

FIGURA 11.22 Induzione di *scleraxis* nello sclerotomo di pollo a opera di Fgf8 prodotto dal miotomo. (A) Il dermatomo, il miotomo e lo sclerotomo si costituiscono prima che i precursori del tendine siano specificati. I precursori tendinei (sindetomo) sono specificati nella fila più dorsale di cellule dello sclerotomo, grazie all'Fgf8 derivante dal miotomo. (B) Percorso attraverso

il quale i segnali di Fgf8 dalle cellule precursori del muscolo inducono le sottostanti cellule dello sclerotomo a diventare tendini. (C) Le cellule del sindetomo migrano (freccie) lungo le vertebre in via di sviluppo. Esse si differenziano in tendini che collegano le coste ai muscoli intercostali, le tanto apprezzate "costine di maiale". (A,C, tratte da Brent et al. 2003.)

grado di distinguerli e permetterci di seguire il destino delle loro cellule.

Il sindetomo si genera grazie alla secrezione di Fgf8, da parte del miotomo, sullo strato cellulare dello sclerotomo immediatamente sottostante (Figura 11.22A; Brent et al. 2003; Brent e Tabin 2004). Altri fattori di trascrizione limitano l'espressione di *scleraxis* alle parti anteriore e posteriore del sindetomo, causando la formazione di due fasce di espressione di *scleraxis*. Nel frattempo, le cellule della cartilagine in sviluppo, sotto l'influenza di Sonic hedgehog dalla notocorda e dal pavimento basale, sintetizzano Sox5 e Sox6, fattori di trascrizione che bloccano la trascrizione di *scleraxis* (Figura 11.22B). In questo modo, la cartilagine si protegge da qualsiasi diffusione del segnale Fgf8. I tendini si associano quindi ai muscoli, posti direttamente al di sopra di essi, e allo scheletro (tra cui le coste) su entrambi i lati (Figura 11.22C; Brent et al. 2005).

MESODERMA INTERMEDIO: IL SISTEMA UROGENITALE

Il mesoderma intermedio dà origine al sistema urogenitale: i reni, le gonadi e i rispettivi sistemi di condotti. Posticipando la trattazione delle gonadi a quando sarà discussa la determinazione del sesso nel Capitolo 14, concentreremo qui l'attenzione sullo sviluppo del rene nei mammiferi.

• Il succedersi di diverse tipologie di rene

Homer Smith osservava nel 1953 come «i nostri reni costituiscono il principale fondamento della nostra libertà filosofica. Soltanto perché i reni funzionano come funzionano è stato possibile per noi avere ossa, muscoli, ghiandole, cervello». Sebbene quest'affermazione sappia di iperbole, il rene umano è un organo incredibilmente complicato la cui importanza non può essere sottovalutata. La sua unità funzionale, il **nefrone**, è formata da oltre 10 000 cellule e almeno 12 tipi cellulari differenti, con ogni tipo cellulare dotato di una funzione specifica e situato in una sede particolare rispetto agli altri, lungo il nefrone.

Lo sviluppo del rene dei mammiferi procede attraverso tre stadi principali. I primi due sono stadi transitori; soltanto il terzo e ultimo rimane come rene funzionale. Precocemente nel corso dello sviluppo (a 22 giorni nell'uomo, a 8 giorni nel topo) nel mesoderma intermedio compare il **dotto pronefrico**, in posizione immediatamente ventrale rispetto alla parte anteriore dei somiti. Le cellule di questo dotto migrano in direzione caudale, e la regione anteriore del dotto induce il mesenchima adiacente a formare il **pronefro**, o tubuli del rene primitivo (Figura 11.23A). Mentre i tubuli pronefrici formano reni funzionanti nei pesci e nelle larve degli anfibi, negli amnioti si ritiene che non siano attivi. Nei mammiferi, i tubuli del pronefro e la parte anteriore del dotto pronefrico degenerano, mentre permangono le

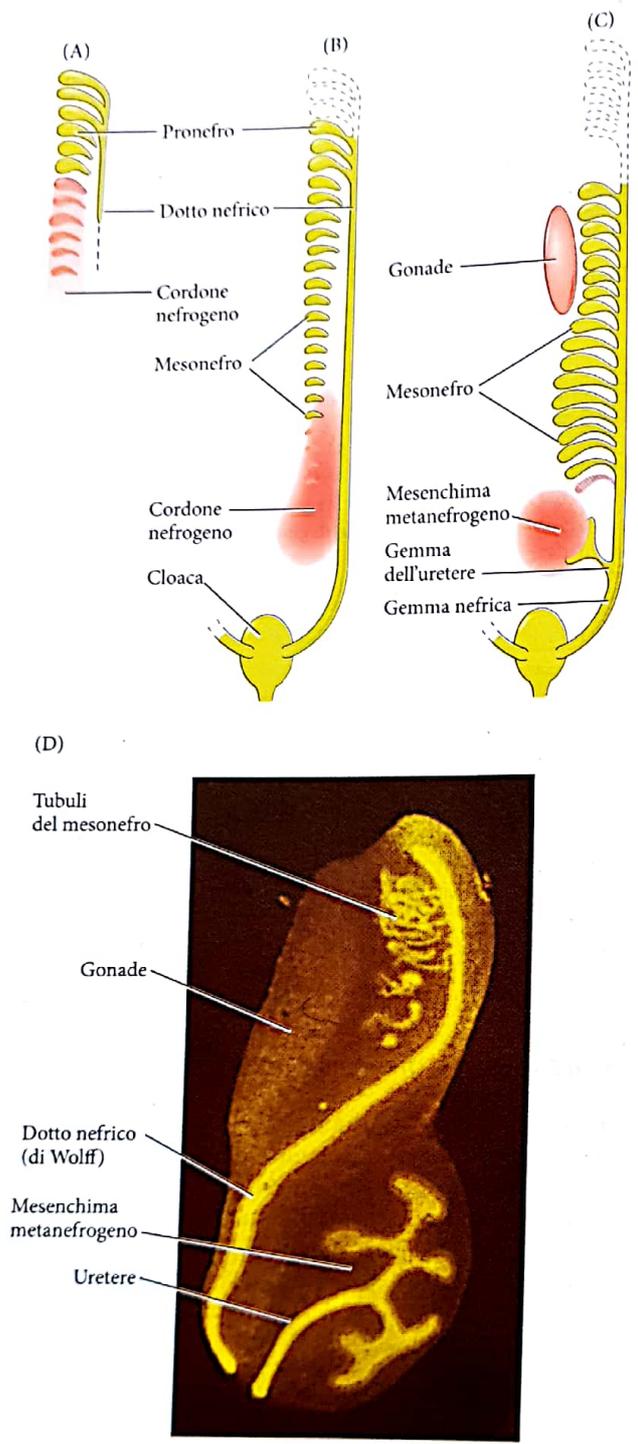


FIGURA 11.23 Schema generale dello sviluppo del rene dei vertebrati. (A) La formazione nel mesenchima nefrogeno dei tubuli primitivi, costituenti il pronefro, è indotta dal dotto pronefrico, via via che questo migra caudalmente. (B) Quando il pronefro regredisce, si formano i tubuli mesonefrici. (C) Il rene definitivo dei mammiferi, il metanefro, è indotto dalla gemma ureterica, che si origina come ramo del dotto nefrico. (D) Mesoderma intermedio di un embrione di topo di 13 giorni, in cui si osserva l'inizio della formazione del rene metanefrico (in basso) mentre è ancora evidente il mesonefro. Il tessuto del dotto è colorato con un anticorpo fluorescente specifico per una citocheratina presente nel dotto pronefrico e nei suoi derivati. (A-C, tratte da Saxén 1987; D, fotografia per gentile concessione di S. Vainio.)

parti più caudali del dotto pronefrico che servono come componente centrale del sistema escretore durante tutto lo sviluppo (Toivonen 1945; Saxén 1987). Questo dotto che permane è spesso indicato come **dotto nefrico**, o **dotto di Wolff**.

Mentre i tubuli pronefrici degenerano, al contempo, la parte mediana del dotto mesonefrico induce una nuova serie di tubuli renali nel mesenchima adiacente. Questa serie di tubuli costituisce il **mesonefro** o rene mesonefrico (Figura 11.23B; Sainio e Raatikainen-Ahokas 1999). In alcune specie di mammiferi, il mesonefro funziona per breve tempo nella filtrazione dell'urina, ma nei topi e nei ratti non agisce come un rene funzionante. Nell'uomo si formano circa 30 tubuli mesonefrici, a cominciare dal venticinquesimo giorno di sviluppo. Via via che vengono indotti nuovi tubuli in direzione caudale, i tubuli mesonefrici anteriori cominciano a regredire per apoptosi (sebbene nel topo permangano i tubuli anteriori, mentre regrediscono quelli posteriori: Figura 11.23C, D). Sebbene non sia ancora noto se il mesonefro umano abbia effettivamente una funzione nella filtrazione del sangue e nella produzione di urina, nel corso della sua breve esistenza esso svolge funzioni importanti nello sviluppo. In primo luogo, come si vedrà nel Capitolo 12, è la principale fonte di cellule staminali emopoietiche necessarie per lo sviluppo degli elementi del sangue (Medvinsky e Dzierzak 1996; Wintour et al. 1996). In secondo luogo, nel maschio dei mammiferi alcuni tubuli mesonefrici permangono, diventando le vie di trasporto degli spermatozoi dal testicolo all'uretra (l'epididimo e i dotti deferenti; vedi Capitolo 14).

Il rene permanente degli amnioti, il **metanefro**, si origina da alcuni degli stessi componenti del precedente rene transitorio (vedi Figura 11.23C). Si ritiene che esso si formi attraverso una serie complessa d'interazioni tra costituenti epiteliali e mesenchimali del mesoderma intermedio. Nei primi stadi, in regioni caudali del mesoderma intermedio, si forma il **mesenchima metanefrogeno**, che induce la comparsa di un'evaginazione in ciascuno dei due dotti nefrici. Questi siti di ramificazione epiteliale sono definiti **gemme ureteriche**. Alla fine, tali gemme si separeranno dal dotto nefrico, per diventare i dotti collettori e gli ureteri che portano l'urina alla vescica. Quando si originano dal dotto nefrico, le gemme ureteriche penetrano nel mesenchima metanefrogeno. Esse inducono questo tessuto mesenchimale ad addensarsi attorno a esse e a differenziarsi nei nefroni del rene dei mammiferi. Nel differenziarsi, questo mesenchima induce le gemme ureteriche a ramificarsi e accrescersi.

La specificazione del mesoderma intermedio: Pax2/8 e Lim1

Il mesoderma intermedio dell'embrione di pollo acquisisce la capacità di formare reni mediante le sue interazioni con il mesoderma parassiale. Mentre la sua tendenza a divenire mesoderma intermedio è probabilmente stabilita attraverso il gradiente BMP di cui si è accennato in precedenza, la specificazione sembra stabilizzarsi attraverso segnali provenienti dal mesoderma parassiale. Mauch e collaboratori (2000) hanno dimostrato che segnali del me-

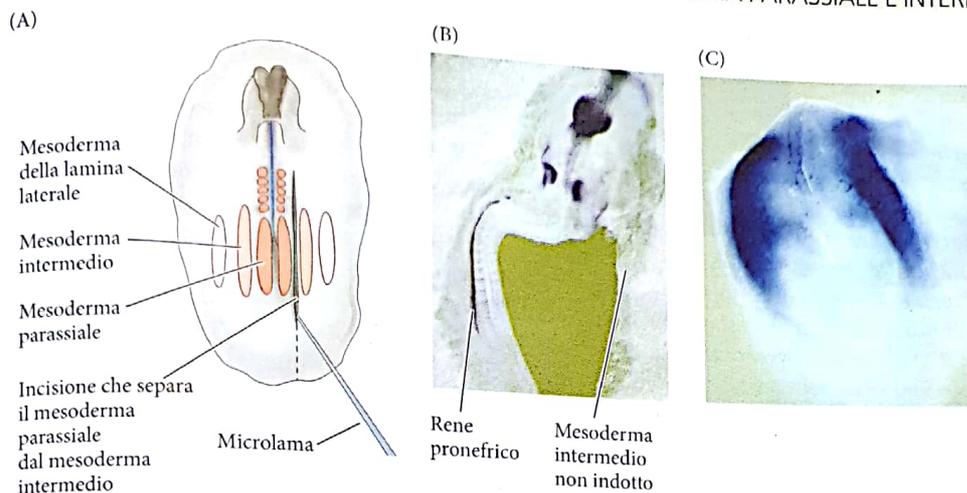


FIGURA 11.24 Segnali provenienti dal mesoderma parassiale inducono la formazione del pronefro nel mesoderma intermedio dell'embrione di pollo. (A) Il mesoderma parassiale è stato separato chirurgicamente dal mesoderma intermedio nel lato destro del corpo. (B) Di conseguenza, si è sviluppato un rene pronefrico (tubuli che si colorano per Pax2) soltanto

nel lato sinistro. (C) Espressione di Lim1 in un embrione di topo all'ottavo giorno di sviluppo, che mostra il mesoderma intermedio prospettico. (A, B tratte da Mauch et al. 2000; B, per gentile concessione di T. J. Mauch e G. C. Schoenwolf; C, per gentile concessione di K. Sainio e M. Hytönen.)

so derma parassiale inducono nel mesoderma intermedio dell'embrione di pollo la formazione del rene primitivo. I ricercatori sezionarono embrioni in via di sviluppo in modo tale che in un lato del corpo il mesoderma intermedio non potesse avere contatto con il mesoderma parassiale. In quel lato del corpo (dove era stato soppresso il contatto con il mesoderma parassiale), non si formarono reni, mentre il lato su cui non si era intervenuti era ancora in grado di formarli (Figura 11.24A,B). Il mesoderma parassiale si dimostra necessario e sufficiente a indurre nel mesoderma intermedio la capacità di formare reni, dal momento che la cocoltura di mesoderma della lamina laterale con il mesoderma parassiale induce la formazione di tubuli pronefrici nel mesoderma della lamina laterale e che nessun altro tipo cellulare è in grado di esercitare questa azione.

Queste interazioni inducono l'espressione di una serie di fattori di trascrizione a omeodominio, fra cui Lim1, Pax2 e Pax8, che inducono il mesoderma intermedio a formare il rene (Figura 11.24C; Karavanov et al. 1998; Kobayashi et al. 2005). In *Xenopus*, i domini d'espressione delle proteine Pax8 e Lim1 hanno confini sovrapposti e lo sviluppo del rene origina da cellule esprimenti entrambe le proteine. Allo stesso modo, la coespressione ectopica dei geni Pax8 e Lim1 produrrà reni in altri tessuti (Carroll e Vize 1999).

Nell'embrione di pollo, Pax2 e Lim1 sono espresse nel mesoderma intermedio, a partire dalla regione affiancata al sesto somite (cioè, solo nel tronco, non nella testa); se Pax2 viene sperimentalmente espresso nel mesoderma presomitico, esso converte quel mesoderma parassiale in mesoderma intermedio, esprime Lim1 e forma i reni (Mauch et al. 2000; Suetsugu et al. 2002). Allo stesso modo, in embrioni di topo in cui entrambi i geni Pax2 e Pax8 sono stati deleti, la transizione mesenchimo-epiteliale necessaria per la formazione del dotto del rene è impedita, le cellule vanno incontro ad apoptosi, e non si forma nessuna strut-

tura nefritica (Bouchard et al. 2002). Inoltre, nel topo, le proteine Lim1 e Pax2 sembrano indursi l'un l'altra.

Lim1 svolge diversi ruoli nello sviluppo renale nel topo. Per prima cosa, questa proteina è necessaria per convertire il mesenchima intermedio in dotto renale (Tsang et al. 2000); in seguito, è necessaria per la formazione della gemma ureterica e della struttura tubulare sia nel mesenchima mesonefrico che in quello metanefrico (Shawlot e Behringer 1995 (Karavanov et al. 1998; Kobayashi et al. 2005).

Il confine anteriore delle cellule esprimenti Lim1 e Pax2 sembra essere stabilito dalle cellule poste sopra una determinata regione che perdono la loro competenza nel rispondere all'attivina secreta dal tubo neurale. Questa competenza è conferita dal fattore di trascrizione Hoxb4, che non è espresso nella regione più anteriore del mesoderma intermedio. Il confine anteriore del dominio d'espressione di Hoxb4 è stabilito da un gradiente di acido retinoico, e l'aggiunta locale di attivina permetterà al rene di estendersi anteriormente (Barak et al. 2005; Preger-Ben Noon et al. 2009).

● Interazioni reciproche dei tessuti renali in via di sviluppo

I due tessuti del mesoderma intermedio, ossia la gemma ureterica e il mesenchima metanefrogeno, interagiscono e s'inducono reciprocamente a formare il rene (Figura 11.25). Il mesenchima metanefrogeno induce la gemma ureterica ad allungarsi e a ramificarsi. Le estremità di queste ramificazioni inducono le cellule del mesenchima lasso a formare aggregati di tipo epiteliale. Ogni aggregato nodulare di circa 20 cellule prolifererà e si differenzierà nella intricata struttura di un nefrone. Ogni nodulo dapprima si allunga, assumendo un aspetto "a virgola", poi forma un tubulo con una caratteristica forma a "S". Subito dopo, le cellule di questa struttura epiteliale cominciano a differenziarsi in tipi

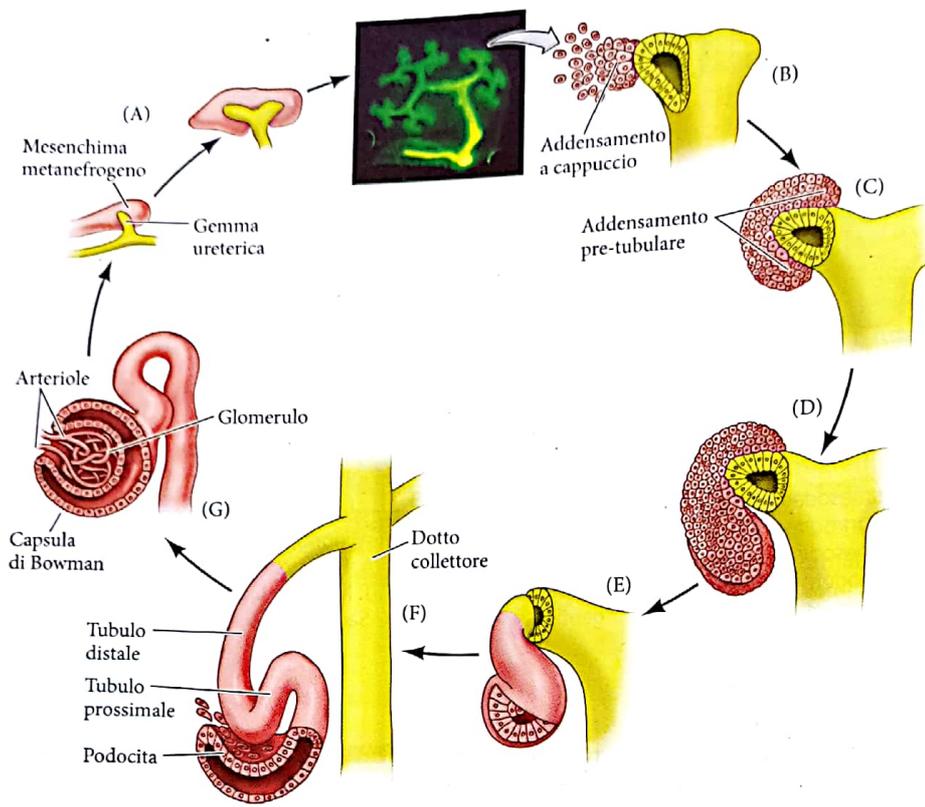


FIGURA 11.25 Induzione reciproca nello sviluppo del rene dei mammiferi. (A) Quando la gemma ureterica penetra nel mesenchima metanefrogeno, questo induce la gemma a ramificarsi. (B-G) Alla sommità delle ramificazioni, l'epitelio induce il mesenchima ad aggregarsi e cavitarsi, formando i tubuli renali (in cui avviene la filtrazione del sangue portato dalle arteriole). Quando il mesenchima si è compattato in un epitelio, esso riassorbe la lamina basale delle cellule della gemma ureterica che l'hanno indotto, per poi connettersi con l'epitelio della gemma ureterica. Una parte del mesenchima aggregato (l'addensamento pretubulare) diviene il nefrone (tubulo renale e capsula di Bowman), mentre il ramo della gemma ureterica diviene il dotto collettore dell'urina. (Tratta da Saxén 1987 e Sariola 2002.)

cellulari a specificità regionale, che comprendono le cellule della capsula, i podociti, e le cellule del tubulo distale e del tubulo prossimale. Mentre avviene questa trasformazione i noduli epiteliali degradano la lamina basale delle ramificazioni della gemma ureterica e si fondono con esse³. Con questa fusione, tra il tubulo neoformato e la gemma ureterica si stabilisce una connessione che permette il passaggio di materiali dall'uno all'altra (Bard et al. 2001). Questi tubuli derivati dal mesenchima costituiscono i nefroni secretori del rene funzionante, e le ramificazioni della gemma ureterica danno origine ai dotti collettori renali e all'uretere, che drena l'urina dal rene.

Clifford Grobstein (1955, 1956) documentò questa induzione reciproca *in vitro*. Separò la gemma ureterica dal mesenchima metanefrogeno e li mise in coltura separatamente sia insieme. In assenza del mesenchima, la gemma ureterica non si ramifica. In assenza della gemma ureterica, il mesenchima va presto incontro a morte. Quando invece sono coltivati insieme, la gemma ureterica si accresce e si ramifica e si formano nefroni in tutto il mesenchima. Questo meccanismo è stato confermato mediante esperimenti in cui sono state usate proteine marcate per monitorare la divisione e la ramificazione cellulare (Figura 11.26; Srinivas et al. 1999).

³ La complessa coordinazione dello sviluppo del nefrone con i capillari sanguigni filtrati dai nefroni è data dalla secrezione di VEGF a opera dei podociti. Il VEGF, come si vedrà nel Capitolo 12, è un potente induttore di vasi sanguigni poiché induce le cellule endoteliali dell'aorta dorsale a formare le anse capillari dell'apparato di filtrazione del glomerulo (Aitkenhead et al. 1998; Klanke et al. 1998).

● **I meccanismi dell'induzione reciproca**

L'induzione del metanefro può essere interpretata come una sorta di dialogo tra la gemma ureterica e il mesenchima metanefrogeno. Via via che il dialogo procede, entrambi i tessuti si modificano. Noi seguiremo questo dialogo con più attenzione rispetto a quanto abbiamo fatto per gli altri organi. Questo perché il rene è diventato un modello generale per l'organogenesi. Ci sono molte ragioni per questa scelta. In primo luogo, lo sviluppo renale iniziale ha solo due componenti principali. In secondo luogo, sono stati scoperti l'identità e i ruoli di molti dei fattori paracrini di trascrizione, prodotti nel corso di questo dialogo, grazie a studi condotti su topi, in cui tali fattori sono stati deleti (topi *knockout*). In terzo luogo, l'assenza di molti di questi fattori di trascrizione è associata a gravi patologie caratterizzate dall'assenza dei reni o dalla presenza di reni rudimentali.

Sebbene si svolgano numerosi dialoghi simultanei tra gruppi differenti di cellule renali, sono almeno nove i segnali importanti che agiscono nell'induzione reciproca dei metanefri.

Stadio 1: formazione del mesenchima metanefrogeno, Fox, Hox e WT1 Soltanto il mesenchima metanefrogeno ha la competenza per rispondere alla gemma ureterica formando tubuli renali; infatti, questo mesenchima non è in grado di diventare nessun altro tipo di tessuto che non sia il nefrone. Se indotto da tessuti non renali (come le ghiandole salivari embrionali o il tessuto del tubo neurale), il mesen-