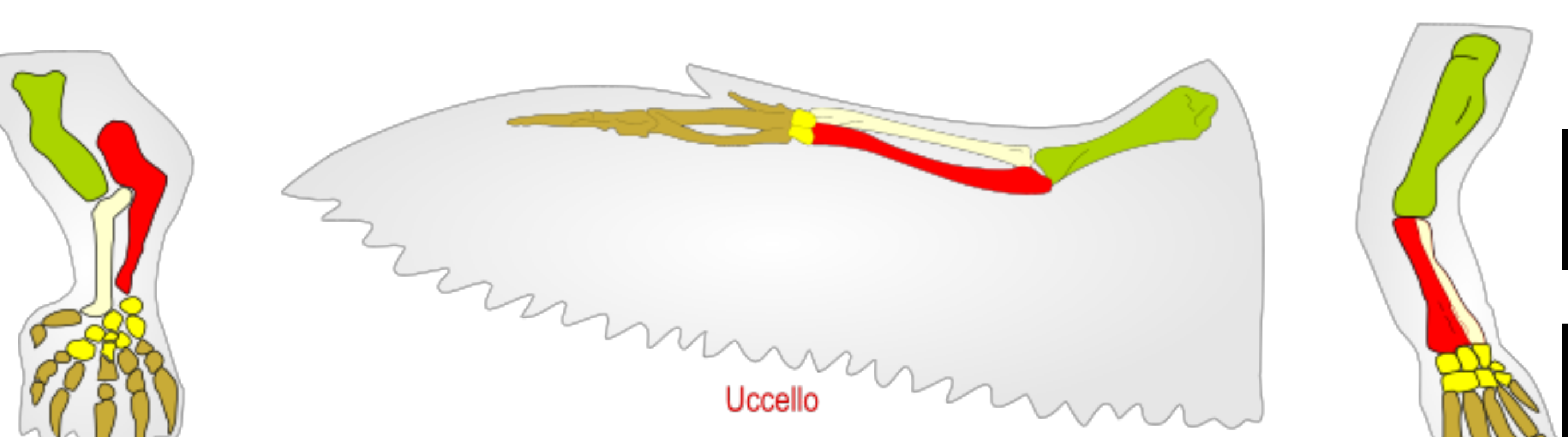
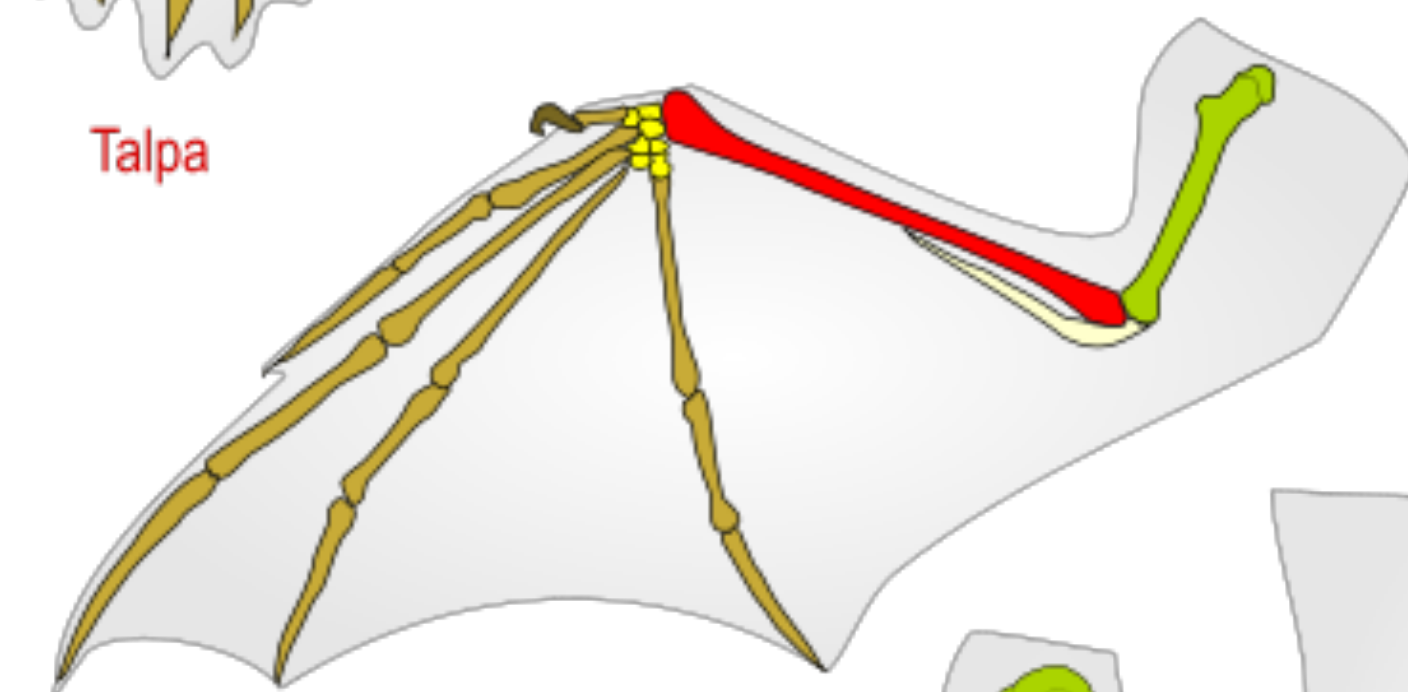


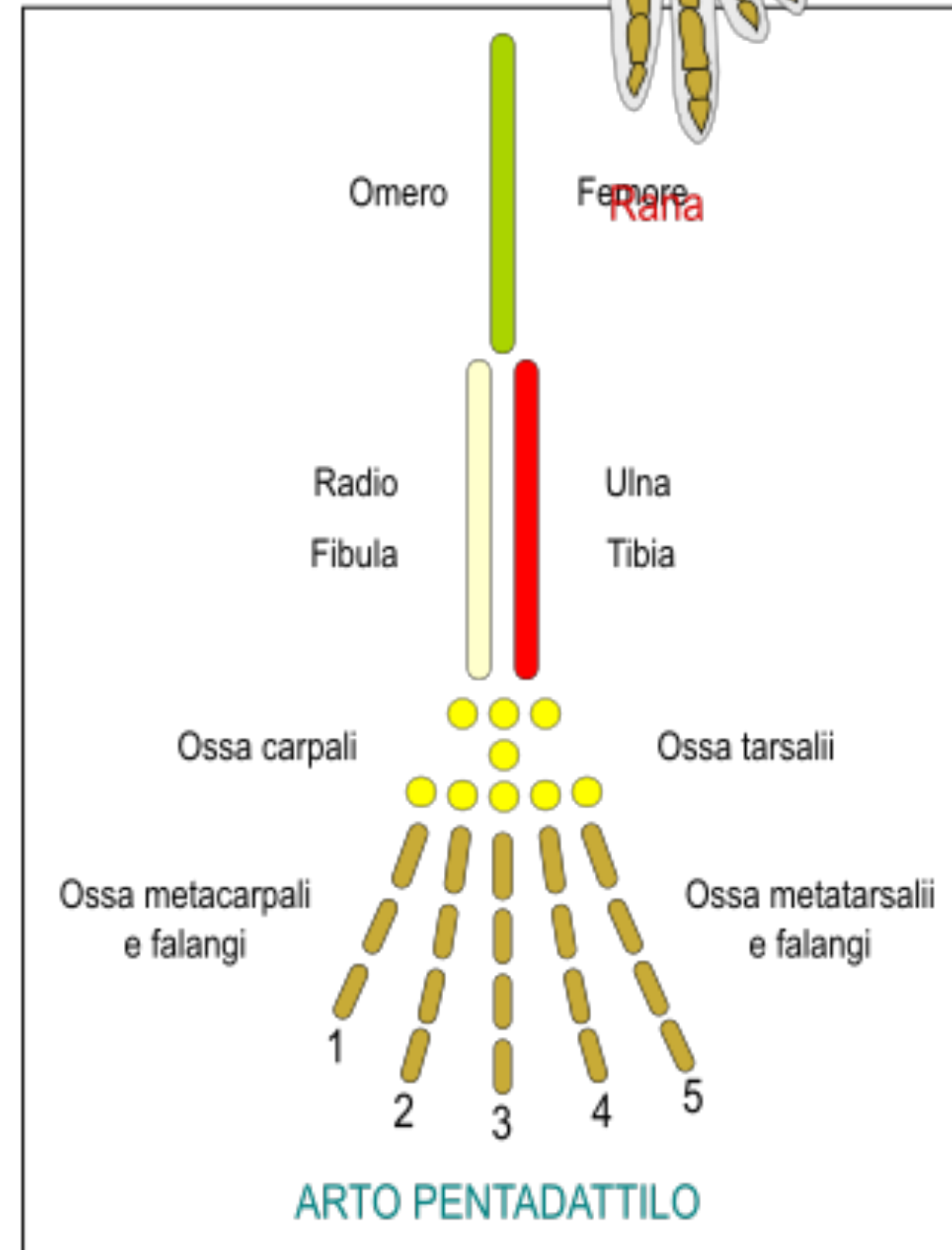
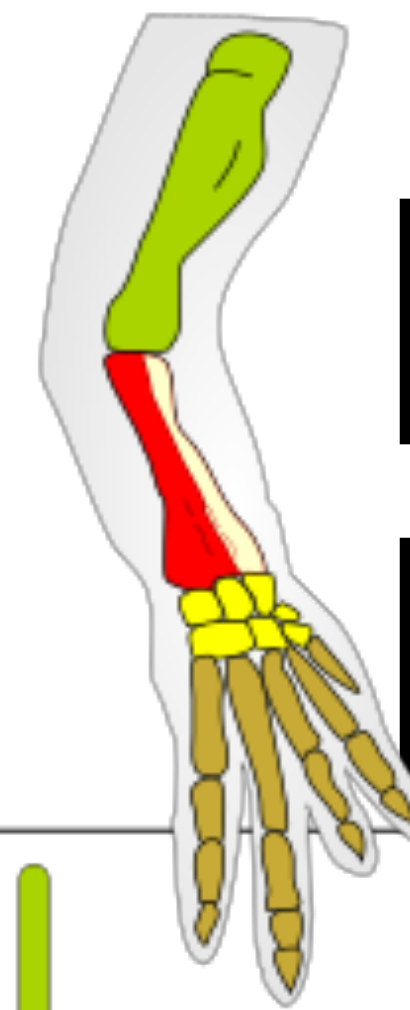
LO SVILUPPO DELL'ARTO



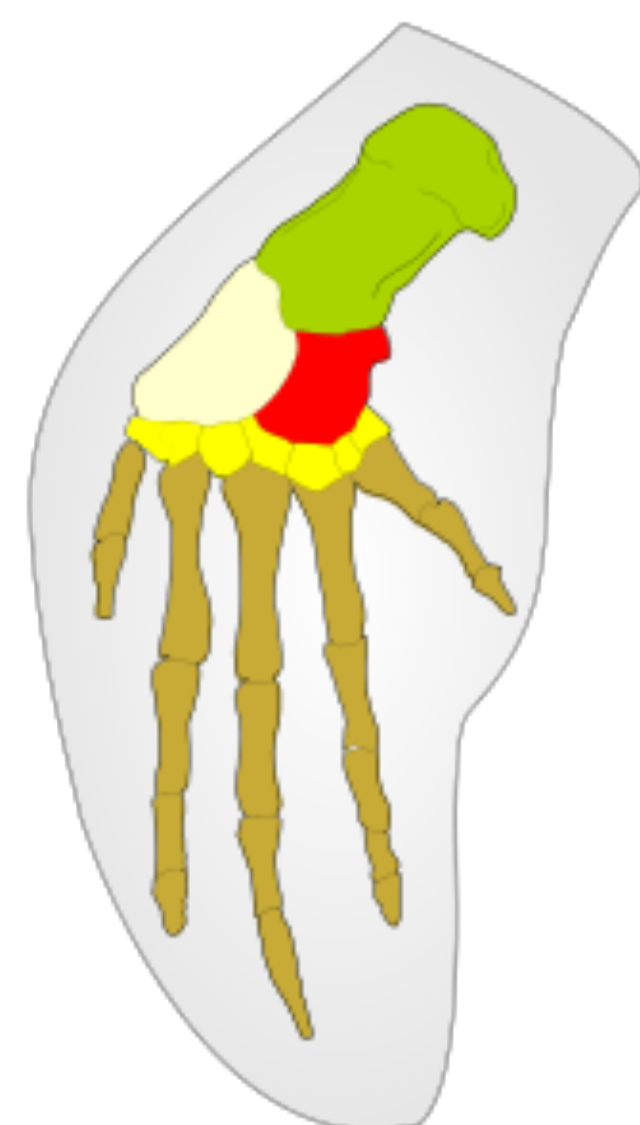
Uccello



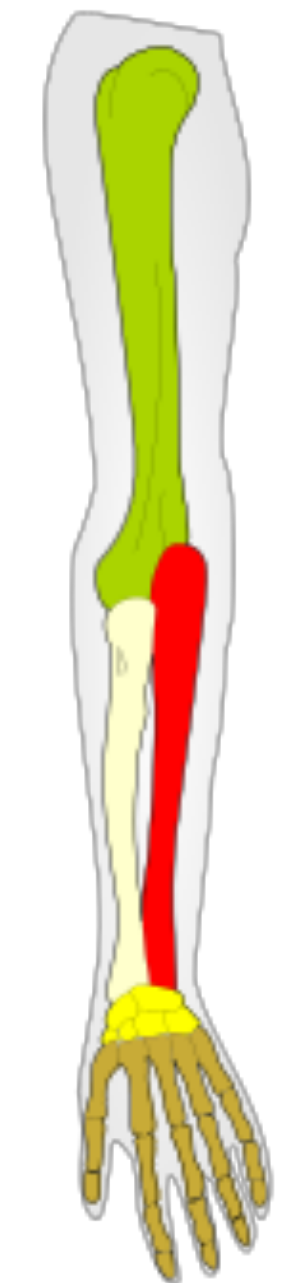
Talpa



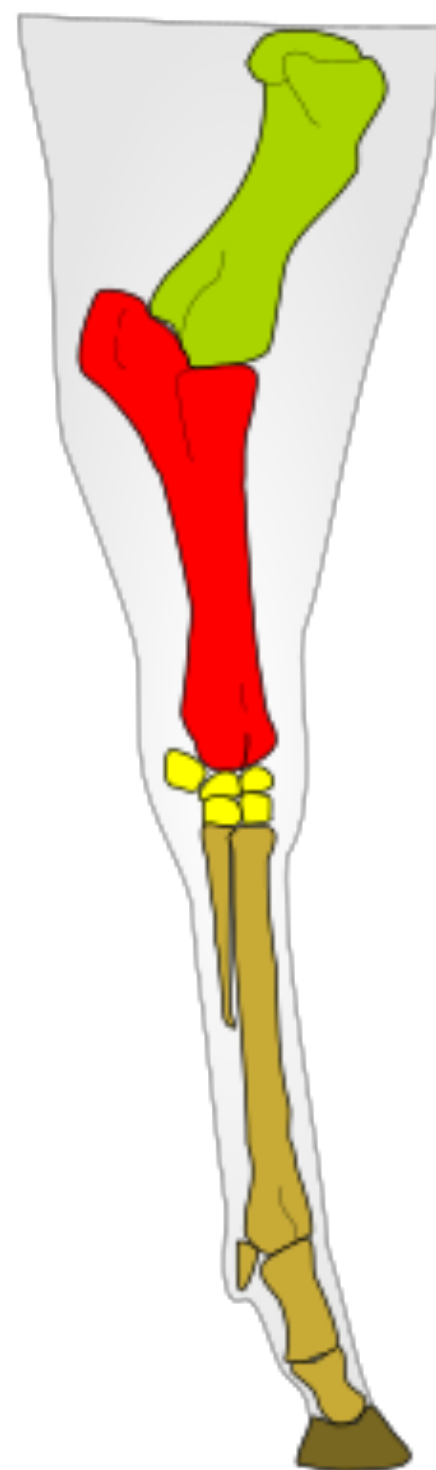
Perché i vertebrati possiedono quattro arti, e non sei o otto?
 Perché le dita si formano a un'estremità dell'arto e da nessun'altra parte ?
 Com'è che il mignolo si sviluppa a un margine dell'arto e il pollice all'altro?
 Come fa l'arto superiore ad accrescersi in modo differente dall'arto inferiore?
 Come può l'accrescimento essere regolato così precisamente?



Balena



Uomo



Cavallo



Cane

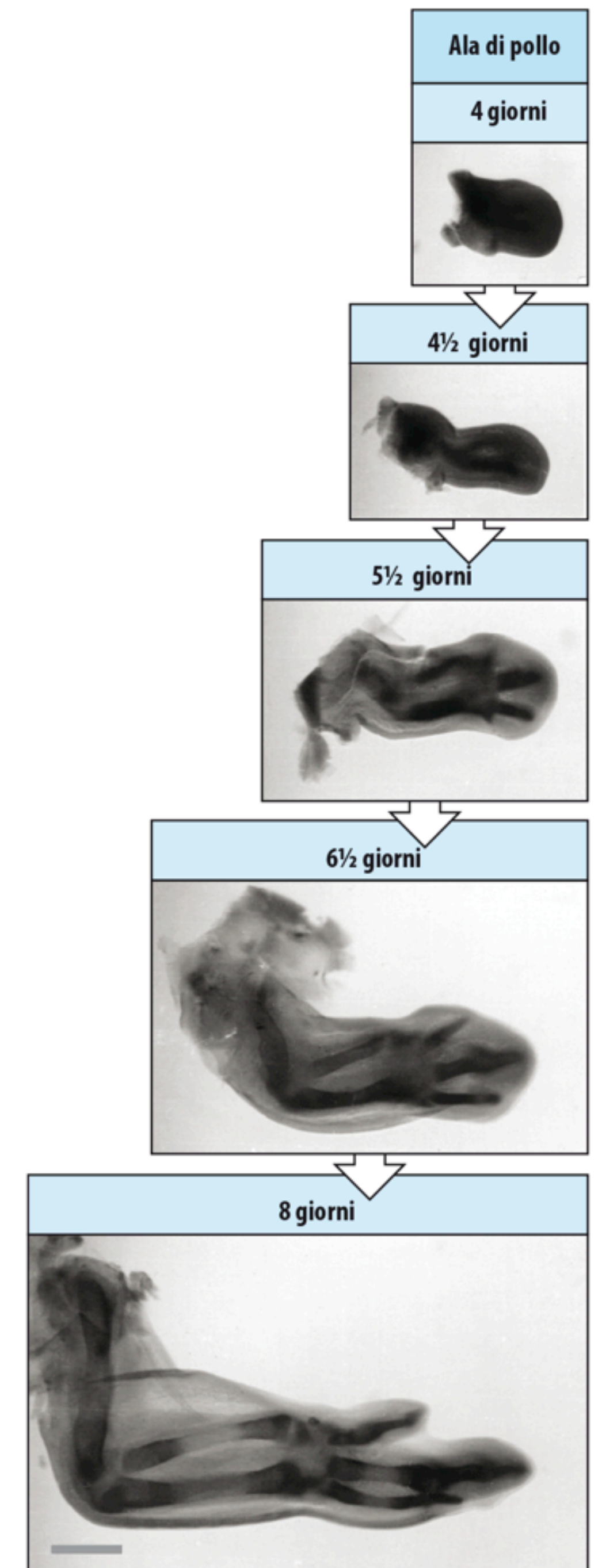
L'arto degli embrioni dei vertebrati è un sistema adatto allo studio dei principi generali di sviluppo.

L'arto è un valido **modello** per studiare le interazioni cellulari e per far luce sul ruolo dei segnali tra le cellule durante lo sviluppo, infatti vedremo dei meccanismi cellulari, molecole segnali e geni a noi familiari.



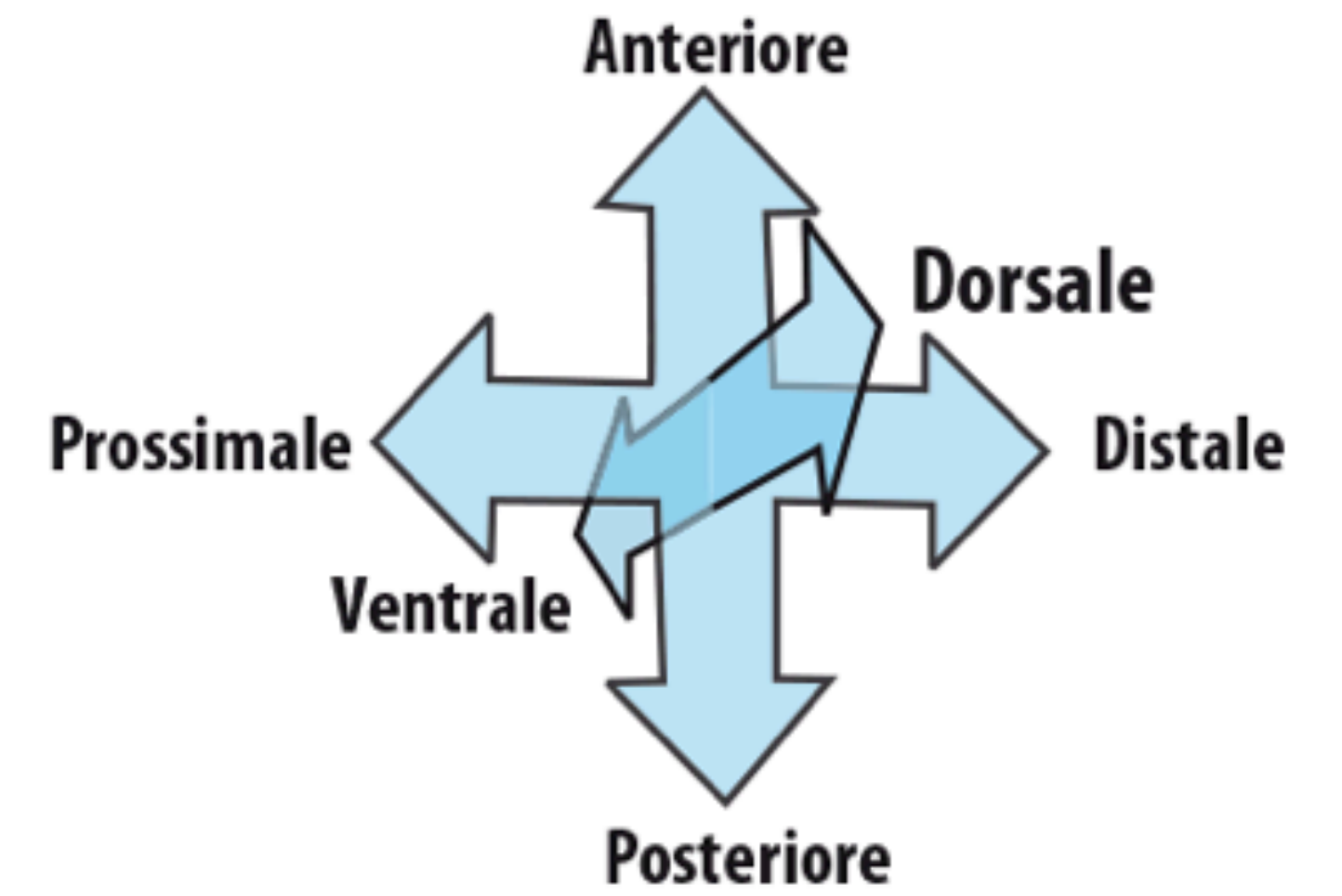
I principali modelli utilizzati, principalmente attraverso l'utilizzo di mutanti spontanei e knock-out genici, furono gli embrioni di **pollo**, poiché in questo modello gli arti in via di sviluppo sono facilmente accessibili alla manipolazione chirurgica.

Negli embrioni di pollo i primi segni dello sviluppo dell'arto si possono osservare intorno al terzo giorno dopo la deposizione dell'uovo, quando le strutture degli assi corporei principali sono già ben definite. A 10 giorni, le caratteristiche principali degli arti sono ben delineate.



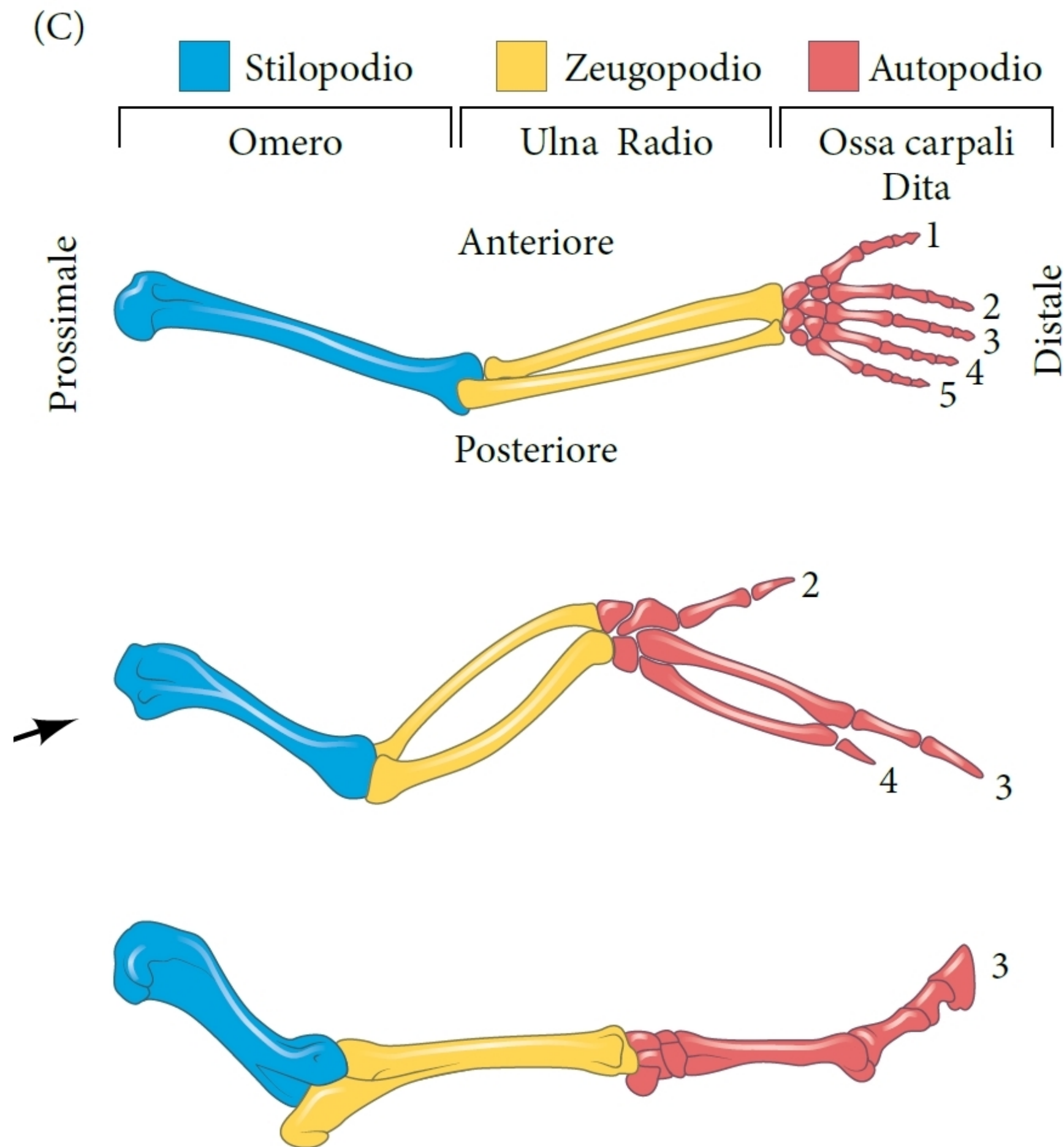
Tutti i vertebrati che hanno 4 arti vengono chiamati **tetrapodi**, le loro ossa sono composte da:

- stilopodio
- zeugopodio, adiacente alla parete del corpo
- autopodio nella regione più distale

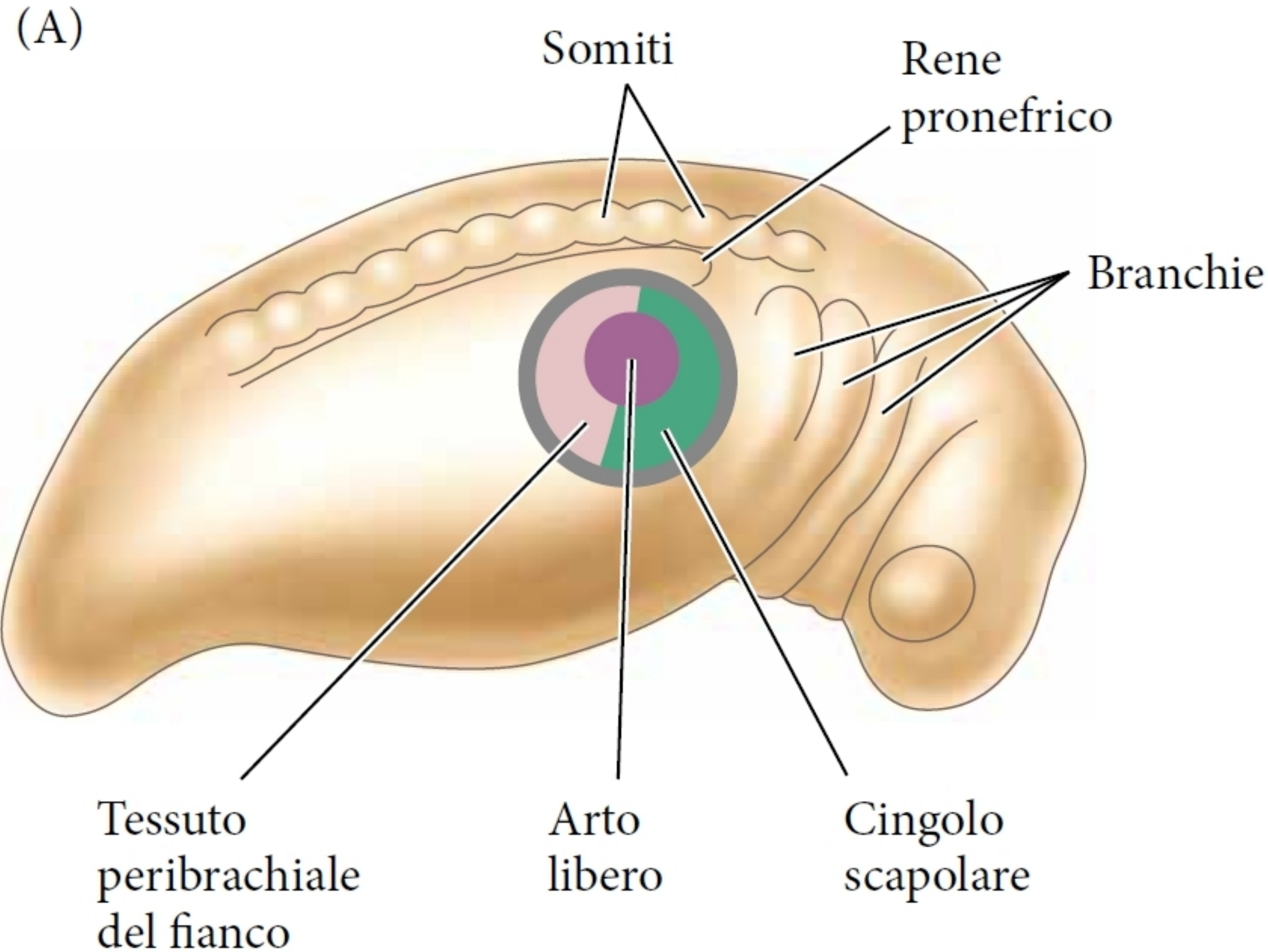


Le informazioni necessarie per la costruzione di un arto sono quelle di **posizione**.

1. **l'asse prossimo-distale** ("vicino-lontano"; spalla-dita delle mani o anca-dita dei piedi).
2. **l'asse antero-posteriore** (pollice- mignolo). Nell'arto superiore umano, il mignolo contrassegna, per esempio, il lato posteriore, mentre il pollice il lato anteriore.
3. **l'asse dorso-ventrale**: i palmi delle nostre mani (ventrali) sono facilmente distinguibili dalle nostre nocche (dorsali).



Il primo segno visibile dello sviluppo dell'arto è la formazione di due protuberanze laterali, chiamate **abbozzi dell'arto**.



Studi sulla mappatura del destino cellulare condotti dal laboratorio di **Ross Granville Harrison** hanno dimostrato che il **centro** di questi dischi di cellule contiene cellule destinate a formare l'arto libero.

L'anello di cellule situate all'esterno di queste regioni non forma normalmente l'arto, ma è in grado di formarlo se i tessuti più centrali vengono asportati. Se il tessuto asportato comprende anche quest'anello di cellule, l'arto non si sviluppa.

Questa regione più ampia, che rappresenta tutte le cellule dell'area capaci di formare un arto, è definita **campo dell'arto**. Adiacenti a esso si trovano le cellule che formeranno il tessuto peribrachiale del fianco e il cingolo scapolare.

(A) Campo prospettico dell'arto anteriore della salamandra *Ambystoma maculatum*.

Il **campo dell'arto** ha la capacità di attuare una regolazione per perdita o acquisizione di parti.

Ciascuna metà del campo dell'arto è in grado di generare un arto intero.

Il campo dell'arto rappresenta un "**sistema armonico equipotenziale**" in cui una cellula può essere istruita a formare qualsiasi parte dell'arto.



Questa potenzialità si può osservare sperimentalmente o attraverso un esperimento naturale

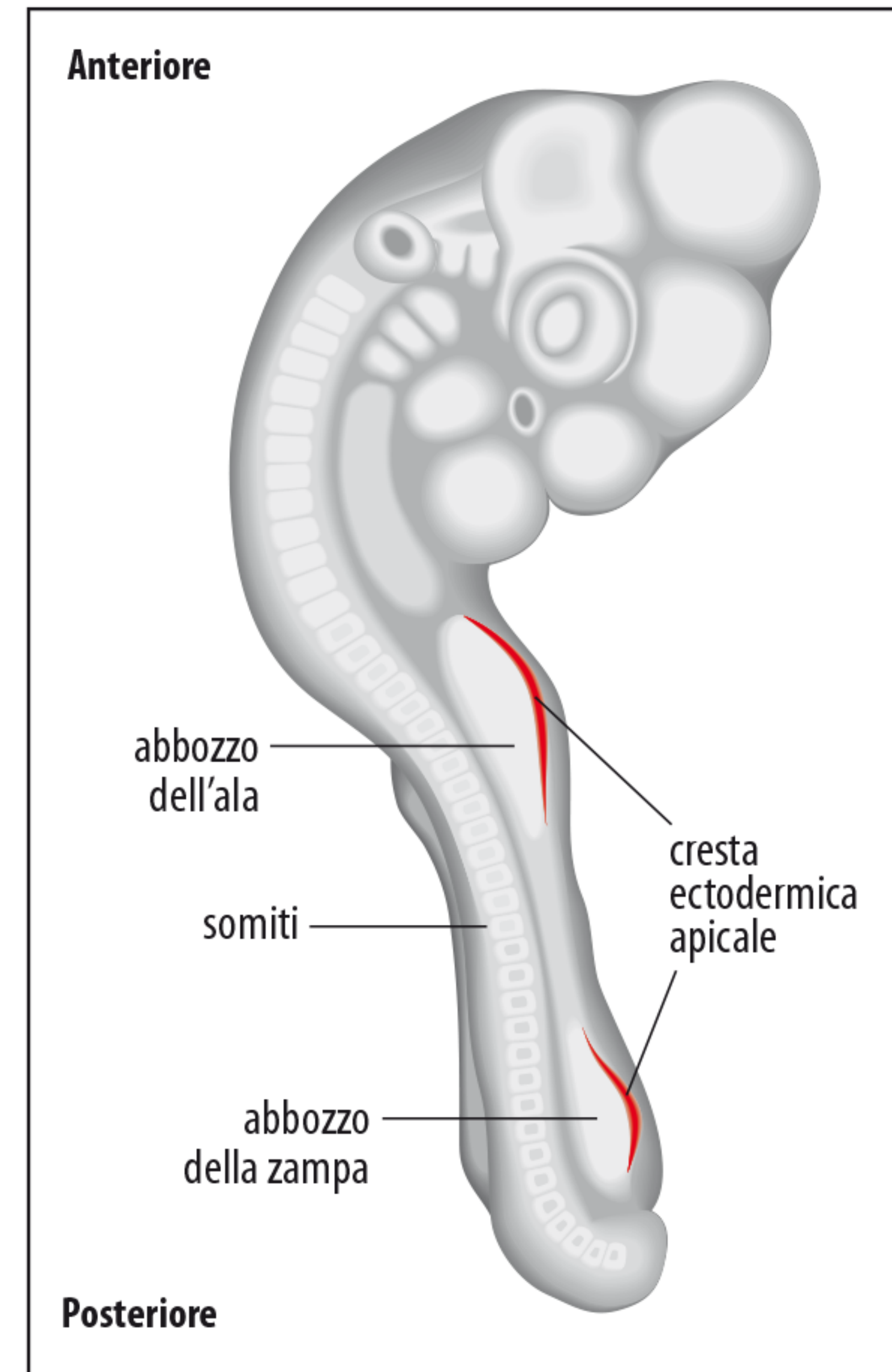
In molti stagni degli Stati Uniti sono state trovate rane e salamandre con molte zampe, questo grazie ad un'infestazione dell'addome della larva da parte di vermi trematodi parassiti, le uova dei vermi suddividano le gemme degli arti in più parti.

Le cellule che formeranno l'abbozzo dell'arto derivano da:

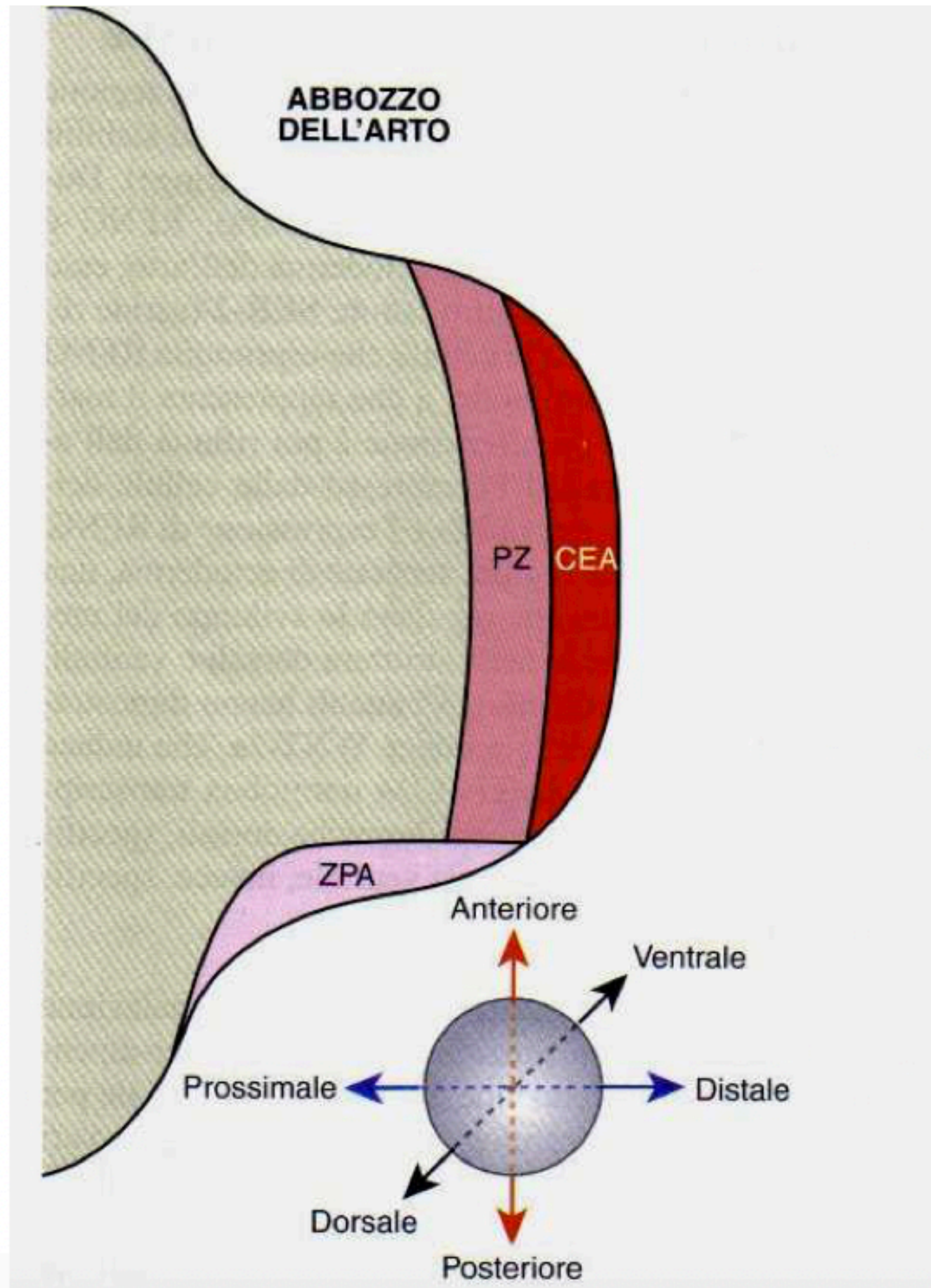
1. Porzione posteriore del **mesoderma laterale**
2. **Somiti** adiacenti
3. **Dall'ectoderma** sovrastante l'abbozzo.

Avranno destini differenti:

1. Le cellule **mesenchimali della lamina laterale** migrano nel campo dell'arto per formare le cellule precorritrici dello scheletro
2. Le **cellule mesenchimali dei somiti** migrano allo stesso livello per formare i precursori muscolari degli arti, daranno origine alle cellule miogeniche dei musco
3. Le cellule epiteliali sono di derivazione ectodermica e daranno origine all'epidermide della pelle



L'abbozzo dell'arto possiede una sua organizzazione.



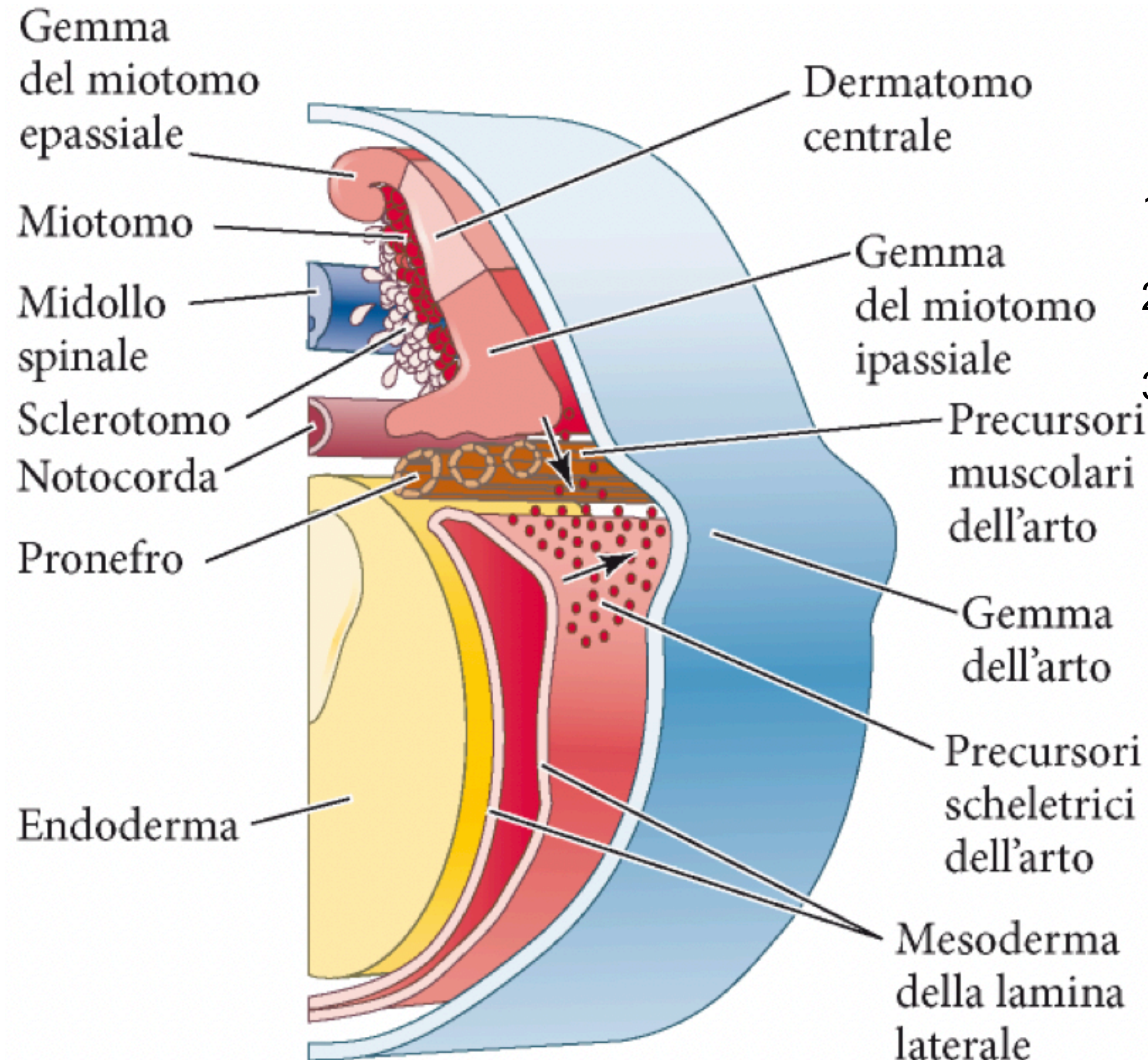
La principale direzione di accrescimento lungo l'asse **prossimo-distale** (somiti-ectoderma), e un minor accrescimento lungo gli assi dorso-ventrale e antero-posteriore.

L'abbozzo dell'arto è ulteriormente suddiviso in tre domini funzionalmente distinti:

1. Il mesenchima in rapida proliferazione che alimenta l'accrescimento dell'arto è noto come **mesenchima della zona di progressione (PZ)**, a volte definita anche zona indifferenziata.
2. Le cellule che si trovano nella regione posteriore della zona di progressione costituiscono la **zona ad attività polarizzante (ZPA)**, che dirige il destino cellulare lungo l'asse antero-posteriore.
3. La **cresta ectodermica apicale (AER)** è un ispessimento dell'ectoderma sulla sommità distale dell'abbozzo dell'arto in via di sviluppo .

Studi di mappatura precoce e di trapianto nel pollo hanno dimostrato che ci sono delle specifiche regioni di **mesoderma somitico** e **mesoderma della piastra laterale** da cui vengono formati gli arti

Queste cellule mesodermiche che danno origine a un arto possono essere identificate senza interferire con i processi vitali dell'organismo tramite:



1. **asportando** specifici gruppi di cellule e osservando che in loro assenza l'arto non si sviluppa
2. **trapiantando** gruppi di cellule in una nuova sede e osservando se formano o no un arto in questa nuova localizzazione.
3. **marcando** gruppi di cellule con coloranti o con precursori radioattivi e osservando come i loro discendenti prendono parte allo sviluppo dell'arto

Esperimenti hanno dimostrato che le "**regole morfogenetiche**" sono le stesse in tutti i tetrapodi.

Esperimento di trapianto del mesoderma parassiale (somiti)

Sebbene gli arti dei Vertebrati siano diversi per quanto riguarda i somiti da cui si generano, essi sono tutti uguali, perchè la loro posizione è costante per quanto riguarda il livello di espressione dei geni Hox

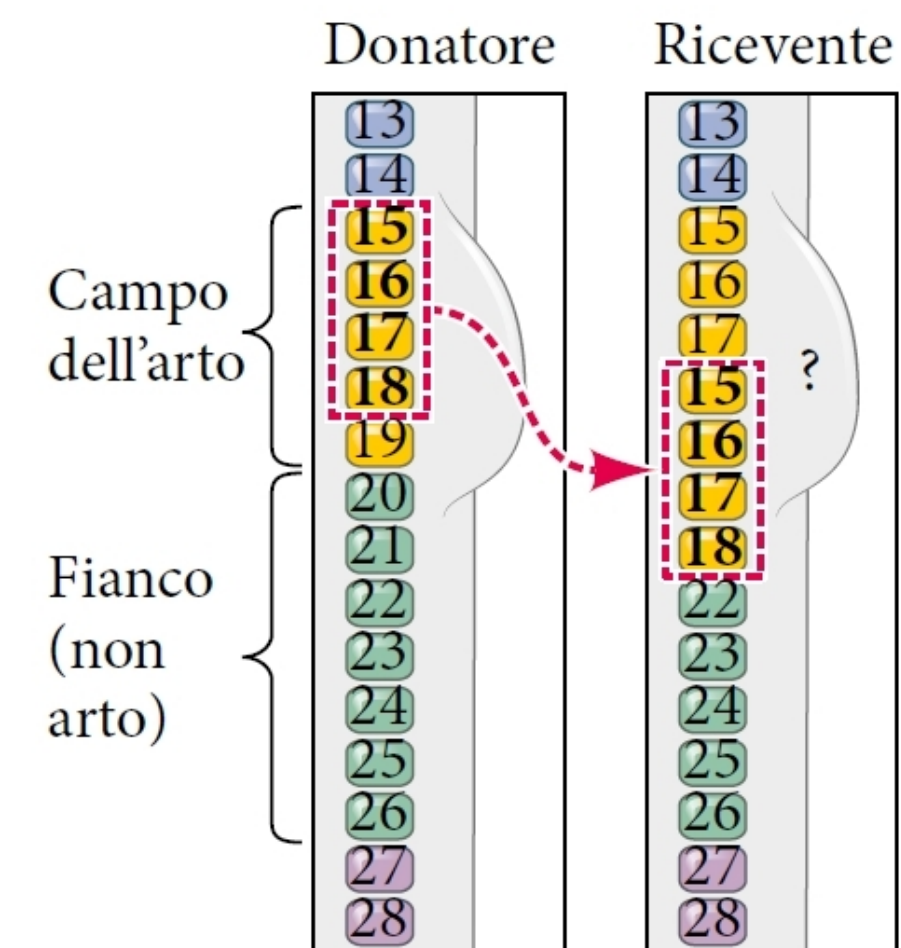
Questa l'informazione posizionale fa sì che il mesoderma parassiale nella regione di formazione dell'arto sia differente da tutto il resto del mesoderma parassiale.

Esperimenti di trapianto in cui il mesoderma parassiale (somiti) proveniente da diverse regioni viene spostato in posizione adiacente alla piastra laterale del fianco mostrano come il mesoderma parassiale della regione che **forma** l'arto **promuova** la formazione dell'abbozzo dell'arto, mentre quello proveniente da regioni del fianco che **non generano arto reprima** la formazione dell'arto.

La zona dove si forma l'abbozzo dell'arto e la sua identità sono definite dal profilo di geni HOX

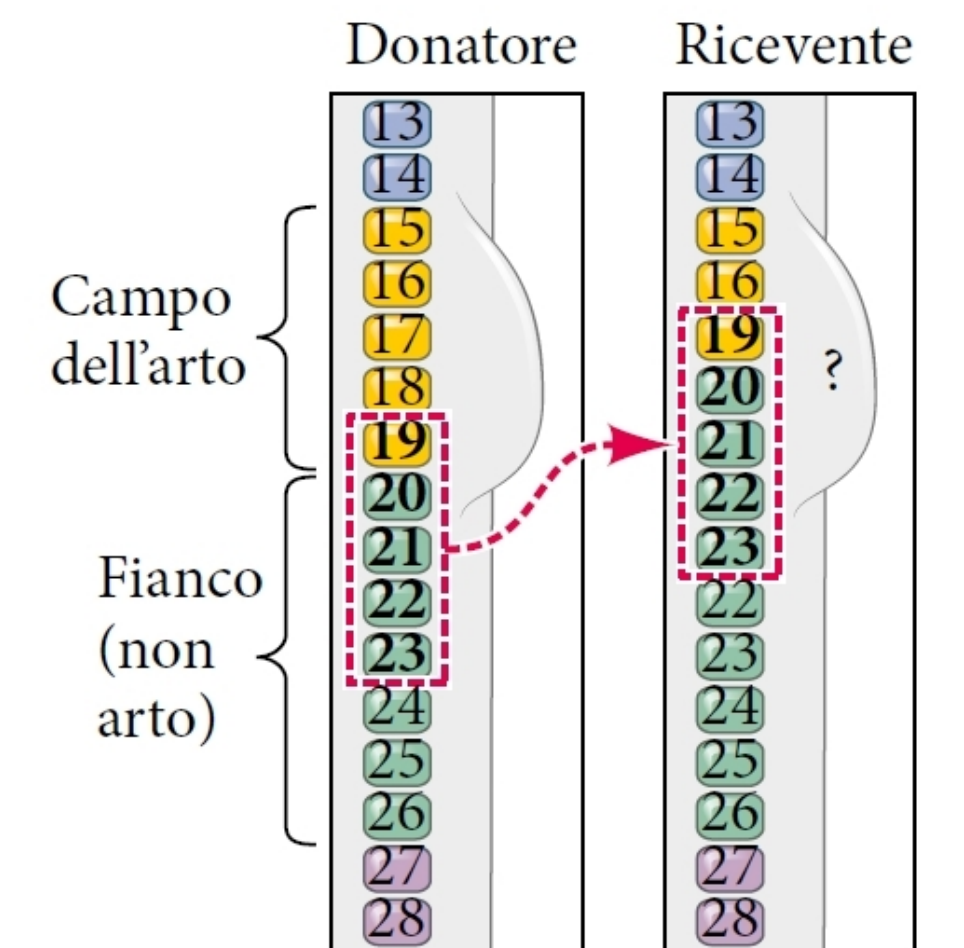
(A)

Espianto di somiti dalla regione dell'arto e re-impianto a livello del fianco

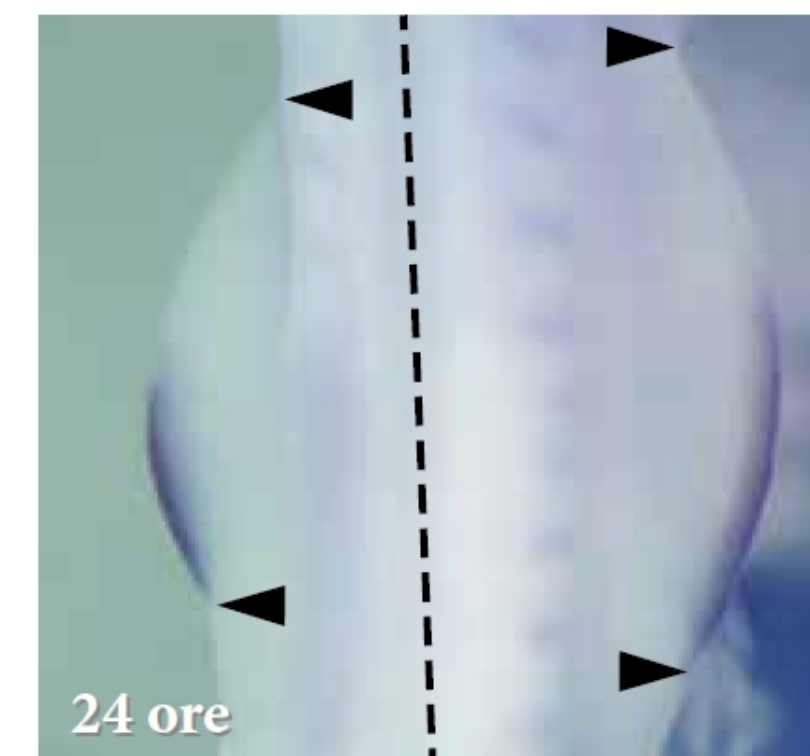


(B)

Espianto di somiti dalla regione del fianco e re-impianto a livello dell'arto

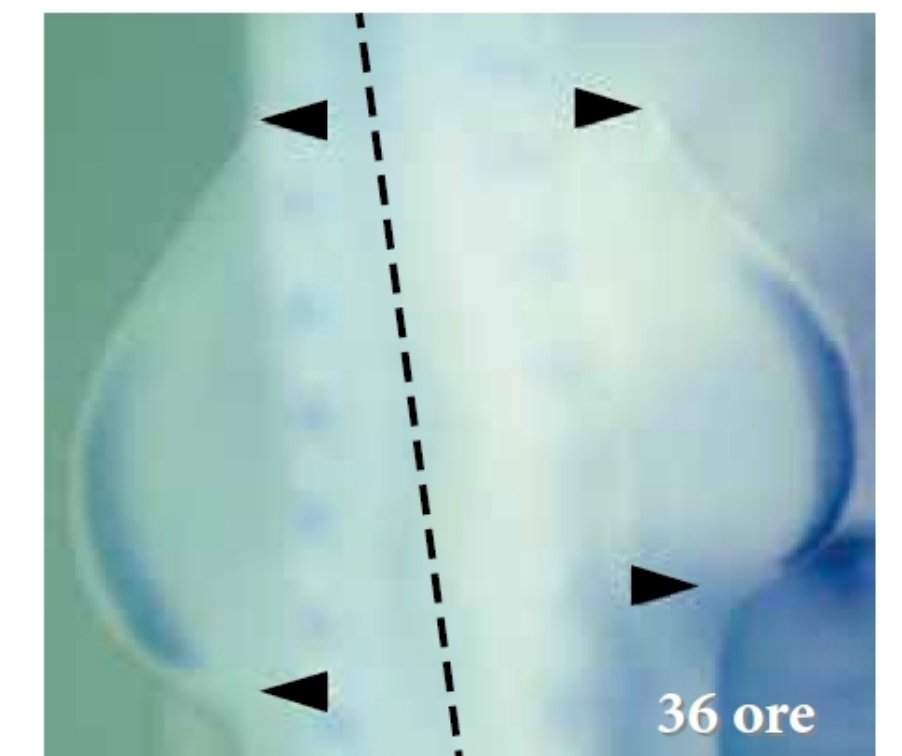


Lato di controllo Lato dell'impianto



Risultato: un abbozzo dell'arto più ampio

Lato di controllo Lato dell'impianto



Risultato: un abbozzo dell'arto più piccolo

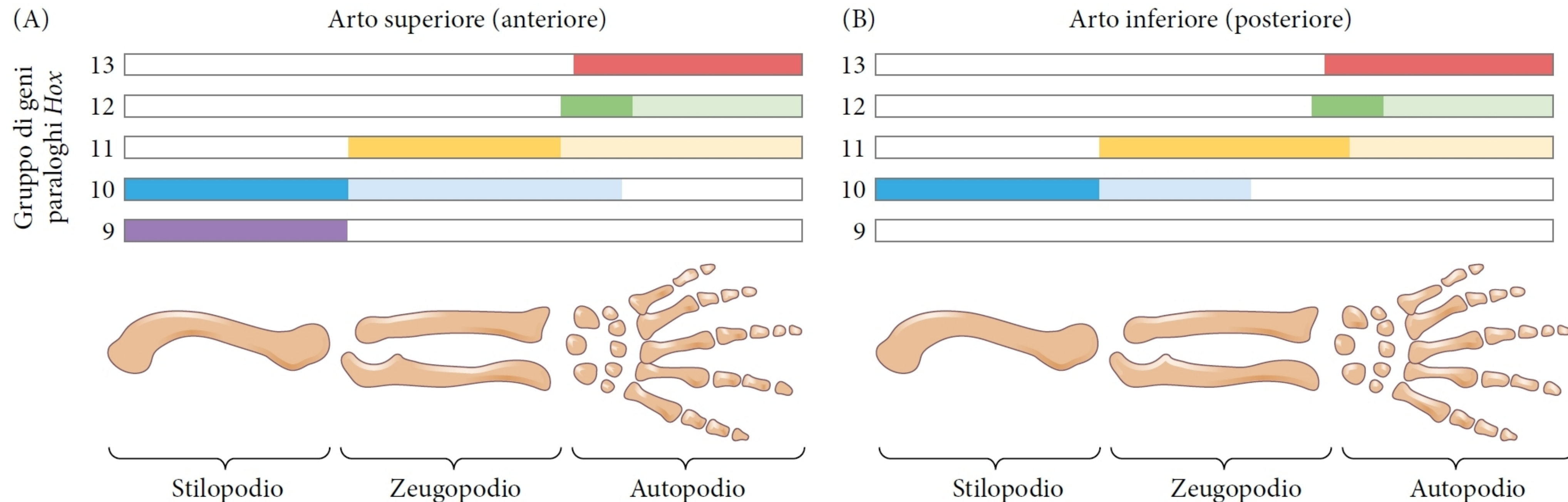
Geni Hox (geni codificanti fattori trascrizionali omeotici)

I geni Hox dei vertebrati specificano la posizione lungo l'asse antero-posteriore del corpo.

Sulla base del profilo d'espressione dei geni Hoxaa e Hoxad e di mutazioni spontanee ottenute mediante esperimenti di **knockout genico**, il laboratorio di **Mario Capecchi** ha proposto un **modello** in cui questi geni specificano l'identità delle varie regioni dell'arto

Secondo il modello proposto:

- i geni Hox9 e Hox10 specificano lo stilopodio
- Hox11 specificano lo zeugopodio
- Hox12 e Hox13 specificano l'autopodio.



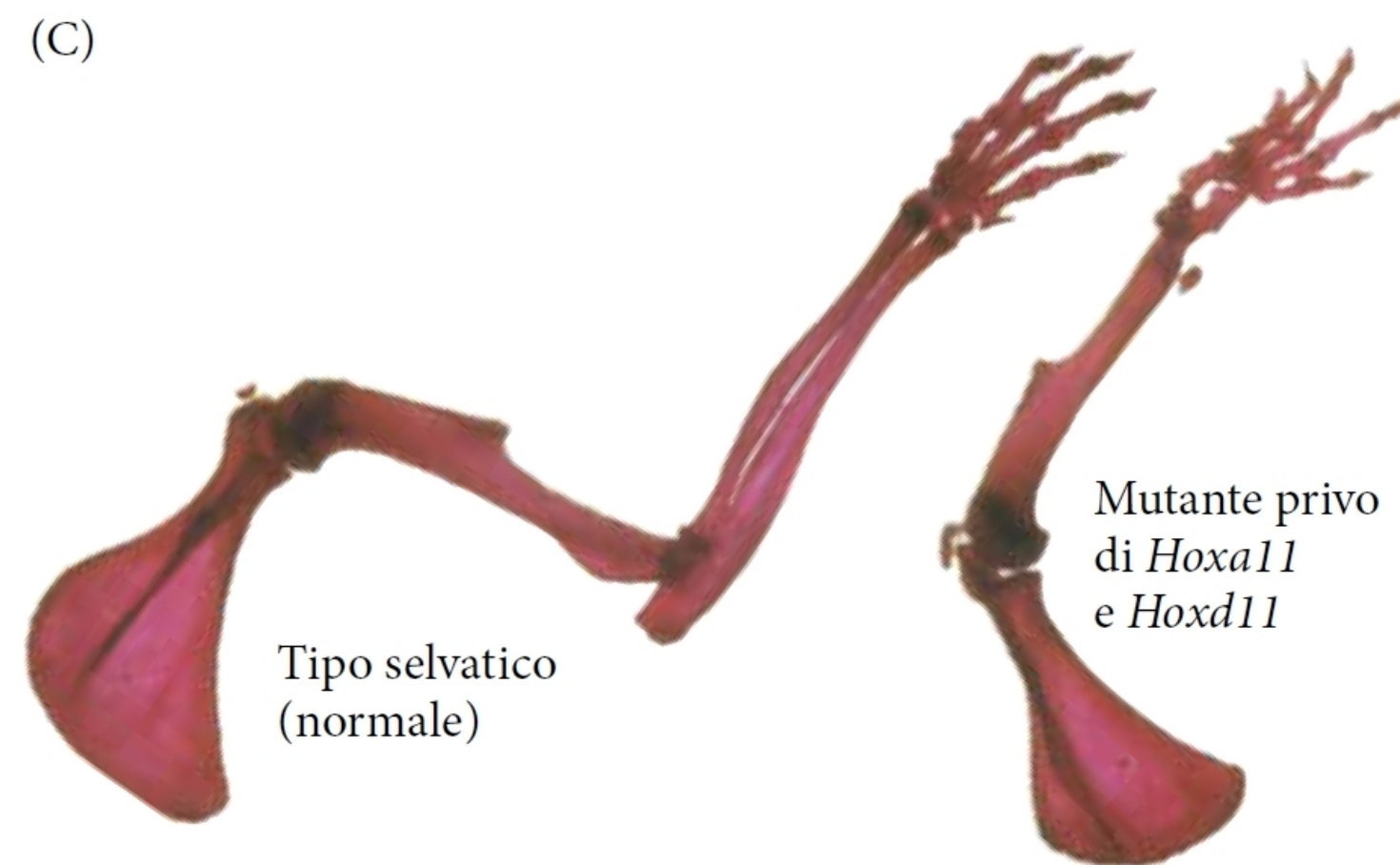
Hanno un ruolo fondamentale nella **specificazione di una cellula mesenchimale verso il suo destino di cellula di stilopodio, zeugopodio o autopodio** e sono successivamente utilizzati nello sviluppo dell'arto.

Questo scenario è stato confermato da numerosi esperimenti:

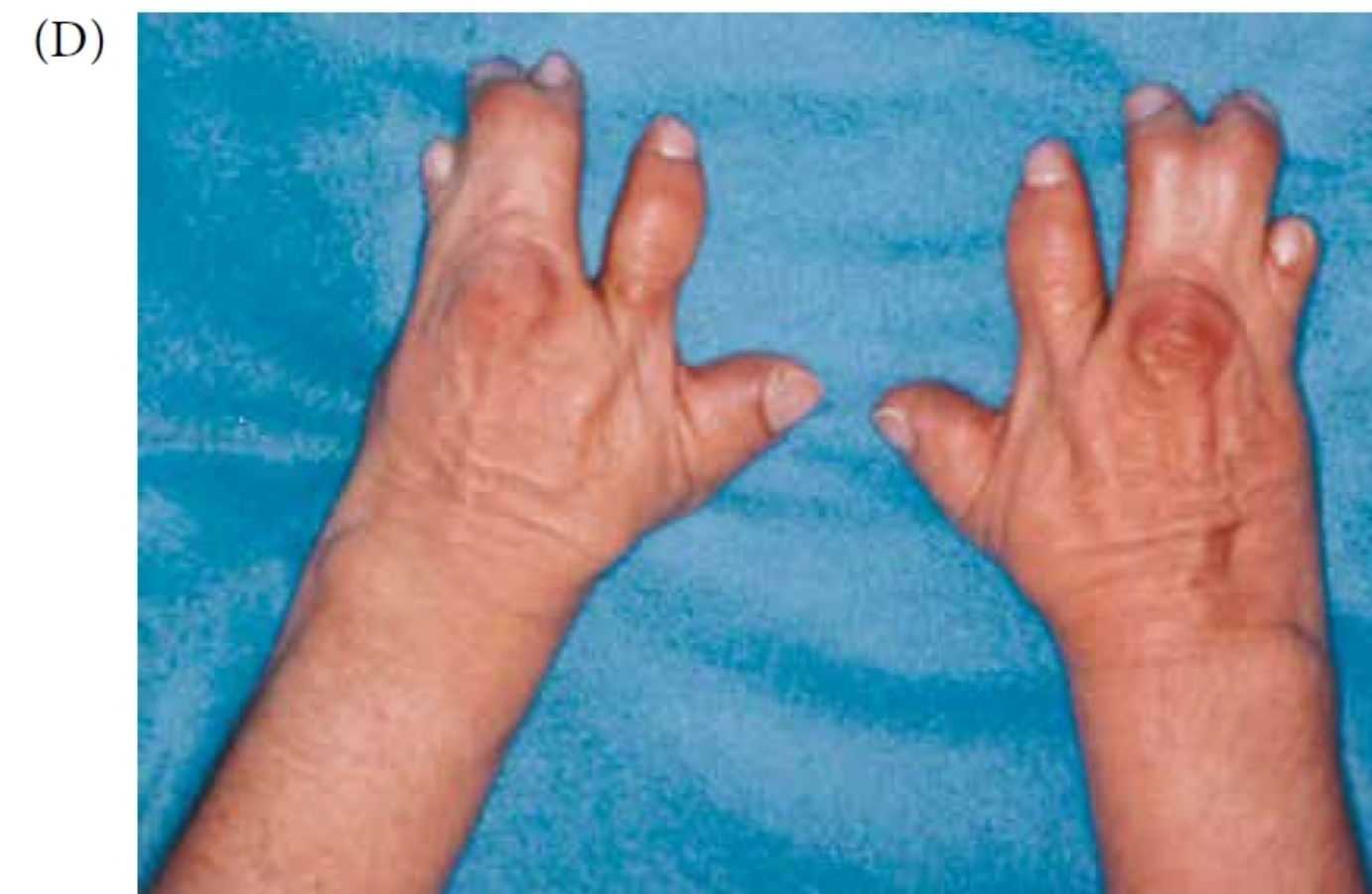
Wellik e Capecchi fecero un esperimento dove inattivavano tutti e sei gli alleli di **Hox10** (Hox10aacdd) nel topo, i risultati erano **gravi difetti dello scheletro assiale**, ed erano del tutto **privi di femore e rotula**.

Quando tutti e sei gli alleli di **Hox11** venivano eliminati, in tutti i topi mancava lo zeugopodio

Analogamente, il knockout di tutti e quattro i loci di **Hoxa13** e **Hoxd13** dava luogo alla completa assenza dell'autopodio



In questa foto è stata indotta una doppia mutazione con perdita di funzione per i geni *Hoxa11* e *Hoxd11*



Mutazione locus *Hoxd13* negli individui omozigosi

In che modo le appendici dei vertebrati si sono evolute in quegli arti che oggi troviamo utilissimi?

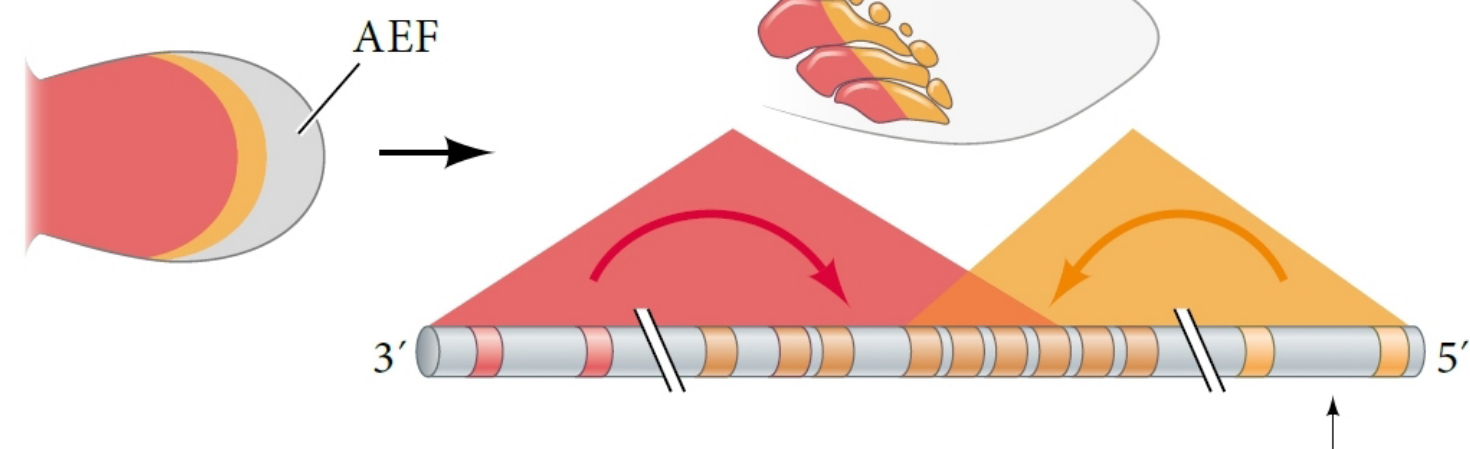
La scoperta del fossile Tiktaalik rosene, il "pesce con le dita" ha reso evidente l'importanza di uno sviluppo comune nell'evoluzione dell'arto.

L'esistenza delle **articolazioni** potrebbe aver consentito la modificazione delle ossa delle pinne in ossa degli arti.

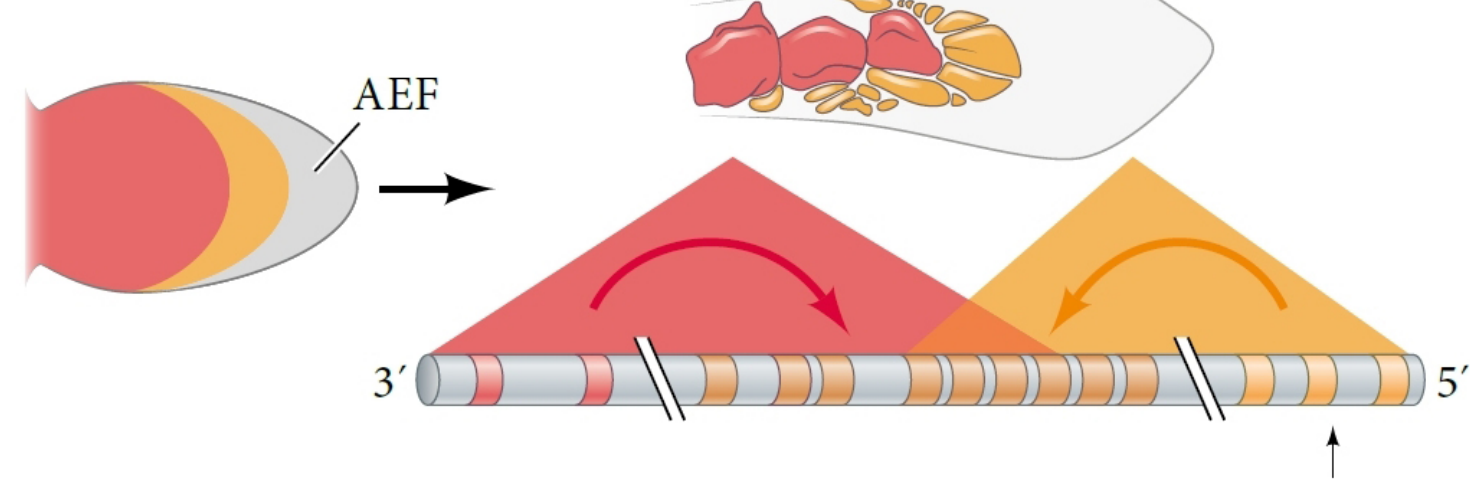
Le articolazioni delle pinne pettorali indicano che i Tiktaalik avevano polsi mobili e una postura sostenuta. Si ritiene quindi che Tiktaalik possa rappresentare una transizione tra pesci e anfibi: «un pescepode»



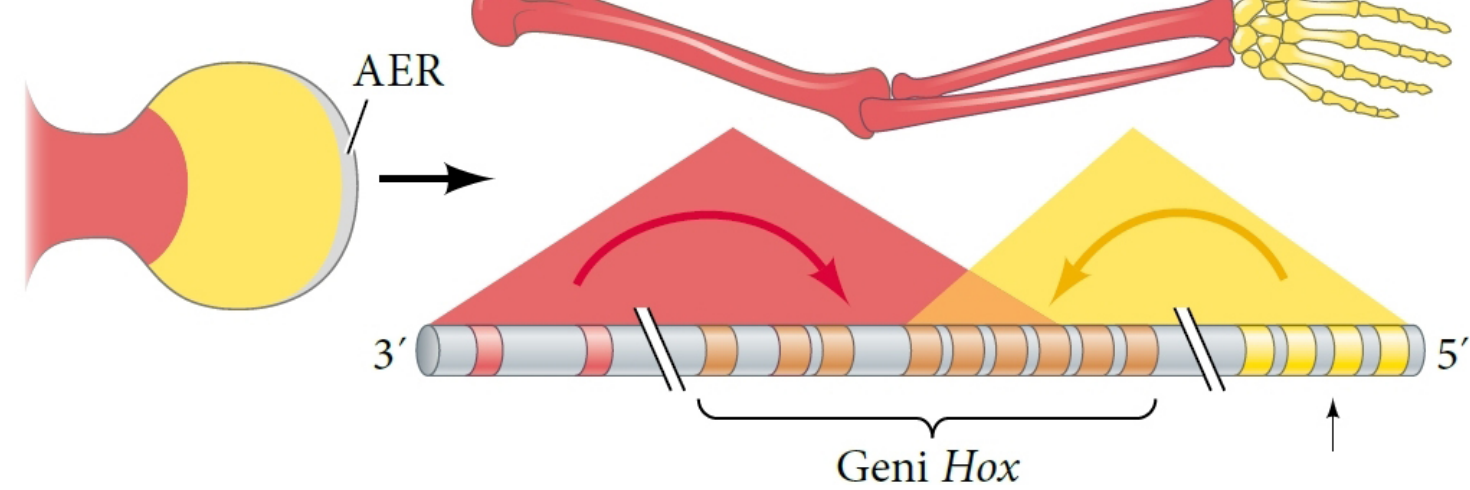
Teleostei



Celacanti



Tetrapodi



Come si sono formate le estremità distali dei tetrapodi?

L'abbozzo della pinna è omologo all'abbozzo dell'arto.

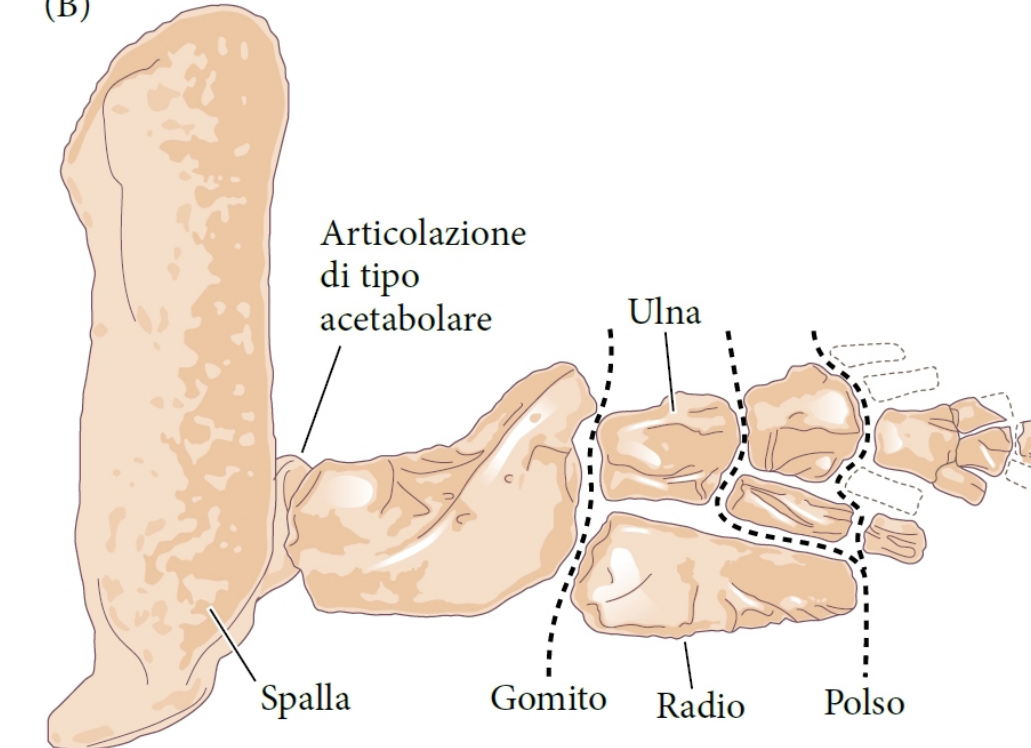
Possiede una **zona di progressione mesenchimale** e una **cresta ectodermica apicale sovrapposta (AER)**

L'AER si modifica e forma la **plica ectodermica apicale (AEF)** che promuove lo sviluppo dei raggi della pinna al posto delle dita.

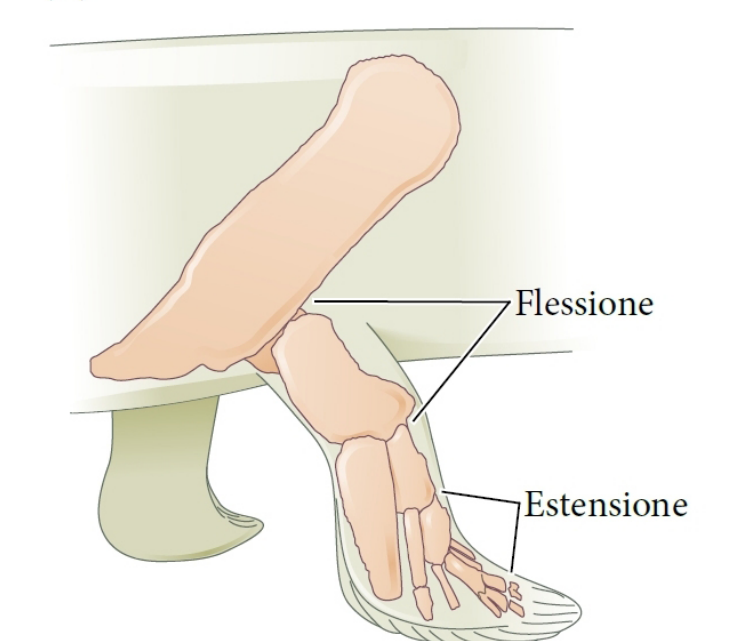
Ipotesi:

- ritardi nello sviluppo della transizione da AER ad AEF potrebbero aver determinato un'esposizione più lunga ai segnali dell'AER distali, permettendo al mesenchima della zona di progressione di trasformarsi in autopodio (dita).
- cambiamenti nel profilo di espressione dei geni Hox distali

(B)



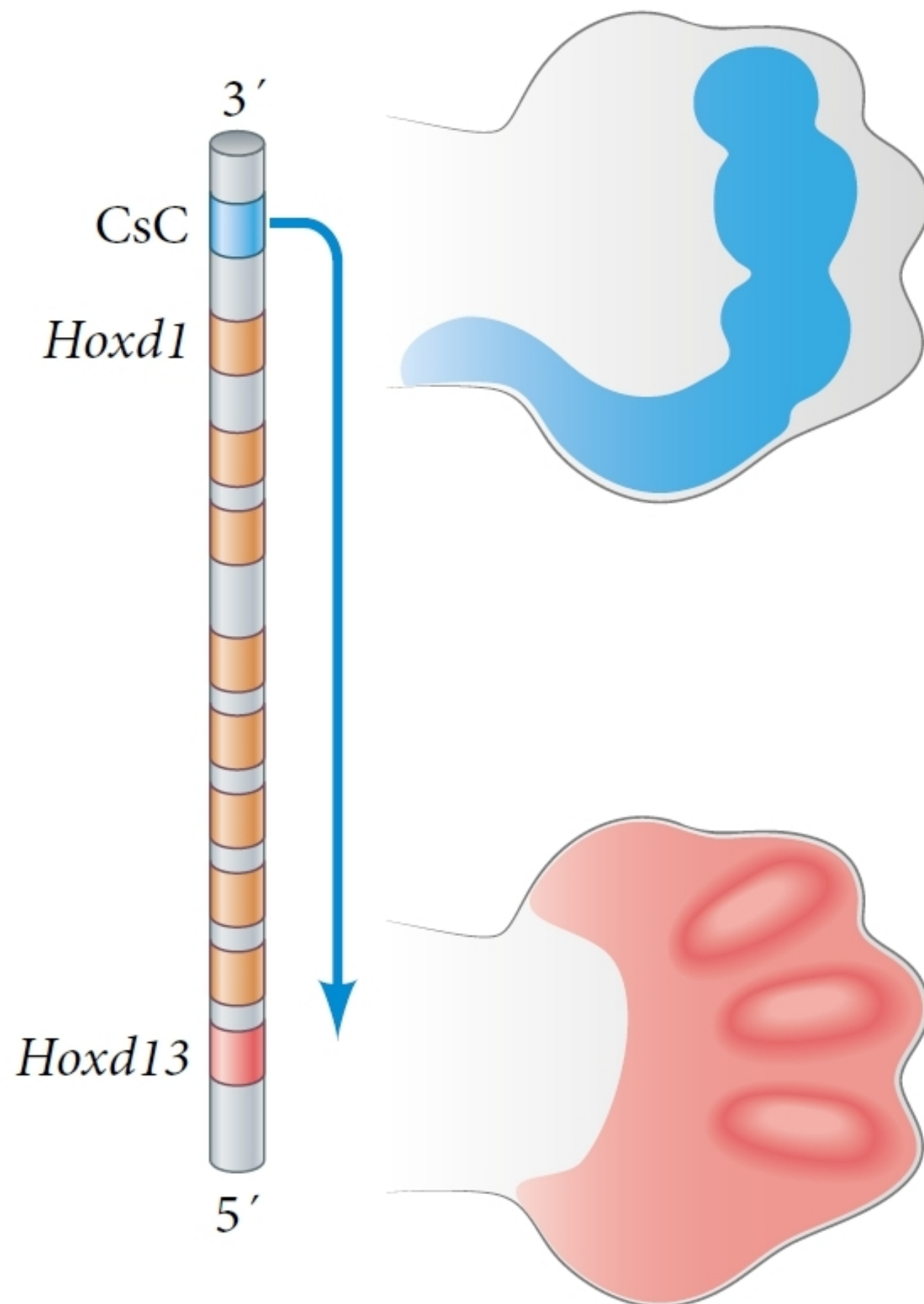
(C)



L'adattamento dell'autopodio potrebbe essere regolato anche da un aumento numerico degli **enhancer regolativi** in cis associati ai cluster Hoxa/d.

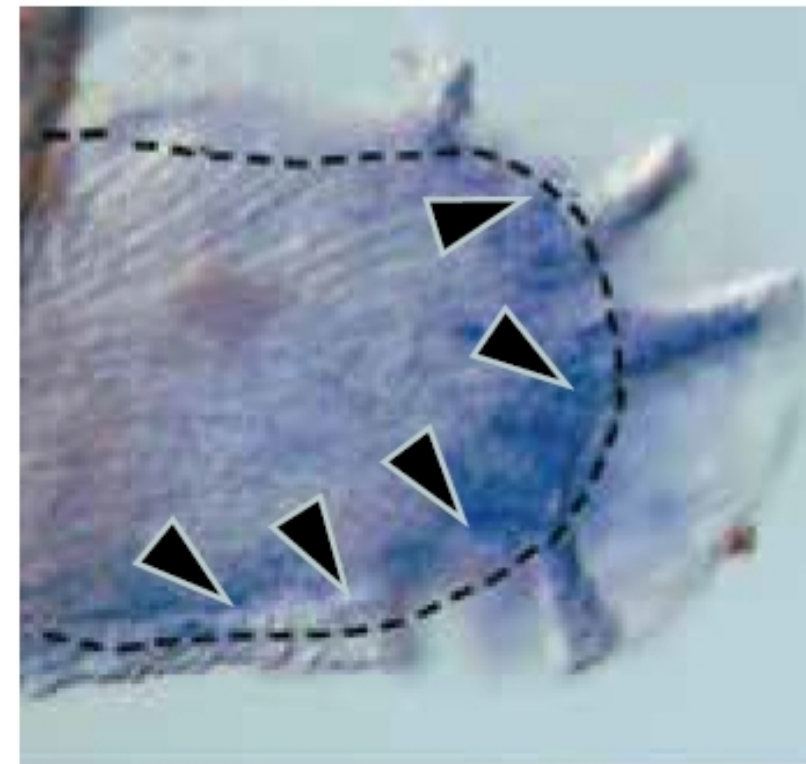
Hanno identificato sia enhancer conservati (GCR, e CsB) che specifici dei tetrapodi (CsS), associati all'espressione iniziale e tardiva dei geni Hox.

(A) Topo (E 12,5)

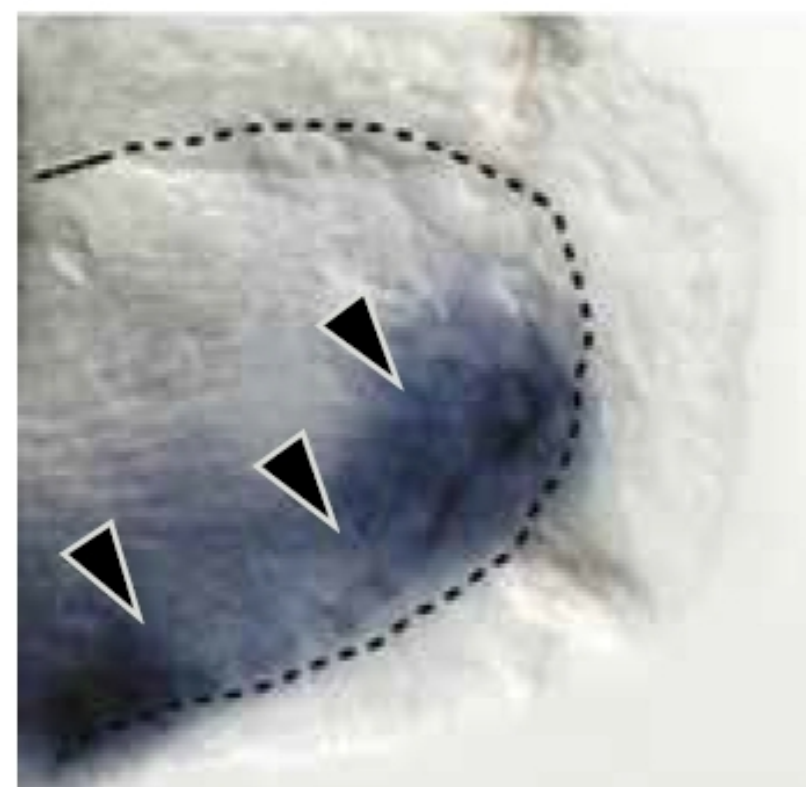


(B) Zebrafish

mCsC 4 giorni



(C) *Hoxd13a* 4 giorni



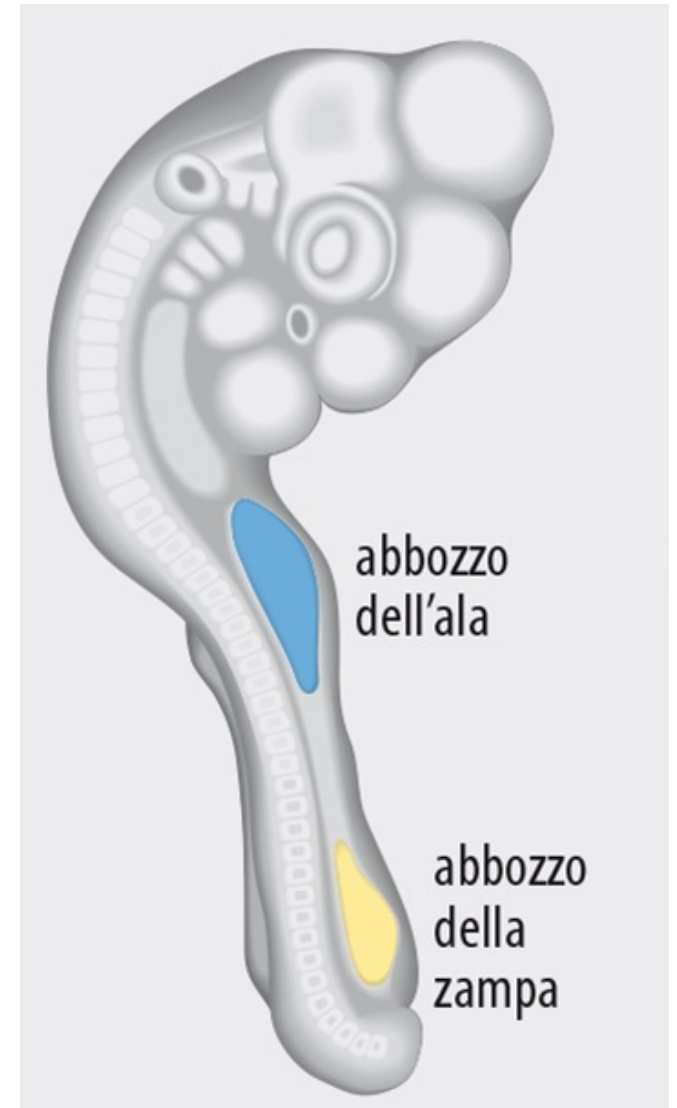
Questo breve esame dell'evoluzione dell'arto dei tetrapodi, ci ha aiutato a comprendere l'importanza dei geni Hox nel regolare lo sviluppo dell'arto, fondamentali nella specificazione del destino cellulare.

Quali sono e come funzionano i segnali che servono per:

- (1) determinare dove si formeranno gli arti
- (2) promuovere l'accrescimento e il modellamento dell'abbozzo dell'arto
- (3) specificare il destino lungo gli assi antero-posteriore e dorso-ventrale?

Quali sono i meccanismi che determinano la formazione dell'arto?

- 1) Rendere il mesoderma permissivo alla formazione dell'arto
- 2) Specificare l'arto anteriore e posteriore (superiore o inferiore nei bipedi)
- 3) Indurre le transizioni epitelio-mesenchimali
- 4) Stabilire due circuiti di retroazione positiva (circuiti di feedback positivo)



Rendere il mesoderma permissivo

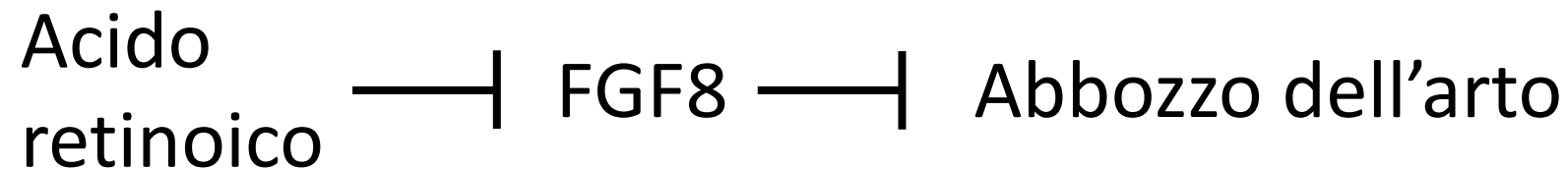
Il primo passaggio per la formazione dell' abbozzo dell'arto è relativo all'antagonismo tra acido retinoico e fattore paracrino fgf8

durante le prime fasi della somitogenesi.

Il fattore fgf8 viene espresso nella zona posteriore dei somiti ed espresso anche nel mesoderma laterale del cuore.

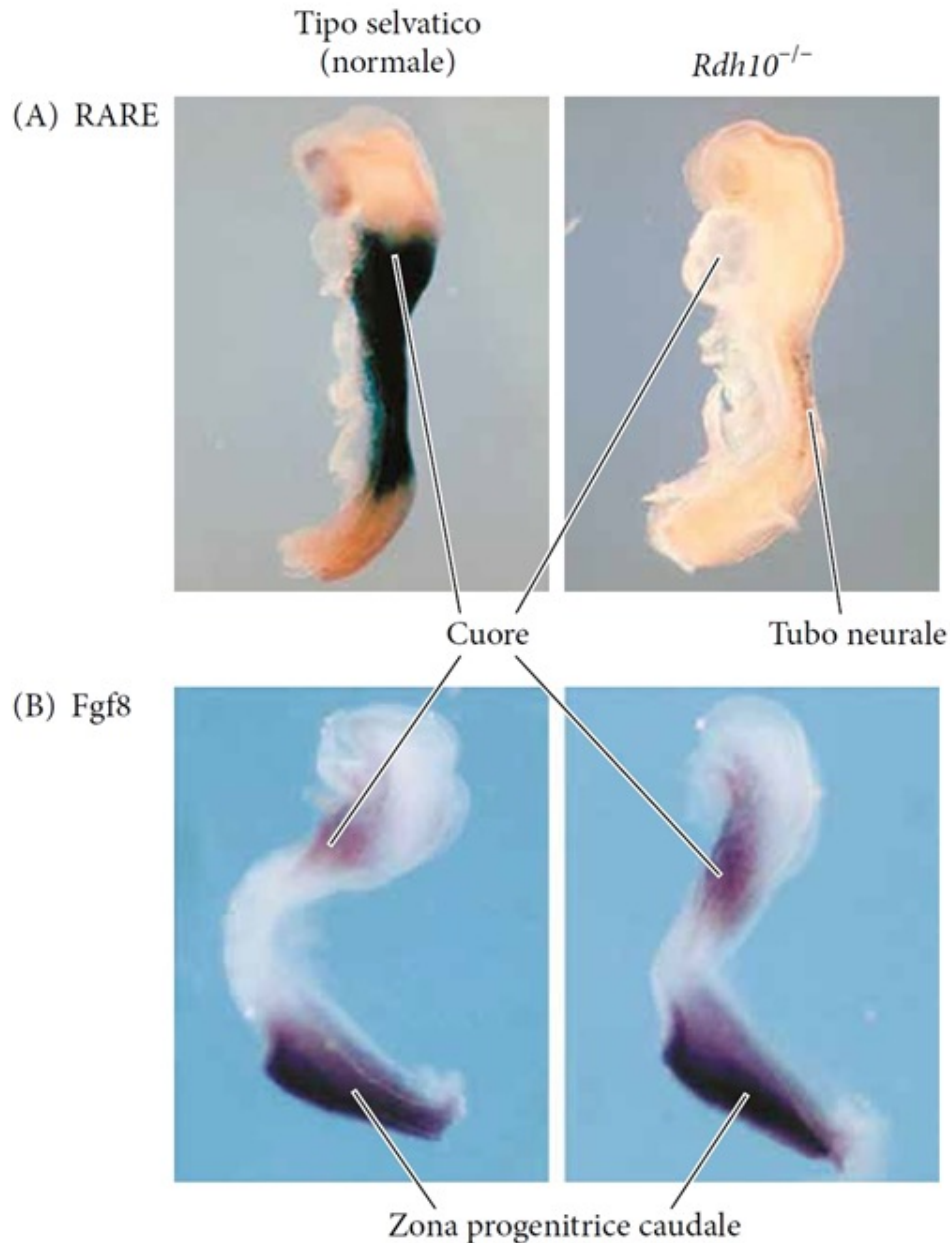
Tra le due aree troviamo l'area del futuro abbozzo dell'arto dove i somiti produrranno acido retinoico.

fgf8 è un fattore capace di reprimere la formazione dell'abbozzo, deve esser quindi represso a sua volta dall'acido retinoico capace di legarsi a fattori di trascrizione in grado di reprimere la trascrizione del gene fgf8



In realtà RA ha questa funzione solamente nell'arto superiore, infatti la rimozione di RA nelle zone posteriore non comporta drastiche differenze nello sviluppo del topo.

Non è però ancora identificato qual è il segnale responsabile della formazione dell'arto posteriore.



Nella prima immagine A è possibile osservare un embrione dove è marcata l'espressione di un gene reporter controllata dall'elemento regolativo di RA (RARE).

Nella prima immagine B è invece marcata la zona di espressione di *fgf8*, nelle immagini di destra è invece assente un enzima, la deidrogenasi retinoide 10 necessaria per la corretta espressione dell'acido retinoico.

Nell'immagine B di destra è quindi apprezzabile come in assenza di acido retinoico si avrà un'espansione delle zone contenenti FG8 andando a coprire anche le future aree dell'abbozzo impedendone lo sviluppo.

Specificazione del tipo di arto

FGF 10 è il principale induttore della formazione della gemma dell'abbozzo dell'arto determinando l'inizio della proliferazione cellulare e dei cambiamenti della morfologia cellulare.

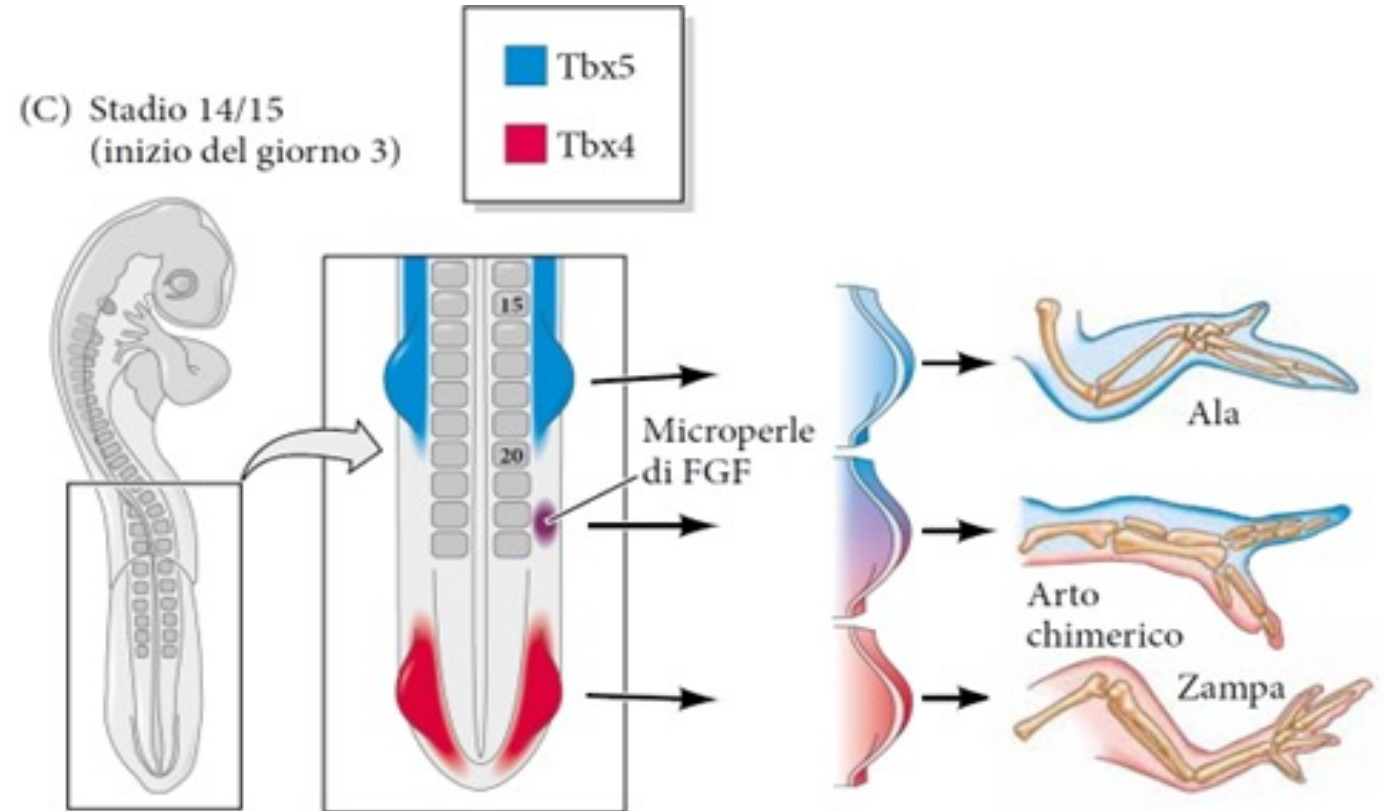
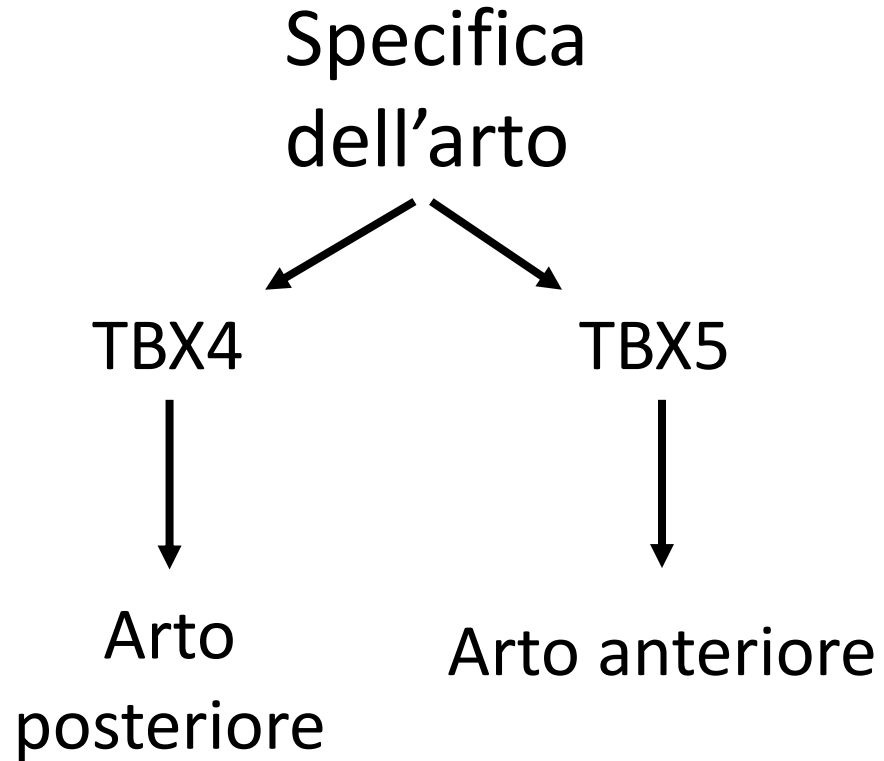
FGF 10 viene infatti espresso nel mesoderma della lamina laterale a livello di dove si formeranno gli arti.

Si possono generare delle cellule transgeniche in grado di esprimere FGF10 che se trapiantate nel fianco del pollo porteranno a un ulteriore gemma dell'arto



FGF10 porta allo sviluppo della gemma dell'arto ma non è lui a specificare se l'arto sarà anteriore o posteriore.

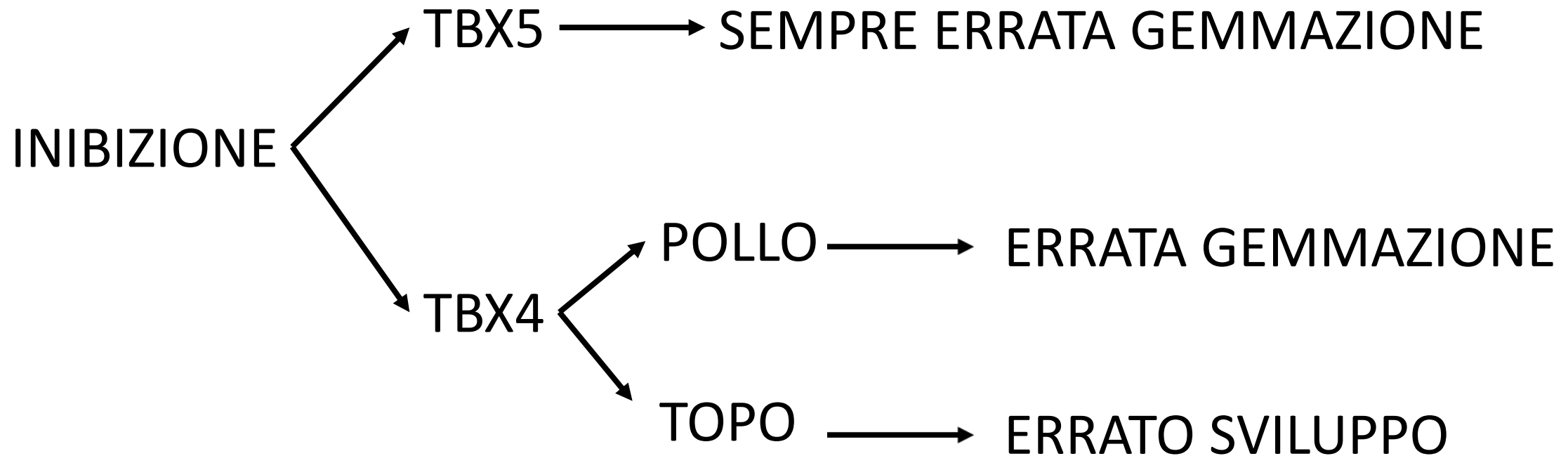
Altri due fattori di trascrizione hanno questo ruolo:



TBX 4 non ha esattamente la stessa funzione in tutti i tetrapodi.

Infatti l'inibizione di TBX5 sia nel pollo che nel topo portava a una mancata formazione della gemma, stesso destino per TBX5 nel pollo.

Ma l'inibizione di TBX4 nel topo portava a dei risultati differenti da quelli attesi, infatti il processo di gemmazione risultava normale ma si aveva un precoce arresto dell'accrescimento dell'arto.



Quindi nel topo devono esser presenti altri fattori di trascrizione che sono coinvolti nella formazione iniziale della gemma dell'arto posteriore:

- **ISLET 1**
- **PITX1**

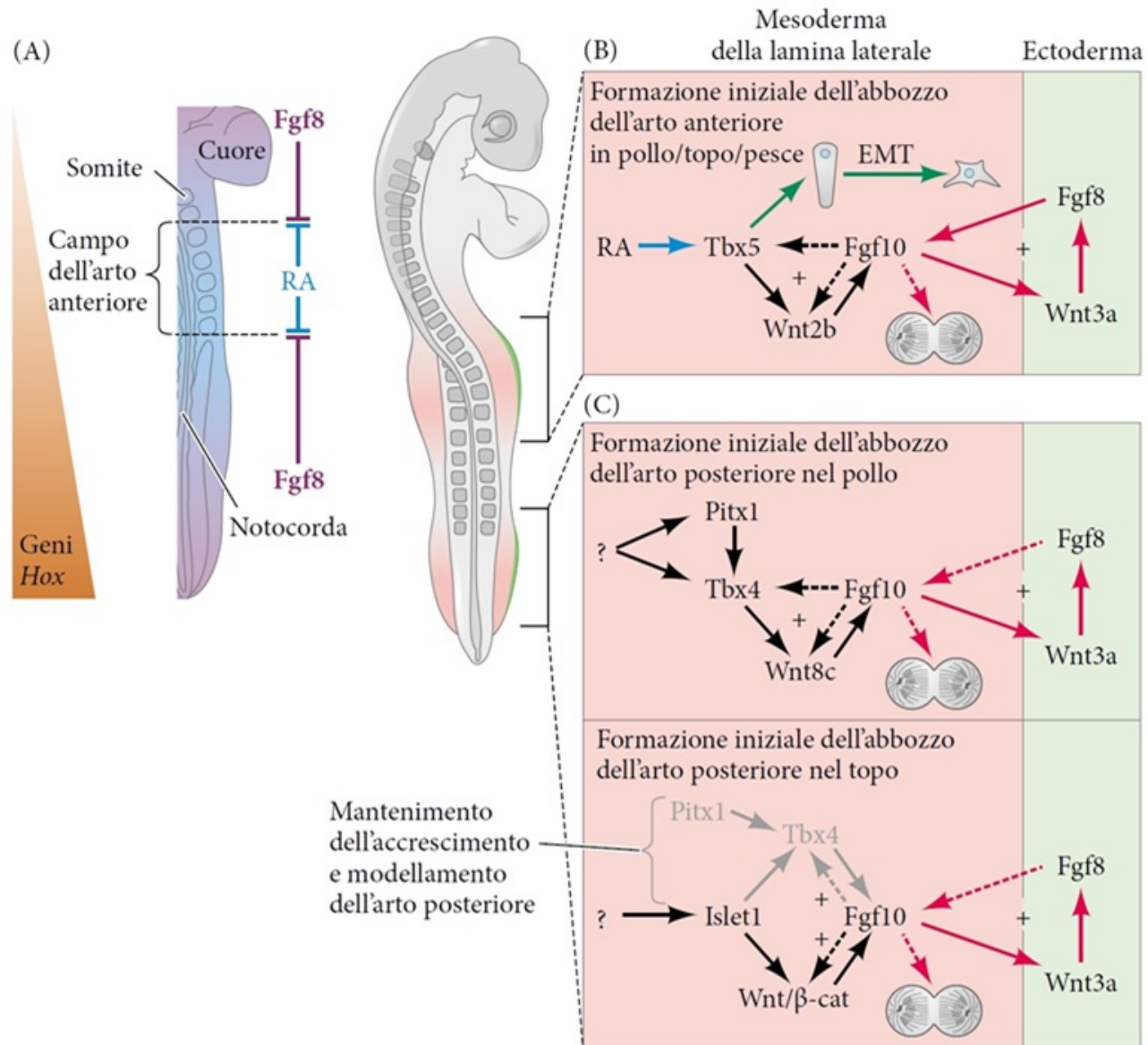
Nell'arto inferiore è proprio ISLET1 (fattore a omeodominio) a permettere la produzione di FGF10

ISLET1 → FGF10 → GEMMA DELL'ARTO

~~ISLET1~~ → NO GEMMA

PITX1 ha il compito per attivare i geni specifici per l'arto inferiore come TBX4 e HOX10, infatti una sovraespressione di PITX1 porta ad un arto anteriore con caratteristiche di quello posteriore

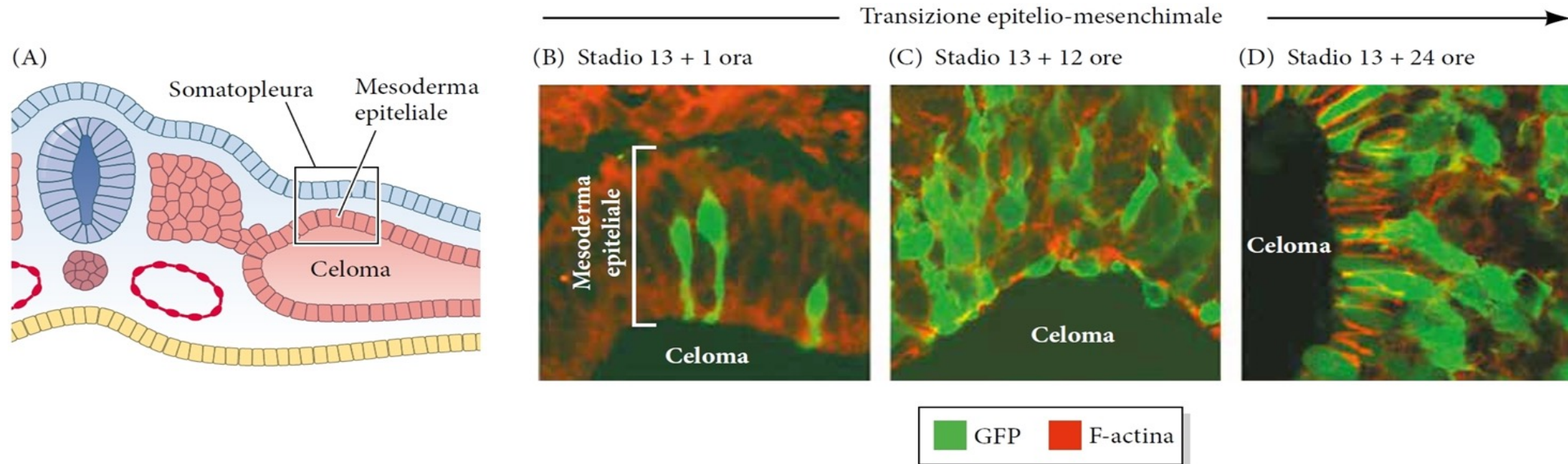
PITX1 → TBX4



Induzione della transizione epitelio-mesenchimatica

Il mesoderma della piastra laterale: **epitelio pseudostratificato**
Cellule dell'abbozzo: **cellule mesenchimatiche**

Nell'arto superiore è stato identificato TBX5 come responsabile dell'emt, nell'arto inferiore non è stato identificato nessun responsabile.



Generazione di 2 circuiti a feedback positivo

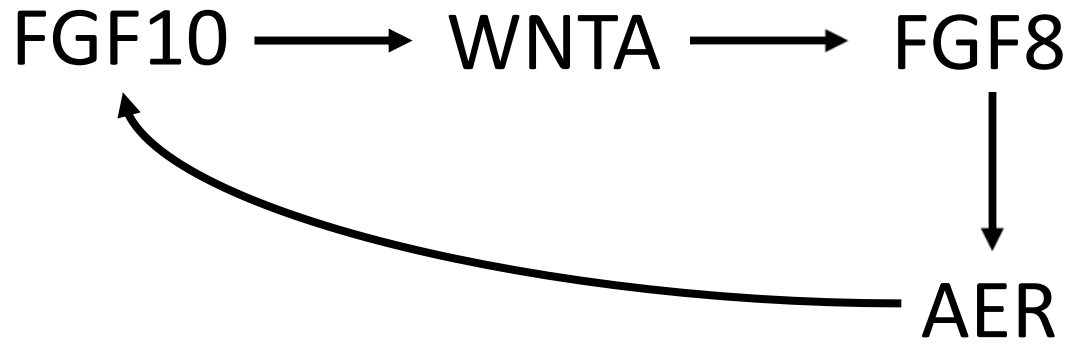
FGF10 deve continuare ad essere espresso durante tutta la formazione della gemma dell'arto.



Nell'arto posteriore il meccanismo è analogo ma con fattori differenti FGF10 stimola TBX4 o ISLET1

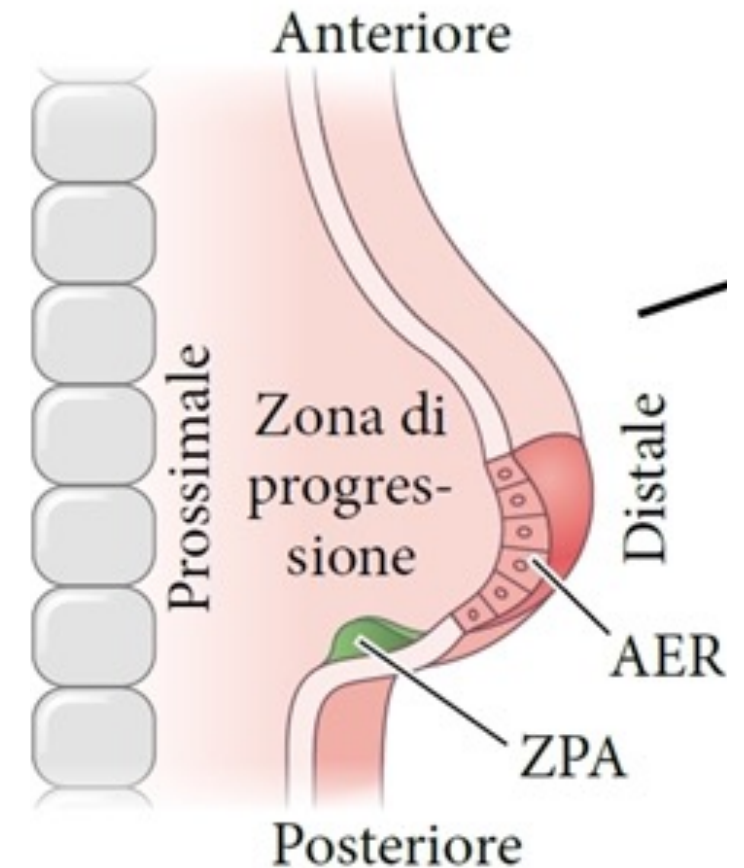
Ma perché il segnale deve essere perpetuato?

FGF 10 verrà secreto dal mesenchima del campo dell'arto ed ha un importantissima funzione ossia indurre l'ectoderma sovrastante a formare la cresta apicale o AER.

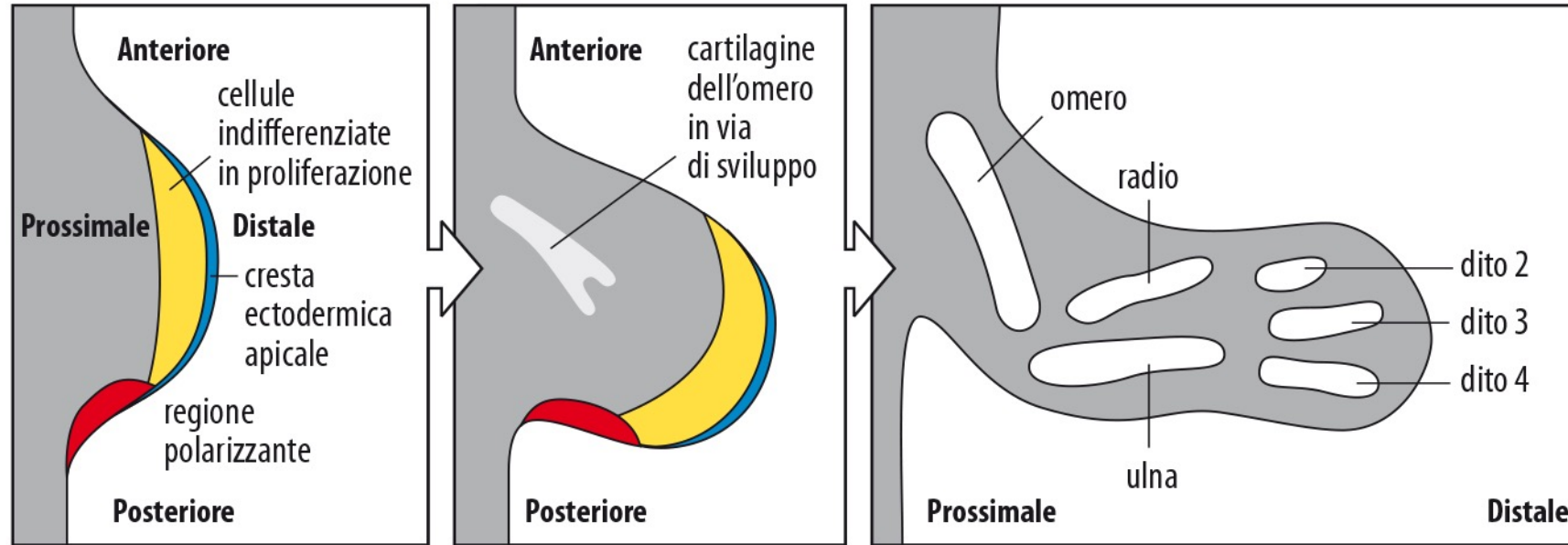


L'AER è un importantissimo centro di segnalazione per l'arto stesso oltre che un componente del secondo sistema di feedback.

L'AER può crescere solo nell'ectoderma di confine tra dorso e ventre

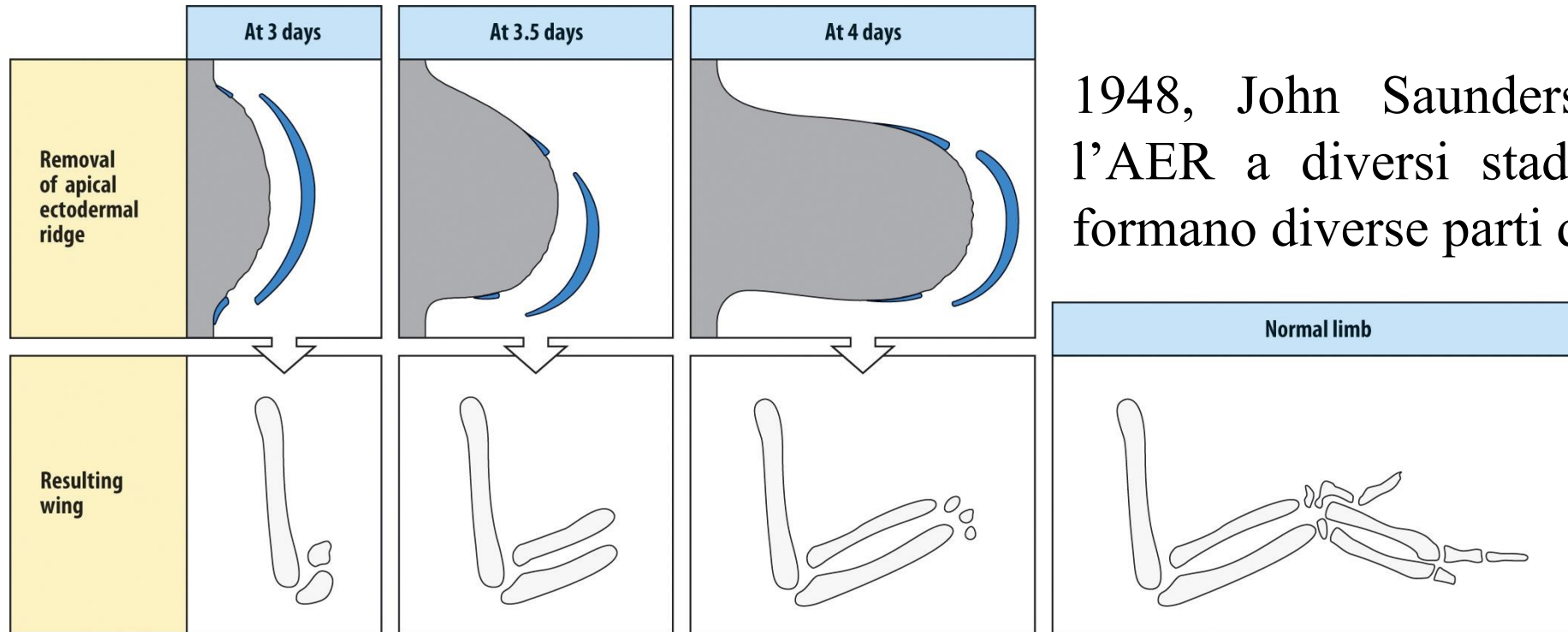


Determinazione della polarità prossimo-distale



Nell'abbozzo precoce dell'ala di pollo ci sono due principali regioni di segnalazione: la regione polarizzante a livello del margine posteriore (rosso) e la cresta ectodermica apicale (blu). La regione polarizzata specifica la posizione lungo l'asse antero-posteriore; **ma come avviene invece la specificazione prossimo-distale dell'arto?**

Che ruolo hanno rispettivamente mesenchima e cresta ectodermica apicale nella loro interazione reciproca? L'informazione posizionale per la polarità prossimo-distale risiede nel mesenchima o nella AER?

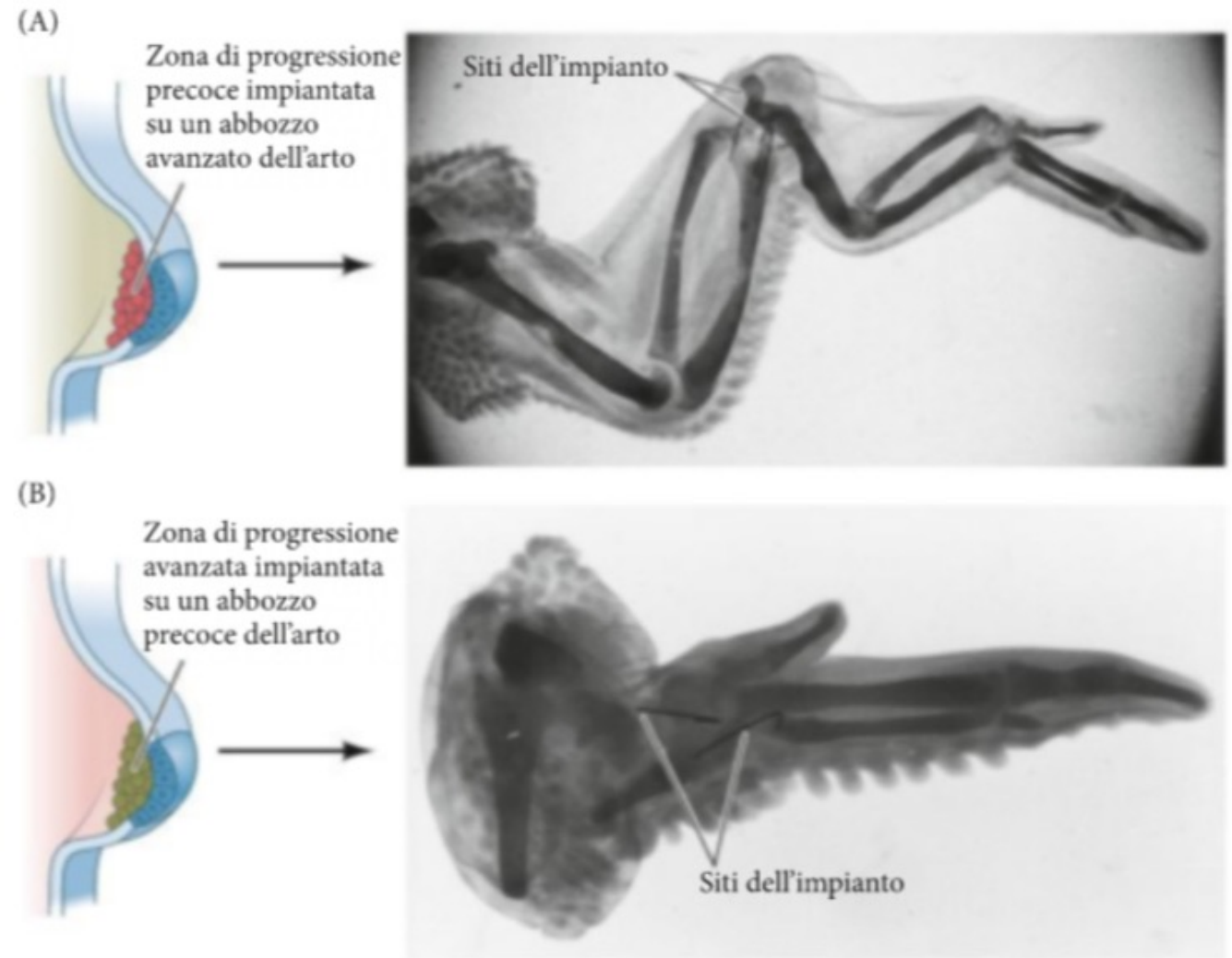


1948, John Saunders → asportando l'AER a diversi stadi di sviluppo, si formano diverse parti dell'arto.

Se fosse stato l'AER a specificare la polarità prossimo-distale, trapiantandolo a stadi precoci in mesenchima a stadio avanzato avremmo trovato *duplicazioni*; trapiantando AER a stadi avanzati con mesenchima precoce invece avremmo avuto *delezioni*. **Entrambi questi esperimenti diedero risultati normali.**

Trapiantando zone di progressione precoci in un abbozzo avanzato si trovarono *duplicazioni* (A); trapiantando invece zone di progressione avanzate in un abbozzo precoce si avevano delle *delezioni* (B).

Quindi il mesenchima specifica l'identità scheletrica lungo l'asse prossimo-distale.



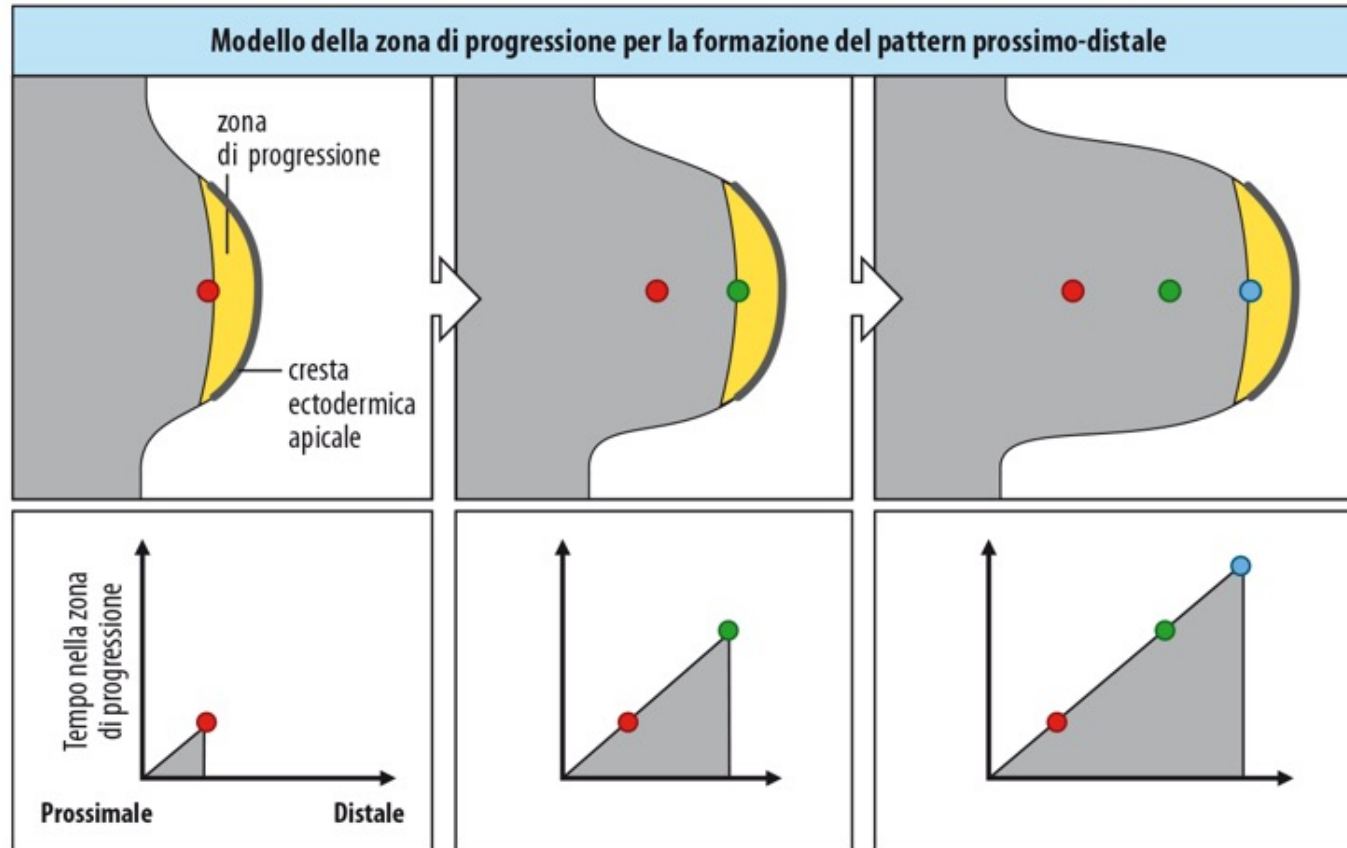
Ma come fa il mesoderma a specificare la polarità prossimo-distale dell'arto?

Sono stati formulati tre modelli diversi che provano a spiegare il meccanismo dietro l'acquisizione di identità delle cellule lungo l'asse prossimo distale. Questi sono:

- 1. Modello a tempo (o della zona di progressione)**
- 2. Modello a doppio gradiente**
- 3. Modello di reazione-diffusione di Turing**

Tutti i modelli descritti però non sono in grado di supportare tutte le evidenze sperimentali.

Modello a tempo (o modello della zona di progressione)



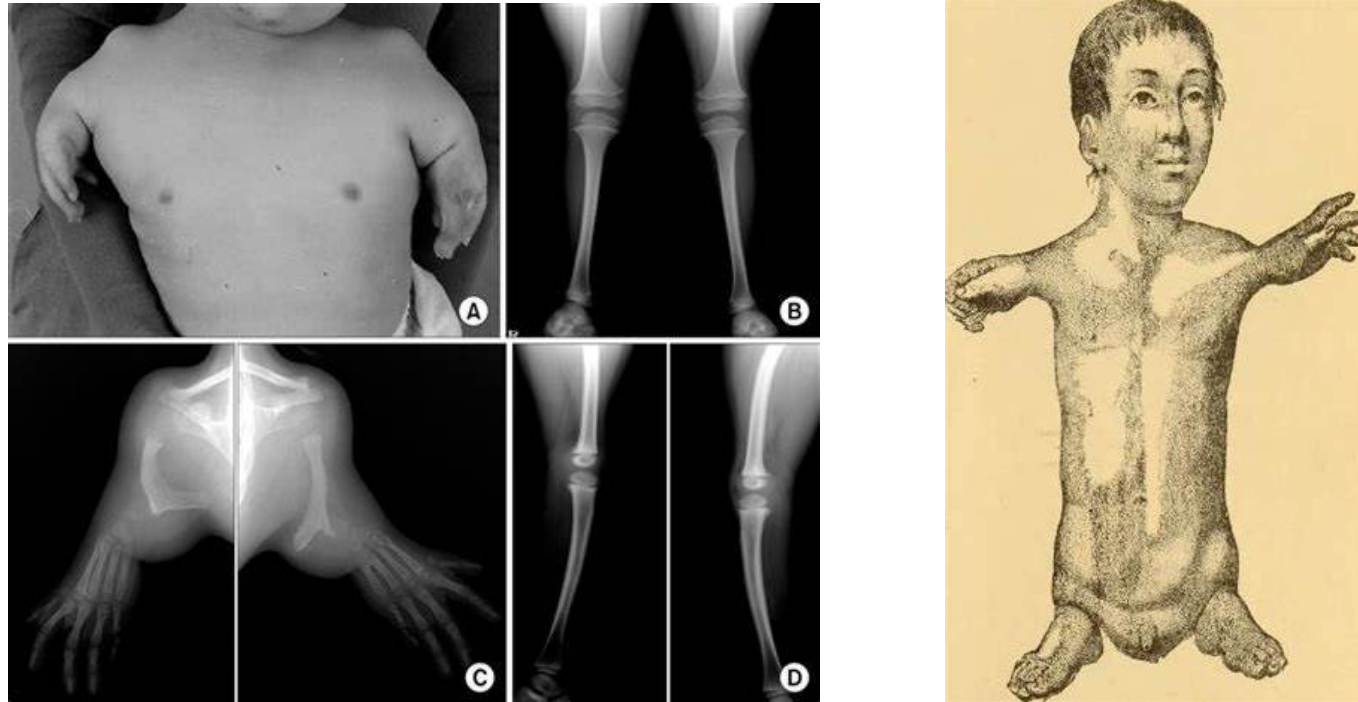
Questo modello propone che la specificazione del pattern prossimo-distale dipende da quanto tempo le cellule rimangono nella zona di cellule indifferenziate all'estremità prossimale dell'arto. Questa zona si chiama **zona di progressione (ZP)**.

Le cellule che lasciano per prime la ZP formeranno lo *stilopodio*; sono seguite poi da quelle che formano lo *zeugopodio*; le ultime a lasciare la ZP formano l'*autopodio*.

Sperimentando sul pollo si vide che irradiando cellule della ZP precoce al fine di ucciderle, non si formarono le strutture prossimali, mentre le distali si formarono in maniera per lo più normale.

Questo indicava che le cellule irradiate non si dividevano più, e per questo motivo meno cellule lasciavano la ZP nell'unità di tempo.

La **focomelia** è una patologia dell'uomo che vede la perdita di strutture prossimali dell'arto. Negli anni '50 molti bambini nacquero con questa condizione (assunzione talidomide).

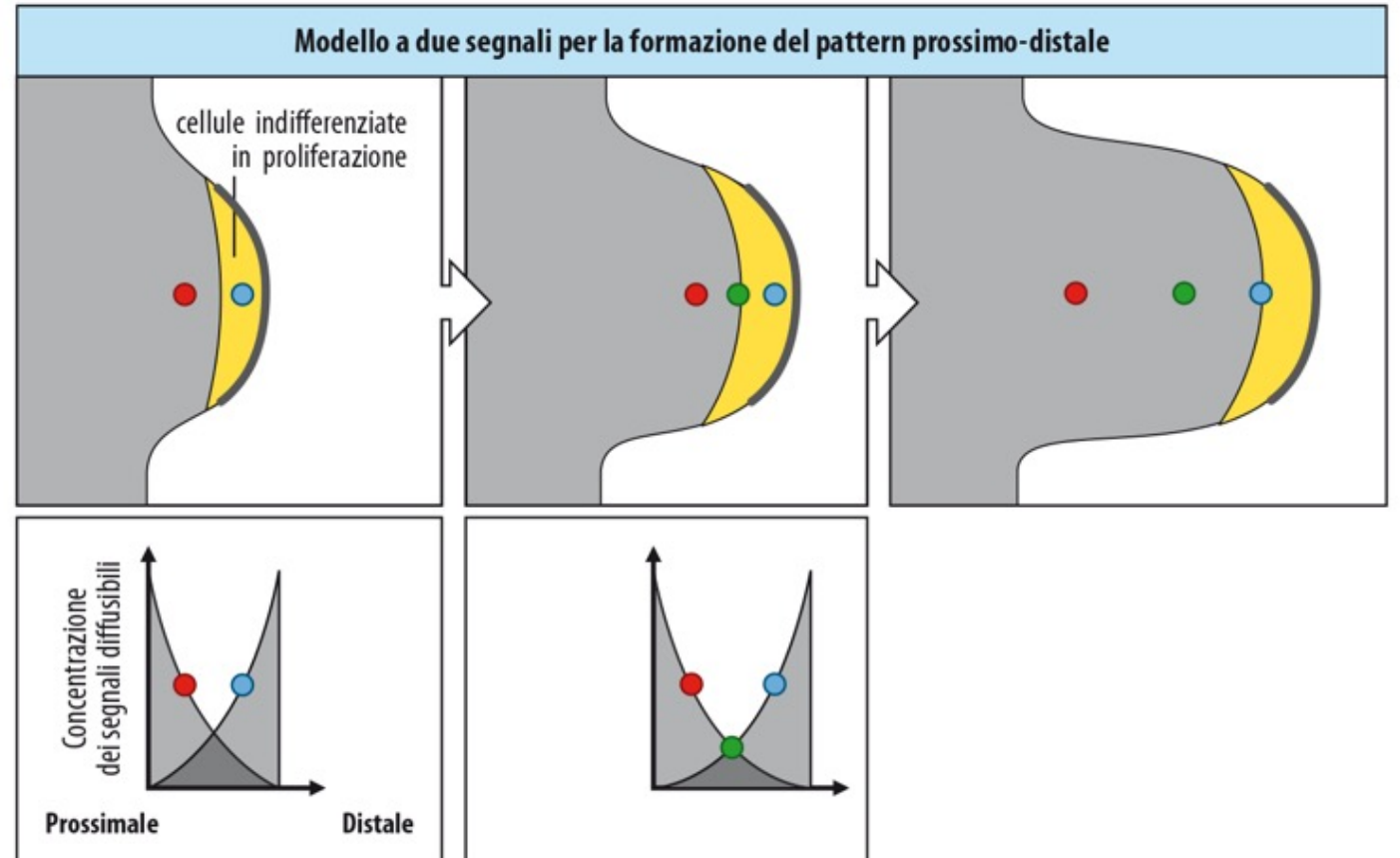


Modello a doppio gradiente

Secondo questo modello il segnale **FGF** a livello *distale* è contrapposto al segnale *prossimale* dell'**acido retinoico (RA)**, e che i valori di posizione prossimali siano specificati dall'RA che si diffonde dall'adiacente parete corporea dell'abbozzo dell'arto.

Si vede che i gradienti erano due:

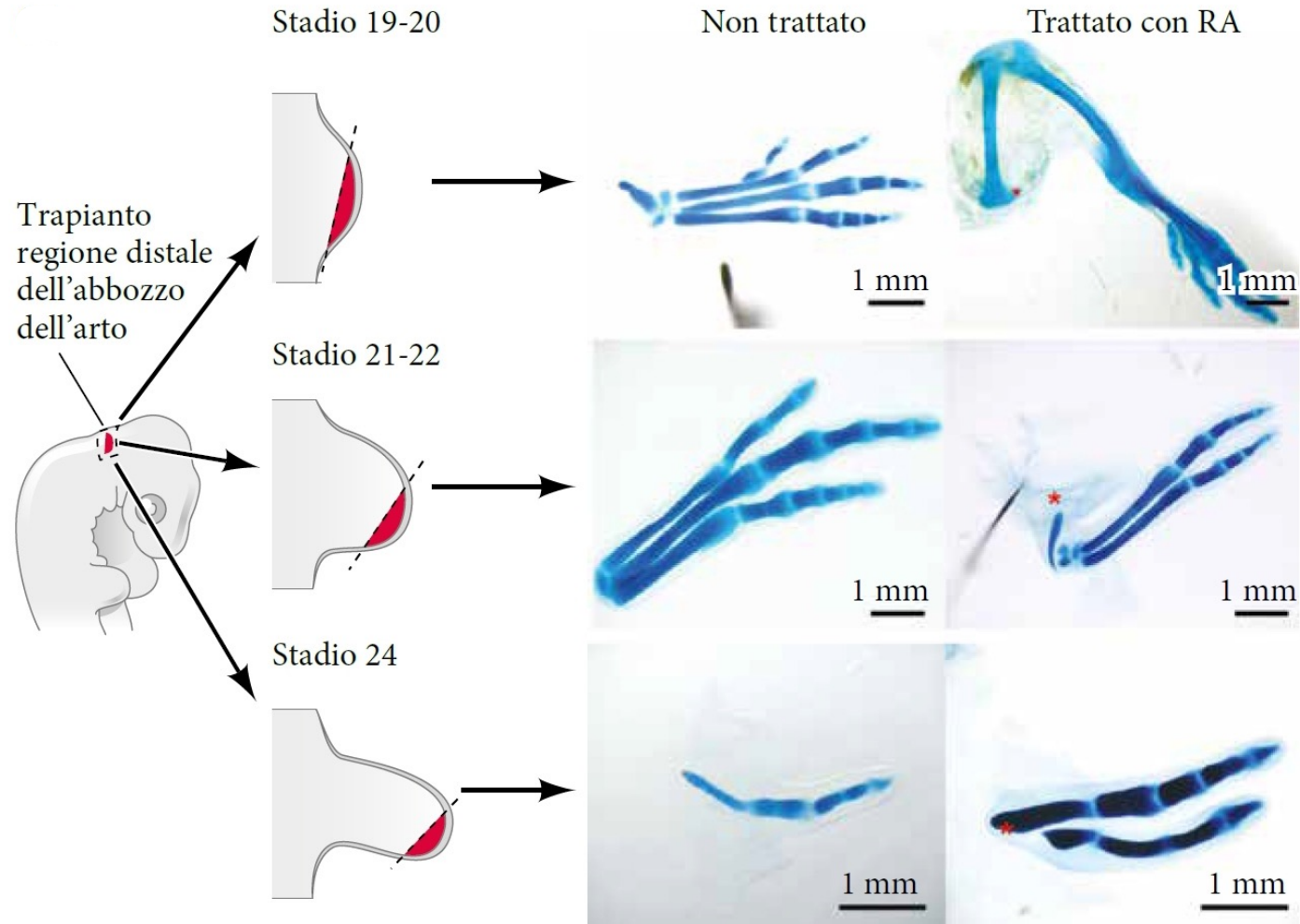
1. Gradiente Fgf e Wnt dell'AER distale
2. Gradiente RA del tessuto prossimale del fianco

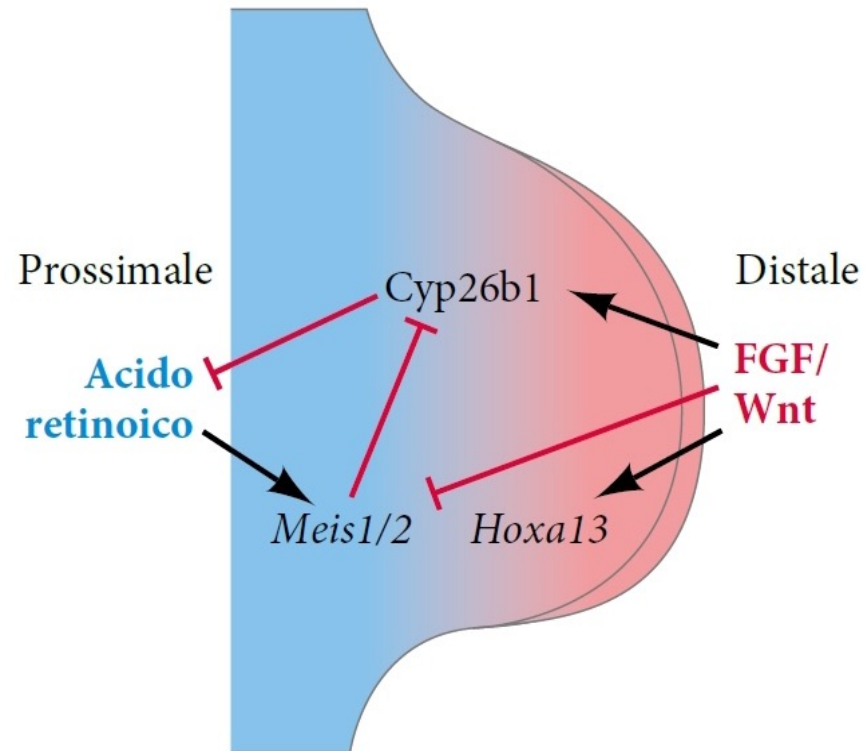


Ipotizzato per gli anfibi, ma attuali evidenze supportano questo modello anche per gli altri organismi tetrapodi.

Cooper e Rosello-Diaz espiantarono cellule mesenchimali da una gemma dell'arto e le impiantarono in una a stadio precoce. L'osso diventava **più prossimale** se il mesenchima trapiantato era trattato con RA in presenza di Wnt e Fgf; diventava **più distale** se trattato solo con Wnt e Fgf.

C'è un **equilibrio** tra l'effetto di induzione *prossimale* determinato da RA e l'azione *distale* di Wnt e Fgf. Si suppone che alla base di ciò ci fossero **gradienti di concentrazione** dei vari fattori.



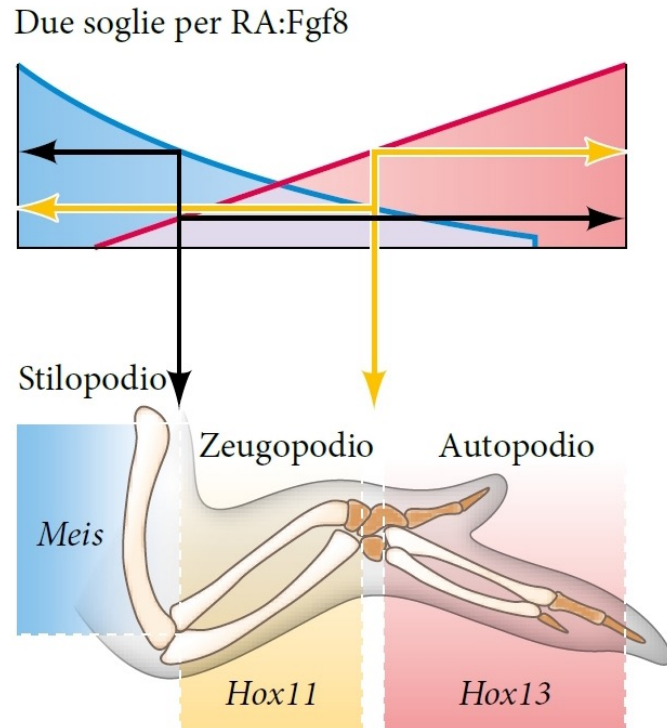


RA e Fgf8 sono *antagonisti*:

- RA reprime Fgf8
- Fgf8 induce la sovraespressione dell'enzima **CYP26**, che degrada RA
- RA promuove l'espressione di **Meis1** (stilopodio), Fgf8 la reprime
- Fgf8 promuove la sintesi di **Hoxa13** (autopodio), RA lo reprime

Una **soglia di segnale** procede da RA a Fgf8; il variare del loro rapporto specifica parti diverse dell'arto lungo l'asse P-D.

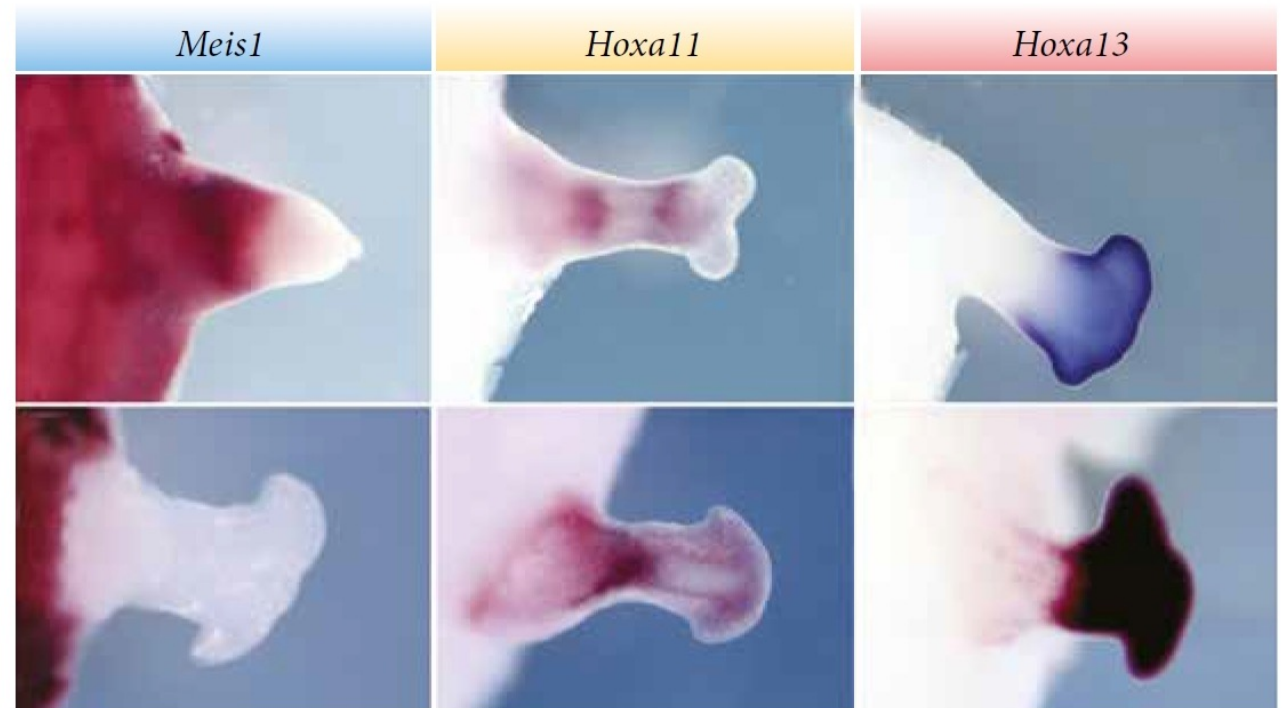
Trattamenti con i fattori Fgf8 e Wnt3a sovrascrivono Hoxa13 e diminuiscono l'espressione di Meis1 → **distalizzano le strutture**



(C)

Mesenchima non trattato allo stadio 18

Mesenchima incubato con FGF/Wnt allo stadio 18



Questo modello però si basa su dati ottenuti sul pollo, e sono state trovate incongruenze nel topo (RA non necessario per lo sviluppo degli arti posteriori). In alternativa è stato proposto un **modello a gradiente singolo**, in cui ci si concentra sui segnali provenienti dall'AER (FGT e Wnt).

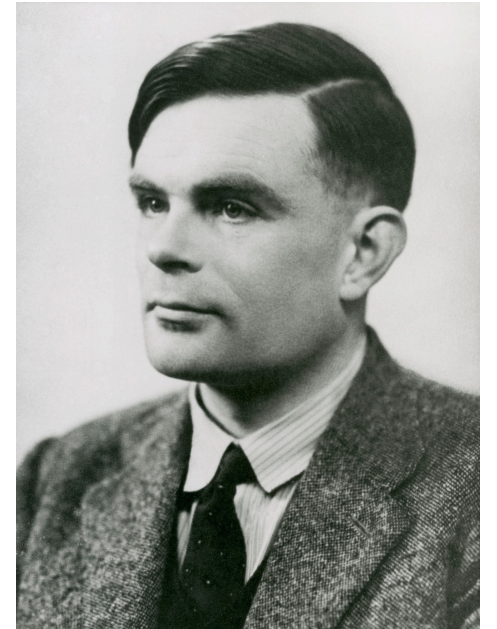
Modello di Turing, reazione-diffusione

È un modello matematico formulato da **Alan Turing** nel 1952, atto a descrivere come i profili di modellamento possono essere *auto-organizzati*.

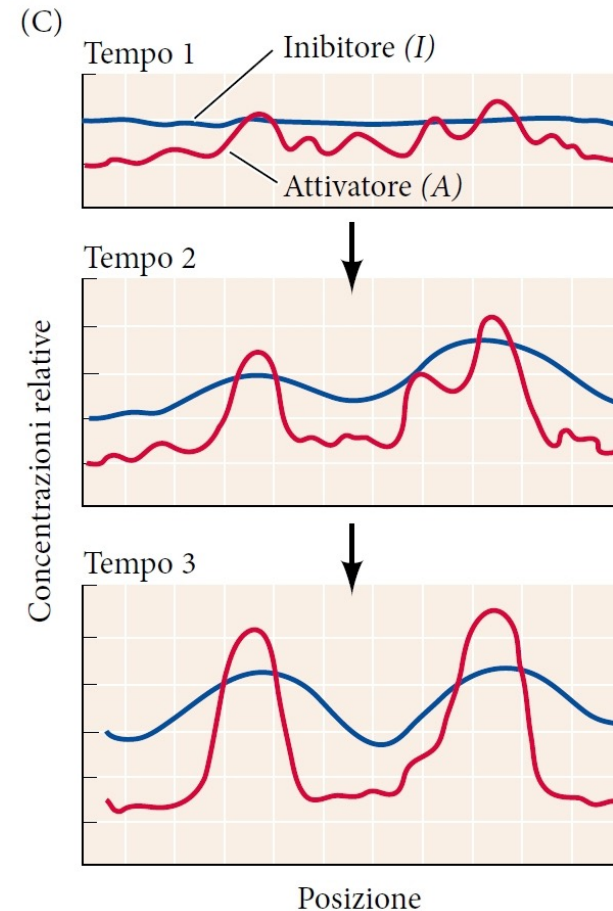
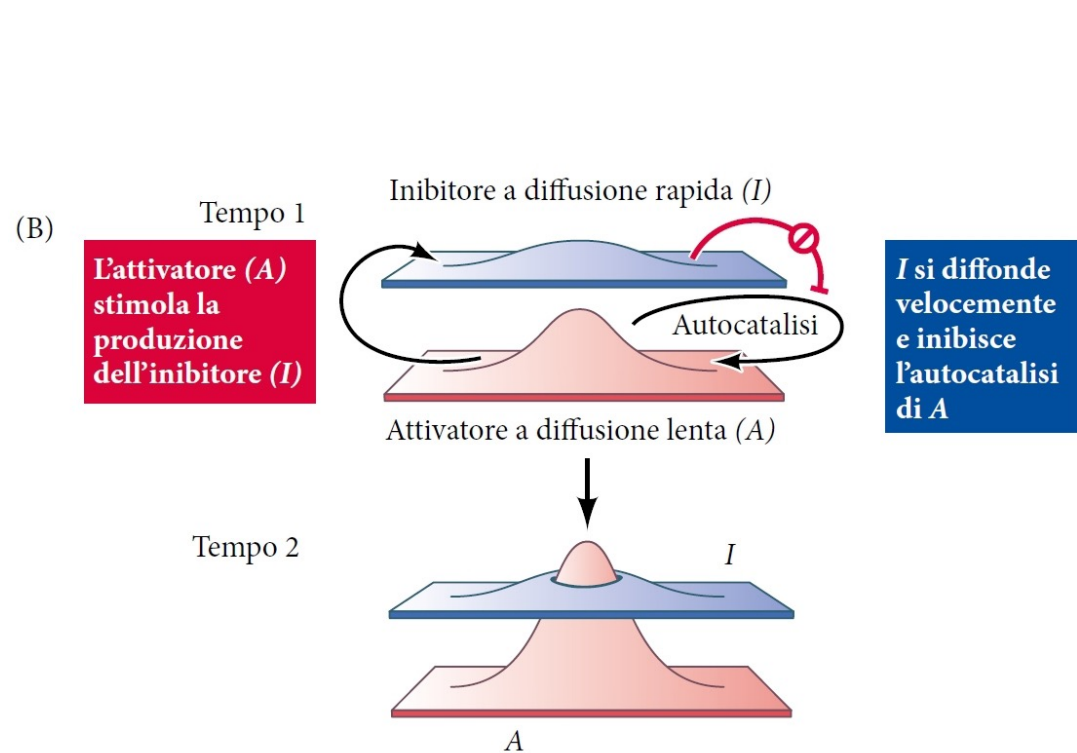
Le interazioni tra due molecole possono produrre spontaneamente dei profili non uniformi («reazione»); questo in presenza di sostanze:

- omogeneamente distribuite
- che influiscono sull'espressione l'una dell'altra
- hanno velocità di diffusione diverse

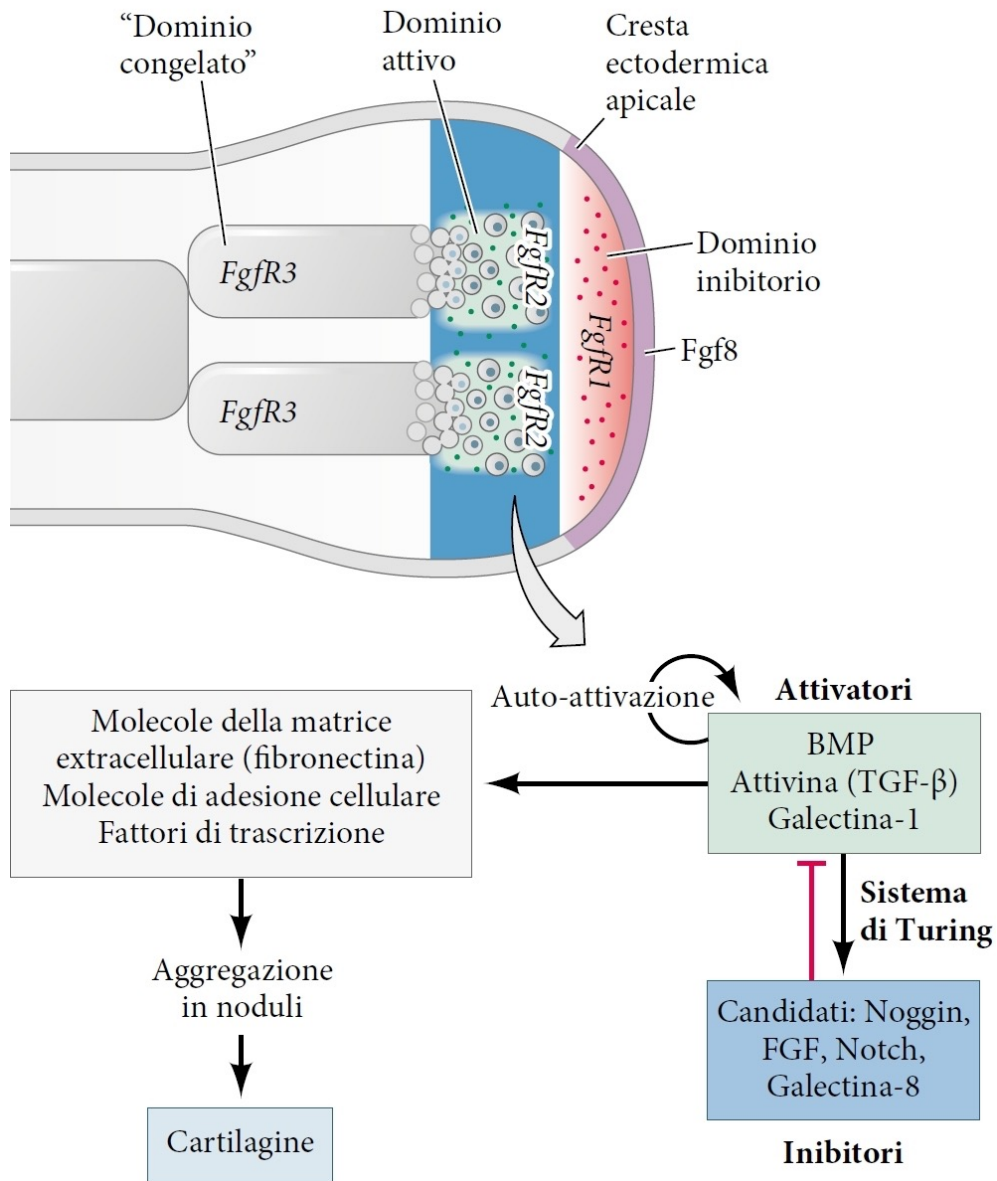
$$\frac{\partial \mathbf{c}}{\partial t} = \mathbf{f}(\mathbf{c}) + D \nabla^2 \mathbf{c}$$



Fornì un sistema «**autoattivazione locale – inibizione laterale**» a carico di due morfogeni: un attivatore **A** che promuove la formazione di altro A, ed un inibitore **I**, prodotto da A, che inibisce A.



Inizialmente la diffusione di A ed I è casuale, poi secondo il modello LALI si creano dei picchi di concentrazioni alternate che indurranno destini cellulari differenti.



Stuart Newman dimostrò come il meccanismo di reazione-diffusione sia in grado di spiegare il modellamento del mesenchima dell'arto. Il mesenchima si divide in tre parti:

1. **zona apicale**, mesenchima più vicino all'AER, con condensazione della pre-cartilagine repressa
2. **zona attiva**, mesenchima in cui avviene la coalescenza delle condizioni cartilaginee (qui si applica il modello di Turing)
3. **zona congelata**, mesenchima oltre l'influenza dell'AER, con i primordi cartilaginei della zona prossimale

Zona attiva: produce attivatori come **TGF-β**, fattore autocrino, BMP e galectine. Queste ultime producono **fibronectine** → aggregati cartilaginei. Sono sintetizzati anche inibitori dell'aggregazione, come Nogging e galectine inibitorie.

Le onde di sintesi e di inibizione formerebbero il profilo originale dell'arto.

Zhu e colleghi fornirono un modello che rappresentasse il tipo di scheletro che si forma in base a tre parametri: **geometria della gemma, diffusibilità e velocità di sintesi e inibizione.**

Destra: concentrazione TGF- β a varie fasi dello sviluppo + condensazione delle ossa

Sinistra: modello computerizzato previsione sviluppo dell'arto

