

# Neurulazione: Definizione e Induzione della Placca Neurale

Dal tubo neurale nasce l'intero sistema nervoso centrale — induzione dalla notocorda

## Definizione

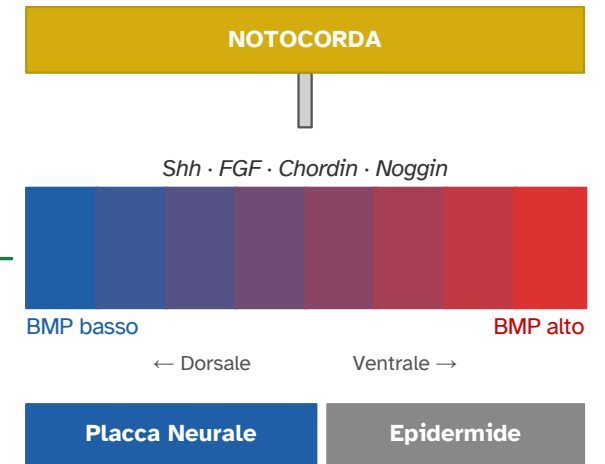
- Processo che trasforma l'ectoderma dorsale in tubo neurale — precursore di encefalo e midollo spinale
- Segue immediatamente la gastrulazione; produce anche le creste neurali (popolazione migratoria)

## Segnale primario: la notocorda invia Shh

- Sonic Hedgehog (Shh) dalla notocorda induce la placca neurale e la floor plate del tubo neurale
- FGF (da notocorda e mesoderma parassiale) mantiene la competenza dell'ectoderma all'induzione

## Gradiente BMP e default neurale

- BMP4 alto → epidermide; BMP4 basso → placca neurale (stato di default dorsale)
- Chordin e Noggin (dall'organizzatore) abbattano BMP4 dorsalmente; Wnt/ $\beta$ -catenina coopera



# Pieghe Neurali, Chiusura del Tubo e Difetti

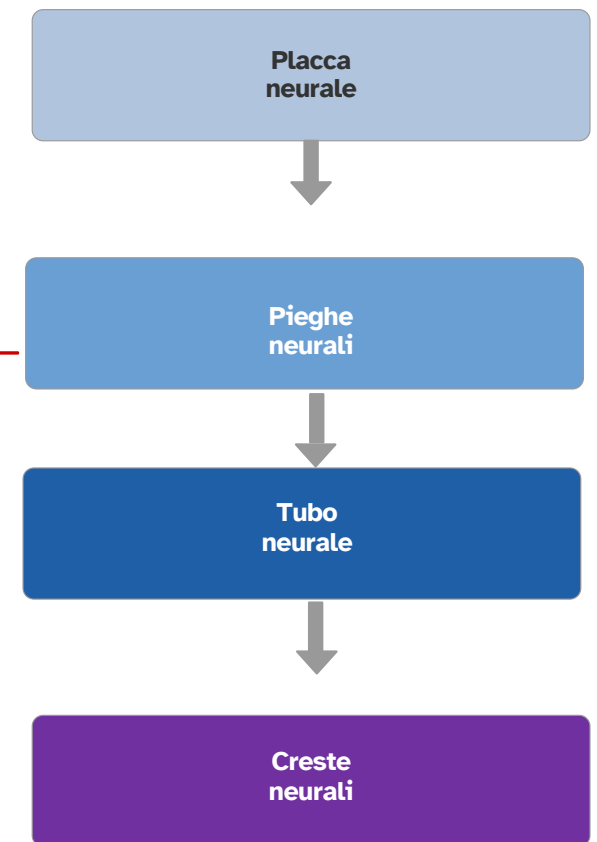
La chiusura incompleta del tubo neurale è causa di gravi malformazioni congenite

## Formazione e chiusura del tubo neurale

- Placca neurale si ispessisce → bordi si sollevano (pieghe neurali) → convergono sulla linea mediana dorsale
- Fusione inizia al romboencefalo e si propaga ant./post. (chiusura a cerniera); neuropori anteriore e posteriore chiudono per ultimi
- Convergenza-estensione (Wnt/PCP, Vangl2, Celsr1) orienta le forze di chiusura lungo l'asse A-P

## Difetti del Tubo Neurale (DTN) – ~1/1000 nati vivi

- Spina bifida: mancata chiusura neuroporo posteriore → midollo spinale esposto (meningomielocele)
- Anencefalia: mancata chiusura neuroporo anteriore → assenza emisferi cerebrali, letale alla nascita
- Acido folico periconcezione riduce l'incidenza del 70% – meccanismo: metilazione del DNA e sintesi nucleotidica



# Le Creste Neurali: Origine, Migrazione e Destini

Popolazione di cellule migratorie definita 'quarto foglietto germinativo' – Le Douarin

## Origine e induzione

- Al bordo della placca neurale: BMP intermedio + FGF + Wnt → espressione di Pax3, Zic1, Msx
- EMT: perdono N-caderina, acquisiscono caderina-7 e vimentina → cellule migratorie singole

## Vie di migrazione

- Via dorso-laterale: tra ectoderma e somiti → melanociti della cute
- Via ventrale: attraverso i somiti → neuroni e glia SNP, cellule cromaffini del surrene
- Creste craniali: migrano nel mesenchima cefalico → ossa craniche, cartilagini, dentina

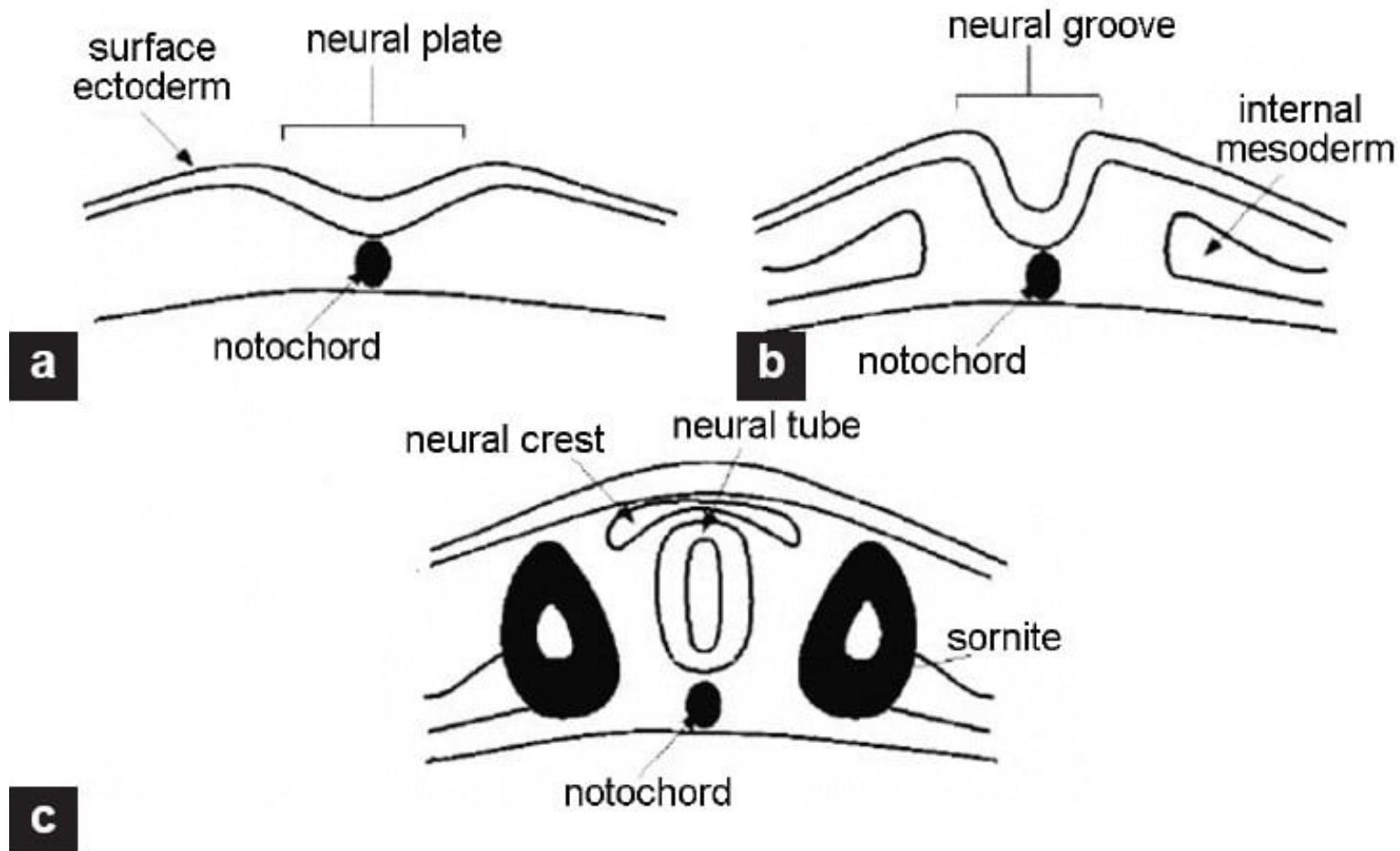
## Destini principali

- SNC/SNP: neuroni DRG, neuroni simpatici/parasimpatici, cellule di Schwann, glia enterica
- Melanociti, cellule C della tiroide, cellule cromaffini del surrene – conservati in tutti i vertebrati



Conservate in tutti i vertebrati  
Xenopus · Gallus · Sus scrofa

# Neural tube formation - es.1



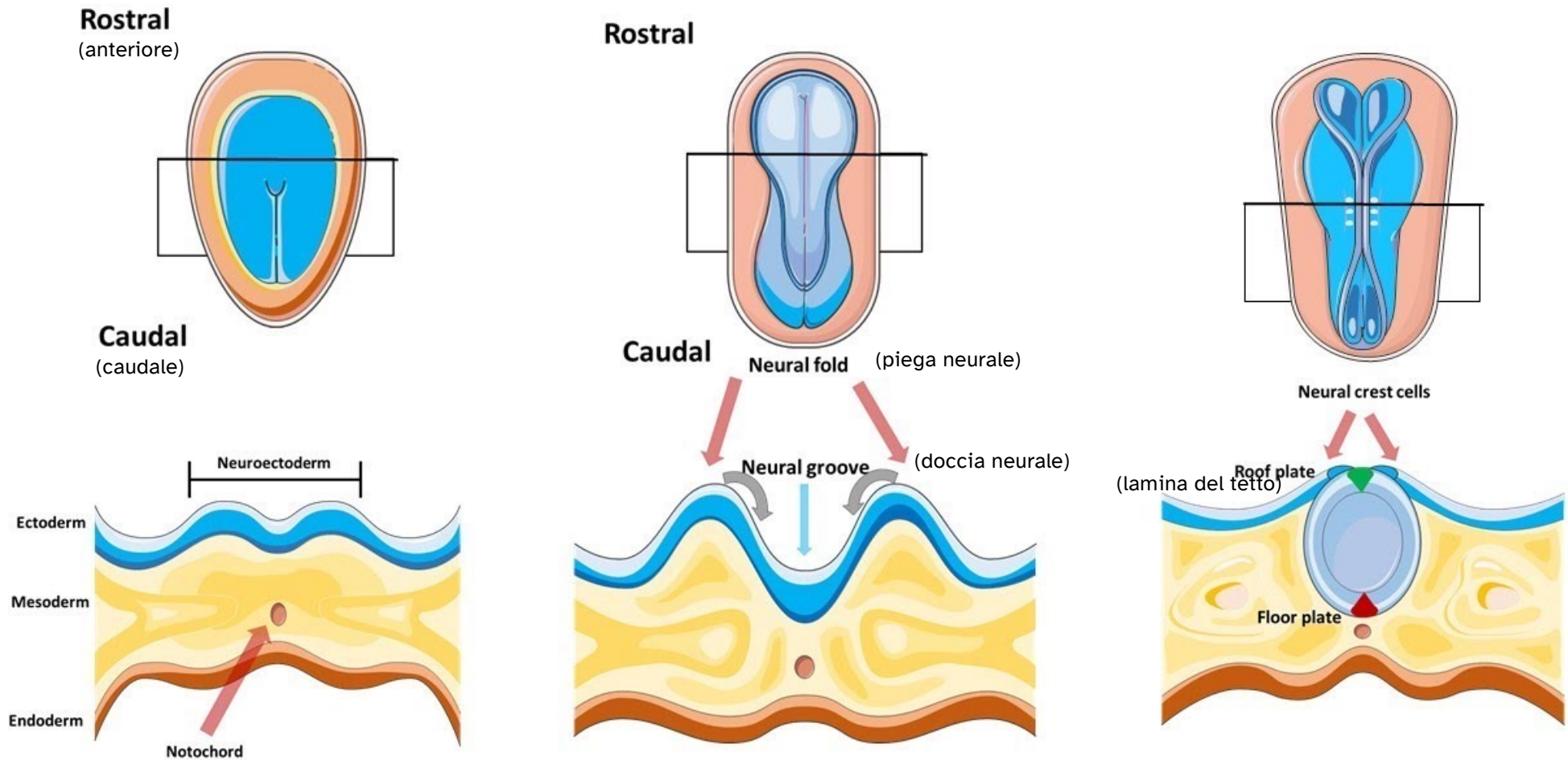
Scheme of the embryo's transverse cross sections during neurulation process.

A = neural plate stage

B = neural groove stage

C = neural tube stage

# Neural tube formation - es.2



## Anomalie del Tubo Neurale (DTN) — Schema Riassuntivo

### Principali Tipologie

PATOLOGIA	TIPO	DESCRIZIONE	CUTE (ECTODERMA)	GRAVITÀ	NOTE
Mielomeningocele	Aperto	Difetto vertebrale con sacco contenente meningi + midollo spinale	Assente sulla lesione	Grave	Forma più comune di spina bifida
Meningocele	Aperto	Sacco meningeo + LCR sporge, midollo rimane nel canale	Assente sul sacco	Moderata	Deficit neurologici minori
Rachischisis	Aperto	Tubo neurale completamente aperto, placca neurale esposta	Assente	Massima	Rarissimo
Anencefalia	Aperto	Assenza di gran parte del cervello e del cranio (neuroporo craniale)	Assente su calotta	Letale	Incompatibile con la vita
Cefalocele	Aperto	Erniazione del contenuto intracranico attraverso difetto del cranio	Assente sul sacco	Grave	Occipitale nella maggior parte dei casi
Spina bifida occulta	Chiuso	Difetto osseo midlineare, cute integra, midollo normale	Presente — integra	Lieve	Spesso asintomatica

### ⚠ CAUSE E FATTORI DI RISCHIO

- Carenza acido folico (vitamina B9) — principale
- Diabete materno
- Farmaci teratogeni (es. valproato)
- Fattori genetici

### ✓ PREVENZIONE

- Acido folico prima del concepimento e durante il 1° trimestre
- Evitare farmaci a rischio teratogeno
- Controllo glicemico in gravidanza

*La cute deriva dall'ectoderma – lo stesso foglietto embrionale da cui origina il tubo neurale. Nei difetti aperti, la mancata chiusura del tubo neurale impedisce anche la corretta migrazione e fusione dell'ectoderma superficiale sopra la lesione.*

# Creste Neurali: Induzione Molecolare e Fattori di Trascrizione

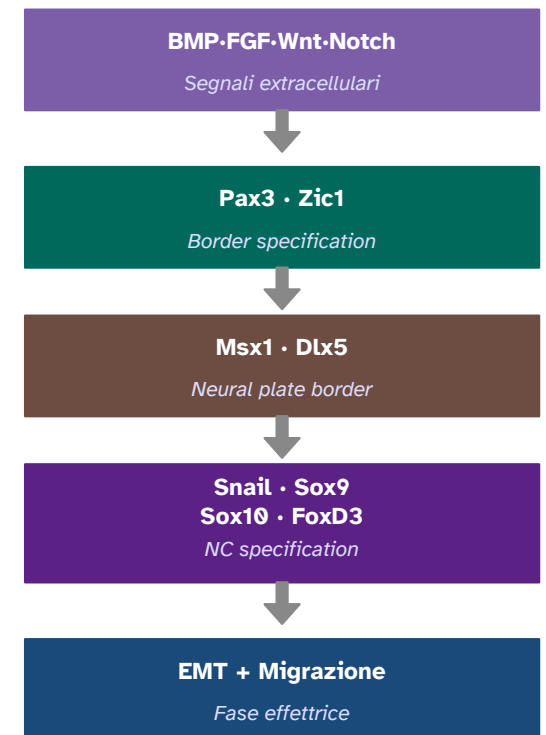
*Il bordo della placca neurale come zona di confine — segnali combinatori e rete regolativa*

## Il segnale combinatorio: BMP intermedio + FGF + Wnt

- BMP4 intermedio al bordo della placca neurale — né alto (epidermide) né basso (neuroectoderma) — è necessario e sufficiente per iniziare l'induzione
- FGF (da mesoderma parassiale e rombomeri) coopera abbassando la soglia di risposta al BMP; Wnt (da ectoderma non neurale) stabilizza e amplifica il segnale
- Notch/Delta opera tra cellule adiacenti per affinare il confine: amplifica le differenze tra cellule di cresta e neuroectoderma vicine

## Rete di fattori di trascrizione (GRN — Gene Regulatory Network)

- Pax3 e Zic1 (fase I — specificazione border): attivati per primi, definiscono la competenza del bordo della placca neurale
- Msx1/2, Dlx5 (fase II — induzione): amplificano il segnale e attivano i regolatori della fase successiva; repressi da BMP basso → confine netto
- Snail1/2, Sox9, Sox10, FoxD3 (fase III — determinazione): attivano l'identità di cresta neurale, reprimono E-caderina, preparano la EMT



# Creste Craniali: Scheletro Cranio-Facciale e Archi Faringei

Le creste craniali sono l'unica fonte di mesenchima cefalico nei vertebrati – trasformano l'ectoderma in strutture ossee e cartilaginee

## Origine e percorso delle creste craniali

- Originano dal prosencefalo, mesencefalo e rombencefalo (r1-r7); migrano in tre correnti distinte determinate dai rombomeri
- Entrano negli archi faringei: 1° arco (mandibolare), 2° arco (ioideo), 3°-4°-6° arco (archi branchiali/laringei)
- L'identità dei derivati è determinata dal codice Hox dei rombomeri di partenza – r1-r2 (Hox-neg.) → 1° arco con pattern craniale massimo

## Strutture derivate dal 1° arco (mascellare e mandibolare)

- Ossa: mascella, mandibola, zigomatico, palatino, osso temporale (squama); malleo e incudine (ossicini dell'udito)
- Cartilagini: cartilagine di Meckel (precursore mandibolare) → ossificazione encondrale e sostituita dall'osso membranoso

## Strutture derivate dal 2° arco (ioideo) e archi successivi

- 2° arco: stapede, processo stiloideo, corno minore dell'ioide, cartilagine di Reichert
- 3° arco: corpo e corno maggiore dell'ioide; 4°-6° arco: cartilagini laringee (tiroide, cricoide, aritenoidee)
- Dentina dei denti: da odontoblasti derivati da creste craniali; lo smalto è di origine epiteliale

1°  
Mascellare  
Mandibolare

2°  
Ioideo  
(Reichert)

3°  
Ioide corpo  
+ corno

4°-6°  
Cartilagini  
laringee

### Codice Hox dei rombomeri:

r1-r2 (Hox-neg.) → 1° arco  
r4 → 2° arco  
r6-r7 → 3°-4° arco

# Destini del Tronco e Neurocristopatie

Difetti di migrazione, sopravvivenza o differenziazione delle creste causano malformazioni multi-organo

## Sistema Nervoso Periferico

- Neuroni sensoriali — gangli della radice dorsale (DRG)
- Neuroni simpatici (gangli paravertebrali, prevertebrali) e parasimpatici
- Glia: cellule di Schwann (mielinizzazione SNP), glia satellite dei gangli

## Sistema Nervoso Enterico

- Neuroni e glia dei plessi di Meissner e Auerbach — colonizzano il tratto intestinale cranio-caudale
- Colonizzazione completa entro il giorno 7 (pollo) / settimana 12 (umano)

## Cellule Neuroendocrine e Altri Destini

- Cellule cromaffini del midollo surrenale (secretono adrenalina e noradrenalina)
- Cellule C della tiroide (calcitonina); cellule di tipo I del glomo carotideo
- Melanociti della cute, occhio (uvea), orecchio interno (stria vascularis)

## NEUROCRISTOPATIE

### Sindrome di Waardenburg

**Gene: PAX3, SOX10, MITF, EDN3**

Sordità neurosensoriale, ipopigmentazione (ciocca bianca, eterocromia iride) — difetto melanociti e creste del tronco

### Sindrome di DiGeorge (22q11)

**Gene: TBX1 (+ delezione 22q11)**

Aplasia del timo e paratiroidi, difetti cardiaci conotruncali — mancata migrazione creste craniali nel 3°-4° arco

### Malattia di Hirschsprung

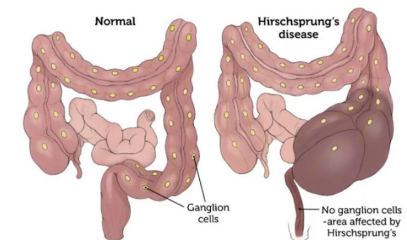
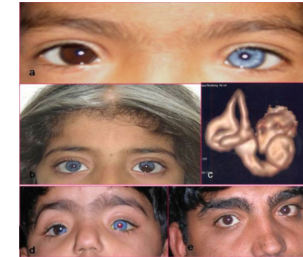
**Gene: RET, EDNRB, SOX10**

Aganglionosi del colon (mancata colonizzazione enterica) → megacolon congenito; più grave nei maschi

### Melanoma

**Gene: BRAF V600E, NRAS, NF1**

Tumore maligno dei melanociti — riattiva programma migratorio EMT delle creste: N-caderina↑, E-caderina↓, vimentina↑



# Xenopus: Induzione e Formazione della Placca Neurale

Stadi 13-14 N&F – la notocorda è depositata, *Shh* e il gradiente *BMP* inducono la placca neurale dorsale

## Raccordo dalla gastrulazione

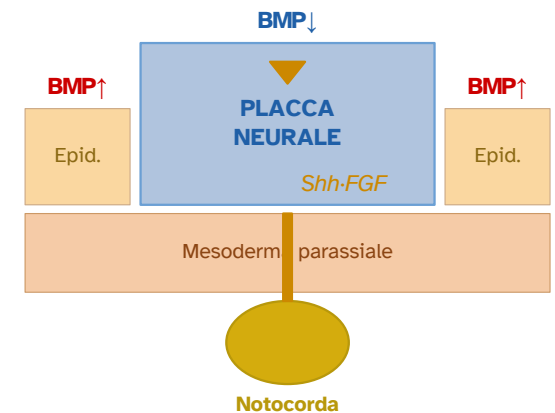
- Alla fine della gastrulazione (stadio 12) la notocorda corre lungo il tetto dell'arcènteron – inizia subito a segnalare verso l'ectoderma sovrastante
- $\beta$ -catenina nucleare (lato dorsale) + inibizione di BMP da Chordin/Noggin hanno già predisposto l'ectoderma dorsale alla competenza neurale

## Induzione della placca neurale

- *Shh* dalla notocorda e dal mesoderma dorsale raggiunge l'ectoderma dorsale → attiva *Sox2* e *N-CAM* → identità neuroectodermale
- FGF (via *FGFR4*) mantiene la competenza e previene la differenziazione epidermica prematura dell'ectoderma dorsale
- BMP4 basso dorsalmente (inibito da Chordin/Noggin) → default neurale; BMP4 alto lateralmente → ectoderma non neurale (epidermide)

## Morfologia della placca neurale (stadio 13-14)

- Ispessimento epiteliale a forma di scudo sul dorso: larga anteriormente (futuro encefalo), stretta posteriormente (futuro midollo spinale)
- Le cellule della placca si allungano apico-basalmente (colonnari, altezza ~2x larghezza) e si appiattiscono lateralmente – preparano la curvatura



### Staging N&F

St. 12 → gastrula matura  
St. 13 → placca neurale visibile  
St. 14 → bordi in sollevamento

# Xenopus: Pieghe Neurali e Chiusura del Tubo Neurale

Stadi 14-20 N&F – convergenza-estensione, bottle cells, fusione delle pieghe

## Sollevamento delle pieghe neurali (stadi 14-16)

- I bordi laterali della placca neurale si sollevano formando le pieghe neurali (neural folds) – guidate da forze intrinseche al citoscheletro apicale (actomiosina)
- Le bottle cells del bordo mediale si contraggono apicalmente, generando la forza che curva il foglio epiteliale verso il centro dorsale

## Convergenza-estensione (Wnt/PCP)

- Le cellule della placca neurale si intercalano lungo l'asse medio-laterale → il territorio si restringe lateralmente e si allunga antero-posteriormente
- Controllata da Wnt/PCP (Vangl2, Celsr1, Prickle): orienta la polarità cellulare planare; mutazioni → pieghe non convergono → tubo aperto
- La convergenza-estensione allunga anche la notocorda e i somiti in parallelo – coordina l'allungamento dell'intero asse corporeo

## Fusione e chiusura (stadi 16-20)

- Le pieghe si incontrano sulla linea mediana dorsale e si fondono – fusione mediata da N-caderina e molecole di adesione del bordo delle pieghe
- In *Xenopus* la chiusura è continua e inizia nella regione cefalica procedendo caudalmente (non a cerniera come nei mammiferi)

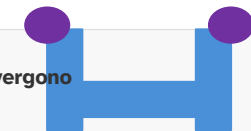
St.13  
Placca piatta



St.14-15  
Pieghe in sollevamento



St.17-18  
Pieghe convergono



St.20  
Tubo chiuso





# Gallus: Disco Germinativo Piatto e Placca Neurale

Stadi HH4-8 — la geometria del disco impone una neurulazione diversa da Xenopus

## Differenze strutturali rispetto a Xenopus

- L'embrione di pollo si sviluppa su un disco germinativo piatto (blastoderma), non in un uovo sferico con vitello abbondante — geometria completamente diversa
- La gastrulazione avviene attraverso la stria primitiva (non il blastoporo) — la notocorda è depositata cefalicamente dalla Hensen's node procedendo in senso antero-posteriore
- Staging: sistema di Hamburger & Hamilton (HH) — HH4 = gastrula con nodo di Hensen; HH8 = 4 somiti; HH10 = 10 somiti con tubo quasi chiuso

## Induzione della placca neurale in Gallus

- Shh dal nodo di Hensen e dalla notocorda nascente induce la placca neurale cefalicamente, prima ancora che la stria sia completamente retratta
- FGF8 (dal nodo e dalla stria) + Wnt3a mantengono la PSM posteriore in stato proliferativo; BMP inibito da Chordin/Follistatina nell'epiblasto dorsale → default neurale

## Forma e orientamento della placca neurale in Gallus

- La placca neurale si forma cefalicamente prima che la neurulazione sia completa posteriormente — anterior-to-posterior wave (onda antero-posteriore)
- La forma a "pala" (shovel shape) è più larga e piatta rispetto a Xenopus — riflette la geometria del disco e la quantità di tessuto cefalico da generare



HH4

Stria completa, nodo

HH7

1° somite, pieghe

HH10

10 somiti, tubo 90%

HH13

Tubo chiuso, NC migra

## Gallus: Chiusura del Tubo e Pattern Dorso-Ventrale

Stadi HH8-13 — chiusura a cerniera bidirezionale, pattern Shh/BMP identico a Xenopus

### Chiusura del tubo neurale in Gallus — differenze chiave

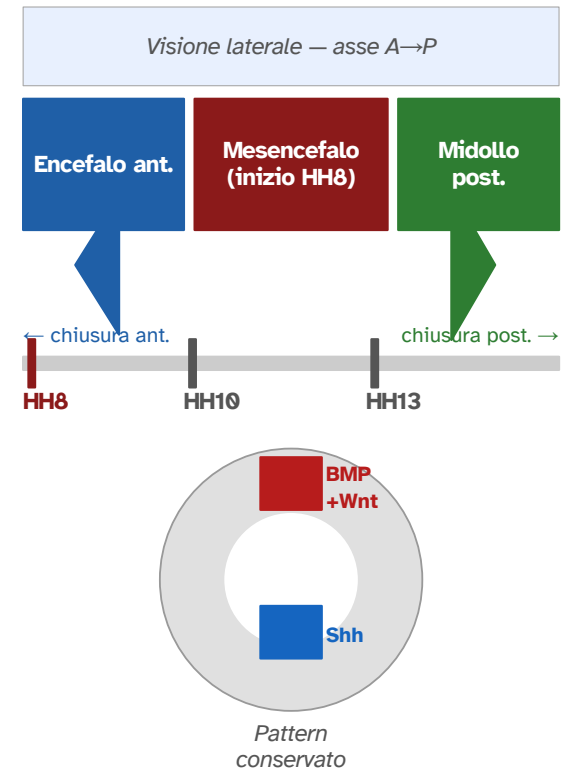
- In Gallus la chiusura parte dalla regione del futuro mesencefalo (HH8-9) e procede sia cefalicamente sia caudalmente — modello a cerniera bidirezionale (come nei mammiferi, diversamente da Xenopus)
- La chiusura cefalica si completa prima di quella caudale — encefalo chiuso a HH10, midollo spinale posteriore ancora aperto fino a HH13
- L'ampiezza del disco richiede forze di convergenza-estensione più potenti rispetto a Xenopus — maggiore dipendenza da Wnt/PCP (Vangl2, Ptk7)

### Specificità morfologica: il cranio si piega prima

- La placca neurale cefalica sviluppa pieghe craniofacciali (head folds) già a HH7 — pliche anteriori che separano fisicamente l'encefalo dal resto del blastoderma
- La flessura cefalica — curva ventrale del futuro encefalo anteriore — è visibile già a HH10 e non ha equivalente in Xenopus a questi stadi

### Pattern D-V del tubo neurale — conservato

- Shh dalla notocorda e floor plate → domini ventrali (FP, p3, pMN, p0-p2): identici a Xenopus — motoneuroni e interneuroni V0-V3
- BMP dal roof plate + Wnt1/Wnt3a → domini dorsali (dI1-dI6): Wnt1/3a hanno ruolo più prominente nel pollo rispetto ad altri vertebrati
- Il pollo è il modello in cui il pattern D-V è stato caratterizzato per la prima volta — trapianti di notocorda ectopica di Jessell et al. 2000



# Gallus: Creste Neurali – Specificità e Modello Aviale

Il pollo come sistema chiave per i trapianti di cresta neurale – esperimenti classici di Le Douarin

## Specificità delle creste neurali nel pollo

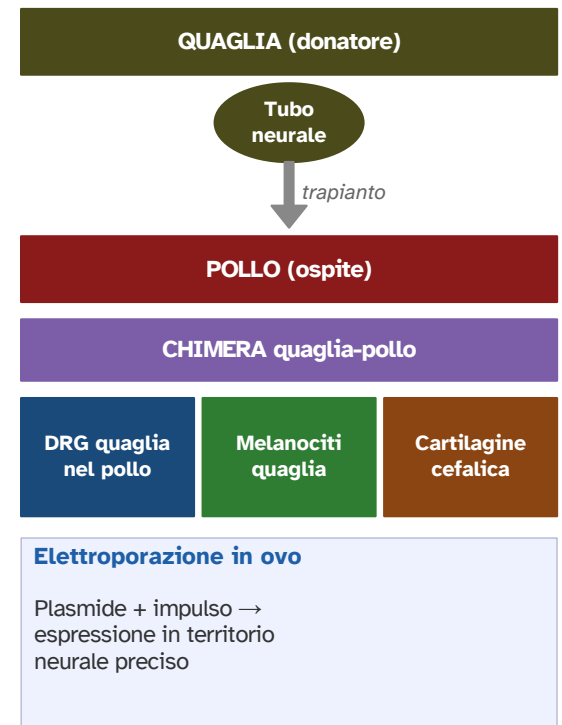
- Le creste craniali del pollo danno un contributo osseo più consistente rispetto a Xenopus – la maggior parte del neurocranio e dello splancnocranio è di origine neurale
- Le creste del tronco nel pollo sono più abbondanti che in Xenopus e danno tutti i destini visti nel generale: DRG, simpatici, Schwann, cromaffini, melanociti
- Timing: le creste iniziano a migrare subito dopo la chiusura del tubo per quella regione – migrazione craniale a HH9-10, migrazione del tronco a HH12-15

## Il chimera quaglia-pollo – esperimento classico di Le Douarin

- Nicole Le Douarin (anni '70): trapianto del tubo neurale di quaglia in embrione di pollo – le cellule di quaglia hanno nucleolo eterocromatico distintivo, visibile in istologia
- Risultato: tracciamento di ogni singolo derivato delle creste neurali in un vertebrato amniote – mappa completa dei destini delle creste craniali e del tronco
- Queste mappe sono ancora oggi il riferimento gold standard – il pollo ha permesso la scoperta che il mesenchima cefalico è quasi interamente di origine neurale

## Vantaggi sperimentali del modello aviale

- Accessibilità: sviluppo fuori dalla madre – trapianti, ablationi ed elettroporazione in ovo a qualsiasi stadio HH
- Elettroporazione in ovo: plasmide + impulso elettrico → espressione genica localizzata in un territorio preciso del tubo neurale o della cresta



# Sus scrofa: Neurulazione nel Mammifero

E11-E14 – disco piatto come Gallus, chiusura da siti multipli – strategia conservata nei placentati

## Geometria embriologica del mammifero

- Embrione discoidale come il pollo (blastoderma piatto), ma sviluppo interno – impianto uterino, placenta emocoriale nei roditori, epiteliocoriale nel maiale
- La gastrulazione avviene attraverso la stria primitiva (come in Gallus); il nodo primitivo equivale all'organizzatore di Spemann – deposita la notocorda in senso antero-posteriore
- Staging in Sus scrofa: giorni di gestazione (E = embryonic day) – E11: stria primitiva; E12-13: placca neurale; E13-14: chiusura del tubo

## Chiusura del tubo neurale nei mammiferi – siti multipli

- Nei mammiferi (topo, maiale, umano) la chiusura avviene da più siti di fusione simultanei (closure sites 1, 2, 3) – non da uno solo come in Gallus
- Sito 1: giunzione cervicale (futuro romboencefalo/midollo) – primo a chiudersi; da qui si propaga in entrambe le direzioni come in Gallus
- Sito 2: giunzione prosencefalo/mesencefalo; Sito 3: neuroporo anteriore (estremità rostrale) – chiusura quasi simultanea nei mammiferi placentati

## Differenza chiave rispetto a pollo e Xenopus

- Siti multipli riducono la distanza percorsa da ogni fronte di fusione → minor rischio di DTN rispetto a chiusura da singolo sito
- Strategia conservata in tutti i mammiferi placentati – variazioni nel numero di siti tra specie (topo: sito 2 distinto; umano: non sempre presente)



# Sus scrofa: Creste Neurali nel Mammifero

Stessa logica molecolare, tempi più lunghi – il maiale come ponte verso la biologia umana

## Creste neurali in Sus scrofa – caratteristiche generali

- Le creste iniziano a migrare dopo la chiusura locale del tubo – creste craniali a E14-15, creste del tronco a E15-17 (tempi molto più lunghi rispetto a pollo e Xenopus)
- I geni driver della specificazione (Pax3, Sox10, Snail2, FoxD3) e dell'EMT sono identici a Xenopus e Gallus – la GRN delle creste è una sinapomorfia dei vertebrati
- Contributo allo scheletro cranio-facciale molto esteso – ancora maggiore che nel pollo; ossa membranose del volto completamente di origine neurale come nell'umano

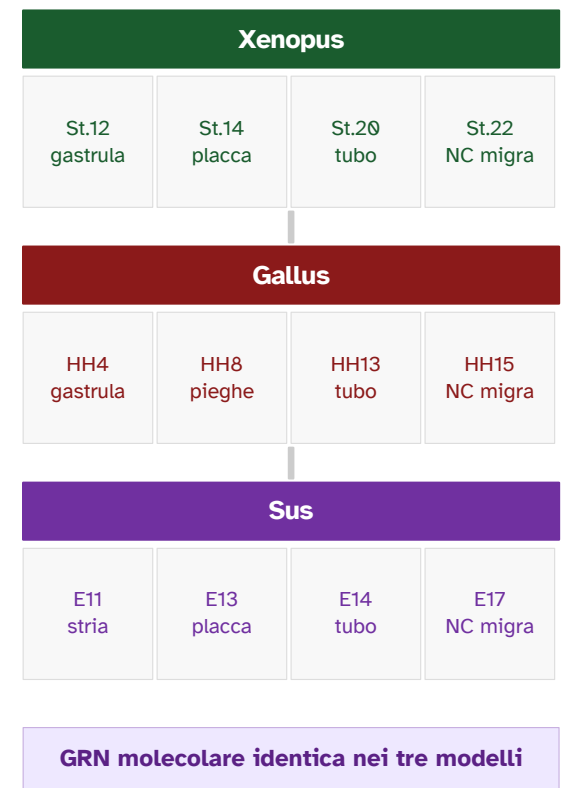
## Colonizzazione enterica – rilevanza per Hirschsprung

- Le creste neurali colonizzano il tratto intestinale in senso cranio-caudale; nel maiale la colonizzazione completa del colon richiede fino a E30 – scala temporale paragonabile all'umano (settimana 12)
- Il maiale è il modello preclinico preferito per la malattia di Hirschsprung – dimensioni intestinali, timing di colonizzazione e varianti genetiche di RET simili all'umano

## Confronto diretto con Gallus e Xenopus

- Xenopus: creste del tronco ridotte, metamorfosi rimodella le craniali; Gallus: creste del tronco complete, chimera quaglia-pollo come strumento; Sus: tempi lunghi, scala umana
- La GRN di induzione (BMP-FGF-Wnt-Notch → Pax3/Zic1 → Msx → Snail/Sox) è identica nei tre modelli – differisce solo il timing, non la logica molecolare

### Timing comparativo



## Xenopus laevis

Anfibio — neurulazione primaria

Stadi 13-14 N&F — *Shh* dalla notocorda, gradiente BMP

### Segnale primario: la notocorda

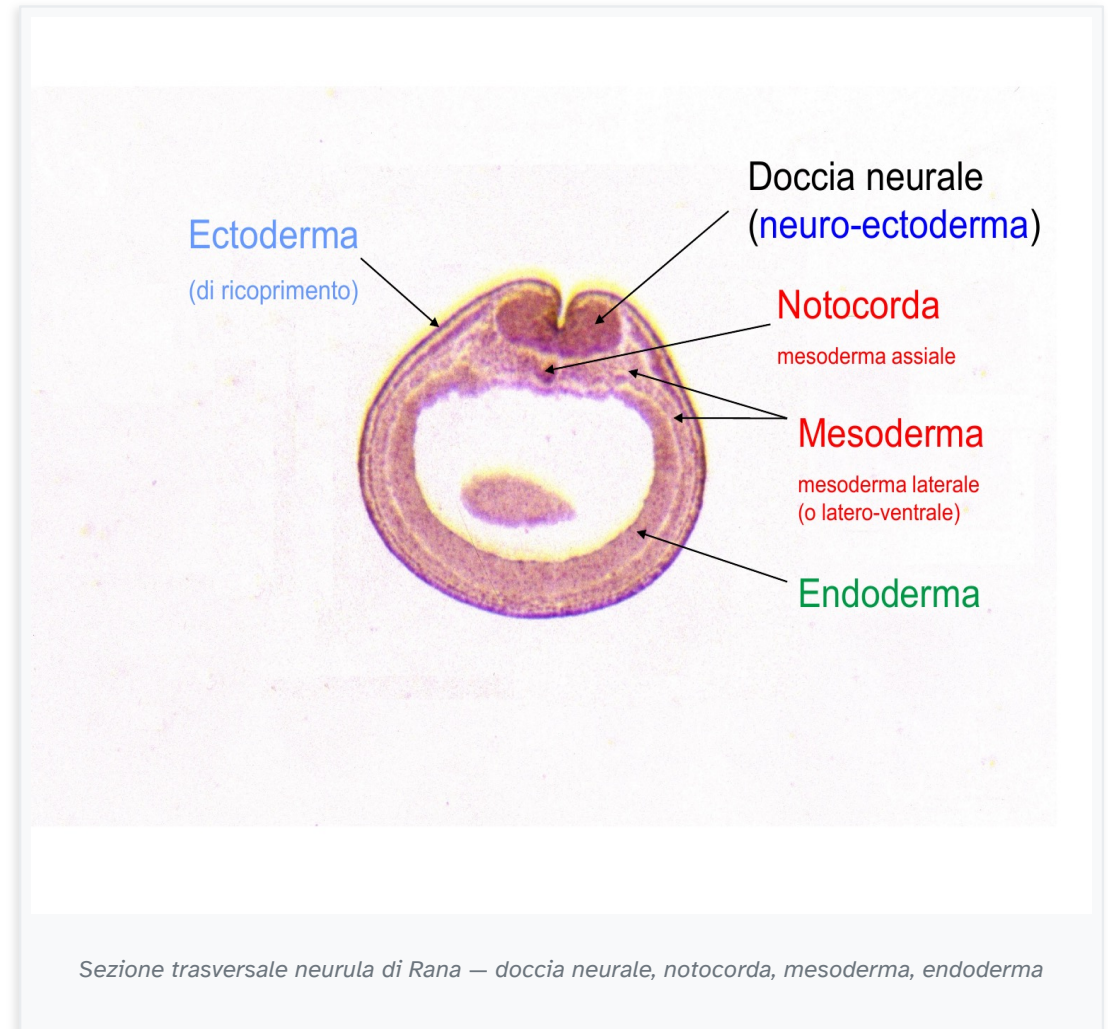
**Shh (Sonic Hedgehog)** dalla notocorda → induce placca neurale e floor plate

**FGF** mantiene la competenza ectodermica all'induzione  
BMP4 alto → epidermide; **BMP4 basso** → **default neurale**  
Chordin/Noggin abbattano BMP4 dorsalmente

### Morfologia — stadio 13-14

Ispessimento epiteliale a scudo sul dorso; largo anteriormente (encefalo), stretto posteriormente (midollo)

Cellule colonnari apico-basalmente → preparano la curvatura delle pliche



# Pliche Neurali e Chiusura

Stadi 14-20 N&F – convergenza-estensione *Wnt/PCP*, *bottle cells*

## Convergenza-estensione (*Wnt/PCP*)

**Vangl2**, **Celsr1** orientano la polarità planare → cellule si intercalano M-L

Territorio si restringe lateralmente e si allunga A-P

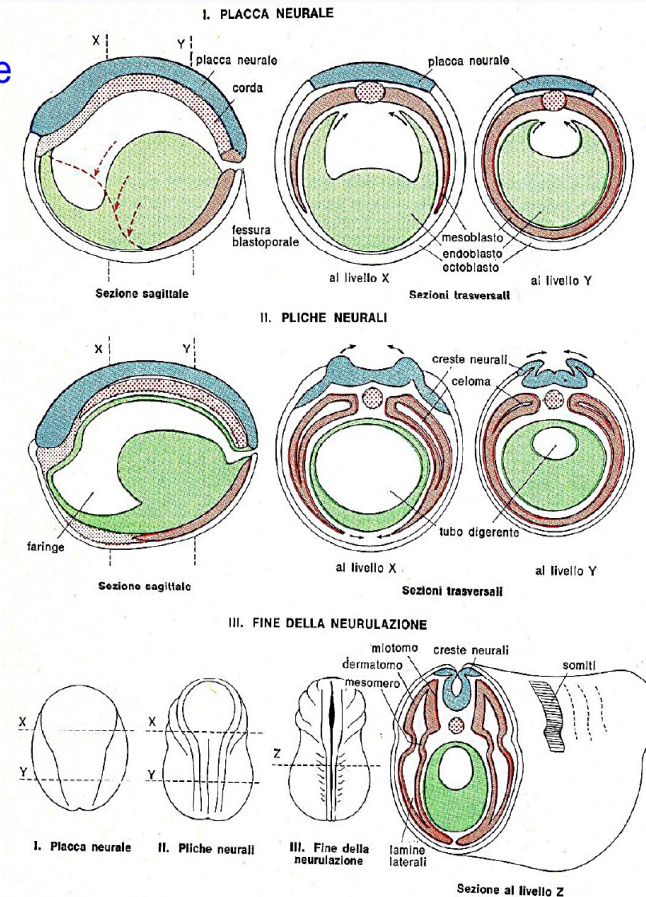
Mutazioni → tubo aperto (DTN)

## Chiusura – specificità di *Xenopus*

**Chiusura continua e unimodale**, dalla regione cefalica procedendo caudalmente

**Diversa dai mammiferi** (siti multipli S1/S2/S3) e da Gallus (bidirezionale dal mesencefalo)

## Neurulazione



Creste neurali = 4° foglietto

Schema neurulazione *Rana*: I. Placca neurale · II. Pliche neurali · III. Fine neurulazione (sezioni sag. e trasv.)

# Bottone Caudale

Sezioni sagittali di Rana — organogenesi precoce

## Strutture visibili al bottone caudale

**Vescicola cerebrale** (pros-, mesen-, romben-cefalo) differenziate

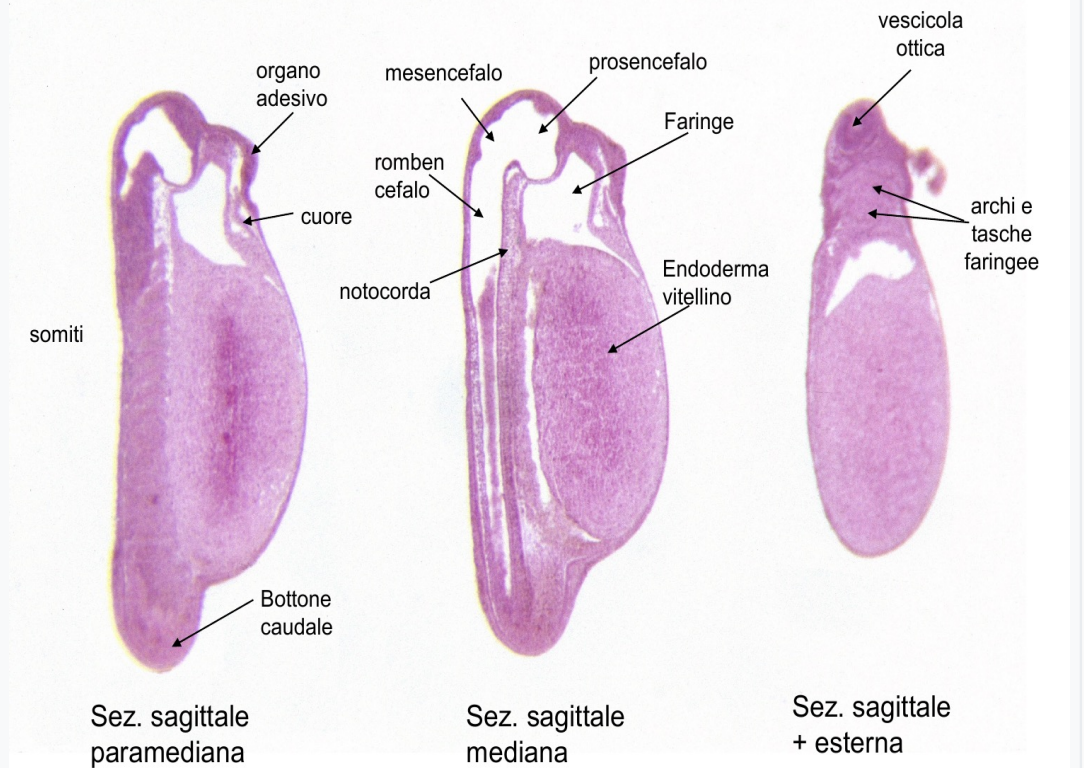
**Notocorda** — struttura assiale impari mediana

**Somiti** bilaterali a lato del tubo neurale

**Cuore** · organo adesivo · tasche branchiali

**Endoderma vitellino** ancora abbondante ventralmente

## Rana: bottone caudale – Sez. Sagittali



*Rana: bottone caudale — sezioni sagittali paramediana, mediana, esterna (HE, 10×)*

## Rana 4 mm — Sez. Trasversali

Livelli cefalico, tronco, coda — strutture identificabili

### Strutture identificabili per livello

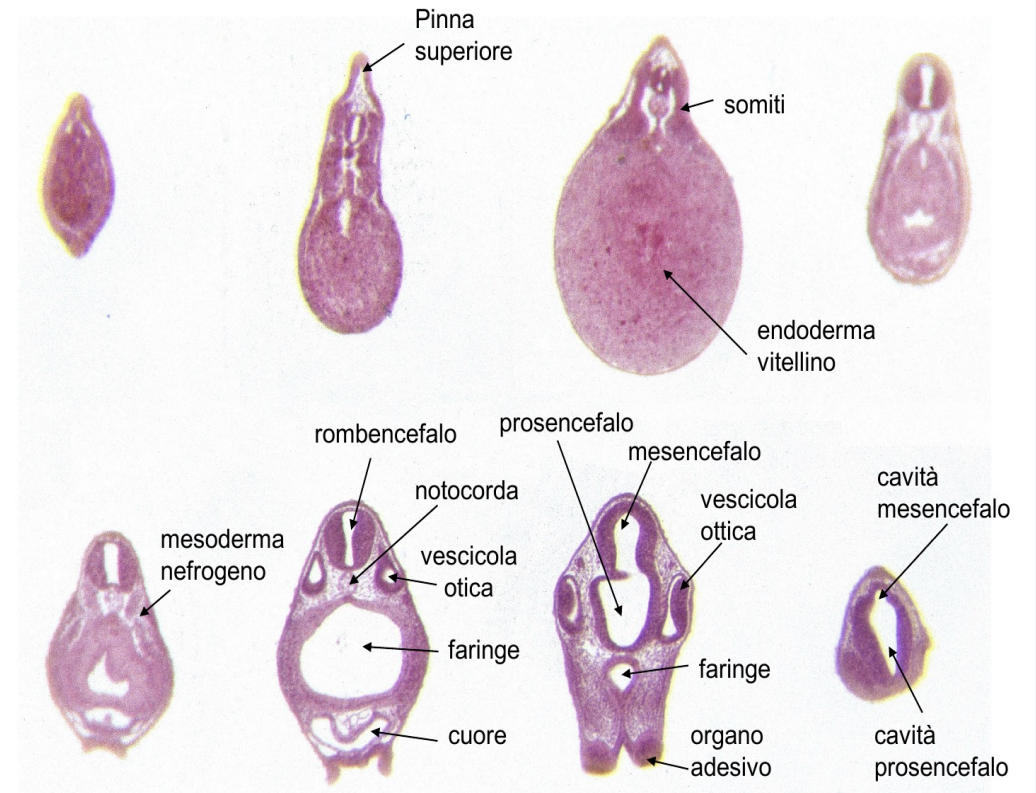
**Livello cefalico:** mesencefalo, prosencefalo, vescicola ottica, faringe

**Livello rombencefalo:** vescicola otica, cuore, organo adesivo, notocorda

**Livello tronco:** midollo spinale, notocorda, miotomo, mesoderma nefrogeno

**Notocorda:** sempre riconoscibile come struttura circolare mediana ventrale al tubo neurale

### Rana 4mm - Sez. trasversali



Rana 4mm — sezioni trasversali colorate: dalla coda (alto sx) alla testa (basso dx). HE.

## Gallus gallus

Uccello — disco germinativo piatto

Whole mount in toto — placca neurale, Nodo di Hensen

### Differenze chiave rispetto a Xenopus

**Disco germinativo piatto** → gastrulazione via stria primitiva (non blastoporo)

**Nodo di Hensen** = equivalente funzionale del labbro dorsale del blastoporo

**Chiusura bidirezionale** dal mesencefalo → cefalicamente e caudalmente (HH8-9)

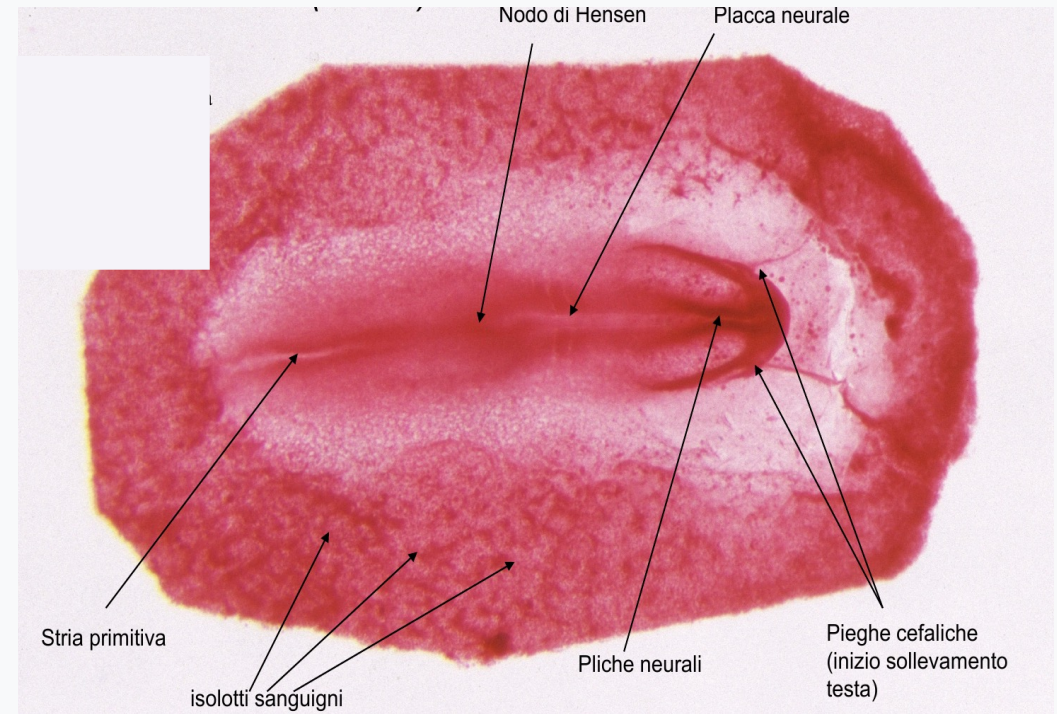
### Visibili a HH20 (≈ 20 ore)

**Placca neurale** • **Pliche neurali** in avanzamento

**Nodo di Hensen** • **Stria primitiva** (ancora presente)

**Pieghe cefaliche** (inizio sollevamento testa) • **Isolotti sanguigni** (angiogenesi)

### Pollo 20 ore



*Gallus gallus* — pollo 20h W.M. (in toto). Placca neurale, Nodo di Hensen, stria primitiva, isolotti sanguigni.

## Neurulazione HH24 (≈24 ore)

*Pliche in saldatura, neuroporo, somiti, piega cefalica*

**Pliche neurali in saldatura:** fusione inizia dal mesencefalo, avanza bilateralmente

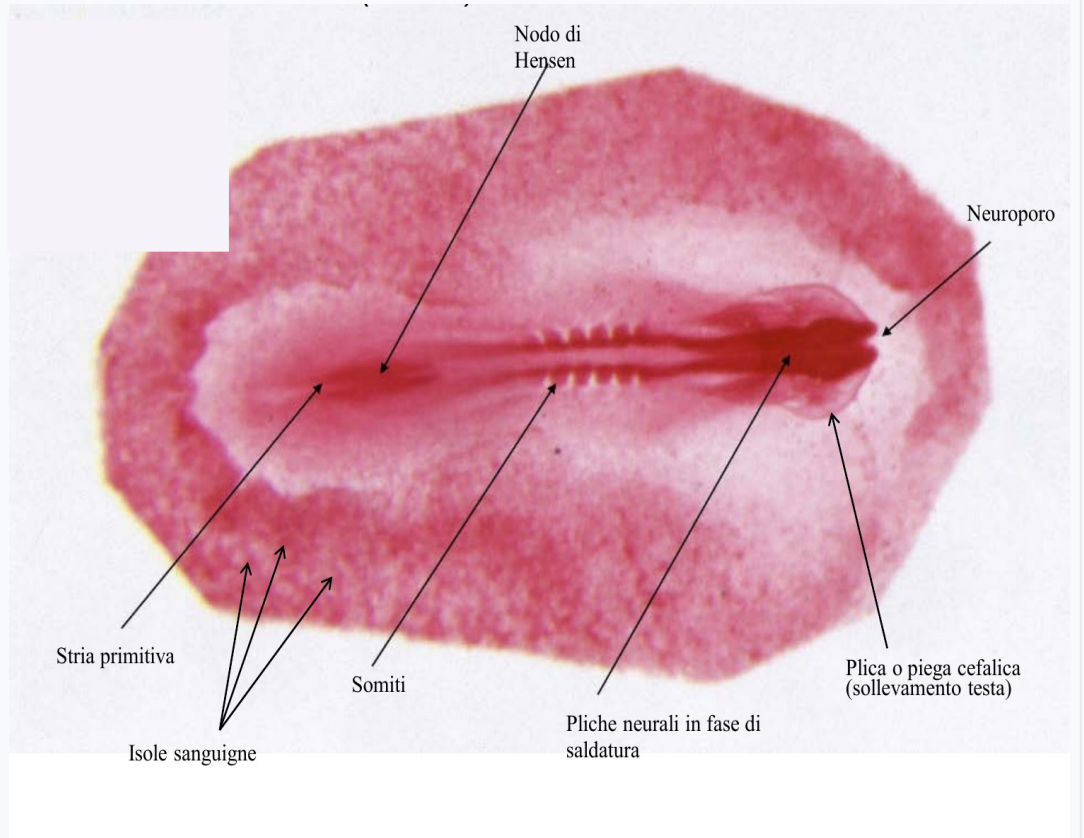
**Neuroporo anteriore:** ancora aperto a HH24; si chiude completamente a HH10

**Somiti** visibili bilateralmente — orologio segmentale Notch/Wnt/FGF attivo

**Piega cefalica:** testa si solleva dal blastoderma

**Isole sanguigne:** vasculogenesi nell'area opaca extraembrionale

Pollo 24 ore



*Gallus gallus — pollo 24h W.M. (in toto). Pliche in fase di saldatura, neuroporo, somiti, piega cefalica.*

## Sus scrofa

Mammifero eutero — siti multipli

E11-E14 — siti multipli; GRN identica a *Xenopus* e *Gallus*

### Siti multipli di chiusura — strategia dei mammiferi

**S1** (giunzione cervicale) — primo; si propaga in entrambe le direzioni

**S2** (giunzione pros./mesencefalo)

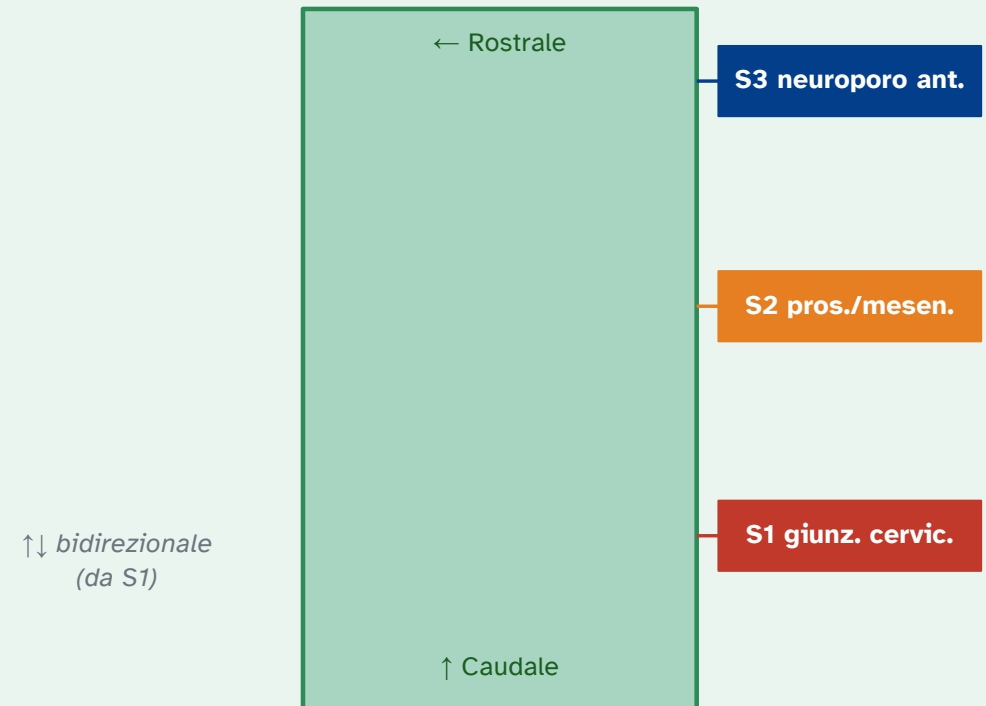
**S3** (neuroporo anteriore) — quasi simultaneo a S2 nei placentati

→ **Minore rischio DTN** rispetto a chiusura da sito singolo

### Timing comparativo — tre modelli

Specie	Gastrula	Placca	Tubo chiuso	NC migra
<i>Xenopus</i>	St.12	St.13	St.20	St.22
<i>Gallus</i>	HH4	HH7-8	HH13	HH15
<i>Sus scrofa</i>	E11	E12-13	E14	E17

### Chiusura del tubo neurale nei Mammiferi — siti multipli



GRN molecolare identica nei 3 modelli: BMP-FGF-Wnt-Notch → Pax3/Zic1 → Snai/Sox

# Confronto: Neurulazione nelle 3 Specie

## Xenopus laevis

- Uovo sferico telolecito — gastrulazione con blastoporo
- Neurulazione primaria — chiusura continua, cefalica → caudale
- Stadi N&F: placca (13) → tubo chiuso (20) → NC migra (22)
- Creste neurali: Pax3, Snail2/Slug — identificati per la prima volta in Xenopus

## Gallus gallus

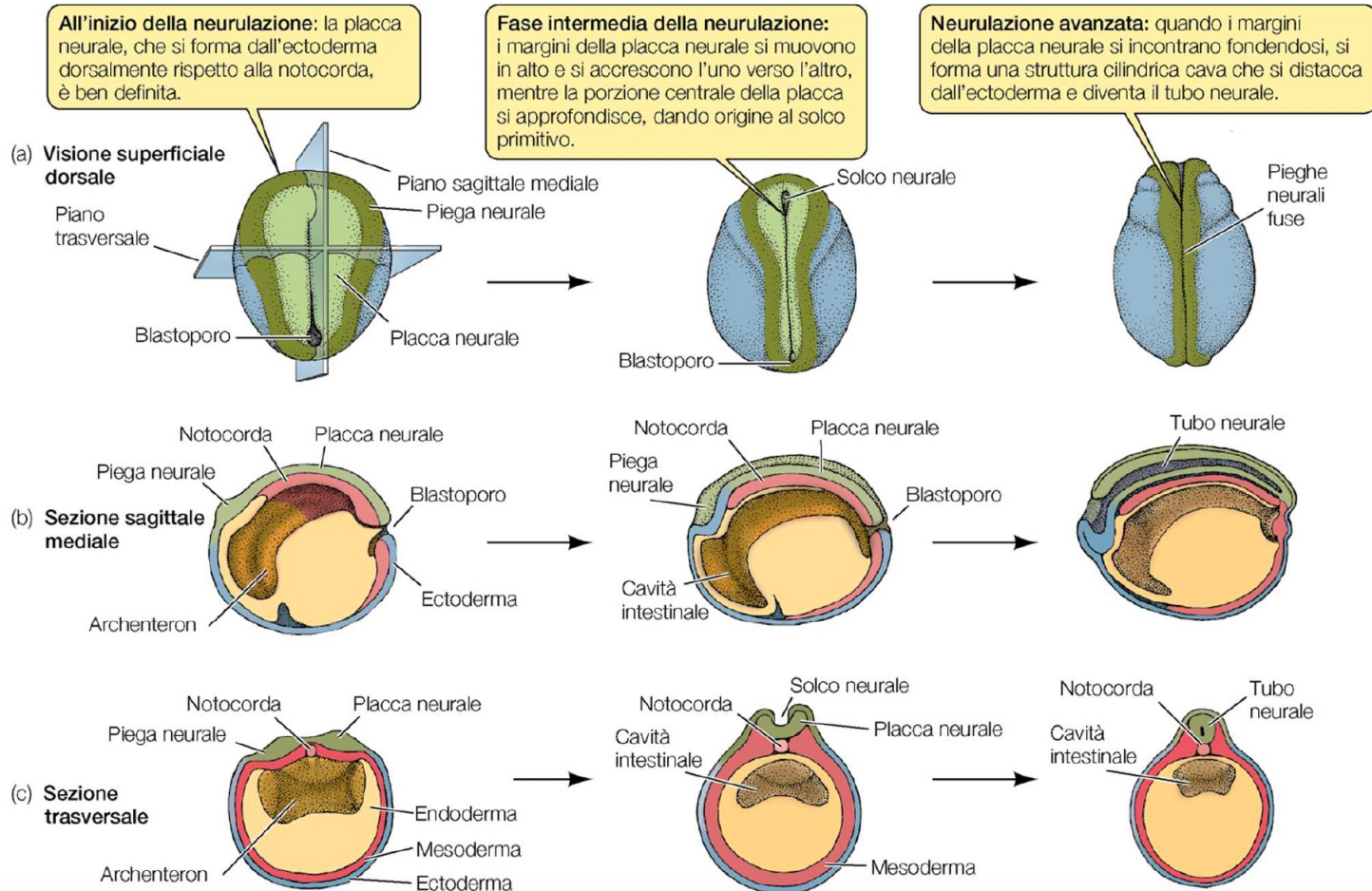
- Disco germinativo piatto — gastrulazione via stria primitiva
- Chiusura bidirezionale dal mesencefalo (HH8-9)
- Chimera quaglia-pollo (Le Douarin) — mappa creste neurali
- Creste craniali: maggiore contributo osseo rispetto a Xenopus

## Sus scrofa

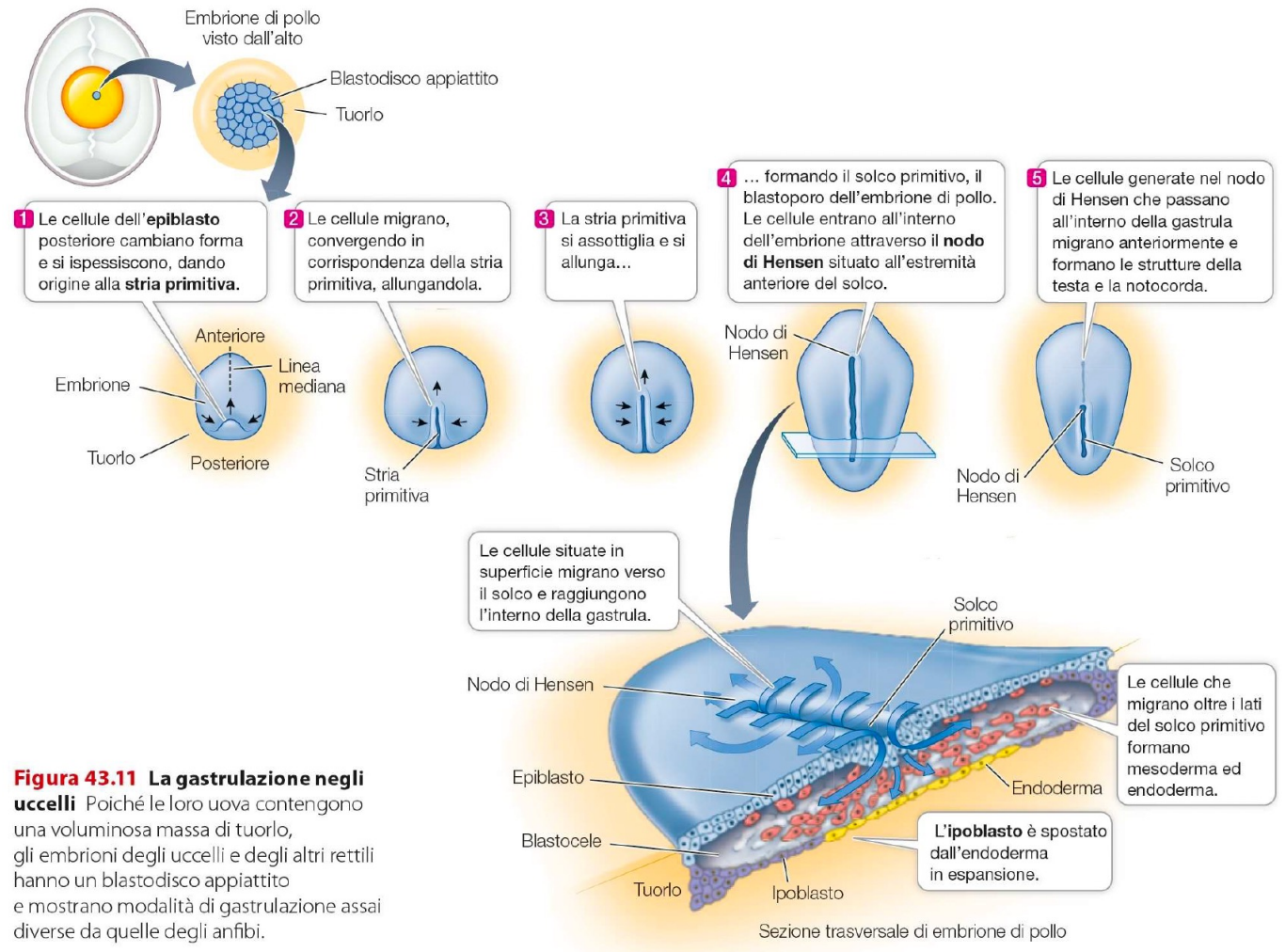
- Disco piatto come Gallus — sviluppo intrauterino
- Siti multipli di chiusura (S1 cervicale, S2, S3) simultanei
- Timing lungo: creste craniali E14-15, tronco E15-17
- Modello preclinico DTN: metabolismo folato e taglia intestino simili a umano

*GRN molecolare identica — BMP-FGF-Wnt → Pax3/Zic1 → Snail/Sox: sinapomorfia dei vertebrati*

## Xenopus laevis – Neurulazione



# La Neurulazione Pollo



**Figura 43.11 La gastrulazione negli uccelli** Poiché le loro uova contengono una voluminosa massa di tuorlo, gli embrioni degli uccelli e degli altri rettili hanno un blastodisco appiattito e mostrano modalità di gastrulazione assai diverse da quelle degli anfibi.

# Neurulazione – Chiusura del Tubo Neurale

A → F: sequenza di chiusura



- A – placca piatta
- B – solco neurale
- C – pieghe si alzano
- D – cresta neurale
- E – tubo chiuso
- F – ~~canale neurale~~ ganglio spinale

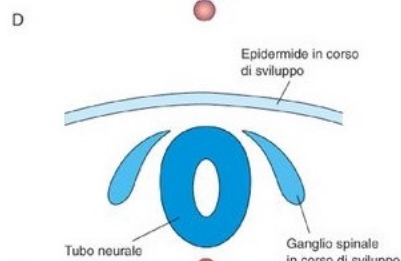
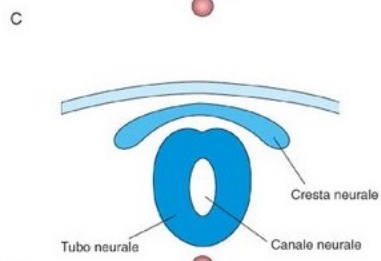
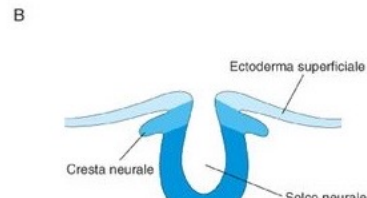
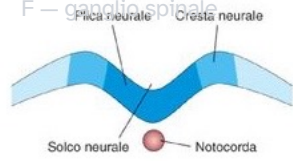
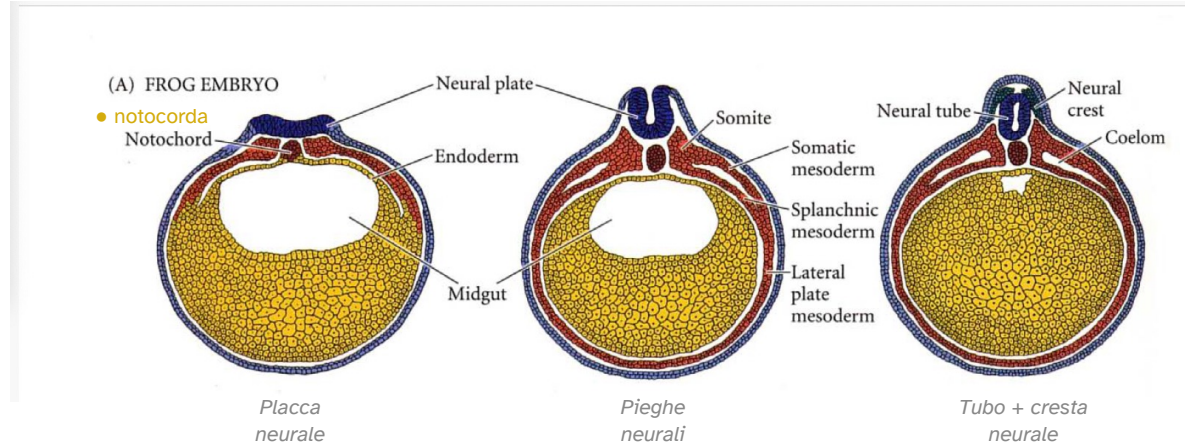


Figura 4-10. Disegni schematici di sezioni trasverse di embrioni in fasi successive dello sviluppo: è illustrata la formazione del solco neurale, delle pliche neurali, del tubo neurale e della cresta neurale.

Moore, Persaud  
Lo sviluppo prenatale dell'uomo, II Ed.  
EdiSES Edises

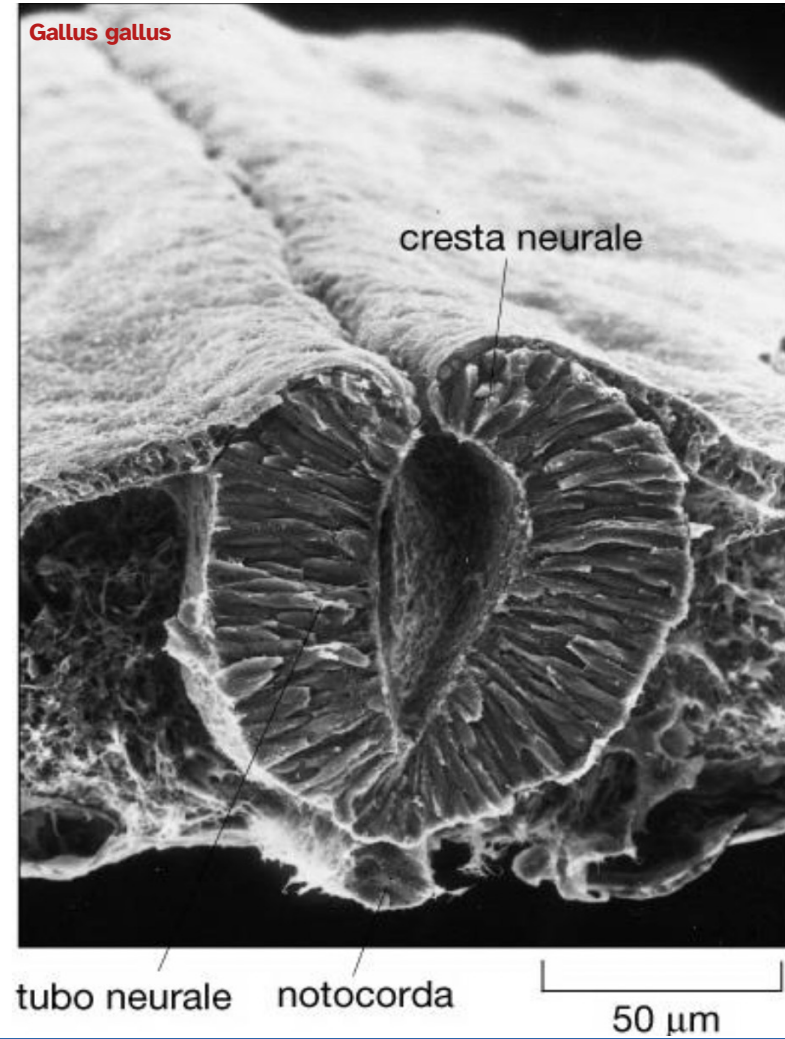
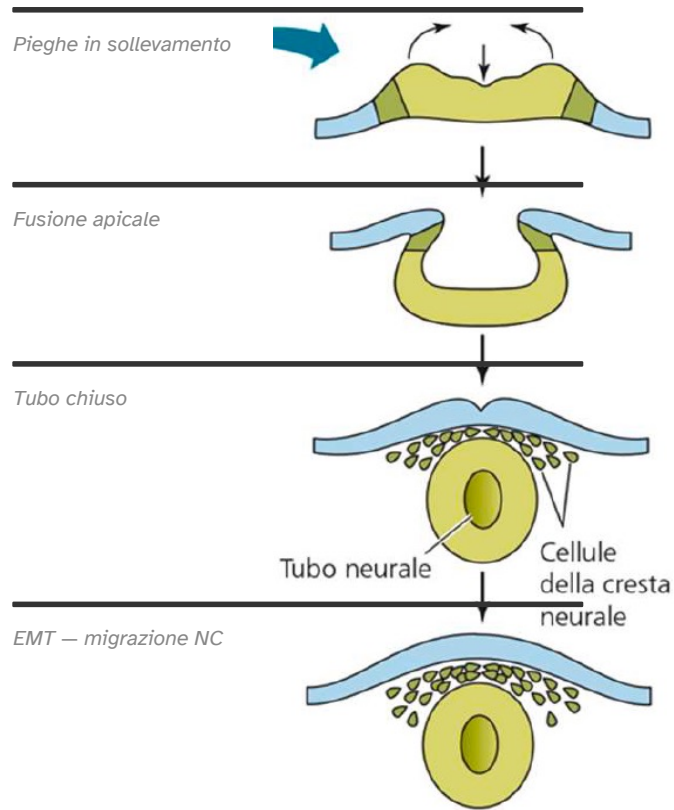
## Xenopus laevis



Xenopus – sezioni trasversali comparative

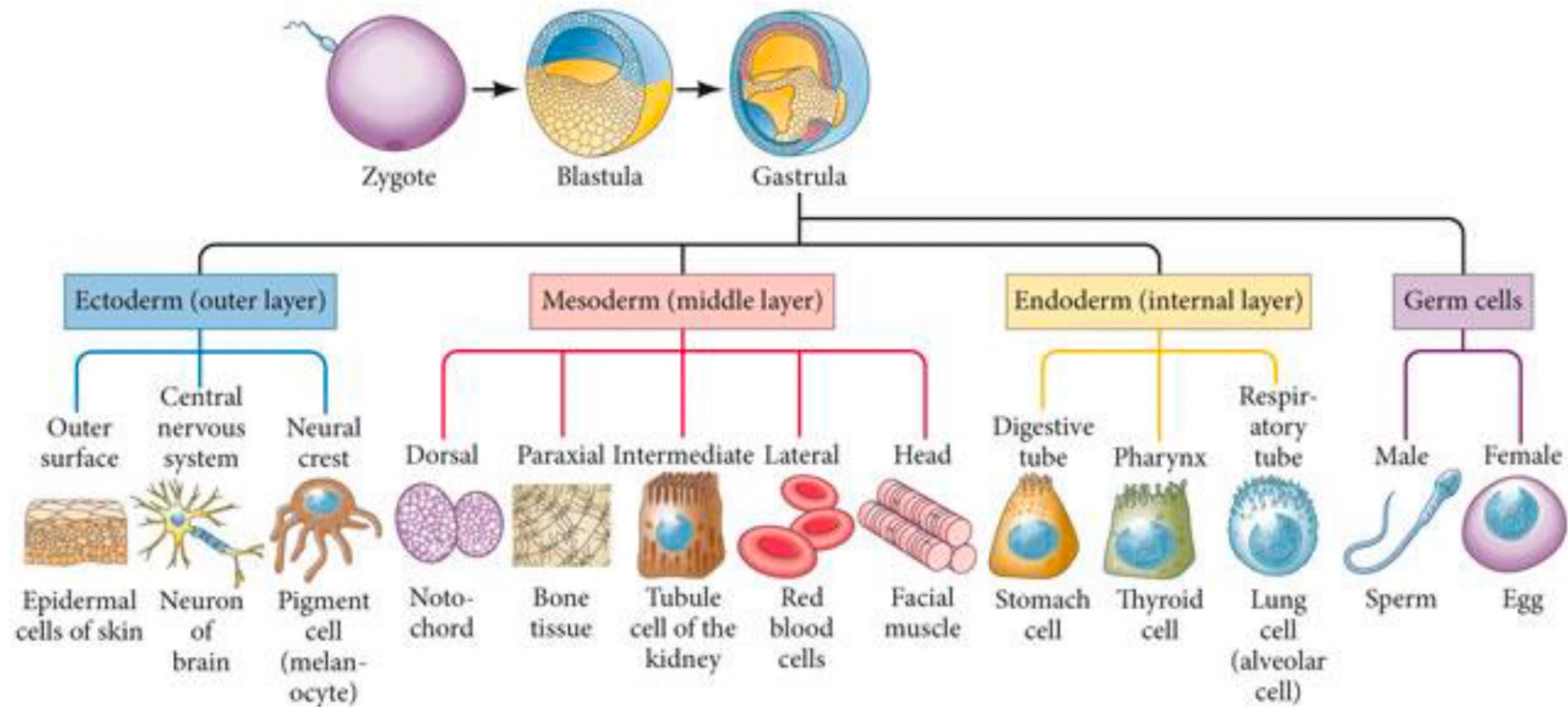
# Neurulazione — Creste Neurali: EMT e Migrazione

Schema — pieghe → tubo → EMT



SEM —  
embrione di pollo  
in neurulazione

# La gastrulazione è seguita dalla fase di differenziamento cellulare e organogenesi



DEVELOPMENTAL BIOLOGY 11e, Figure 1.7  
© 2016 Sinauer Associates, Inc.

# Organogenesi

Dal foglietto germinale all'organo – come tre strati cellulari costruiscono un organismo

L'organogenesi è la fase dello sviluppo embrionale che segue la gastrulazione: i tre foglietti germinali – ectoderma, mesoderma ed endoderma – si differenziano e interagiscono attraverso segnali induttivi per generare tutti gli organi e i tessuti dell'organismo adulto. La logica di fondo è conservata in tutti i Metazoi: stessa gerarchia di foglietti, stessi geni, stessa sequenza.



Wolpert cap. 5-6

## Argomenti del modulo:

- 1 Derivati principali dei foglietti
- 2 Segmentazione del mesoderma parassiale e formazione dei somiti
- 3 Clock molecolare Notch/Wnt – modello Cooke-Zeeman
- 4 Destino dei somiti: sclerotomo · miotomo · dermatomo
- 5 Asse antero-posteriore e codice Hox

### ECTODERMA NEURALE

1. Tubo neurale → encefalo e derivati, midollo spinale
2. Creste neurali → gangli spinali e simpatici, cromatofori, componenti scheletriche del cranio, odontoblasti

ECTODERMA → placodi e derivati, stomodeo e proctodeo, epidermide e derivati

**MESODERMA**

Somite

- Notocorda
- Miotomo
- Dermatomo
- Sclerotomo

Peduncolo del somite

App. escretore

Aorta

Celoma

Piastra laterale

- Strato parietale (somatopleura)
- Strato viscerale (splanchnopleura)

Angioblasti

ENDODERMA → faringe e derivati (**app. respiratorio**)  
 esofago, stomaco, intestino, polmone, fegato, pancreas  
 Gh. Endocrine, org. linfatici

Miotomo → Muscoli

Dermatomo → Derma

Sclerotomo → Vertebre

Rene

Dotto urinario primario

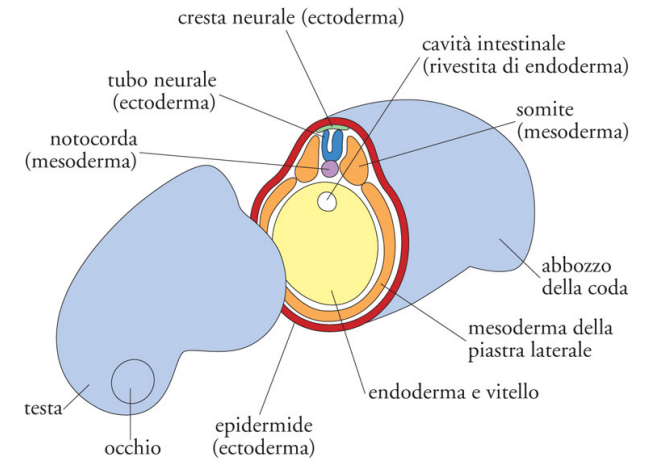
Gonade

Peritoneo

Cavità del corpo

Muscolo liscio

Cuore, vasi sanguigni



# Foglietti Germinali – Derivati Principali

Tre strati, una logica condivisa tra tutti i Metazoi – Wolpert cap. 5

ECTODERMA	MESODERMA	ENDODERMA
<b>Sistema nervoso centrale</b> encefalo, midollo spinale, retina	<b>Muscolo striato scheletrico</b> da miotomo dei somiti	<b>Epitelio gastroenterico</b> esofago → retto
<b>Sistema nervoso periferico</b> creste neurali → gangli, SNP	<b>Muscolo cardiaco e liscio</b> mesoderma laterale e splanchnico	<b>Fegato e pancreas</b> evaginazioni del tubo intestinale
<b>Epidermide</b> cheratinociti, annessi cutanei	<b>Scheletro assile</b> da sclerotomo — vertebre, coste	<b>Polmone e vie aeree</b> evaginazione dalla faringe
<b>Placodi sensoriali</b> cristallino, orecchio interno, olfatto	<b>Scheletro appendicolare</b> mesoderma della lamina laterale	<b>Tiroide, paratiroide, timo</b> tasche faringee endodermiche
<b>Adenoipofisi</b> da placodo ipofisario (Rathke)	<b>Apparato cardiovascolare</b> cuore, vasi, sangue	<b>Vescica e uretra</b> seno urogenitale
<b>Smalto dentario</b> ameloblasti di origine ectodermica	<b>Rene, gonadi, surreni</b> mesoderma intermedio	
	<b>Derma, connettivo</b> da dermatomo e mesoderma laterale	

# Mesoderma Parassiale – Segmentazione e Somitogenesi

Dal mesoderma non segmentato ai somiti epiteliali – Wolpert cap. 5

## Organizzazione del mesoderma

- Il mesoderma postgastrulazione si suddivide in tre domini longitudinali: mesoderma parassiale (flanking la notocorda), mesoderma intermedio (rene, gonadi) e lamina laterale (somatopleura + splancnopleura)
- Il mesoderma parassiale è bilaterale, non segmentato inizialmente – si organizza in presomitic mesoderm (PSM) posteriormente e somiti anteriormente via processi di epithelizzazione progressiva

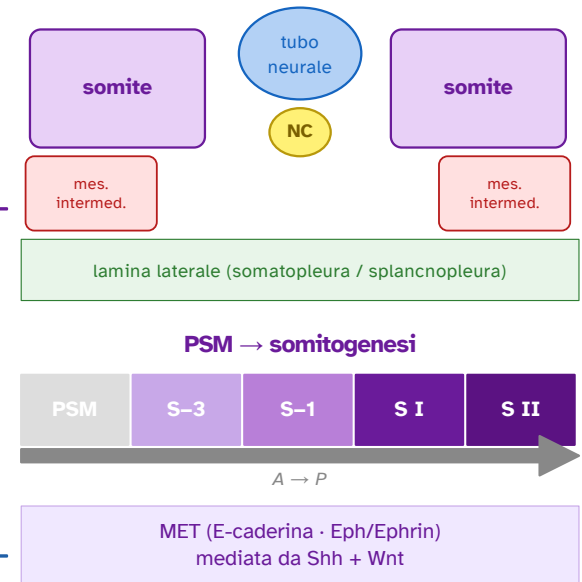
## Formazione dei somiti

- I somiti si formano per segmentazione periodica del PSM: ogni nuovo somite si stacca dall'estremità anteriore del PSM per MET (transizione mesenchima-epitelio), mediata da E-caderina e Eph/Ephrin
- Il confine tra somiti adiacenti è definito dalla regola della 'segmentation clock': un'onda di espressione genica che attraversa il PSM e viene 'letta' da un fronte di determinazione posizionale (wavefront)
- Ciascun somite è inizialmente una sfera epiteliale con cavità interna (somitocoele); successivamente si regionalizza in sclerotomo ventrale (Shh/FGF) e dermomiotomo dorsale (Wnt/BMP)

## Numero e timing – conservazione filogenetica

- Zebrafish: 1 somite ogni 30 min a 28°C – 30 somiti totali. Xenopus: 1/90 min a 23°C. Gallus: 1/90 min a 38°C – 52 somiti. Mus: 1/2h – 65 somiti. Sus: 1/4h – ~55 somiti

Sezione trasversale – organizzazione mesoderma



# Clock Molecolare — Modello Cooke-Zeeman

Segmentation clock Notch/Wnt/FGF e wavefront di determinazione posizionale

## Il modello clock & wavefront (Cooke e Zeeman, 1976)

- Due componenti distinte cooperano: un oscillatore (clock) — onda periodica di espressione genica che percorre il PSM in senso P→A — e un fronte di maturazione (wavefront) — soglia di concentrazione di morfogeni che avanza gradualmente
- Quando un'onda del clock raggiunge il wavefront, viene 'cristallizzata' in un confine intersomite: il somite si stacca dal PSM. La periodicità dell'oscillatore determina la dimensione dei somiti, la velocità del wavefront la loro posizione

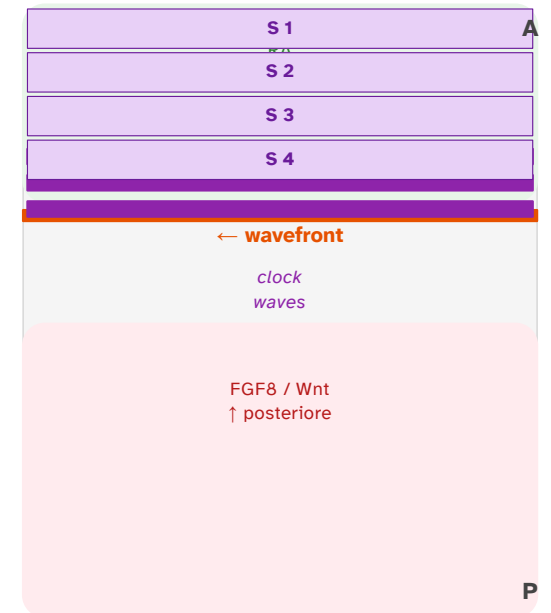
## Geni del clock — Notch/Wnt/FGF

- Il clock è alimentato da oscillazioni in controfase di tre pathway: Notch (Lunatic fringe, Hes7, Dll1/3), Wnt (Axin2, Dkk1) e FGF (Dusp4/6). Periodo: 30 min (zebrafish), 90 min (pollo), 2h (topo)
- Notch è il pacemaker primario: Hes7 si auto-reprime con ritardo (~20 min) creando un'oscillazione sostenuta. Lunatic Fringe glicosila il recettore Notch modificandone la sensibilità al ligando Dll1

## Il wavefront — gradiente FGF/Wnt vs RA

- FGF8 e Wnt3a sono prodotti dalla coda dell'embrione → gradiente decrescente A→P che mantiene il PSM nello stato indifferenziato. L'acido retinoico (RA), prodotto anteriormente, contrograda e abbassa FGF/Wnt — il punto di equilibrio è il wavefront
- Proof of concept: inibizione di FGF (SU5402) arresta il wavefront → somiti giganti; incremento di FGF sposta il wavefront → somiti piccoli. Identico risultato con manipolazione di RA

Schema clock & wavefront



## Destino dei Somiti – Sclerotomo, Miotomo, Dermatomo

La regionalizzazione dorsoventrale è mediata da gradienti Shh/BMP/Wnt – Wolpert cap. 5

### Regionalizzazione del somite

- Il somite epiteliale si suddivide rapidamente in due domini: il dermomiotomo dorsale (mantenuto epiteliale da Wnt1/3a della cresta neurale + BMP dorsale) e lo sclerotomo ventrale (indotto da Shh dalla notocorda e dal floor plate)
- La soglia di Shh determina l'identità: alta concentrazione → sclerotomo (Pax1, Pax9, Sox9); concentrazione intermedia → compartimento mediale del dermomiotomo (Myf5); bassa → dermomiotomo laterale (Pax3, Pax7)

### Sclerotomo – scheletro assile

- Seconda EMT → migrazione attorno alla notocorda → condensazione in cartilagine (Sox9 → CollageneII) → vertebre e coste. Regola di Remak (risegmentazione): ogni vertebra = metà posteriore somite N + metà anteriore somite N+1

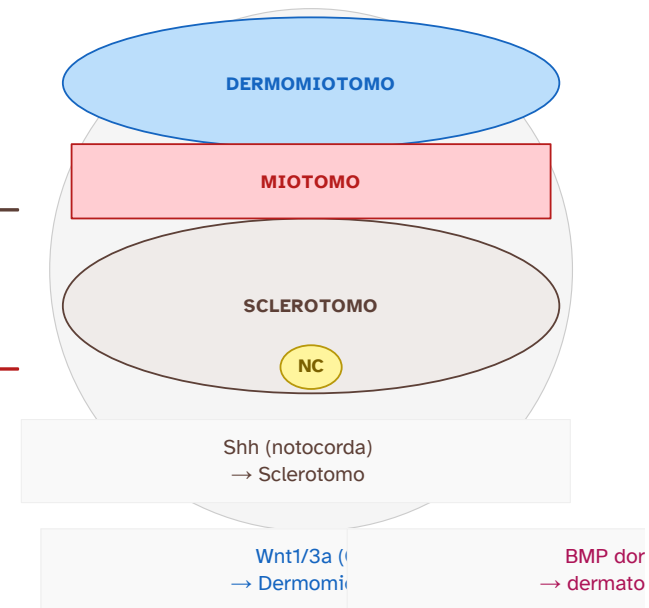
### Miotomo – muscolo scheletrico

- Le cellule del miotomo esprimono Myf5 e MyoD (fattori MRF – Myogenic Regulatory Factors); si allungano e si differenziano in miotubi. Il miotomo mediale → muscoli epassiali (paravertebrali); il miotomo laterale → muscoli ipossiali (parete toracica, addome, arti)
- Le cellule muscolari degli arti migrano a lunga distanza dal dermomiotomo sotto guida di HGF/Met; perdono l'espressione di Pax3/7 e si impegnano nel lignaggio muscolare definitivo

### Dermatomo – derma del dorso

- Il dermatomo (strato dorsale del dermomiotomo) genera i fibroblasti del derma assile. Wnt dalla cresta neurale e neurotropine mantengono le cellule del dermatomo in stato proliferativo; l'espressione di Dermo1 e Twist le indirizza al lignaggio connettivale

Sezione trasversale – destino del somite



# Asse Antero-Posteriore – Identità Hox

Collinearità spaziale e temporale dei geni Hox – Wolpert cap. 5-6

## I geni Hox – struttura

- I geni Hox codificano fattori di trascrizione omeodominio che specificano l'identità di posizione lungo l'asse A-P. Nei vertebrati: 4 cluster (HoxA, B, C, D) con 13 gruppi paralogici – 39 geni totali in mammiferi

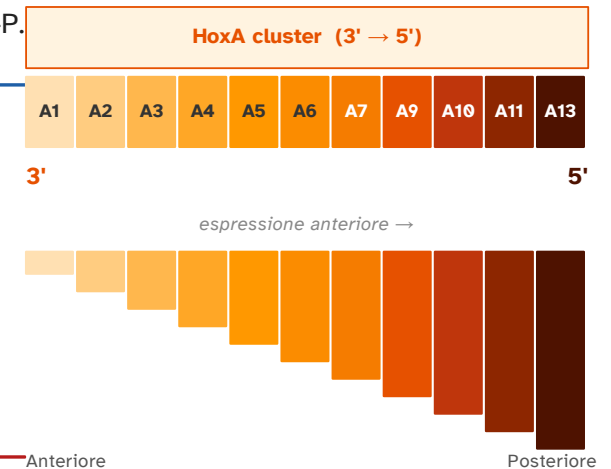
## Regolazione – acido retinoico e morfogeni

- L'acido retinoico (RA) è il principale induttore dell'espressione Hox posteriore: gradient RA alto → attiva geni Hox 5', RA basso → confina i geni 3' anteriori. FGF e Wnt rinforzano il gradiente posteriore
- Modificazioni epigenetiche (PRC2 → H3K27me3 per silenziare; Trithorax/MLL → H3K4me3 per attivare) mantengono il pattern Hox anche dopo la scomparsa del segnale induttivo – memoria cellulare della posizione

## Prove sperimentali

- Loss of function (knockout) di HoxB4 trasforma la vertebra C3 in C2 (occipitalizzazione). Gain of function (misexpression anteriore) di Hoxc8 trasforma costole cervicali in toraciche – trasformazione omeotica anteriore→posteriore (posteriorizzazione)

Cluster HoxA – collinearità



Anteriore

Posteriore

### Posterior prevalence

Hox 5' domina su 3' se coespresso – il gene più posteriore determina l'identità del segmento

# Cavità Encefaliche – Vescicole Cerebrali

Da tre a cinque vescicole: la regionalizzazione del tubo neurale anteriore – Wolpert cap. 6

## Vescicole primarie (stadio a 3 vescicole)

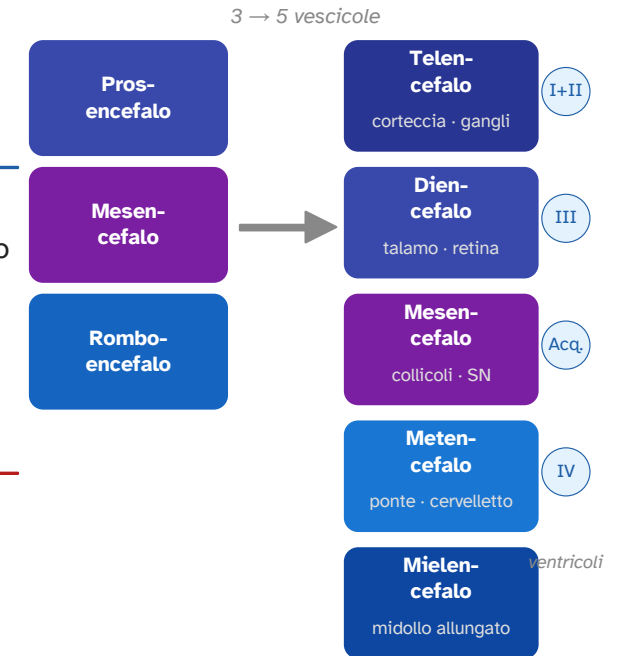
- Alla chiusura del neuroporo anteriore il tubo neurale si dilata in tre vescicole: prosencefalo, mesencefalo e rombencefalo. I confini sono definiti da restrizioni di espressione di Otx2 (pros+mes) vs Gbx2 (rombo). Il confine Otx2/Gbx2 all'istmo è un organizzatore che secreta FGF8 e Wnt1

## Vescicole secondarie (stadio a 5 vescicole)

- Il prosencefalo si suddivide in telencefalo (→ corteccia cerebrale, gangli della base, bulbo olfattivo) e diencefalo (→ talamo, ipotalamo, epifisi, retina). Il rombencefalo si suddivide in metencefalo (→ ponte, cervelletto) e mielencefalo (→ midollo allungato)
- Il mesencefalo rimane indiviso → tetto del mesencefalo (collicoli superiori e inferiori), tegmento, substantia nigra. La cavità del tubo neurale persiste come sistema ventricolare: ventricoli laterali (I, II) nel telencefalo, III ventricolo nel diencefalo, acquedotto nel mesencefalo, IV ventricolo nel rombencefalo

## Segmentazione del rombencefalo – rombomeri

- Il rombencefalo è segmentato in 8 unità trasversali – i rombomeri (r1-r8) – visibili morfologicamente e definiti da codici Hox specifici. I nervi cranici emergono in modo stereotipato: V da r2/r3, VII/VIII da r4, IX da r6, X da r7-r8. Le creste neurali migrano in stream separati da ciascun rombomero pari mantenendo identità Hox



## Vescicole Ottiche e Otiche – Organi di Senso

Induzione reciproca ectoderma-neuroepitelio – Wolpert cap. 6

### Vescicola ottica → occhio

- Il diencefalo emette le vescicole ottiche che inducono il placode del cristallino (Sox2, Pax6). La vescicola ottica invagina → coppa ottica a doppia parete: strato interno → retina neurosensoriale; strato esterno → epitelio pigmentato (RPE). Il peduncolo ottico → nervo ottico
- Pax6 è il master regulator dell'occhio, conservato da *Drosophila* (eyeless) ai vertebrati. Il processo è un classico di induzione reciproca: vescicola → placode; placode → rinforza la coppa

### Placodo otico → orecchio interno

- Il placode otico è indotto dal rombencefalo (FGF3/10 da r5-r6). Invagina → otocisti (Pax2, Sox9, Atoh1): porzione dorsale → canali semicircolari, utricolo, sacculo; porzione ventrale → coclea (organo del Corti). Knockout di Atoh1 → assenza di cellule ciliate

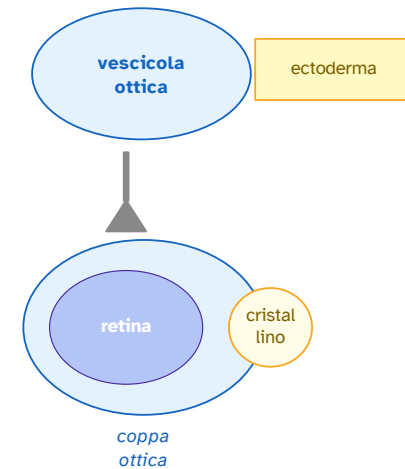
### Placodi cranici – quadro generale

- Tutti i placodi originano dalla regione di pre-placode (PPR, Dlx3/5, Six1/4) attorno al prosencefalo. Include: placodo ipofisario (Rathke → adenoipofisi), placodi dei gangli cranici (V, VII, IX, X), placode olfattivo (→ neuroni GnRH), placode del cristallino



From:  
DOI: [10.1242/dev.124.23.4819](https://doi.org/10.1242/dev.124.23.4819)

Formazione coppa ottica



Otocisti → orecchio interno

Canali  
semicirc.

Utricolo  
Sacculo

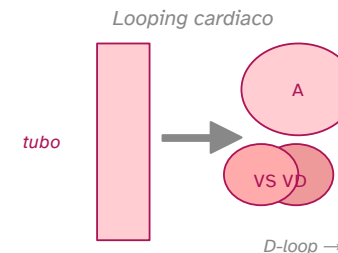
Coclea  
(Corti)

# Cardiogenesi e Mesonefro

Il primo organo funzionale e il rene embrionale transitorio – Wolpert cap. 6

## Cardiogenesi – formazione del cuore

- Il cuore origina dal mesoderma splanchnico anteriore (cardiogenic crescent). Due popolanti: First Heart Field (FHF, *Nkx2.5+*, *Tbx5+*) → ventricolo sinistro e atri; Second Heart Field (SHF, *Isl1+*, *FGF10+*) → ventricolo destro e tratto di efflusso
- Il tubo cardiaco primitivo subisce il D-loop verso destra, guidato da *Nodal-Lefty-Pitx2* che stabiliscono l'asimmetria sinistra-destra. Anomalie del looping → situs inversus o heterotaxia
- La septazione in 4 camere avviene tramite cuscinetti endocardici (EMT, *TGFβ/BMP*) e setto interventricolare muscolare. Il foramen ovale si chiude alla nascita con l'aumento della pressione polmonare



## Mesonefro – rene transitorio

### Tre reni in sequenza

- Pronefro (vestigiale) → mesonefro (transitorio, funzionale in pesci e anfibi) → metanefro (definitivo nei tetrapodi)

### Mesonefro

- Mesoderma intermedio toracico-lombare. Dotti di Wolff: nel maschio → epididimo, deferente; nella femmina regrediscono (cisti di Gartner)

### Induzione del metanefro

- Gemma ureterale + blastema metanefrico → *GDNF/Ret* → ramificazione dicotomica → pelvi, calici, tubuli. *Wnt9b* → tubuli e glomeruli

# Stomaco, Intestino e Sviluppo Polmonare

Rotazione gastrica, anse intestinali e ramificazione bronchiale – Wolpert cap. 6

## Stomaco – rotazione e morfogenesi

- Dilatazione del foregut → rotazione 90° oraria (curvatura maggiore a sinistra) + 45° dorsoventrale (piloro in alto a destra).

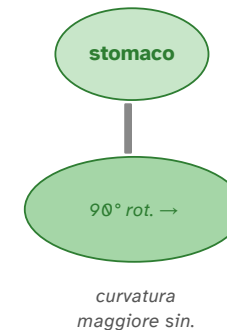
## Intestino – anse e rotazione

- Intestino medio cresce > cavità addominale → erniazione ombelicale fisiologica (5<sup>a</sup>-10<sup>a</sup> sett.) con rotazione 90° antioraria attorno all'arteria mesenterica superiore
- Al rientro (10<sup>a</sup> sett.) ulteriori 180° antiorari → duodeno retroperitoneale, colon ascendente dx, discendente sin. Anomalie → malrotazione, volvolo, situs inversus viscerum

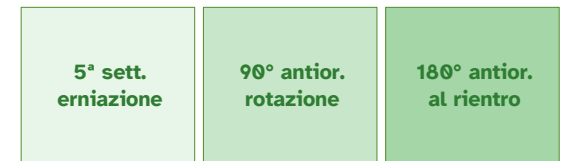
## Nota – Sviluppo tardivo dell'apparato polmonare

- Evaginazione ventrale del foregut (≈ 4<sup>a</sup> sett.) → diverticolo respiratorio → trachea + bronchi. Ramificazione bronchiale dicotomica guidata da FGF10/FGFR2b → 23 generazioni nell'umano
- 4 fasi: pseudoghiandolare (5<sup>a</sup>-17<sup>a</sup> sett., ramificazione) → canalicolare (16<sup>a</sup>-25<sup>a</sup>, vascolarizzazione) → sacculare (24<sup>a</sup>-38<sup>a</sup>, sacchi terminali) → alveolare (36<sup>a</sup> sett.→2 anni postnati). Surfactante (DPPC, pneumociti II) critico per sopravvivenza del prematuro
- La maggior parte degli alveoli si forma postnatalmente: neonato ~30 milioni → adulto 300-500 milioni in 2 anni (PDGF-A + elastina)

Rotazione intestinale



## Ansa intestinale



## Fasi sviluppo polmonare

