: ~3h dalla fecondazione

MBT (4000 cellule): ~7h — fine del controllo materno



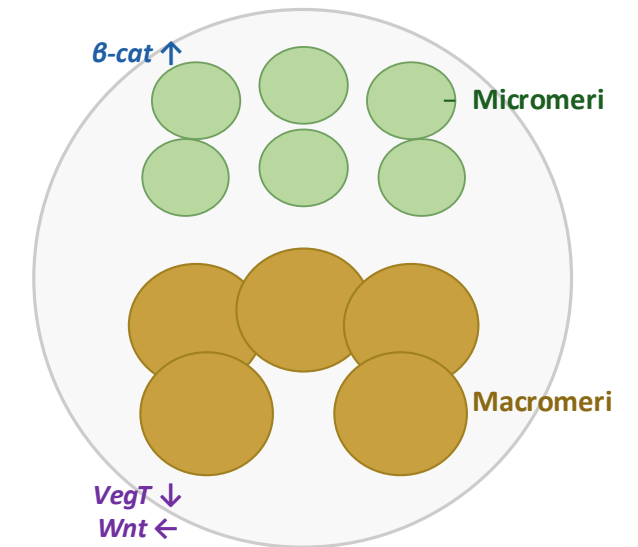
Micromeri e Macromeri: Segmentazione Totale Ineguale

DIFFERENZE TRA MICROMERI E MACROMERI

	Micromeri (polo animale)	Macromeri (polo vegetativo)
Dimensioni	Piccole (~50 μm allo stadio 32)	Grandi (~250 μm allo stadio 32)
Vitello	Scarso	Abbondante
Velocità div.	Rapida	Lenta (ritardo 10-20 min)
Destino	Ectoderma + mesoderma dorsale	Endoderma + mesoderma ventrale
mRNA materni	β -catenina, Noggin, Chordin	VegT, Vg1, Xdazl

SEGREGAZIONE DEGLI mRNA MATERNI

- **VegT**: fattore di trascrizione localizzato al polo vegetativo — induce l'endoderma e attiva Nodal
- **Wnt/ β -catenina**: localizzata dorsalmente dopo la rotazione corticale — induce il futuro mesoderma dorsale (organizzatore)
- **Vg1**: mRNA localizzato al polo vegetativo — coopera con VegT nell'induzione mesodermale
- **Xdazl**: proteina legante mRNA, al polo vegetativo — essenziale per la cellula germinale primordiale



Blastulazione in Xenopus: Stadio 7-8 di Nieuwkoop & Faber

CARATTERISTICHE DELLA BLASTULA DI XENOPUS

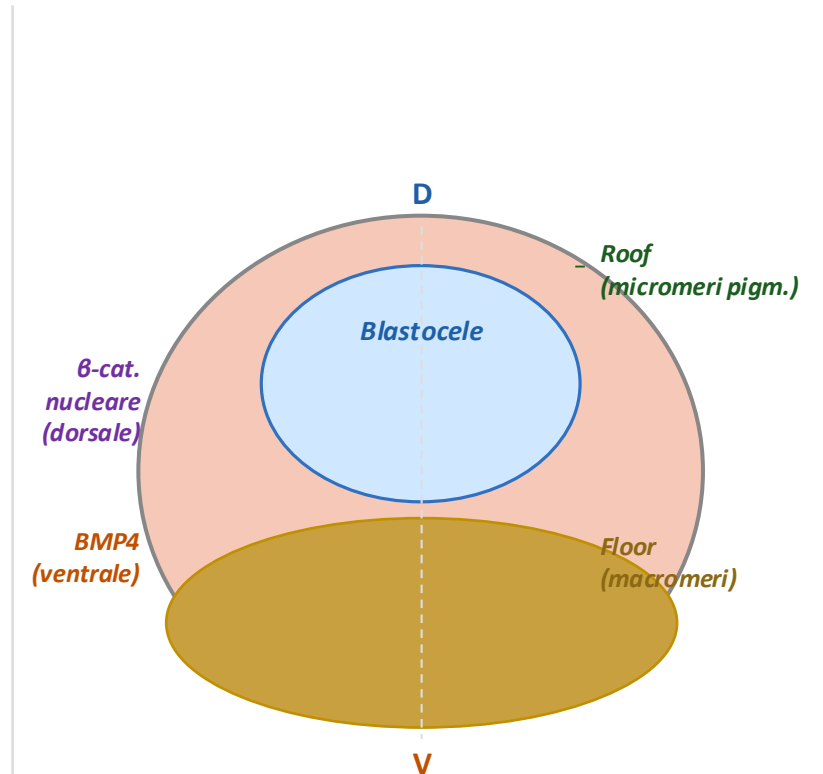
- **Blastocele eccentrico**: spostato verso il polo animale — il vitello del polo vegetativo occupa la metà inferiore, escludendo il fluido
- **~128 cellule** (stadio 7), **~256** (stadio 8) — la dimensione cellulare diminuisce ad ogni divisione
- **Roof** (tetto): monostrato di micromeri pigmentati — zona di massima reattività a Wnt/BMP
- **Floor** (pavimento): macromeri ricchi di vitello — massima espressione di VegT e Nodal

DORSALIZZAZIONE PRECOCE — ASSE D-V

- **β -catenina nucleare**: si accumula nei nuclei del lato dorsale → attiva geni come *Siamois* e *Twin* — i primi geni del futuro organizzatore
- **BMP4**: espresso al polo ventrale e laterale — inibisce la differenziazione dorsale
- **Il gradiente BMP4 (ventrale) ÷ Chordin/Noggin (dorsale)** è già presente nel blastocele — la mappa del futuro embrione è già scritta

MBT — MID-BLASTULA TRANSITION

- **Allo stadio ~4000 cellule (stadio 8.5)**: il rapporto nucleo/citoplasma raggiunge la soglia critica → **attivazione del genoma zigote**
- **Fine del controllo materno**: le cellule acquisiscono mobilità, il ciclo cellulare rallenta, inizia la trascrizione zigotica








Mappa dei Territori Presuntivi (Fate Map) di Xenopus

CHE COS'È LA FATE MAP

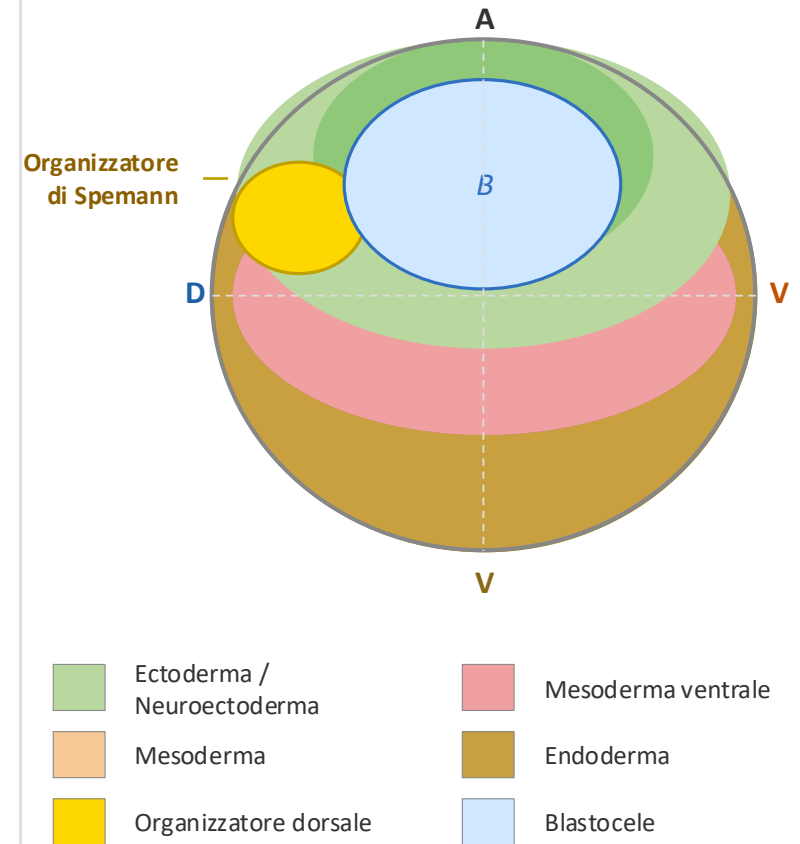
- **La fate map:** mappa che indica il **destino presuntivo** di ogni regione della blastula — ovvero quale struttura adulta produrrà ogni territorio SE lo sviluppo procede normalmente
- **Metodo classico:** iniezione di traccianti fluorescenti (es. rodamina-destrano) in singole cellule → mappatura dei discendenti
- **Fate map di Xenopus (Keller 1975, Nieuwkoop & Faber 1994)** — la più usata in embriologia sperimentale

I TERRITORI PRESUNTIVI NELLA BLASTULA

	Polo animale (tetto blastocele) → <i>Ectoderma + neuroectoderma</i>
	Fascia equatoriale → <i>Mesoderma (notocorda, somiti, laterale)</i>
	Lato dorsale equatoriale → <i>Organizzatore di Spemann</i> → <i>mesoderma dorsale</i>
	Polo vegetativo → <i>Endoderma (intestino, fegato, pancreas)</i>
	Fascia ventrale equatoriale → <i>Mesoderma ventrale (sangue, mesotelio)</i>

COLLEGAMENTO ALLA GASTRULAZIONE

- La fate map definisce il punto di partenza — la gastrulazione è il processo che **ri-posiziona** questi territori dalla superficie verso l'interno dell'embrione
- **Il blastoporo si aprirà nel lato dorsale vegetativo** — esattamente nel confine tra mesoderma e endoderma presuntivi



L'Uovo di *Gallus gallus*: struttura telolecitale

TIPO DI UOVO

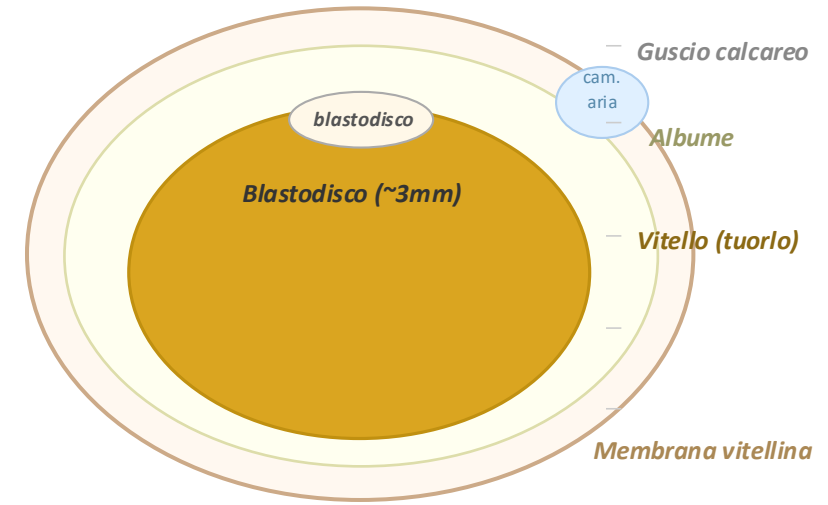
- Uovo **telolecitale**: enorme quantità di vitello concentrata al polo vegetativo — il citoplasma attivo è ridotto a un piccolo disco detto **blastodisco** (~3 mm di diametro)
- **Diametro totale dell'uovo**: ~35 mm — il blastodisc rappresenta meno del 2% del volume totale

STRUTTURA DEL BLASTODISCO

- Il **blastodisco** è un disco di citoplasma non yolkly che galleggia sul tuorlo — contiene il nucleo e tutti gli organelli attivi
- **Zona pellucida area** (area pellucida, AP): regione centrale chiara — separata dal vitello da uno spazio sottile
- **Area opaca** (AO): periferia del blastodisc, a diretto contatto con il vitello — darà annessi extraembrionali

STRUTTURE PROTETTIVE DELL'UOVO DI GALLINA

- **Membrana vitellina**: avvolge il tuorlo direttamente
- **Albume (bianco d'uovo)**: riserva acquosa e proteica (ovoalbumina, lisozima) — ammortizzatore meccanico e riserva idrica
- **Membrane testacee** (interna + esterna) e **guscio calcareo**: protezione meccanica e regolazione degli scambi gassosi
- **Camera d'aria**: si forma al polo ottuso — riserva di O₂ per l'embrione nelle fasi finali dello sviluppo



Segmentazione Meroblastica Discoidale

CARATTERI DELLA SEGMENTAZIONE

- **Solo il blastodisco si divide** — il vitello rimane completamente indiviso: impossibile clivarlo fisicamente
- Segmentazione **meroblastica discoidale**: i solchi di clivaggio si propagano radialmente nel disco ma non penetrano nel vitello
- **Blastomeri** inizialmente incompleti: connessi lateralmente al vitello fino alle prime 4-5 divisioni

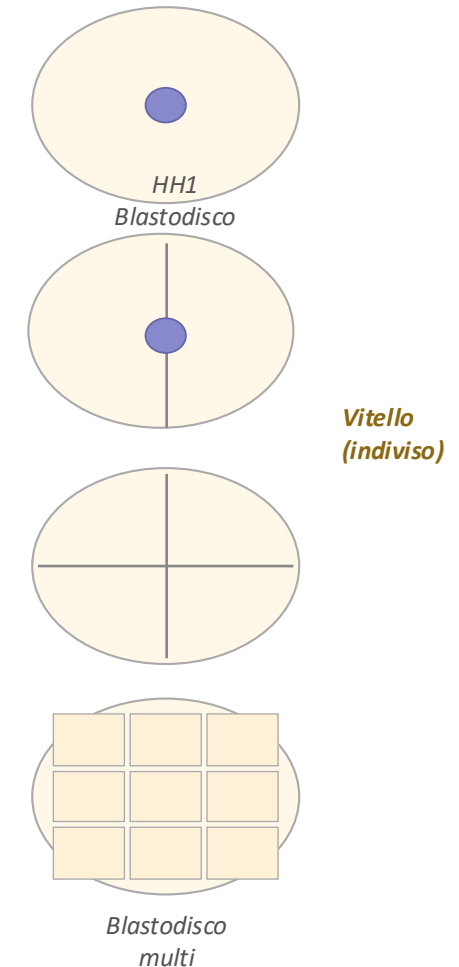
I PIANI DI CLIVAGGIO NEL BLASTODISCO

- **1^a–2^a divisione**: solchi meridionali perpendicolari → 4 cellule centrali
- **3^a divisione**: solco latitudinale parallelo alla superficie → clivaggio orizzontale, separa cellule superiori da quelle più profonde
- **Divisioni successive**: combinazione di solchi meridionali e latitudinali → disco pluristratificato nella zona centrale

STAGIONE HH (HAMBURGER & HAMILTON)

- **HH1**: blastodisco non diviso — uovo appena deposto
- **HH2**: 1–4 cellule — avviene già nell'ovidutto prima della deposizione
- **HH3–4**: blastodisco in rapida espansione — cavità subgerminale già in formazione
- La segmentazione inizia **nell'ovidutto** e continua nelle prime ore dopo la deposizione a 38°C

VISTA DALL'ALTO DEL BLASTODISCO



Epiblasto, Ipoblasto e Cavità Subgerminale

FORMAZIONE DEL BLASTODISCO BILAMELLARE

- **Dopo ~16h a 38°C:** il blastodisco si organizza in due strati sovrapposti separati da una cavità — il **blastodisco bilamellare**
- **Cavità subgerminale:** spazio tra il blastodisco e il vitello — equivalente funzionale del blastocele di *Xenopus*

EPIBLASTO

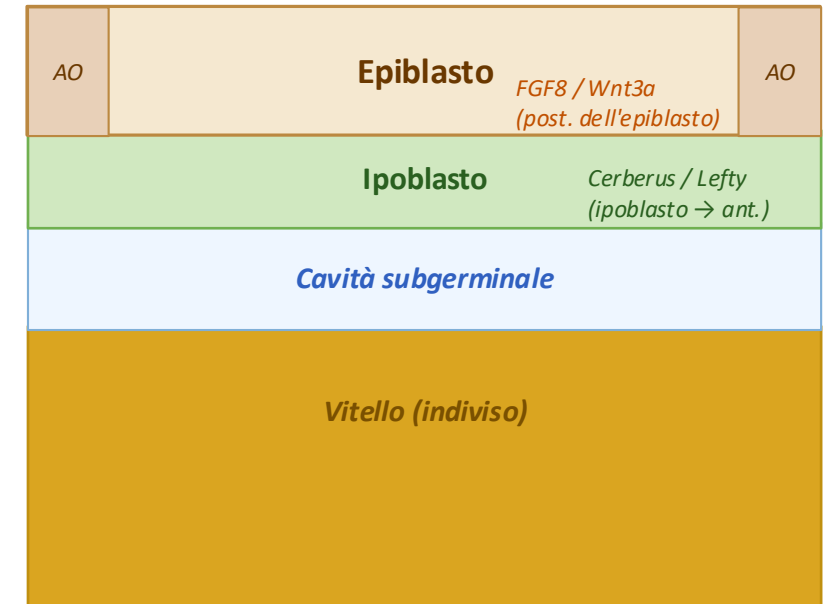
- **Strato superiore del blastodisco** — cellule colonnari, compatte, pluripotenti
- **Darà tutto l'embrione:** ectoderma, mesoderma, endoderma — e la linea germinale
- **FGF8** e **Wnt3a** sono espressi nell'epiblasto posteriore — regioni di competenza per la futura stria primitiva

IPOBLASTO

- **Strato inferiore** — cellule appiattite, non pluripotenti, di origine controversa (delaminazione vs. poliingressione)
- **Non darà strutture embrionali** — contribuisce al sacco vitellino e ai tessuti extraembrionali
- **Ruolo inducente:** secerne **Cerberus** e **Lefty** che inibiscono la formazione della stria primitiva anteriormente — stabilisce l'asse A-P
- **Sostituito** progressivamente da endoderma definitivo secreto dall'epiblasto durante la gastrulazione

SEZIONE TRASVERSALE — HH4

← Area pellucida →



Blastulazione nel Pollo: Area Pellucida e Staging HH

LA BLASTULA DEL POLLO: BLASTODISCO BILAMELLARE

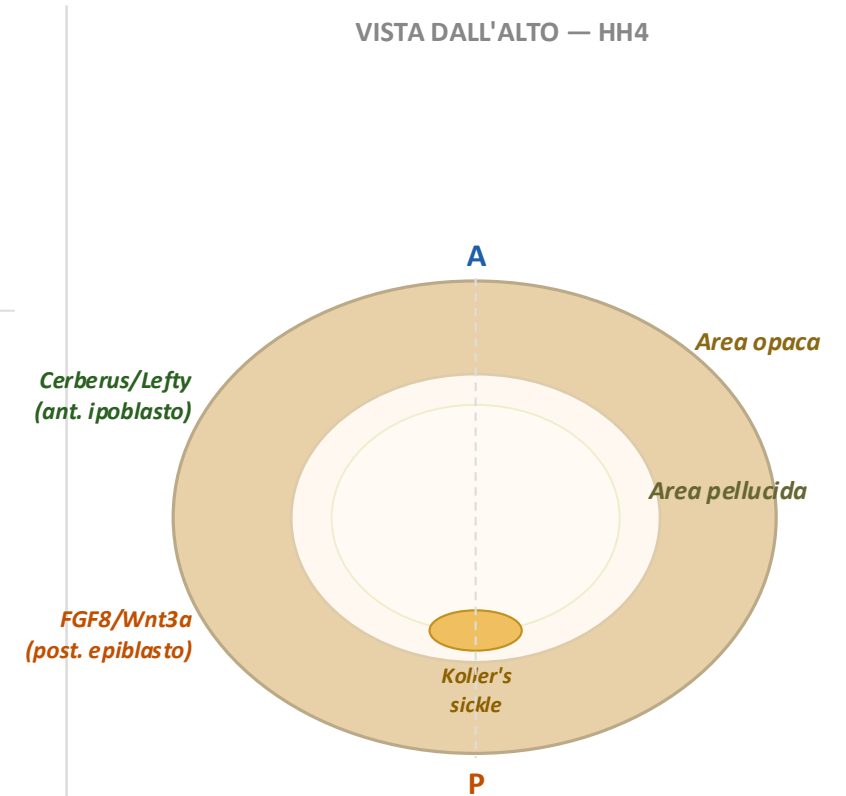
- **Non esiste una vera blastula sferica:** l'equivalente è il blastodisco bilamellare con cavità subgerminale — struttura piatta di ~20.000 cellule
- **Area pellucida (AP):** zona centrale trasparente del blastodisco — si forma perché il liquido si accumula tra lo strato cellulare e il vitello
- **Area opaca (AO):** periferia del blastodisco a contatto con il vitello — cellule in contatto diretto con le riserve nutritive

STAGING DI HAMBURGER & HAMILTON (HH)

- **HH1 (0h):** blastodisco non segmentato — uovo appena fecondato nell'ovidutto
- **HH2 (~6h):** segmentazione in corso, 1–16 cellule — avviene nell'ovidutto prima della deposizione
- **HH3 (~12–13h):** blastodisco in espansione, cavità subgerminale in formazione, ipoblasto che inizia a comparire
- **HH4 (~18–19h):** blastodisco bilamellare completo — epiblasto + ipoblasto ben distinti, asse A-P già definito da Cerberus/Lefty
- **HH5–6 (~20–24h):** inizio della gastrulazione — comparsa della stria primitiva nell'epiblasto posteriore

GRADIENTE A-P — COME SI FORMA

- **Il punto di ingresso dello spermatozoo** non definisce l'asse A-P nel pollo — è invece il flusso dell'albume nell'ovidutto a ruotare il blastodisco e definire il futuro lato posteriore
- **Koller's sickle:** struttura cellulare specializzata al margine posteriore dell'ipoblasto — equivalente del corpo di Nieuwkoop di *Xenopus*









Mappa dei Territori Presuntivi (Fate Map) del Pollo

FATE MAP NELL'EPIBLASTO DI HH4

- **La fate map del pollo:** elaborata con traccianti (Dil, GFP) da Hatada & Stern (1994) e Psychoyos & Stern (1996) — indica dove si trovano nell'epiblasto le precelle dei diversi foglietti germinativi
- **Differenza chiave da *Xenopus*:** nella rana la fate map è già nella blastula sferica; nel pollo è in un **disco piatto** — la posizione A-P è l'asse principale

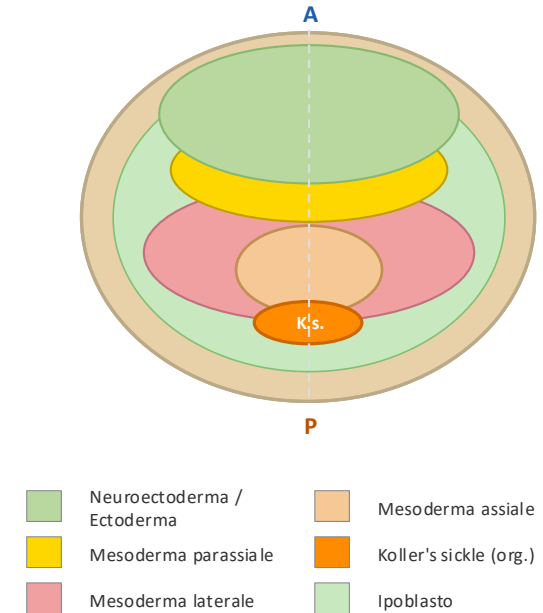
I TERRITORI PRESUNTIVI NELL'EPIBLASTO

-  **Epiblasto posteriore centrale** → *Mesoderma assiale (notocorda) + mesoderma parassiale*
-  **Epiblasto posteriore laterale** → *Mesoderma laterale (cuore, sangue, mesotelio)*
-  **Epiblasto anteriore** → *Neuroectoderma (encefalo, midollo) + ectoderma superficiale*
-  **Fascia equatoriale** → *Mesoderma somitico (somiti, muscolatura)*
-  **Margine posteriore (Koller's sickle)** → *Organizzatore (equivalente Spemann) → induce asse D-V*
-  **Ipoblasto** → *Endoderma extraembrionale (sacco vitellino)*

CONFRONTO CON XENOPUS

- **In *Xenopus*:** asse D-V = asse principale, blastula sferica
- **Nel pollo:** asse A-P = asse principale, blastodisco piatto — la gastrulazione inizia dal margine posteriore verso l'anteriore
- **Entrambi:** un 'organizzatore' (Spemann in rana, nodo di Hensen in pollo) è presente e induce il mesoderma assiale

EPIBLASTO HH4 — VISTA DALL'ALTO



L'Uovo di *Sus scrofa*: struttura oligolecitale

TIPO DI UOVO

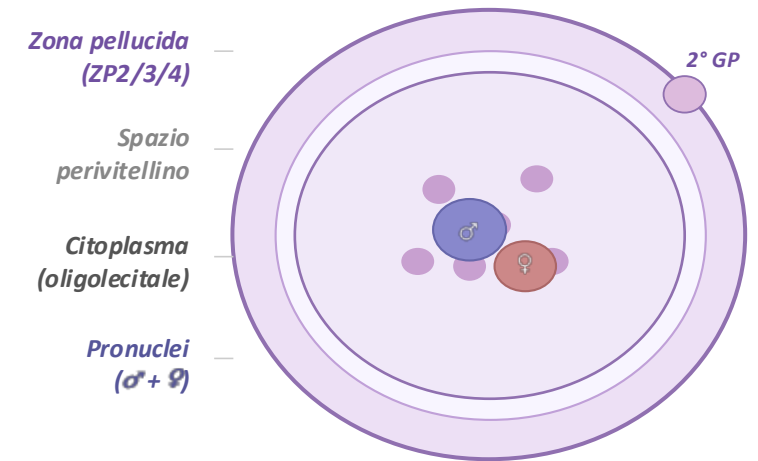
- Uovo **oligolecitale**: pochissimo vitello, distribuito uniformemente — simile all'uovo umano
- **Diametro**: ~120 μm (con zona pellucida) — molto piccolo rispetto a rana e pollo
- **Zona pellucida**: spessa matrice glicoproteica (ZP2, ZP3, ZP4) — media il riconoscimento sperma-uovo e protegge l'embrione fino all'impianto

DIFFERENZA CHIAVE CON RANA E POLLO

- Il **maiale è un mammifero euterio**: non dipende dal vitello per nutrire l'embrione — la nutrizione è garantita inizialmente dalle secrezioni uterine e poi dalla **placenta**
- **Riduzione evolutiva del vitello**: i mammiferi euteri hanno 'perso' il vitello abbondante degli antenati amnioti perché non ne hanno più bisogno — convergenza con gli oligolecitanti marini (riccio di mare)

FECONDAZIONE E ATTIVAZIONE

- La **fecondazione avviene nell'ovidutto** (ampolla tubarica) — lo spermatozoo deve attraversare la zona pellucida legandosi a ZP3
- **Reazione corticale**: liberazione di granuli corticali al momento della fecondazione — modifica la zona pellucida impedendo la polispermia
- **Ripresa della meiosi**: l'ovocita II completa la meiosi II dopo la penetrazione dello spermatozoo → espulsione del secondo globulo polare
- **Pronuclei maschile e femminile**: si formano, si avvicinano e si fondono (singamia) → zigote $2n$



Segmentazione in *Sus scrofa*: Totale Quasi Uguale

CARATTERI DELLA SEGMENTAZIONE

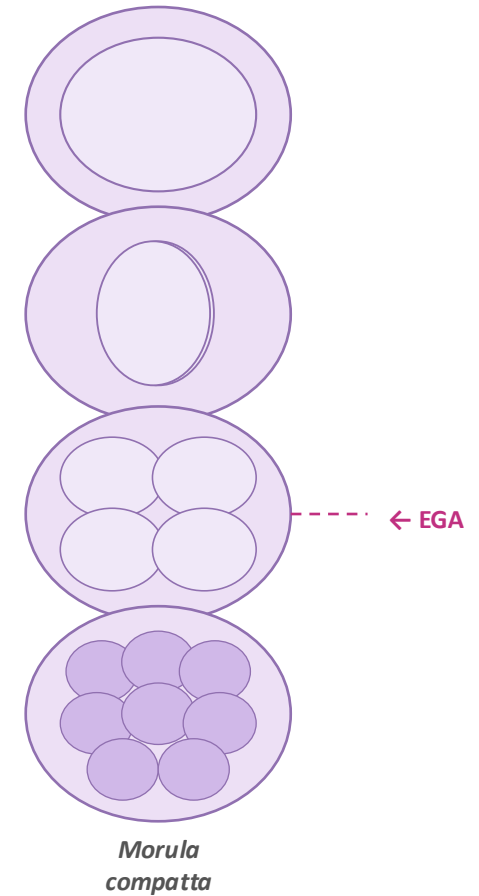
- Segmentazione **totale quasi uguale**: tutto il citoplasma si divide — blastomeri di dimensione simile (scarsa influenza del vitello)
- **Velocità**: molto lenta rispetto a rana e pollo — ogni divisione richiede **12–24 ore** (ciclo cellulare completo con G1 e G2)
- **Asincronia precoce**: già dalla 2^a–3^a divisione i blastomeri si dividono in modo non sincronizzato — stadio a 3 o 5 cellule è normale

ATTIVAZIONE DEL GENOMA EMBRIONALE (EGA)

- Nel maiale l'**EGA (Embryonic Genome Activation)** avviene allo stadio di **4 cellule** — molto prima rispetto al topo (2 cellule) e all'umano (4–8 cellule)
- **Prima dell'EGA**: lo sviluppo è guidato da mRNA e proteine materne depositate nell'ovocita
- **Dopo l'EGA**: il nuovo genoma zigote controlla lo sviluppo — cambiamento radicale del trascrittoma cellulare

COMPATTAZIONE E E-CADERINA

- **Stadio 8–16 cellule**: i blastomeri si **compattano** — le superfici di contatto si massimizzano grazie all'E-caderina (uvomorulina)
- **La compattazione** è il prerequisito per la successiva differenziazione ICM/trofoectoderma — le cellule esterne (con meno contatti) diventeranno trofoectoderma
- **Gap junctions**: si formano tra i blastomeri interni durante la compattazione — consentono la comunicazione metabolica e il coordinamento dello sviluppo



Formazione della Blastocisti: ICM e Trofoectoderma

DALLA MORULA ALLA BLASTOCISTI

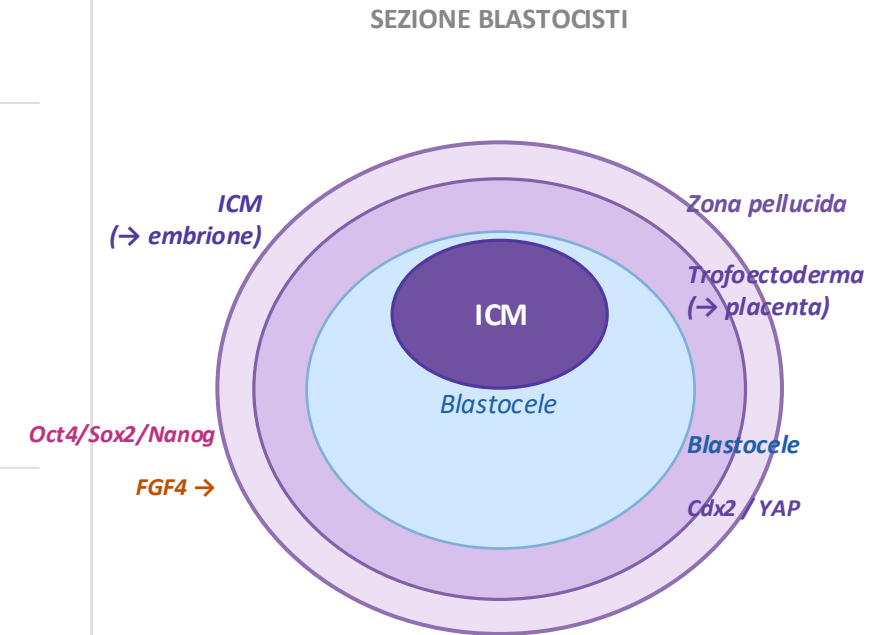
- **Stadio ~32 cellule (giorno 4–5):** inizia la **cavitazione** — le Na^+/K^+ -ATPasi del trofoectoderma pompano Na^+ verso l'interno → accumulo di fluido → blastocele
- **Blastocisti matura:** struttura a tre componenti — **ICM + trofoectoderma + blastocele**

ICM — INNER CELL MASS

- **Cellule interne della morula compatta:** pluripotenti, daranno tutto l'embrione e l'amnio
- **Oct4, Sox2, Nanog:** fattori di trascrizione che mantengono la pluripotenza nell'ICM — formano il 'circuitto della pluripotenza'
- **FGF4** (dall'ICM) → attiva **FGF-R2** nel trofoectoderma → mantiene la proliferazione del trofoectoderma

TROFOECTODERMA

- **Cellule esterne della morula compatta:** darà placenta, corio, e tutti gli annessi extraembrionali
- **Cdx2:** fattore di trascrizione chiave del trofoectoderma — reprime Oct4 e Nanog, stabilizza l'identità trofoectodermale
- **Via Hippo:** nelle cellule esterne (pochi contatti cellulari) YAP è attivo → attiva Cdx2. Nelle cellule interne (molti contatti) YAP è inattivato → attiva Oct4/Nanog
- **Nel maiale:** la blastocisti si allunga enormemente prima dell'impianto — da sferica (~0,5mm) a filamentosa (>1 metro!), unica tra i mammiferi



Blastocisti Espansa, Epiblasto e Endoderma Primitivo

DIFFERENZIAZIONE DELL'ICM

- L'ICM si differenzia in due popolazioni: **epiblasto** (futuro embrione) e **endoderma primitivo / ipoblasto** (futuro sacco vitellino)
- **FGF4/FGFR1-2**: segnale chiave — le cellule che ricevono più FGF4 diventano endoderma primitivo (Gata6+), quelle che ne ricevono meno diventano epiblasto (Nanog+)
- **Pattern 'salt and pepper'**: inizialmente le cellule Nanog+ e Gata6+ sono miste nell'ICM — poi si segregano per apoptosi selettiva e migrazione

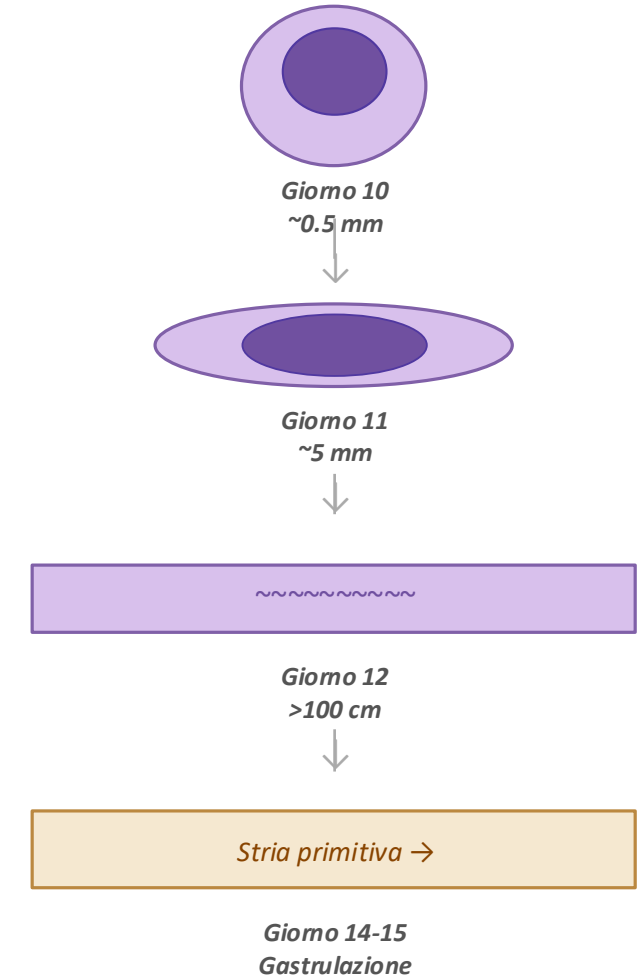
HATCHING — USCITA DALLA ZONA PELLUCIDA

- La blastocisti si espande aumentando la pressione osmotica interna → la zona pellucida si assottiglia e si rompe
- **Strofinasi-1 (STRO1)**: proteasi secreta dalla blastocisti — degrada enzimaticamente la zona pellucida facilitando l'hatching

ALLUNGAMENTO DELLA BLASTOCISTI NEL MAIALE

- **Caratteristica unica del maiale**: prima dell'impianto la blastocisti si allunga da sferica (~0,5mm, giorno 10) a tubulare (5mm, giorno 11) a filamentosa (>100 cm, giorno 12)
- **Segnale: estrogeni** secreti dal trofoectoderma → MRP (Maternal Recognition of Pregnancy) → blocca la luteolisi e mantiene il progesterone
- L'impianto nel maiale è **non invasivo** (placenta epiteliochoriale diffusa) — diverso dall'umano dove è invasivo (emocoriale)
- **Giorno 14-15**: inizio della gastrulazione — formazione della stria primitiva nell'epiblasto

ALLUNGAMENTO BLASTOCISTI



Mappa dei Territori Presuntivi: dalla Blastocisti alla Gastrulazione

FATE MAP NELLA BLASTOCISTI DI SUS SCROFA

- **La fate map del maiale:** meno dettagliata di rana e pollo per via della difficoltà tecnica — dati da Hassoun et al. (2009) e Blomberg et al. (2008)
- **Struttura a 3 territori già nella blastocisti:** trofoectoderma, epiblasto, endoderma primitivo — ciascuno con destino separato

I TERRITORI PRESUNTIVI

- Trofoectoderma (TE)** → Placenta (corio), membrane extraembrionali — **NON** contribuisce all'embrione
- Epiblasto (EPI)** → Tutti e tre i foglietti embrionali + amnio + linea germinale
- Endoderma primitivo (PE/Ipoblasto)** → Sacco vitellino, endoderma parietale e viscerale — **NON** contribuisce all'embrione
- Epiblasto post. (stria primitiva)** → Mesoderma + endoderma definitivo (durante gastrulazione)
- Epiblasto ant.** → Neuroectoderma, ectoderma superficiale

CONFRONTO TRA I TRE MODELLI

	Rana	Pollo	Maiale
Asse principale	D-V	A-P	A-P
Organizzatore	Spemann	Nodo di Hensen	Nodo primitivo
Equivalente blastula	Blastula sferica	Blastodisco	Blastocisti
Endoderma extra.	Macromeri	Ipoblasto	Endoderma primitivo

BLASTOCISTI — SEZIONE

