



DESENVOLUPAMENT DE LES EXTREMITATS I MALFORMACIONS CONGÈNITES ASSOCIADES

- Revisió bibliogràfica -

Treball de fi de grau - Memòria

Alumna: Gisela Sanchis Pitarch

Grau en Veterinària - Curs 2022/2023

Universitat Autònoma de Barcelona

Tutor: Marc Navarro Beltrán

Convocatòria: Febrer de 2023

ÍNDEX

1 Introducció.....	3	5 Malformacions congènites.....	11
2 Objectius.....	3	5.1. Eix Proximodistal.....	11
3 Material i mètodes.....	3	5.1.1. Amèlia.....	11
4 Desenvolupament de les		5.1.2. Micromèlia.....	12
extremitats.....	4	5.1.3. Braquidactília.....	12
4.1. Context temporal.....	4	5.1.4. Acondroplàsia.....	12
4.2. Conceptes.....	4	5.2. Eix Craniocaudal.....	13
4.3. Adhesivitat.....	5	5.2.1. Sindactília.....	13
4.4. Hox.....	5	5.2.2. Polidactília.....	13
4.5. L'Àcid retinoic.....	6	5.2.3. Inversions.....	13
4.6. Eixos.....	6	5.3. Eix Dorsiventral.....	13
4.6.1. Eix Proximodistal - La CEA.....	7	5.3.1. Ectromèlia.....	13
4.6.2. Eix Craniocaudal - La ZAP.....	9	6 Conclusions	14
4.6.2.1. Shh-BMP.....	9	7 Bibliografia.....	14
4.6.3. Eix Dorsiventral -			
L'ectoderma.....	11		

1 INTRODUCCIÓ

Els esbossos de les extremitats sorgeixen a ambdós costats de l'embrió i consisteixen, principalment, en mesoderma de la placa lateral (PLM) cobert per una capa d'ectoderma, amb la qual interacciona. La PLM (amb característiques d'un epitelí pseudoestratificat) (Gilbert i Barresi, 2016), conté els progenitors de totes les poblacions cel·lulars de les extremitats, excepte del múscul (que prové del dermomiòtom dels sòmits axials) (Pineault i Wellik, 2014; Mariani *et al.*, 2017). A mesura que l'esbós creix distalment, els diversos teixits es diferencien i estableixen el patró dels elements esquelètics. Aquests es poden subdividir morfològicament en estilopodi, zeugopodi i autopodi (Mundlos i Horn, 2014). Parlem de camp o àrea de l'extremitat quan ens referim al conjunt de cèl·lules de diferent origen presents en una regió capaces de diferenciar-se i formar una extremitat per elles mateixa (Gilbert i Barresi, 2016).

Aquestes cèl·lules mesodèrmiques indiferenciades estan cobertes per un engruïment a l'ectoderma, la cresta ectodèrmica apical (CEA). Es tracta d'una estructura epitelial transitòria engrossida que recorre el marge distal de l'esbós i actua com un centre de senyalització amb un paper imprescindible en la regulació i el creixement proximodistal (PD) dels membres (Mundlos i Horn, 2014; Mariani *et al.*, 2017; Lin i Zhang, 2020).

Per conèixer totes aquestes cèl·lules, molècules i processos, Saunders J. W. va realitzar diversos experiments amb embrions de pollastre que consistien en: (1) eliminar grups cel·lulars i observar si el membre es desenvolupava en la seva absència, (2) trasplantar grups cel·lulars a altres ubicacions i observar si es formaven extremitats ectòpiques, i (3) marcar els grups cel·lulars amb colorants i observar el seu destí i descendents al llarg del desenvolupament de les extremitats (Saunders, 1972; Gilbert i Barresi, 2016).

2 OBJECTIUS

En aquest treball intentarem fer un recull de les dades que ens aporten els estudis dels últims 20 anys per tal d'explicar com totes aquestes estructures i teixits embrionaris interaccionen entre ells per formar les extremitats dels mamífers. A més, veurem quins són els moments en que apareixen defectes en el desenvolupament i com aquests condueixen a les malformacions congènites dels membres.

3 MATERIAL I MÈTODES

Si busquem en Pubmed "limb development" surten 81.663 publicacions. Si acotem la cerca en el temps per tenir en compte els articles dels últims 20 anys, i, a més, afegim el filtre "free full text" per poder accedir lliurement a la informació, la xifra es redueix a 23.184 resultats. Revisat fins a la pàgina 5 (els 50 articles millor valorats) el dia 5/10/2022 i escollint un total de 9 articles. S'han descartat aquells que parlaven més concretament d'amfibis, aquells excessivament específics o aquells amb un desenvolupament semblant a altres més

actuals. També s'han descartat aquells que es centraven en elements concrets del sistema musculoesquelètic (múscul, os, tendons, ...).

Si busquem en Pubmed “embryonic limb development” surten 6.434 publicacions. Si acotem la cerca en el temps per tenir en compte els articles dels últims 20 anys, i, a més, afegim el filtre “free full text” per poder accedir lliurement a la informació, la xifra es redueix a 1.827 resultats. Revisat fins a la pàgina 4 (els 40 articles millor valorats) el dia 5/10/2022 i escollint un total de 2 articles. S'han descartat aquells que ja s'havien trobat en cerques anteriors, aquells massa específics, aquells que es centraven en amfibis o aquells que tenien conclusions semblants a altres més actuals.

Si busquem en Pubmed “limb development malformation” surten 8.041 publicacions. Si acotem la cerca en el temps per tenir en compte els articles dels últims 20 anys, i, a més, afegim el filtre “free full text” per poder accedir lliurement a la informació, la xifra es redueix a 1.937 resultats. Revisat fins a la pàgina 5 (el 50 articles millor valorats) el dia 6/10/2022 i escollint un total de 2 articles. S'han descartat aquells específics d'humana o que tractaven altres elements aliens a les extremitats.

Si busquem en Science “chondrodysplasia dog” surten 7 publicacions. Si acotem la cerca en el temps per tenir en compte només els articles dels últims 20 anys la xifra es redueix a 5 resultats. Revisat el dia 26/12/2022 i escollint un article. S'han descartat aquells que es centren en medicina humana, en l'aspecte genètic o de la raça i no tant en les malformacions.

4 DESENVOLUPAMENT DE LES EXTREMITATS

4.1. CONTEXT TEMPORAL

Al ratolí, l'esbós de les extremitats anteriors és evident a partir del E 9'5, mentre que l'extremitat posterior apareix aproximadament mig dia després. Els precursors musculars migren cap a les extremitats anteriors al voltant d'E 10'5 i es detecta l'expressió de factors miogènics a E11, amb masses musculars evidents a E12'5. Els fascicles nerviosos es veuen ja a E11'5. Els progenitors dels tendons es condensen i diferencien a tenòcits, detectats a E13'5, que produeixen molècules de matriu extracel·lular i les organitzen en fibril·les. Aquestes fibril·les s'organitzen en fibres tendinoses, i per a E14'5 els tendons ja són visibles als dits. La modulació esquelètica dels membres comença amb la formació de condensacions cartilaginoses, al voltant d'E11'5, precursoras dels ossos. El desenvolupament de les articulacions comença amb la formació de la interzona, una regió de cèl·lules mesenquimàtiques, seguida per la cavitació articular visible al E15'5. El desenvolupament de les extremitats normalment es completa al voltant d'E18'5 (Rafipay *et al.*, 2018).

4.2. CONCEPTES

Per començar hem de comprendre que dintre dels esbossos dels membres ens podem referir a diferents àrees funcionals, per exemple el mesoderma altament proliferatiu que alimenta el creixement dels brots de les extremitats o zona de progrés (ZP) i les cèl·lules que es troben a la regió més caudal de la ZP constitueixen la zona d'activitat polaritzant (ZAP), que intervé en el destí cel·lular al llarg de l'eix craniocaudal (CC) (Figura1) (Gilbert i Barresi, 2016).

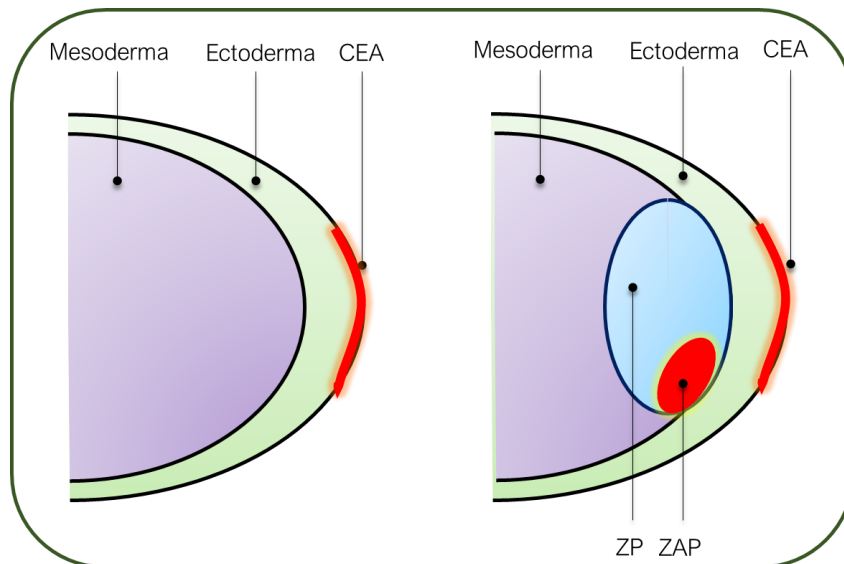


Figura 1. Parts dels esbossos de les extremitats.

4.3. ADHESIVITAT

Les cèl·lules del mesènquima mostren propietats adhesives diferencials de cada teixit, donant lloc a la formació de compartiments dorsiventrals (DV) independents. La diversa adhesió entre teixits adjacents restringeix la distribució cel·lular i, per tant, influeix a la morfogènesi (Wada, 2011; Delgado i Torres, 2017).

La tensió de les cèl·lules mesodèrmiques del brot és major que les del mesoderma del tronc perquè les cèl·lules en el camp de l'extremitat s'adhereixen més fort entre elles com a resultat de l'increment d'adhesivitat, per això es comporten diferent. Aquesta possibilitat està recolzada en l'efecte del Fgf8b (Factor de creixement de fibroblasts 8b), el qual s'expressa a l'ectoderma del camp de les extremitats just abans de la iniciació del membre i potencia la tensió superficial (Wada, 2011).

L'adhesivitat específica de posició de les cèl·lules és un mecanisme conservat entre espècies i és possible que estigui relacionat amb la regulació del desenvolupament i la regeneració de les extremitats. També s'observen afinitats cel·lulars del mesènquima dependent de la posició al llarg de l'eix CC, cosa que indica que el mesènquima es divideix en diversos subgrups cel·lulars que presenten propietats d'adhesió úniques. La diferent adhesivitat és manté fins estadis tardans (Wada, 2011).

4.4 HOX

Les extremitats anteriors es formen al límit de les vèrtebres cervico-toràciques i les posteriors al límit lumbosacre. Les cèl·lules de la PLM estan capacitades per formar les extremitats des de l'etapa somítica 2 i per especificar la posició de les extremitats intervenen els gens Hox (McQueen i Towers, 2020).

Els gens Hox, són els responsables d'establir la identitat posicional correcta de les vèrtebres al llarg de l'eix corporal CC. Són un total de 39 gens (en mamífers) que es classifiquen en 13 grups paral·lels segons la posició i similitud de les seqüències gèniques. Els membres de cada grup comparteixen dominis d'expressió semblants i realitzen funcions redundants. La diferència entre el patró axial i el patró de les extremitats és deu a la funció solapada dels paral·lels dintre de l'extremitat. Els clústers Hox A i Hox D s'expressen en extremitats anteriors

i posteriors, mentre que Hox C només s'expressa en extremitats posteriors (Pineault i Wellik, 2014).

D'altra banda, també determinaran la identitat dels dits. I és important destacar que els gens Hox han intervingut en l'evolució dels membres a les diverses espècies i, per tant, en les diferents adaptacions de les extremitats al medi (Gilbert i Barresi, 2016).

4.5. L'ÀCID RETINOIC

L'àcid retinoic (ÀR) és el derivat metabòlic primari de la vitamina A, una molècula que actua com a lligand dels receptors d'esteroides nuclears. Aquests receptors funcionen com a activadors o repressors transcripcionals depenent de si estan o no units a l'ÀR (Lewandoski i Mackem, 2009). L'ÀR està present a totes les regions somítiques del tronc adjacents als membres anteriors, on és necessari per reprimir l'expressió de Fgf8 del tronc i promoure la iniciació del brot al lloc adequat. A mesura que l'esbós progressa, la CEA s'allunya del tronc i queda fora de l'abast de l'ÀR, permetent una major expressió gradual de Fgf8 (Tanaka, 2013; Cunningham i Duester, 2015; Berenguer i Duester, 2021).

L'ÀR es genera al tronc mitjançant el metabolisme seqüencial del retinol a retinaldehid per part de la RDH10 (retinaldehid deshidrogenasa), seguit pel metabolisme del retinaldehid a ÀR per part de la ALDH1A2 (aldehid deshidrogenasa). Posteriorment entra al membre per difusió des del tronc. L'ÀR pot ser degradat per enzims del Cyp26 (membres de la família del citocrom p-450) expressats al membre distal un cop el creixement ha començat (Lewandoski i Mackem, 2009). La pèrdua genètica d'aquests enzims interromp l'inici del desenvolupament de les extremitats anteriors en ratolins. L'ÀR funciona per sobre de Tbx5, essencial per a la iniciació de les extremitats anteriors mitjançant l'estimulació de la transició epiteli-mesoderma i l'activació de Fgf10 (Berenguer i Duester, 2021).

La senyalització ÀR, Fgf i Meis1/2 controla el desenvolupament de les extremitats. El gen Meis1/2 es requereix per la iniciació del brot de les extremitats anteriors, així com per al model PD posterior. La senyal ÀR funciona de manera permissiva durant la iniciació de les extremitats anteriors per l'expressió de Tbx5, reprimint els Fgf8 del tronc (que inhibeixen Tbx5), però l'ÀR no és necessari per al patró de les extremitats. El control de l'ÀR (per Meis) es produeix al tronc per a la somitogènesi, però no a les extremitats, mentre que Fgf és necessari tant per a la iniciació de les extremitats (Fgf10), com per al modelatge (Fgf8) amb els Fgf distals que restringeixen Meis1/2 (Lewandoski i Mackem, 2009; McQueen i Towers, 2020; Berenguer i Duester, 2021).

L'ÀR està involucrat en especificar la polaritat CC mitjançant la regulació dels paràlegs anteriors Hox5-Hox9 i l'expressió posterior de Hand2 en els futurs membres (McQueen i Towers, 2020).

4.6. EIXOS

Pel que fa als eixos de les extremitats, l'eix PD s'estén des del tronc fins a la punta dels dits i està controlat per la CEA; l'eix CC va des del dit 1 fins al dit 5 i està regulat per la ZAP; i l'eix DV, que va des del dors fins al palmell, està modelat per l'ectoderma (Delgado i Torres, 2017). El creixement de les extremitats generalment ocorre en sentit PD i DV al llarg de l'eix longitudinal del membre (Pineault i Wellik, 2014).

El desenvolupament dels brots de les extremitats en els vertebrats està controlat per un sistema de patrons de 4 dimensions que integra feedbacks positius i negatius (Benazet i Zeller, 2009).

4.6.1. EIX PROXIMODISTAL - LA CEA

La funció més important d'aquesta estructura és produir una senyal de Fgf cap al mesoderma per mantenir les seves cèl·lules en un estadi indiferenciat, proliferant i protegides de l'apoptosi, afavorint el creixement de les extremitats al llarg de l'eix PD (Gilbert i Barresi, 2016). D'aquesta manera, Fgf4, 9, 17, i, sobre tot, Fgf8 des de la CEA, indueixen l'expressió mesenquimal de Fgf10, que al seu torn, té la propietat d'induir l'expressió de Fgf8 a l'ectoderma sobrejacent establint un bucle de retroalimentació positiu entre la CEA i el mesoderma (Figura 2). Aquests factors són necessaris per establir la primera partició PD (Mundlos i Horn, 2014; Mariani *et al.*, 2017).

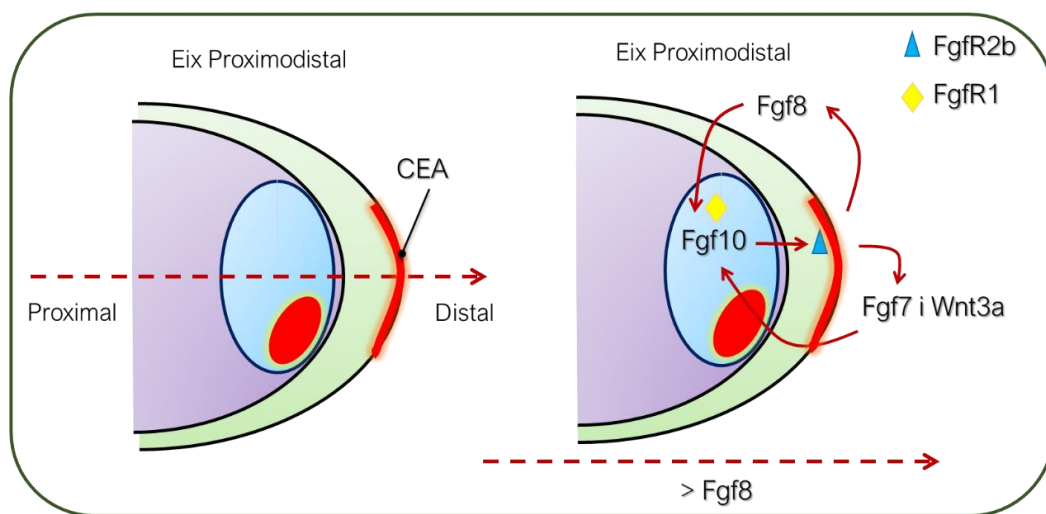


Figura 2. Elements que formen l'eix proximal-distal.

En aquest punt s'inicia la primera interacció entre l'epiteli i el mesènquima, l'esdeveniment clau que inicia el creixement i modelatge de les extremitats. Aquestes interaccions poden regular els esdeveniments dintre de cada teixit, ja que activen cascades de transducció que condueixen a canvis d'expressió gènica. Aquesta resposta dóna a les cèl·lules la capacitat per respondre a nous senyals i continuar amb la comunicació intercel·lular i entre teixits. Una cèl·lula pot rebre diversos senyals alhora que actuïn de forma antagònica o sinèrgica, parlem de vies independents, però coordinades (Selever *et al.*, 2004; Mariani *et al.*, 2017).

El temps que les cèl·lules mesodèrmiques passen sota la influència de Fgf8 és rellevant per a les seves identitats PD: les cèl·lules més distals depenen de la CEA durant més temps. A mesura que la ZP es desplaça distalment, les cèl·lules més proximals deixen d'estar sota la influència de la CEA i això provoca la determinació de les seves identitats, mentre que les cèl·lules progenitores que romanen sota la influència de la CEA més temps adquireixen identitats progressivament més distals (Benazet i Zeller, 2009). Per això, els Fgf8 poc a poc queden restringits al cantell distal de l'ectoderma just on hi és la CEA, de la qual es considera el marcador responsable de totes les seves funcions. Fgf10 s'uneix al receptor FgfR2b, present a l'ectoderma dels membres, mentre que Fgf8 s'uneix a FgfR1, present al mesoderma (Figura 2) (Mundlos i Horn, 2014; Mariani *et al.*, 2017).

En el cas de les extremitats, els gens Hox 9-13 modelen l'esquelet del membre al llarg de l'eix PD (Pineault i Wellik, 2014). Aquests gens determinen si el mesènquima es convertirà en estilopodi (Hox 9 i 10), zeugopodi (Hox 11) o autopodi (Hox 12 i 13) de manera conservada en totes les espècies (Gilbert i Barresi, 2016).

Fgf10 és l'inductor principal de la formació dels esbossos de les extremitats i permet el seu desenvolupament correcte. Depenent de la zona i les molècules amb les quals s'expressi, es formarà una extremitat anterior o una posterior (Lewandoski i Mackem, 2009; McQueen i Towers, 2020; Berenguer i Duester, 2021).

Al ratolí, els gens que codifiquen per Tbx5 es transcriuen als camps de l'extremitat posterior, mentre els gens que codifiquen per Islet 1, Tbx4 i Pitx1 s'expressen als camps anteriors (Gilbert i Barresi, 2016). Islet1 s'expressa transitòriament al camp posterior abans de l'expressió de Fgf10 i de la formació de les extremitats per tal d'induir els esbossos (Yang *et al.*, 2006). Tbx4 sol jugar més bé un paper en el manteniment del creixement, que no en l'inici (Cunningham i Duester, 2015). Pitx1, en canvi, s'encarrega de modelar els membres posteriors (Duboc i Logan, 2011). La interacció entre Fgf10 i aquests factors transcripcionals és el que permet la formació i caracterització de les extremitats (Figura 3) (Mundlos i Horn, 2014).

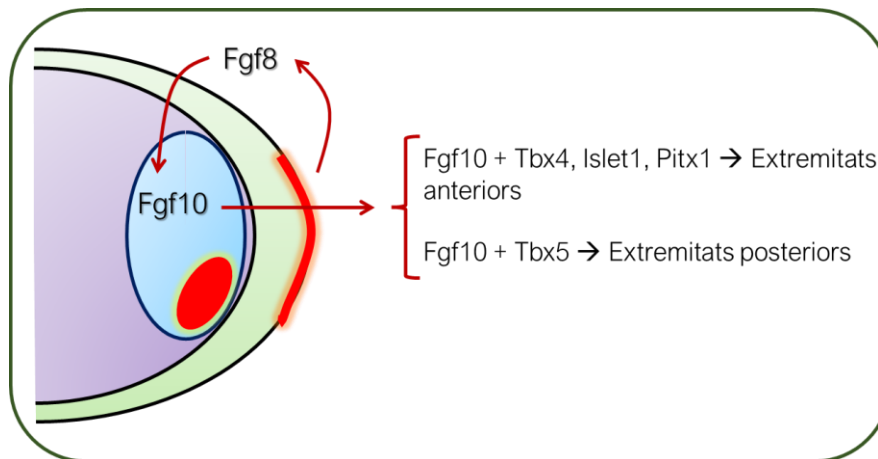


Figura 3. Determinació de les extremitats anteriors i posteriors.

El desenvolupament de membres amb deficiència de Fgf10 s'atura en una etapa molt prematura donant lloc a l'agènesi de les extremitats, la qual cosa manifesta el paper de Fgf10 en la iniciació de les extremitats. La inactivació simultània dels Fgf 4, 9 i 17 no altera el desenvolupament dels membres, però la pèrdua de Fgf8 sí que interromp la formació de l'estilopodi. Tot i que s'ha vist que l'activació temprana i constant de Fgf4 permet un desenvolupament normal de l'esquelet distal. La inactivació de Fgf 4 i 8, provoca una aturada completa del desenvolupament i l'agènesi de les extremitats. Per tant, els Fgf de la CEA tenen un paper instructiu per la especificació i expansió proliferativa de l'eix PD (Benazet i Zeller, 2009).

Després, Fgf10 és responsable de mantenir la integritat de la senyal Fgf8 de la CEA i promoure l'expressió de Fgf7 i Wnt3a a la cresta apical, que al seu torn mantenen Fgf10 a la ZP per iniciar l'amplificació dels progenitors de l'extremitat (Rafipay *et al.*, 2018).

4.6.2. EIX CRANIOCAUDAL - LA ZAP

Les cèl·lules de la ZP que li confereixen activitat polaritzant a la ZAP expressen Sonic hedgehog (Shh). Aquestes cèl·lules, però, no pateixen apoptosi com la CEA en el moment en que ja s'han format els dits, perquè intervenen en la formació del múscul i condensació del cartílag i ossificació de les extremitats posteriors (Gilbert i Barresi, 2016). Shh exerceix les seves funcions gràcies a l'antagonisme que existeix entre aquest i l'oncògen 3 associat al Glioma (Gli3). En absència de Shh, Gli3 es divideix per esdevenir un repressor transcripcional; la presència de Shh evita aquesta escissió i permet que Gli3 realitzi les seves funcions en la proliferació de la ZAP (Selever *et al.*, 2004; Mundlos i Horn, 2014).

Hox informa de la identitat tissular modulant el mesoderma per formar l'extremitat, especificar-la en cranial o caudal i induir les transicions entre epiteli i mesènquima (Gilbert i Barresi, 2016).

D'altra banda, a mesura que les extremitats creixen i les cèl·lules mesodèrmiques de la ZAP avancen al llarg de l'eix PD, contribueixen a la formació dels dits IV, V i part del III gràcies a les senyals de Shh. Aquests gens funcionen com un gradient de morfògens, hi ha més Shh a la ZAP que a la part cranial del mesoderma (Mundlos i Horn, 2014). L'especificació dels dits és dependent de la quantitat de temps que s'expressa Shh i, en menor mesura, de la concentració de Shh que reben les cèl·lules (Tabin i McMahon, 2008). El dit V expressa Shh durant més temps, seguit del dit IV i del dit III, qui també rep Shh des de la ZAP. El dit II depèn exclusivament del Shh que difon des de la ZAP i el dit I n'és completament independent (Figura 4) (Litington *et al.*, 2002; Ros *et al.*, 2003; Scherz *et al.*, 2007).

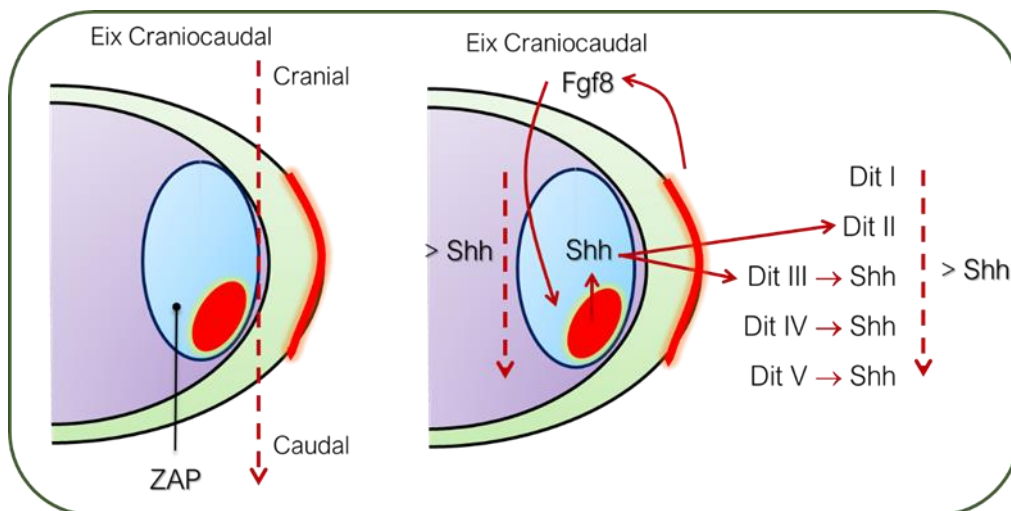


Figura 4. Elements que formen l'eix craniocaudal.

L'eix CC és congruent amb l'eix corporal i es manifesta millor en la morfologia esquelètica del zigopode i en les diferents identitats dels dits de l'autòpode. Les identitats CC dels dits es defineixen morfològicament per la seva posició i nombre, longitud i forma dels metacarpians i les falanges, la qual cosa reflecteix l'establiment d'identitats posicionals durant el desenvolupament dels membres (Benazet i Zeller, 2009).

4.6.2.1. Shh-BMP

En aquest punt, per determinar la identitat dels dits, intervenen les *bone morphogenetic proteins* (BMPs), concretament la BMP2. La senyal seqüencial Shh-BMP és necessària per al control del patró i nombre de dits. Aquestes proteïnes també estan

implicades en la inducció, manteniment i regressió de la CEA i en la modulació del patró DV, modulant la quantitat de Fgf que reben els dits (Selever *et al.*, 2004).

Shh inicia i manté un gradient de BMP capaç d'especificar els dits, la identitat dels quals està determinada pel mesoderma interdigital (la regió de mesènquima que patirà apoptosi, entre altres, com les articulacions) abans que es formin. El seu valor posicional pot veure's alterat si es canvia el nivell de BMP: diferents nivells regulen el reclutament de cèl·lules de la ZP cap als nodes que formen els dits (Gilbert i Barresi, 2016).

En una segona fase, Shh actua com a mitògen del mesènquima per tal d'estimular la proliferació de l'extremitat i l'expansió del camp de formació dels dits (Mundlos i Horn, 2014; Gilbert i Barresi, 2016). Per permetre aquest creixement de l'extremitat i especificació dels dits, es forma altre feedback: Shh activa un inhibidor de les BMP, Gremlin1, que permet mantenir l'expressió de Fgf8 a la CEA (les BMP fan disminuir els nivells de Fgf a la CEA). Al seu torn, Fgf inhibeix els repressors de Shh (Etv 4 i 5) i es completa el bucle que demostra que la CEA i la ZAP es recolzen mútuament. Però com hem comentat abans, a la ZAP hi ha una major expressió de Shh perquè Fgf8 permet que Etv4 i 5 inhibeixin progressivament la transcripció de Shh, reforçant el gradient CC a la ZAP (Gilbert i Barresi, 2016; Delgado i Torres, 2017; Rafipay *et al.*, 2018).

El feedback Shh/Grem1/Fgf permet la progressió distal del brot de l'extremitat en coordinació amb el creixement CC i és essencial pel manteniment de la CEA (Rafipay *et al.*, 2018).

Independentment, a mesura que els nivells de Fgf8 augmenten, un feedback negatiu bloca Gremlin al mesènquima distal. Aquesta repressió de Gremlin, juntament amb l'expansió del membre, crea més distància entre Gremlin, la CEA i la ZAP (hi ha mesènquima pel mig). En aquest moment, les BMP eviten la síntesi de Fgf8, la CEA col·lapsa i la ZAP (sense Fgf8 que la mantinguin) finalitza (Gilbert i Barresi, 2016), al voltant de E12 al ratolí (Mundlos i Horn, 2014).

L'expressió de Shh es desplaça distalment durant el creixement de les extremitats, de manera que es manté la posició relativa de la ZAP i la CEA. Aquest fenomen implica que el llinatge ZAP produeix cèl·lules que surten de la ZAP, deixen d'expressar o rebre Shh i colonitzen els eixos PD i CC gràcies a l'acció de Hox (Delgado i Torres, 2017).

S'ha vist que es produeix una interacció directa entre Hox i la regió cis-reguladora que expressa Shh (Benazet i Zeller, 2009). La presència de Hoxb8 al mesènquima sembla ajudar a definir el límit posterior de l'extremitat anterior (Abbasi, 2011). En aquest punt, la ZAP actua alterant l'expressió de Hoxd. Hoxd13 s'expressa en major mesura i s'estén anteriorment, Hoxd12, 11 i 10 s'expressen en dominis propers, per això el dit més anterior expressa només Hoxd13 (Montavon *et al.*, 2008). La primera fase d'expressió de Hoxd ajuda a especificar la ZAP, mentre que en la segona fase la ZAP instrueix els patrons d'expressió i defineix la identitat dels dits (Gilbert i Barresi, 2016).

L'expressió dinàmica de Hand2 (*Heart and neural crest derivatives expressed protein 2*) al mesènquima i la seva posterior restricció durant l'inici del desenvolupament son paral·leles a la restricció de l'activitat polaritzant. Es dona un antagonisme entre Hand2 i Gli3, cosa que suggereix un mecanisme potencial pel qual aquests dos reguladors premodulen el membre abans de l'expressió de Shh. Aquest mecanisme no només restringeix Shh a la ZAP, sinó que també especifica els compartiments anteriors i posteriors dels membres durant l'inici del desenvolupament (Benazet i Zeller, 2009).

4.6.3. EIX DORSIVENTRAL - L'ECTODERMA

L'ectoderma regula l'especificació tardana de l'eix DV. La molècula decisiva és Wnt7a, expressada a l'ectoderma dorsal, és el primer gen expressat i indueix l'activació de Lmx1b al mesènquima subjacent. Lmx1b codifica per un factor de transcripció clau en l'especificació del destí d'aquestes cèl·lules (Gilbert i Barresi, 2016; Haro *et al.*, 2021). D'altra banda, i gràcies a les BMP mesodèrmiques, l'ectoderma ventral expressa Engrailed 1 (En1) (Figura 5), malgrat que Wnt7a és suficient per generar el patró DV, En1 inhibeix Wnt7a a l'ectoderma ventral (Mundlos i Horn, 2014; Delgado i Torres, 2017; Rafipay *et al.*, 2018).

BMP, Wnt7a i En1 donen feedback a la CEA i a la ZAP a través del bucle Shh-Fgf, com hem dit abans, crucials per a l'inici, maduració i manteniment de la CEA (Rafipay *et al.*, 2018).

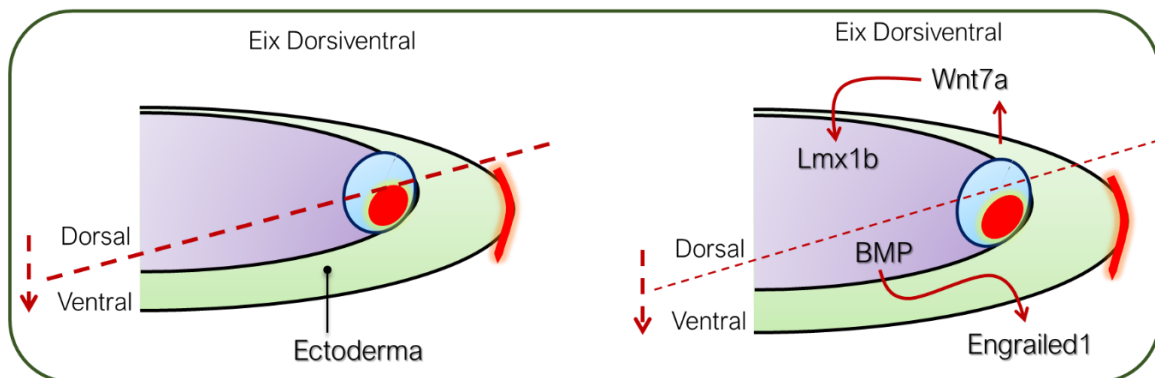


Figura 5. Elements que formen l'eix dorsiventral.

La dorsiventralitat de l'ectoderma es transfereix al mesoderma subjacent un cop les cèl·lules comencen a formar els brots (McQueen i Towers, 2020).

El modelatge i la senyalització impliquen interaccions entre els tres eixos. De fet, el patró de polaritat CC varia segons el segment de l'extremitat PD: l'anatomia i expressió gènica de la CEA es modulen al llarg de l'eix CC i el fet que la posició s'estableixi a la interfície de l'ectoderma dorsal i ventral, indica la comunicació entre els eixos. El complex patró de l'extremitat madura només s'aconsegueix mitjançant una interacció contínua entre els mecanismes que controlen els tres eixos espacials (Delgado i Torres, 2017).

5 MALFORMACIONS CONGÈNITES

5.1. EIX PROXIMODISTAL

5.1.1. AMÈLIA

- Els individus que no tenen activitat d'ÀR en tot el tronc presenten una expressió ectòpica de Fgf8 al camp dels membres anteriors provocant una pèrdua completa de l'expressió de Tbx5 i l'absència de brots de les extremitats anteriors (Berenguer i Duester, 2021).
- Quan la funció dels Fgf de la CEA es redueix abans de temps, el fenotip resultant és l'absència completa d'extremitats. El brot de les extremitats sorgeix i fins i tot es forma una CEA, però els baixos nivells de Fgf interrompen les interaccions ectoderma-mesoderma i el brot primerenc retrocedeix (Mariani *et al.*, 2017).

5.1.2. MICROMÈLIA

- a) En ratolins, les mutacions dels Hox9 i Hox10 donen lloc a elements de l'estilopodi escurçats; les supressions de Hox11 donen lloc a elements zigopodals truncats; i la interrupció de Hox13 dóna lloc a l'agènesi de l'autòpode. D'altra banda, la mutació del Hox de baixa estatura (Shox), dona lloc a l'escurçament desproporcionat de certes regions dels elements estilopodals. Per tant, les perturbacions de Hox i Shox donen lloc a fenotips regionals al llarg de l'eix PD, cosa que suggereix la possibilitat que aquests gens funcionin junts durant el desenvolupament de les extremitats (Neufeld *et al.*, 2014).



Amèlia i Hemimèlia tarsal (Whitacre et al., 2017)

- b) En mutants de ratolí, amb un gen inactivat per Cyp26b1, les extremitats mostren una reducció dels elements esquelètics distals i canvis en l'expressió gènica consistents en una proximalització dels elements de les extremitats. De manera que, els nivells elevats d'ÀR en embrions mutants per Cyp26b1 interrompen el desenvolupament dels membres (Lewandoski i Mackem, 2009).
- c) La deleció de Wnt5a inhibeix el creixement distal del membre provocant el truncament de l'esquelet, cosa que suggereix que Wnt5a regula el creixement mitjançant la modulació de la proliferació i polaritat del mesènquima distal (Wada, 2011).

Les dues malformacions següents també estan relacionades amb l'eix proximodistal, però més focalitzades en la formació de les articulacions.

5.1.3. BRAQUIDACTÍLIA

La regió de formació de les falanges mostra una forta activitat de la via de senyalització de les BMP relacionada amb la identitat i creixement dels dits. Aquest centre depèn també de la CEA i de factors com la Noggina i el IHH (*Indian Hedgehog*), que inhibeix la condensació de les falanges. És aquesta complexitat funcional i reguladora la que fa que les condensacions òssies siguin més propenses a patir malformacions com la braquidactília, en les quals habitualment intervé la via de les BMP, i que consisteix en la formació d'elements ossis digitals més curts (Mundlos i Horn, 2014).

5.1.4. ACONDROPLÀSIA

- a) Mutacions en els FgfR poden causar la seva activació prematura abans de rebre la senyal de Fgf, donant lloc als principals tipus d'acondroplàsia, una condició dominant causada per mutacions en el FgfR3. Consisteix, bàsicament, en la formació d'ossos més curts (Gilbert i Barresi, 2016).
- b) Els Dachshunds tenen una còpia extra del gen que codifica per Fgf4, això causa un excés d'aquest factor provocant l'activació exagerada de FgfR3 i accelerant la via encarregada de frenar el creixement dels condroblasts



Acondroplàsia: Dachshund

(accelerant la seva diferenciació) (Parker *et al.*, 2009).

5.2. EIX CRANIOCAUDAL

5.2.1. SINDACTÍLIA

Aquesta anomalia consisteix en la fusió del mesoderma digital i interdigital per absència d'apoptosi que provoquen la unió dels dits. A mesura que els dits creixen, el teixit entre les condensacions s'elimina per apoptosi. Aquí la CEA té un paper important a l'hora de distingir les regions subjectes a major creixement i les propenses a degeneració. Els Fgf tenen un paper protector contra l'apoptosi interdigital, i s'ha vist que mutacions en els FgfR provoquen sindactília. D'altra banda, la síntesi d'ÀR als espais interdigitals també inhibeix l'apoptosi (inhibeix BMP) i provoca aquestes fusions mesodèrmiques (Mundlos i Horn, 2014).

5.2.2. POLIDACTÍLIA

- a) Els ratolins mutants hemimèlics tenen dits addicionals al costat del dit I de l'autopodi de les extremitats posteriors. Aquest fenotip està associat a una diferència d'un parell de bases al potenciador de Shh específic de les extremitats, que reprimeix la seva habilitat per inactivar Shh. Si aquest potenciador es fusiona al gen de la B-galactosidasa manifesta un patró únic d'expressió en el mesoderma posterior de cada esbós. Els ratolins que porten aquesta mutació mostren activitat B-galactosidasa a totes les extremitats. L'inhibidor no pot unir-se al potenciador mutat i Shh s'expressa en ambdós regions de l'esbós causant el desenvolupament de dits addicionals (Gilbert i Barresi, 2016).



Polidactília (Browning et al., 2020)

- b) Quan BMP1aR està inactiu, l'expressió de Fgf4 i Fgf8 a la CEA es regula provocant sindactília i menys apoptosi a la zona interdigital. A més, l'eliminació de BMP2/4 de la CEA també provoca una expressió augmentada de Fgf4 i Fgf8 amb els mateixos resultats. L'eliminació dels receptors BMP de la CEA provoca polidactília i sindactília. Per tant, els Fgf4/8 i les BMP de la CEA són els responsables de donar forma als dits (Lin i Zhang, 2020).

5.2.3. INVERSIONS

La mala expressió de Pitx 1 a les extremitats anteriors del ratolí provoca l'establiment de característiques morfològiques semblants a les de les extremitats posteriors i la inactivació de Pitx1 provoca canvis en alguns aspectes característics de les extremitats posteriors (Mundlos i Horn, 2014).

5.3. EIX DORSIVENTRAL

5.3.1. ECTROMÈLIA

Aquesta malformació consisteix en la presència d'ossos més petits o l'absència dels mateixos. Els ratolins deficientes de Wnt7a presenten una manca prematura d'estructures dorsals i també dels dits posteriors, ja que aquest gen també participa a l'eix CC. La raó per la qual falten els dits posteriors és que l'expressió de Shh es veu disminuïda. D'altra banda, una senyal excessiva de Wnt a l'ectoderma ventral causa un sobrecreixement de la CEA i produeix

polidactília, indicant que l'eix PD no és independent del DV (Parr i McMahon, 1995). Aquesta malformació podria estar, per tant, classificada també com a proximodistal.

6 CONCLUSIONS

1. L'eix proximodistal està determinat per la Cresta ectodèrmica apical i el mesoderma. En l'establiment d'aquest eix en son clau els Fgf 8 i 10, secretats simultàniament per aquests dos centres de senyalització i que permeten el manteniment de la CEA i el creixement longitudinal de les extremitats. La desorganització d'aquests elements i/o factors pot provocar malformacions, com ara, amèlia o micromèlia.

2. Durant l'establiment dels brots de les extremitats, el fet que Fgf10 coincideixi amb Tbx4, Islet1 i Pitx1 o Tbx5 determinarà la formació d'extremitats anteriors o posteriors i dèficits en algun d'aquests factors poden provocar també amèlia.

3. Els factors Fgf intervenen en la formació del cartílag i les articulacions i, per tant, alteracions en l'expressió d'aquests factors poden provocar alteracions articulars i de creixement, com per exemple la braquidactília o l'acondroplàsia.

4. L'eix craniocaudal està determinat per la Zona d'activitat polaritzant i la Cresta ectodèrmica apical. Aquestes estructures mitjançant l'expressió de Fgf8, Shh i Hox permeten la determinació de les identitats dels dits. Alteracions en l'expressió d'aquests factors poden provocar malformacions, com ara la polidactília o sindactília.

5. L'eix dorsiventral està determinat per l'ectoderma i el mesoderma subjacent, que expressen Wnt7a i Lmx1b, respectivament i consecutivament. Deficiències d'aquests factors poden provocar malformacions, com ara, l'ectromèlia.

6. La formació dels membres és un procés dinàmic i continu, en que els tres eixos es formen i canvien mitjançant processos d'activació i inhibició, proliferació i apoptosi que es produeixen al mateix temps i permeten l'acoblament dels diversos mecanismes per la formació de tots els elements múscul-esquelètics de les extremitats.

7 BIBLIOGRAFIA

Abbasi, A. A. (2011). Evolution of vertebrate appendicular structures: Insight from genetic and palaeontological data. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 240(5), 1005-1016. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22572>

Benazet, J.D., & Zeller, R. (2009). Vertebrate Limb Development: Moving from Classical Morphogen Gradients to an Integrated 4-Dimensional Patterning System. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1(4), a001339-a001339. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001339>

- Berenguer, M., & Duester, G. (2021). Role of Retinoic Acid Signaling, FGF Signaling and Meis Genes in Control of Limb Development. *Biomolecules*, 11(1), 80. <https://doi.org/10.3390/biom11010080>
- Browning, R., Jr, Hayes, E. G., & Lear, A. S. (2020). Spontaneous appearance and transmission of polydactyly in Dexter cattle. *Case Reports in Veterinary Medicine*, 2020, 6407847. <https://doi.org/10.1155/2020/6407847>
- Cunningham, T. J., & Duester, G. (2015). Mechanisms of retinoic acid signalling and its roles in organ and limb development. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 16(2), 110-123. <https://doi.org/10.1038/nrm3932>
- Delgado, I., & Torres, M. (2017). Coordination of limb development by crosstalk among axial patterning pathways. *Developmental Biology*, 429(2), 382-386. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.03.006>
- Duboc, V., & Logan, M. P. O. (2011). Pitx1 is necessary for normal initiation of hindlimb outgrowth through regulation of Tbx4 expression and shapes hindlimb morphologies via targeted growth control. *Development (Cambridge, England)*, 138(24), 5301-5309. <https://doi.org/10.1242/dev.074153>
- Gilbert, S. F., & Barresi, M. J. F. (2016). Development of the Tetrapod Limb. In *Developmental biology* (Eleventh edition., p. 641-680). Sinauer Associates, Inc.
- Haro, E., Petit, F., Pira, C. U., Spady, C. D., Lucas-Toca, S., Yorozuya, L. I., Gray, A. L., Escande, F., Jourdain, A.-S., Nguyen, A., Fellmann, F., Good, J.-M., Francannet, C., Manouvrier-Hanu, S., Ros, M. A., & Oberg, K. C. (2021). Identification of limb-specific Lmx1b auto-regulatory modules with Nail-patella syndrome pathogenicity. *Nature Communications*, 12(1), 5533. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25844-5>
- Lewandoski, M., & Mackem, S. (2009). Limb Development: The Rise and Fall of Retinoic Acid. *Current Biology*, 19(14), R558-R561. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.06.017>
- Lin, G., & Zhang, L. (2020). Apical ectodermal ridge regulates three principal axes of the developing limb. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*, 21(10), 757-766. <https://doi.org/10.1631/jzus.B2000285>
- Litingtung, Y., Dahn, R. D., Li, Y., Fallon, J. F., & Chiang, C. (2002). Shh and Gli3 are dispensable for limb skeleton formation but regulate digit number and identity. *Nature*, 418(6901), 979-983. <https://doi.org/10.1038/nature01033>
- Mariani, F. V., Fernandez-Teran, M., & Ros, M. A. (2017). Ectoderm-mesoderm crosstalk in the embryonic limb: The role of fibroblast growth factor signaling: FGF in Limb Development. *Developmental Dynamics*, 246(4), 208-216. <https://doi.org/10.1002/dvdy.24480>
- McQueen, C., & Towers, M. (2020). Establishing the pattern of the vertebrate limb. *Development*, 147(17), dev177956. <https://doi.org/10.1242/dev.177956>
- Montavon, T., Le Garrec, J.-F., Kerszberg, M., & Duboule, D. (2008). Modeling Hox gene regulation in digits: reverse collinearity and the molecular origin of thumbness. *Genes & Development*, 22(3), 346-359. <https://doi.org/10.1101/gad.1631708>

- Mundlos, S., & Horn, D. (2014). Development of the Limbs. En S. Mundlos i D. Horn, *Limb Malformations: An Atlas of Genetic Disorders of Limb Development* (1a ed., p. 2-9). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-95928-1_1
- Neufeld, S. J., Wang, F., & Cobb, J. (2014). Genetic Interactions Between Shox2 and Hox Genes During the Regional Growth and Development of the Mouse Limb. *Genetics*, 198(3), 1117-1126. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.167460>
- Parker, H. G., VonHoldt, B. M., Quignon, P., Margulies, E. H., Shao, S., Mosher, D. S., Spady, T. C., Elkahlon, A., Cargill, M., Jones, P. G., Maslen, C. L., Acland, G. M., Sutter, N. B., Kuroki, K., Bustamante, C. D., Wayne, R. K., & Ostrander, E. A. (2009). An Expressed Fgf4 Retrogene Is Associated with Breed-Defining Chondrodysplasia in Domestic Dogs. *Science*, 325(5943), 995-998. <https://doi.org/10.1126/science.1173275>
- Parr, B. A., & McMahon, A. P. (1995). Dorsalizing signal Wnt-7a required for normal polarity of D-V and A-P axes of mouse limb. *Nature*, 374(6520), 350-353. <https://doi.org/10.1038/374350a0>
- Pineault, K. M., & Wellik, D. M. (2014). Hox Genes and Limb Musculoskeletal Development. *Current Osteoporosis Reports*, 12(4), 420-427. <https://doi.org/10.1007/s11914-014-0241-0>
- Rafipay, A., Berg, A. L. R., Erskine, L., & Vargesson, N. (2018). Expression analysis of limb element markers during mouse embryonic development: Mouse Limb Development Markers. *Developmental Dynamics*, 247(11), 1217-1226. <https://doi.org/10.1002/dvdy.24671>
- Ros, M. A., Dahn, R. D., Fernandez-Teran, M., Rashka, K., Caruccio, N. C., Hasso, S. M., Bitgood, J. J., Lancman, J. J., & Fallon, J. F. (2003). The chick oligozeugodactyly (ozd) mutant lacks sonic hedgehog function in the limb. *Development (Cambridge, England)*, 130(3), 527-537. <https://doi.org/10.1242/dev.00245>
- Saunders, J. W. (1972). Developmental control of three-dimensional polarity in the avian limb. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 193(1 Patterns of I), 29-42. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1972.tb27821.x>
- Scherz, P. J., McGlenn, E., Nissim, S., & Tabin, C. J. (2007). Extended exposure to Sonic hedgehog is required for patterning the posterior digits of the vertebrate limb. *Developmental Biology*, 308(2), 343-354. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.05.030>
- Selever, J., Liu, W., Lu, M. F., Behringer, R. R., & Martin, J. F. (2004). Bmp4 in limb bud mesoderm regulates digit pattern by controlling AER development. *Developmental Biology*, 276(2), 268-279. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.08.024>
- Tabin, C. J., & McMahon, A. P. (2008). *Developmental biology. Grasping limb patterning.* *Science (New York, N.Y.)*, 321(5887), 350-352. <https://doi.org/10.1126/science.1162474>
- Wada, N. (2011). Spatiotemporal changes in cell adhesiveness during vertebrate limb morphogenesis. *Developmental Dynamics*, 240(5), 969-978. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22552>
- Whitacre, L. K., Hoff, J. L., Schnabel, R. D., Albarella, S., Ciotola, F., Peretti, V., Strozzi, F., Ferrandi, C., Ramunno, L., Sonstegard, T. S., Williams, J. L., Taylor, J. F., & Decker, J. E. (2017). Elucidating the genetic basis of an oligogenic birth defect using whole genome sequence data

in a non-model organism, *Bubalus bubalis*. *Scientific Reports*, 7(1).
<https://doi.org/10.1038/srep39719>

Yang, L., Cai, C.-L., Lin, L., Qyang, Y., Chung, C., Monteiro, R. M., Mummery, C. L., Fishman, G. I., Cogen, A., & Evans, S. (2006). *Isl1Cre* reveals a common *Bmp* pathway in heart and limb development. *Development* (Cambridge, England), 133(8), 1575-1585.
<https://doi.org/10.1242/dev.02322>