

Figura 5.1 Le prime divisioni mitotiche e la compattazione dell'embrione.

Da sinistra a destra, sono mostrate schematicamente le prime fasi della segmentazione; notare i piani della seconda divisione mitotica, perpendicolari fra loro ed entrambi perpendicolari rispetto alla prima mitosi. Fino allo stadio a 8 cellule, i blastomeri sono quasi sferici e poco aderenti fra loro. Con l'ulteriore proliferazione cellulare, si assiste al compattamento dell'embrione, visibile in superficie grazie all'appiattimento delle superfici dei blastomeri (vedi anche Figura 5.3)

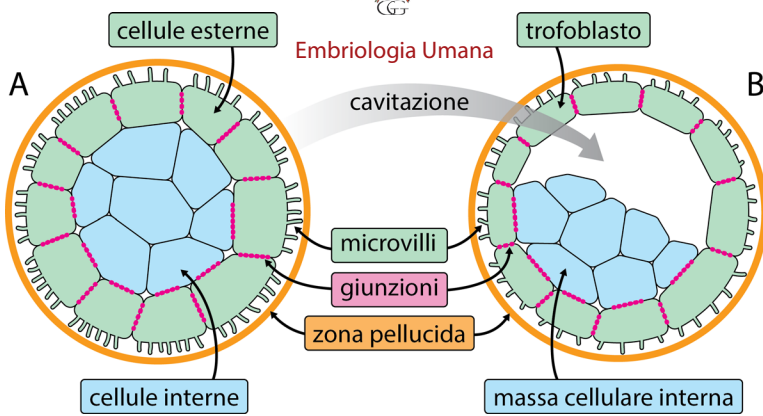


Figura 5.2 Dalla morula alla blastocisti.

Nella morula compattata (A) i blastomeri assumono una forma poliedrica; si iniziano a distinguere cellule interne (celeste) e cellule esterne (verde); queste ultime sono chiaramente polarizzate: la superficie rivolta verso la zona pellucida (arancione) presenta microvilli, mentre le superfici baso-laterali aderiscono alle cellule adiacenti tramite giunzioni intercellulari (rosa).

Con la cavitazione, cioè la confluenza di fluido interstiziale in una singola cavità interna (il blastocele), l'embrione prende il nome di blastocisti (B); le cellule esterne rappresentano il trofoblasto, quelle interne costituiscono la massa cellulare interna.

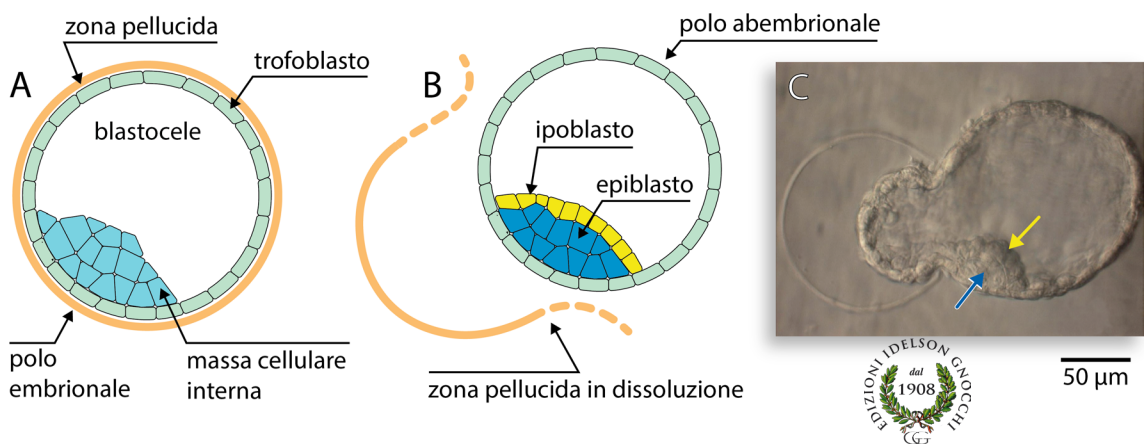


Figura 5.3 *Formazione dell'epiblasto e dell'ipoblasto, schiusa della blastocisti.*

Embriologia Umana

A) Schema di blastocisti a 4 giorni, prima della schiusa; è avvenuto il differenziamento fra trofoblasto e massa cellulare interna. B) Schema di blastocisti a 6 giorni, al momento della schiusa; la massa cellulare interna si suddivide in ipoblasto (o endoderma primitivo) e epiblasto (o ectoderma primitivo). C) Microfotografia in vitro di blastocisti durante la schiusa; le frecce blu e gialla indicano, rispettivamente, epiblasto e ipoblasto.

Tabella 5.1. Cellule staminali derivabili da alcune tappe di sviluppo.

Stadio	Sorgente	Cellula staminale	Abbr.
Blastocisti precoce	massa cellulare interna	c. embrionale staminale	ES
Blastocisti tardiva	ipoblasto	c. staminale dell'endoderma primitivo	EPS
	epiblasto	c. staminale dell'epiblasto	EpiS
	trofoblasto	c. staminale del trofoblasto	TS
Embrione	gonadi in sviluppo	c. embrionale germinale	EG
Adulto	cellule somatiche differenziate	c. staminale pluripotente indotta (tramite riprogrammazione)	iPS
	nicchie staminali in diversi tessuti	c. staminale dell'adulto	



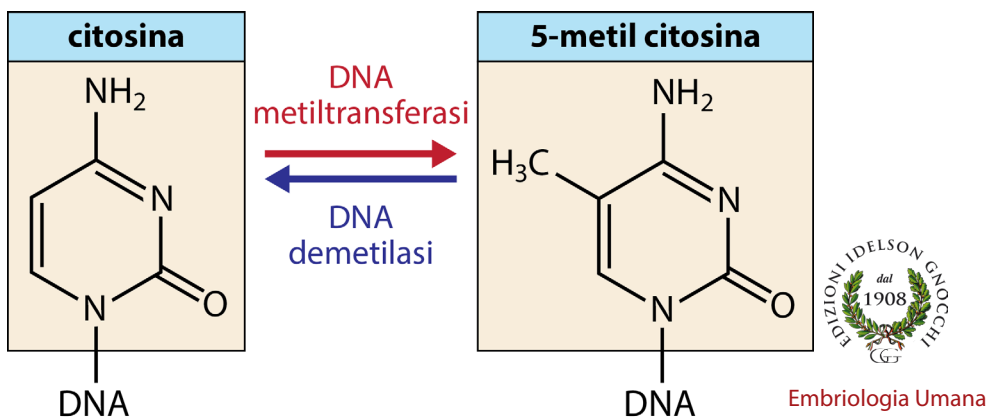
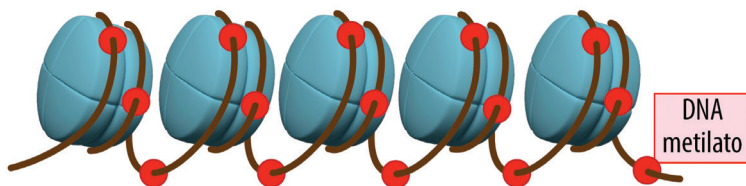


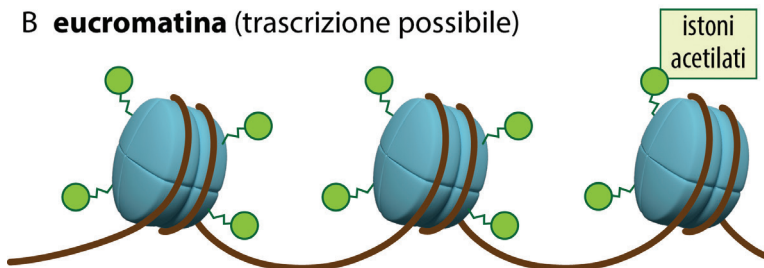
Figura 5.4 Metilazione del DNA.

Gli enzimi metiltransferasi sono in grado di aggiungere un gruppo metile in posizione 5 nelle citosine del DNA appartenenti a sequenze CpG; le DNA demetilasi sono responsabili del processo inverso di rimozione del gruppo metile. La metilazione del DNA inibisce la trascrizione genica (vedi Figura 5.6).

A **eterocromatina** (trascrizione impedita)



B **eucromatina** (trascrizione possibile)



Embriologia Umana

Figura 5.5 Modificazioni epigenetiche della cromatina.

Lo schema illustra in modo semplificato due fra le modificazioni epigenetiche meglio conosciute: la metilazione del DNA e la acetilazione degli istoni dei nucleosomi. A) Quando le citosine del DNA sono metilate, la cromatina è più compatta e la trascrizione è impossibile; B) la demetilazione del DNA e l'aggiunta di gruppi acetile alle proteine istoniche comportano invece la distensione della cromatina che, di conseguenza, diventa trascrivibile.

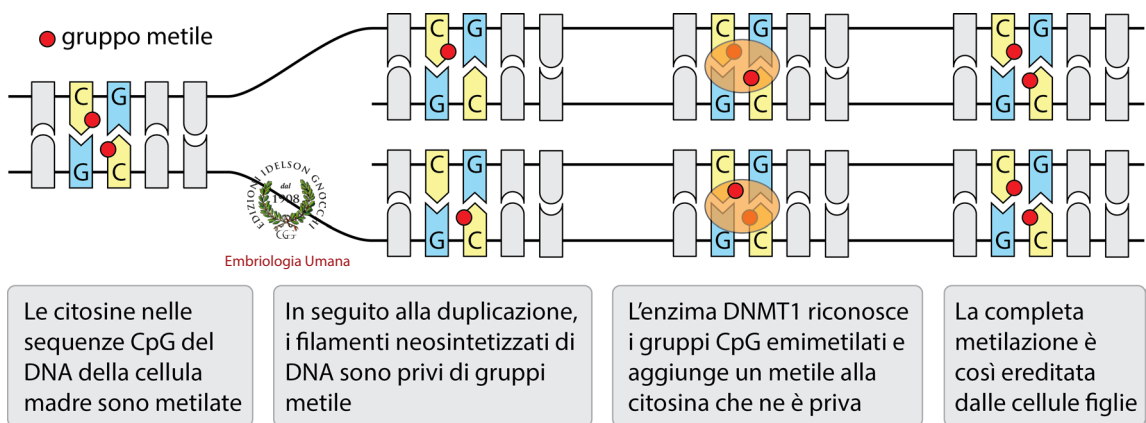


Figura 5.6 *Trasmissione ereditaria delle modificazioni epigenetiche.*

Lo schema illustra il meccanismo attraverso cui la metilazione del DNA è preservata da una generazione cellulare all'altra grazie all'intervento dell'enzima DNA metil-transferasi 1 (DNMT1) in seguito alla replicazione del DNA.



Riprogrammazione e clonazione

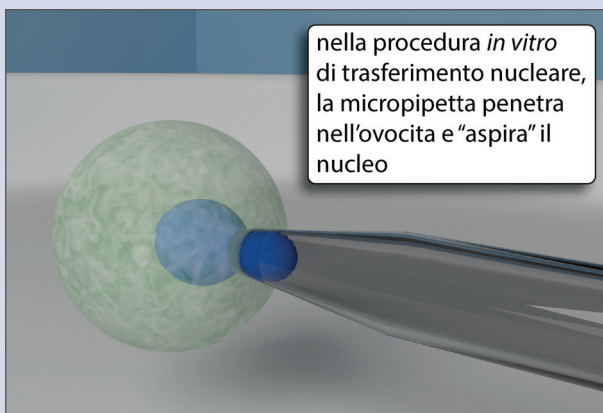
Le modificazioni epigenetiche sono alla base di procedure sperimentali *in vitro* di grande interesse teorico e applicativo. Forse la più famosa è il trasferimento nucleare da cellula somatica (*somatic cell nuclear transfer*, SCNT), la tecnica che ha consentito la **clonazione** di animali domestici.

Il metodo consiste nella rimozione del materiale nucleare da un ovocita (tipicamente nello stadio di metafase II), seguita dall'introduzione del nucleo di una cellula somatica terminalmente differenziata. In certi casi, ha luogo lo sviluppo di un embrione da cui origina un individuo geneticamente identico al donatore del nucleo.

Anche se l'efficienza del processo è bassa (solo una piccola percentuale degli embrioni così prodotti arriva a termine) il principio di base è di estremo interesse; la capacità dell'ovocita di cancellare le marcature epigenetiche (normalmente nei cromosomi propri e in quelli dello spermatozoo) comporta la radicale riprogrammazione del nucleo trasferito, che perde le marcature acquisite durante il precedente differenziamento e torna a essere totipotente.

La riprogrammazione epigenetica è anche il meccanismo che ha consentito la produzione *in vitro* di linee cellulari pluripotenti (*induced pluripotent stem*, **iPS**) a partire da cellule terminalmente differenziate prelevate da individui adulti. Tali linee sono state ottenute incubando le cellule differenziate in presenza di fattori di trascrizione già noti per il loro ruolo determinante nel mantenere la pluripotenza delle cellule embrionali in stadi precoci di sviluppo.

Nonostante le difficoltà a tradurre queste scoperte in concrete applicazioni cliniche, la disponibilità di cellule pluripotenti a partire da tessuti adulti potrebbe stimolare nuove strategie terapeutiche basate sulla produzione, a partire da iPS ottenute dal paziente, di cellule specializzate in grado di sostituire l'attività di cellule degenerate o ammalate (per esempio nel diabete, in malattie del sangue e neurodegenerative).



Embriologia Umana

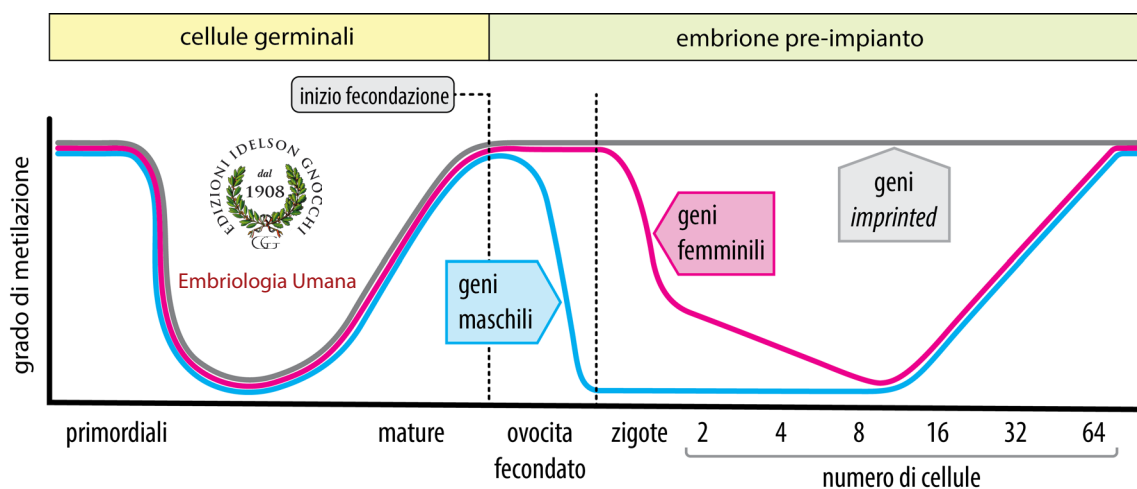


Figura 5.7 Variazioni nella metilazione del DNA nelle cellule germinali e nelle prime fasi di sviluppo embrionale. L'andamento dei livelli di metilazione nel tempo è mostrato separatamente per i geni di origine paterna, materna e *imprinted*. La marcatura epigenetica di tutto il genoma è cancellata nelle fasi precoci del differenziamento delle cellule germinali per essere poi progressivamente ripristinata con la maturazione dei gameti. In seguito alla fecondazione, si verifica una nuova caduta nei livelli di metilazione, con una precisa differenza fra geni di origine paterna e materna. Nei primi, la demetilazione avviene bruscamente e precocemente, prima ancora della formazione dello zigote, mentre nei secondi il processo inizia più tardi ed è più progressivo. In entrambi i casi si assiste al successivo ripristino della marcatura. Da questa seconda oscillazione è escluso il piccolo gruppo di geni *imprinted*, che conservano la marcatura acquisita durante le fasi tardive della gametogenesi.

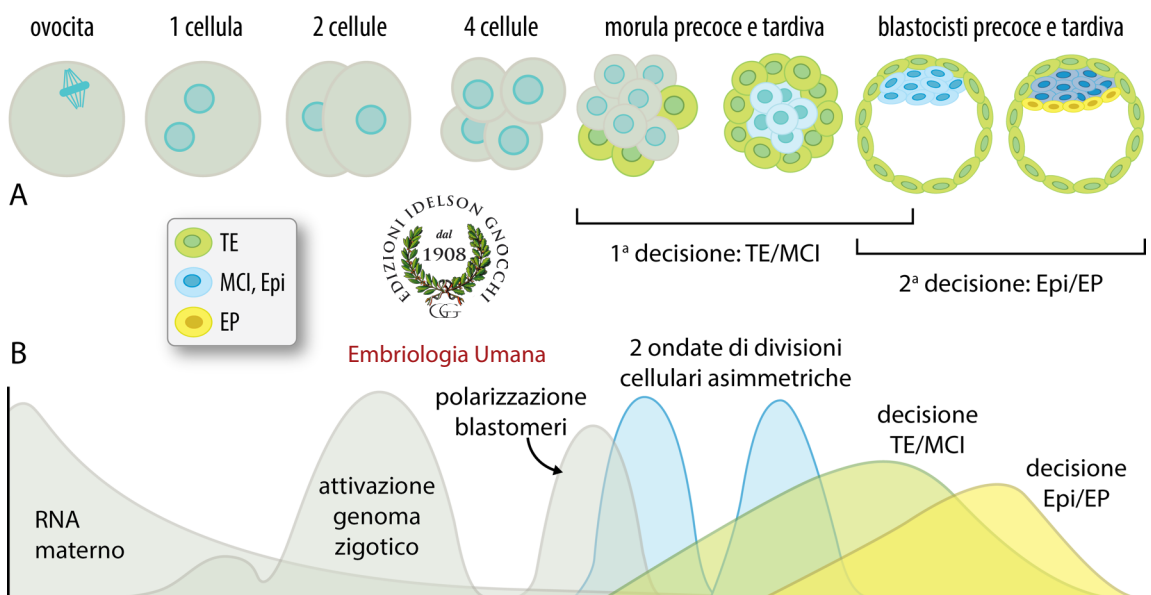
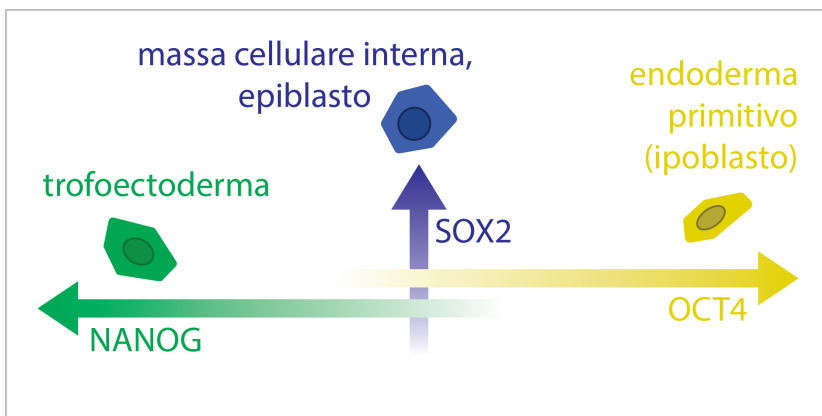


Figura 5.8 Prime decisioni differenziali e attività trascrizionale.

Lo schema illustra la relazione temporale fra le prime decisioni differenziali che avvengono nell'embrione di topo prima dell'impianto e le "ondate" di espressione di RNA nelle cellule embrionali. A) La prima scelta differenziale avviene nello stadio a 8-32 cellule, con la formazione della massa cellulare interna (MCI) e del trofoectoderma (TE). A questo stadio, il destino differenziale delle cellule è ancora reversibile, ma successivamente si stabilizza e non può più essere modificato. La seconda scelta consiste nel differenziamento fra epiblasto (Epi) e ipoblasto, o endoderma primitivo (EP). B) Nelle primissime fasi (fecondazione, formazione dello zigote, prima divisione mitotica) le attività cellulari sono sostenute da RNA di origine materna, precedentemente trascritti nell'ovocita. Questi RNA, destinati alla progressiva degradazione, sono sostituiti dalla prima attivazione del genoma dello zigote, che avviene intorno allo stadio a due cellule. Le fasi seguenti sono caratterizzate da successive ondate trascrizionali, ciascuna delle quali è associata a specifici momenti del differenziamento embrionale.



Embriologia Umana

Figura 5.9 Livelli di espressione dei fattori del differenziamento e destino delle cellule della blastocisti.

Il diagramma riassume in modo semplificato l'effetto delle concentrazioni relative di tre fattori del differenziamento sul destino di una cellula indifferenziata. Elevati livelli di OCT4, in assenza di NANOG, ne determinano il differenziamento in endoderma primitivo; livelli intermedi di OCT4 e la concomitante presenza di SOX2 e NANOG indurranno la formazione della massa cellulare interna e poi dell'epiblasto; il NANOG in assenza di OCT4 indurrà la formazione di trofoectoderma.