



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA

## **Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova**

Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN MEDICINA DELLO SVILUPPO E SCIENZE  
DELLA PROGRAMMAZIONE

INDIRIZZO: SCIENZE CHIRURGICHE PEDIATRICHE E SPERIMENTALI

CICLO XXIV°

**MALFORMAZIONI ANORETTALI: CLASSIFICAZIONE E  
STUDIO MORFOLOGICO ED IMMUNOISTOCHIMICO DELLA NOSTRA CASISTICA**

**Direttore della Scuola** : Ch.mo Prof. Giuseppe Basso

**Coordinatore d'indirizzo**: Ch.mo Prof. Gianfranco Zanon

**Supervisore** :Ch.mo Prof. Piergiorgio Gamba

**Dottorando** : Elisa Zolpi

## 1. Indice

1. Indice	1
2. Riassunto	3
3. Abstract	5
4. Introduzione	8
4.1 Malformazioni anorettali (MAR)	8
4.2 Anatomia del pavimento pelvico e della regione anorettale	9
4.2.1 I muscoli del pavimento pelvico	9
4.2.2 Anatomia del canale anale	13
4.3 Embriologia dell'interno posteriore e della cloaca	15
4.3.1 La linea primitiva	15
4.3.2 Formazione AIP e CIP	17
4.3.3 Il setto "urorettale" dell'intestino posteriore	19
4.3.4 La cloaca e la membrana cloacale	20
4.3.5 Il seno urogenitale e il canale anale	21
4.3.6 Le interazioni epitelio-mesenchimali	24
4.3.7 Sonic Hedgehog	26
4.3.8 Via di segnalazione di Hedgehog durante l'embriogenesi	27
4.3.9 La via di segnalazione Hh	27
4.4 Shh e le interazioni epitelio-mesenchimali	28
4.5 Ruolo del mesoderma viscerale nello sviluppo del tratto gastrointestinale	33
4.6 Classificazione delle MAR	36
4.6.1 Maschio	36

4.6.2	Femmina	40
4.6.3	Anomalie congenite associate	42
4.6.4	Diagnosi	43
4.6.5	Terapia	43
4.7	MAR e vie patogenetiche	44
4.7.1	MAR e geni HOX	44
4.7.2	MAR e Shh-fattori Gli	46
4.7.3	MAR e Foxf geni	49
4.8	Istologia e MAR	53
5.	Scopo dello studio	56
6.	Materiali e metodi	57
6.1	Campioni per lo studio morfologico ed immunohistochimico	57
6.2	Controlli	58
6.3	Colorazione ematossilina-eosina	58
6.4	Immunohistochimica (IHC)	59
6.5	Analisi morfologica	61
6.6	Analisi IHC	61
6.7	Quantitativa real-time PCR	62
6.8	Analisi statistica	62
7.	Risultati	63
7.1	Studio clinico	63
7.2	Studio morfologico ed istologico	64
7.3	Studio IHC	69
7.4	Risultati statistici	71
8.	Conclusioni	72
9.	Bibliografia	80

## 2. RIASSUNTO

### PRESUPPOSTI DELLO STUDIO

L'eziopatogenesi delle malformazioni anorettali è sconosciuta e multifattoriale. La classificazione delle MAR dal punto di vista genetico non è semplice per il fatto che tali malformazioni si presentano sotto differenti forme influenzate probabilmente, da fattori diversi come il genere e le anomalie associate. Sono descritte in letteratura sindromi genetiche e cromosomiche associate a tali malformazioni e per tale motivo risulta importante conoscere il fenotipo con le quali si manifestano ed eseguire un'analisi citogenetica classica nei pazienti con MAR al fine di poterle individuare anomalie cromosomiche che potrebbero essere associate ad una certa ereditarietà. Il normale sviluppo dell'intestino posteriore (hindgut) dipende dal corretto sviluppo della cloaca e della membrana cloacale, nonché dalle corrette interazioni epitelio-mesenchimali indispensabili per una morfogenesi corretta. Sonic Hedgehog (Shh) è un eccellente candidato come mediatore nelle interazioni tra endoderma e mesoderma, multipli studi su modelli animali hanno evidenziato come la ridotta o mancata presenza di Shh o dei mediatori a valle del suo segnale, siano in grado di causare difetti diversi nello sviluppo della regione anorettale.

### SCOPO

La prima parte dello studio è per la maggior parte retrospettiva, ed ha lo scopo di classificare dal punto di vista genetico e clinico, i pazienti affetti da MAR seguiti presso il reparto di chirurgia pediatrica fino all'anno 2011 (periodo 1991-2011), suddividendoli in forme sindromiche e non, in casi sporadici o familiari. Un'ulteriore parte dello studio ha lo scopo di identificare anomalie cromosomiali associate alle MAR. La seconda parte ha lo scopo di effettuare una caratterizzazione morfologica e immunohistochimica del tessuto prelevato dal sito della malformazione per verificare quali alterazioni parietali siano presenti, e valutare l'espressione di Shh nel contesto del tessuto normale e patologico.

## MATERIALI E METODI

La prima parte del lavoro retrospettivo è stato ottenuto rivalutando la storia clinica di tutti i pazienti seguiti presso il reparto di chirurgia Pediatrica dall'anno 1991 fino al 2011. Per il conseguimento del secondo obiettivo è stata effettuata l'analisi citogenetica classica e molecolare (mediante FISH: Fluorescence in situ Hybridization o con array-CGH: array based-comparative genomic Hybridization), del sangue periferico dei pazienti seguiti dall'anno 2000, con eventuale estensione ai genitori o altri familiari.

Per lo studio morfologico il materiale proveniente dalla sede della malformazione, è stato valutato al microscopio ottico e sottoposto alla colorazione classica Ematossilina-Eosina, con lo scopo di valutare: il tipo di rivestimento, presenza di erosione e/o di ulcerazione, edema della lamina propria, l'architettura strutturale della tonaca muscolare, la presenza della trama connettivale e della sua disposizione.

Per lo studio immunohistochimico sono stati utilizzati di alcuni marcatori dei processi di maturazione e differenziazione muscolare (Miogenina), dei marcatori di staminalità (CD34, CD133,) e delle possibili vie patogenetiche coinvolte (Shh).

## RISULTATI

Sono stati individuati nel periodo 1991-2011, 143 pazienti affetti da MAR suddivisi in forme isolate 56, forme associate 82, con 6 forme sindromiche, 4 associazioni cliniche; 5 casi non sono classificabili. Nel maschio sono 50 le forme associate e 32 le forme isolate; nella femmina sono 32 le forme associate e 24 le forme isolate. Le forme sindromiche riscontrate sono: 2 sindromi cromosomiche, 4 sindromi genetiche. Non è stata identificata nessuna forma familiare

Le osservazioni più interessanti dello studio istologico riguardano la tonaca muscolare valutata sia nella sua componente circolare interna che longitudinale esterna: nella maggior parte dei difetti si osserva un importante disarrangiamento delle fibre muscolari con rilevante dissociazione da parte della componente fibrosa.

L'espressione di CD133 è stata valutata nei diversi livelli della parete intestinale; vi è un'intensa espressione di tale marker ma in misura minore rispetto il CD34 che presenta un'intensa positività in tutti gli strati, soprattutto nella lamina propria direttamente al di sotto

dell'epitelio. La miogenina è costantemente negativa. Per quanto riguarda Shh i livelli di intensità del segnale è notevolmente più basso nella tonaca muscolare.

## CONCLUSIONI

I risultati di questo lavoro indicano, in accordo con la letteratura, che il 60% dei pazienti con MAR ha un difetto associato. La fistola rettovescicale nel 80% dei casi si associa ad altre malformazioni seguita da: cloaca (78%), fistola rettouretrale (71%), fistola rettovestibolare (65%), fistola perineale (49%).

Dalla ridotta espressione di Shh a livello del tessuto mesodermico del difetto si può ipotizzare che o, ad un alterazione che colpisce direttamente Sonic o i suoi mediatori a valle, porti all'assenza di un ottimale gradiente parietale necessario per un corretto modellamento degli strati parietali intestinali, e quindi alle alterazioni in parte osservate in questo studio preliminare. Questa down-regulation può fornire un supporto molecolare all'ipotesi che l'incompleta formazione e divisione della cloaca determina un'ampia varietà di malformazioni dell'intestino posteriore. Per confermare tale ipotesi sono comunque necessari ulteriori studi sull'espressione dei mediatori a valle del segnale Shh quali per esempio Gli2, Bmp-4, Hox geni e le proteine Wnt.

## 3. Abstract

### BACKGROUND

The etiology and pathogenesis of anorectal malformations (ARM) are multifactorial, poorly understood and controversial. The classification of ARM from a genetic perspective, it is not easy due to the fact that these malformations exist in various forms probably influenced by different factors such as gender and associated anomalies. In the literature, several chromosomal genetic syndromes have been associated with this malformations; the analysis of associated malformations is an important aspect of the genetic study of ARM, because the association of anomalies with mendelian transmission or with a recognized causative gene can be an essential starting point for further investigations. The normal development of the hindgut depends on the proper development of the cloaca and the cloacal membrane, and epithelial-mesenchymal interactions on the correct essential for proper morphogenesis. Sonic

Hedgehog (Shh) is an excellent candidate as a mediator in the interaction between endoderm and mesoderm, multiple studies in animal models have shown that the reduced or non-presence of Shh or its downstream signal mediators, are able to cause defects of different anorectal region.

#### AIM OF THE STUDY

The first part of the study is for the most part retrospective, and has the purpose of classifying the genetic point of view and clinical the patients suffering from ARM followed at the Department of Pediatric surgery until the year 2011 (period 1991-2011), dividing them into syndromic forms and not , in isolated or familial cases. Another part of the study aims to identify chromosomal abnormalities associated with ARM. The second part is intended to perform a morphological and immunohistochemical staining of tissue taken from the site of the malformation to verify such alteration parietal are present, and assess the expression of Shh in the context of normal and pathological tissue.

#### MATERIALS AND METHODS

The first retrospective of the project has been obtained by re-evaluating the clinical history of all patients followed at the Department of Pediatric Surgery from 1991 until 2011. To achieve the second objective was performed classical and molecular cytogenetic analysis (by FISH: Fluorescence in situ hybridization or array-CGH: array-based comparative genomic hybridization) of the peripheral blood of patients followed since 2000, with possible extension to their parents or other family members. For the morphological study of the material coming from the site of the malformation, was evaluated by light microscopy and subjected to classical staining hematoxylin-eosin, with the aim to evaluate: the type of coating, the presence of erosion and/or ulceration, edema of the lamina own, the structural architecture of the muscularis layer, the presence of the connective tissue and its disposal. Study of some immunohistochemical markers of muscle differentiation and maturation processes (myogenin), stem cell markers (CD34, CD133,) and the possible pathogenetic pathways involved Shh.

#### RESULTS

Were identified in the period 1991-2011, 143 patients divided into 56 isolated forms, 82

associated forms with 6 syndromic forms, 4 clinical associations; 5 cases are not classified. In the male are 50 associated forms and 32 with isolated forms, in the female are 32 associated forms and 24 with the isolated forms. Syndromic forms are found: 2 chromosomal syndromes, 4 genetic syndromes. Was not identified familial form.

The most interesting observations of histological study relate to the muscularis evaluated both in its internal and external component: in most of the defects is observed an important disarray of muscle fibers with significant fibrosis.

The expression of CD133 was evaluated in the different layers of the intestinal wall and it shows there is an intense expression of this marker but to a lesser extent than the CD34 that presents an intense positivity in all the layers, especially in the lamina propria directly to below the epithelium. The myogenin is constantly negative. Regarding Shh levels of signal strength is considerably lower in the muscularis.

#### CONCLUSIONS

The results of this work indicate, in agreement with the literature, that 60% of patients with ARM has a defect associated. Rectovesical fistula in 80% of cases are associated with other malformations, followed by: cloaca (78%), rectourethral fistula (71%), vestibular fistula (65%), perineal fistula (49%). From the reduced expression of Shh in the mesodermal tissue can mean that, or an alteration that affects directly Sonic or its downstream mediators, that causes absence of an optimal gradient parietal necessary for a correct shaping of the intestinal wall layers, and hence the changes in the observed in this preliminary study. This down-regulation may provide a molecular support to the hypothesis that the incomplete formation and division of the cloaca results in a wide variety of malformations of the hindgut. To confirm this hypothesis are still needed further studies on the expression of mediators downstream of the Shh signal such as for example Gli2, Bmp-4, Hox genes and the Wnt protein.

## 4. INTRODUZIONE

### 4.1 Malformazioni ano-rettali (M.A.R.)

Le MAR comprendono un ampio spettro di difetti dovuti all'arresto dello sviluppo dell'ano e del retto, unitamente alle strutture muscolari e nervose che li circondano. A seconda del momento in cui tale processo si arresta il canale anale e gli apparati di continenza possono risultare scarsamente sviluppati, dislocati in una posizione anteriore o mancare del tutto nella loro ultima porzione. L'incidenza è di circa 1/4000-5000 nati vivi, non è influenzata dall'età della madre o da fattori razziali. L'eziologia è ancora sconosciuta. Sicuramente multifattoriale, coinvolti sia fattori genetici che ambientali. La classificazione delle MAR dal punto di vista genetico non è semplice per il fatto che tali malformazioni si presentano sotto differenti forme influenzate probabilmente, da fattori diversi come il genere e le anomalie associate. Le MAR possono essere, isolate, non sindromiche o sindromiche se facenti parte di un complesso fenotipo; vengono definite sporadiche se presenti come unico caso all'interno di una famiglia oppure familiari quando si presentano in più componenti. Le MAR sono associate ad uno o a più difetti congeniti in percentuali abbastanza variabili dal 20% al 70% dei casi. Nel 26-60% le anomalie riguardano l'apparato urogenitale, segue il tratto scheletrico (15-40%), l'apparato cardiovascolare (6-27%) (1). Le forme non sindromiche sono spesso sporadiche, le forme familiari presentano una modalità di ereditarietà variabile. Sono riportate in letteratura, in 11 famiglie 7 casi di ereditarietà autosomica dominante, in un caso autosomica recessiva e nei restanti casi non fu possibile determinare se la modalità di trasmissione fosse autosomica o X-linked recessiva (2). Le forme associate ad altre anomalie congenite possono essere parte di una sindrome cromosomica, come trisomia 21, 18, 13, cromosoma soprannumerario derivativo del cromosoma 22, cromosoma ad anello, ecc; di sindromi genetiche (FG, Pallister-Hall, Townes-brocks, Currarino, Cat-Eye, ecc), o essere parte di un'associazione clinica come nella VACTERL, OEIS, MURCS (3). Per comprendere in modo corretto tale malformazioni è utile soffermarsi sulla descrizione dell'anatomia del canale anale e del pavimento pelvico e sullo sviluppo embriologico dell'intestino posteriore e del complesso sfinteriale, con un approfondimento riguardo la miogenesi embrionale.

## **4.2 Anatomia del pavimento pelvico e della regione anorettale**

### **4.2.1 I muscoli del pavimento pelvico**

Nell'individuo normale i muscoli striati responsabili del controllo fecale sono rappresentati da una struttura imbutiforme che è inserita sul pube, sulla parte bassa del sacro e sulla porzione mediana della pelvi, e che si estende ad avvolgere completamente il retto sino alla cute perineale. Le strutture principali di questo piano muscolare (muscolo ileococcigeo, muscolo pubococcigeo, muscolo puborettale, muscolo sfintere esterno profondo e superficiale) sono difficilmente identificabili e separabili in vivo. A tale proposito Peña sostiene che le strutture sfinteriche sarebbero formate dalla coalescenza lungo la linea mediana di gruppi muscolari simmetrici che formano una struttura unica, comunemente definita fionda pubo-rettale (7). Pertanto, secondo l'Autore, seguendo rigorosamente questa disposizione mediana è possibile separare e successivamente ricomporre queste fibre rispettandone l'anatomia e provocando un danno anatomico-funzionale assai limitato. Anche nelle malformazioni anorettali questo apparato muscolare è sempre presente ed identificabile tramite una meticolosa dissezione, anche se incompleto essendo strettamente correlato alla gravità della malformazione anorettale ed alla presenza o meno di malformazioni del sacro (6). La conformazione ad imbuto del pavimento pelvico è compliantissima nell'accogliere i visceri della regione pelvica ma anche nell'accompagnare quelli che escono dalla pelvi, ossia retto posteriormente e uretra (e vagina nella femmina) anteriormente. La componente muscolare della regione è complessa sia per numero e varietà dei muscoli presenti, sia per la loro disposizione, sia per il ruolo che alcuni muscoli hanno nella funzionalità dei visceri che li attraversano. Nell'analisi dell'impalcatura muscolare vanno considerati due gruppi muscolari: quelli che costituiscono il pavimento pelvico, che sono i muscoli elevatori dell'ano e muscolo coccigeo, che inferiormente chiudono il bacino, e quelli del perineo, muscoli dell'ano e del canale urogenitale. I due gruppi muscolari sono separati ma hanno un punto di contatto importante, poiché in effetti la pelvi è chiusa inferiormente e anteriormente dall'insieme dei muscoli elevatori dell'ano e del diaframma urogenitale (figura 1).

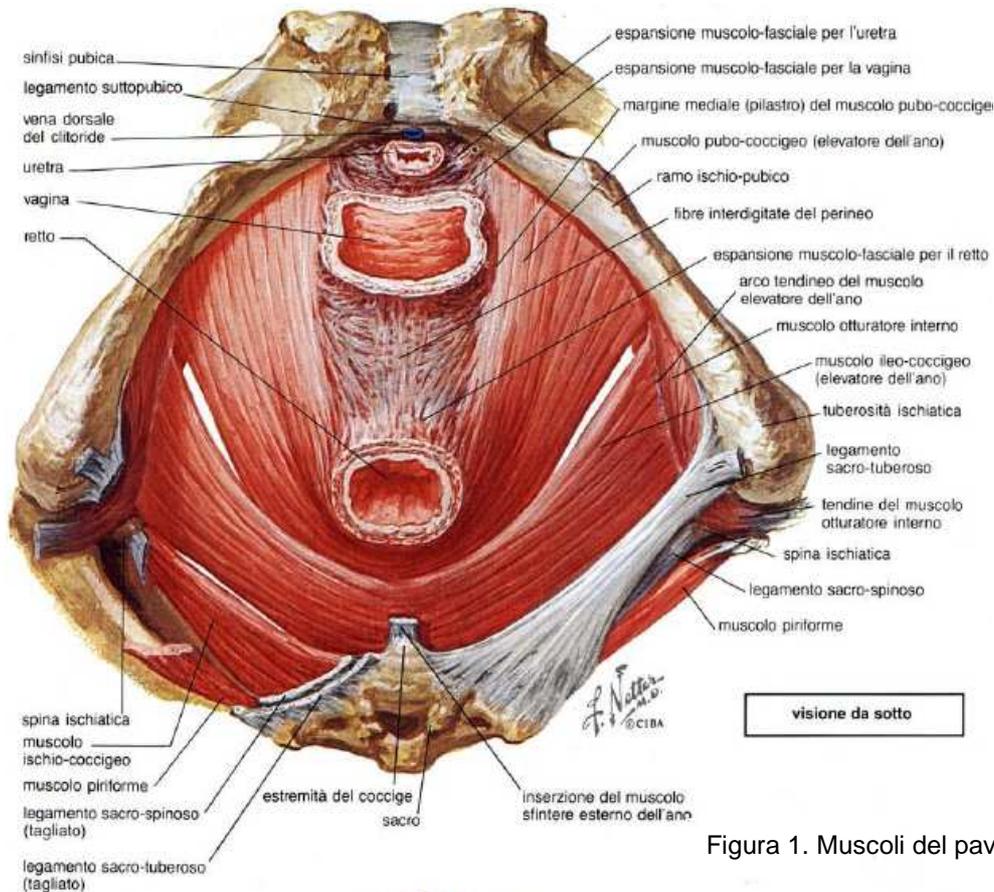


Figura 1. Muscoli del pavimento pelvico

Il muscolo elevatore dell'ano, di forma quadrangolare, è la parte preponderante del diaframma pelvico, che senz'altro è il più esteso dei muscoli del pavimento pelvico.

Esso origina anteriormente dalla faccia posteriore del pube e posteriormente dalla faccia pelvica della spina ischiatica, ma fra queste due inserzioni ossee c'è un'ampia porzione del muscolo che trae origine dalla fascia che ricopre il muscolo otturatore interno, che contemporaneamente contribuisce a rafforzare l'arco tendineo. Tutto il muscolo termina posteriormente sul coccige, poiché però l'origine delle fibre è diversa, viene distinto in muscolo pubococcygeo e muscolo ileococcygeo. Il muscolo puborettales, attualmente considerato parte integrante dell'elevatore dell'ano (sua porzione ventromediale) e del complesso sfinteriale esterno, oltrepassa la prostata o la vagina e il canale anale e si fonde con il contro laterale, formando un manicotto ad U da pube a pube e mantenendosi a stretto contatto con la parete anorettale (7).

Funzionalmente è responsabile del mantenimento dell'angolo caratteristico della giunzione anorettale, quasi uno sfintere accessorio perché impedisce alle feci di passare nel canale

anale finché il muscolo è contratto. Il muscolo ileococcigeo nasce da un ispessimento fibroso della fascia otturatoria denominato arco tendineo del muscolo elevatore dell'ano, da qui in direzione del coccige e del legamento anococcigeo forma una prima parte del diaframma muscolare. Posteriormente il muscolo ileococcigeo si sovrappone al muscolo ischiococcigeo. Il muscolo pubococcigeo dal segmento più ventrale dell'arco tendineo del muscolo elevatore dell'ano e dalla faccia posteriore del pube si spinge posteriormente in direzione del coccige fissandosi al coccige stesso. Il muscolo ischiococcigeo, è situato lateralmente e posteriormente rispetto all'elevatore dell'ano con ampia superficie fibrosa forma il legamento sacrospinoso. L'elevatore dell'ano e l'ischiococcigeo svolgono un ruolo fondamentale nel sostenere i visceri pelvici, che sono forniti di una innervazione volontaria dal plesso sacrale ma anche di un automatismo che mantiene la contrazione durante il sonno, di un contingente parasimpatico, in azione durante la defecazione e la minzione, e di un contingente ortosimpatico.

Il perineo, disposto inferiormente al pavimento pelvico, ne è separato dallo spazio o fossa ischiorettale, più estesa posteriormente. Classicamente, la forma del perineo viene descritta come una losanga delimitata anteriormente dal pube, posteriormente dal coccige e lateralmente dalle spine ischiatiche (figura 2). I muscoli trasversi del perineo, superficiale e profondo, dividono questa losanga in due triangoli a base affrontata detti trigoni: l'anteriore o urogenitale, che dà passaggio all'uretra e nella donna alla vagina, e il posteriore, che dà passaggio al canale anale. Il trigono urogenitale è occupato dal diaframma urogenitale, che insieme all'elevatore dell'ano, costituisce il diaframma pelvico, qui costituito soprattutto dal muscolo trasverso profondo del perineo e dallo sfintere anteriore; essi sono rivestiti assieme dalla fascia del diaframma urogenitale, che inferiormente separa i muscoli perineali superficiali, trasverso superficiale, ischiocavernoso e bulbospinoso (7).

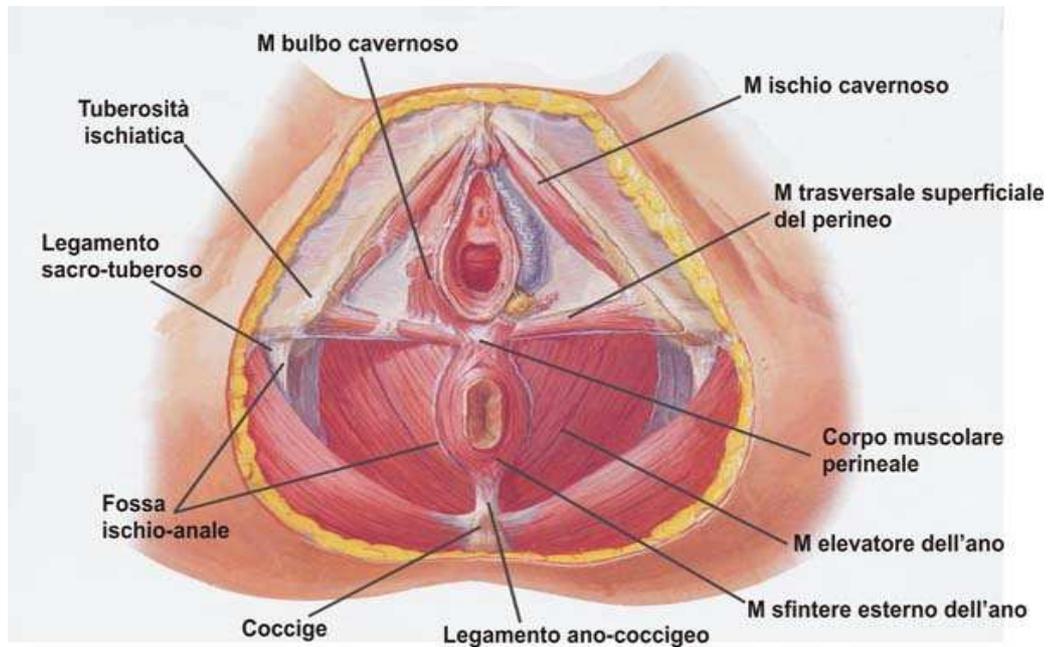
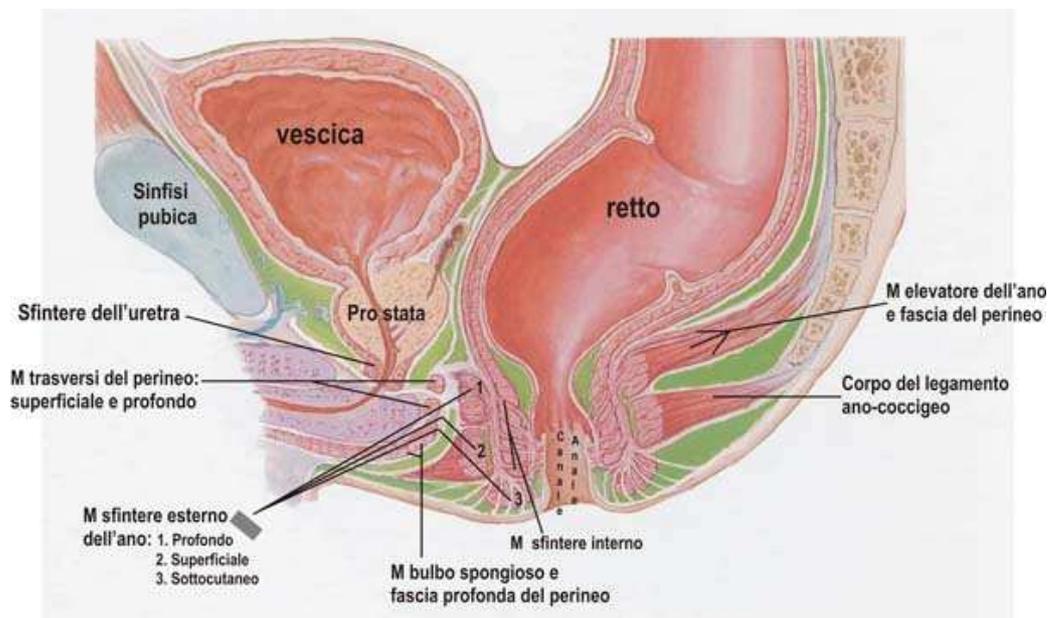


Figura 2. Visione perineo nella femmina

Il trigono posteriore è simile nei due sessi; ospita in posizione centrale il canale anale, circondato dallo sfintere striato e delimitato lateralmente da fasci muscolari del muscolo grande gluteo.



Nota: in verde sono rappresentati gli spazi periviscerali

Figura 3. Visione sagittale del perineo e del canale anoretale

#### 4.2.2 Anatomia del canale anale

Il canale anale passa attraverso il perineo posteriore in posizione mediana tra le due fosse ischiorettali al di sotto del piano dell'elevatore. A livello della sinfisi pubica alla sua parete aderisce la componente destra e sinistra della fionda puborettale, il quale posteriormente si fonde andando a circondare il retto. Il canale anale che si trova tra le valvole anali (o linea pettinata) e l'orifizio anale può essere definito embriologicamente come parte del proctodeo. Infatti circa i due terzi superiori (circa 25mm) del canale anale dell'adulto derivano dall'intestino posteriore mentre il terzo inferiore (circa 13mm) si sviluppa dal proctodeo. La giunzione fra l'epitelio derivato dal proctodeo e l'intestino posteriore è grossolanamente indicata dalla linea pettinata situata al limite inferiore delle valvole anali; tale linea indica approssimativamente il sito primitivo della membrana anale. L'epitelio del canale anale cambia bruscamente a livello della linea pettinata da epitelio stratificato squamoso dell'ano a quello della mucosa colonnare stratificata della retto. Questa linea delimita anche il limite in profondità dello sfintere esterno, il limite inferiore della fionda puborettale e il limite tra il terzo superiore con i due terzi inferiori dello sfintere interno. In questa zona l'epitelio è saldamente legato allo sfintere interno attraverso la sottomucosa (7). A livello dell'anello ano-rettale, l'epitelio si ispessisce presenta cripte, con cellule globose e ghiandole secernenti muco tipici di mucosa rettale. La mucosa anale situata distalmente al margine caudale dello sfintere interno si presenta con follicoli piliferi e ghiandole sebacee e ricoperta da cute di colore marrone e si continua con l'epidermide perineale. Le colonne di Morgagni si proiettano verso l'alto e costituiscono le pieghe longitudinali del canale anale. Il centimetro al di sopra delle colonne di Morgagni e a ridosso della linea Z prende il nome di zona transizionale: segna il passaggio all'epitelio squamoso dall'epitelio cuboidale ricco di apparato sensoriale, quest'ultimo responsabile del riconoscimento del contenuto dell'ampolla rettale.

Data tale importante funzione, è chiaro l'interesse dal punto di vista chirurgico nel preservare la zona. Il canale anale di forma cilindrica, è composto da uno strato mucoso avvolto da uno muscolare liscio, lo sfintere interno, a sua volta avvolto da uno strato muscolare striato, lo sfintere esterno, che forma connessioni strette con il fascio puborettale del muscolo elevatore dell'ano. Inoltre degli stralci muscolari dello sfintere esterno si vanno a disporre fino al sottocute e sono responsabile del corrugamento della cute dell'ano (4).

La muscolatura liscia dello sfintere interno è intrinseca alla parete intestinale e deriva dallo strato muscolare circolare interno del retto. La muscularis propria del retto, a livello della giunzione anorettale cambia; lo strato circolare interno si ispessisce e diventa lo sfintere interno e va ad avvolgere i due terzi superiori del canale anale (5). Il suo limite inferiore è identificato da un solco intersfinterico sulla cute, definendo così il limite superiore della parte bassa del canale anale. Il canale anale dal punto di vista anatomico, si estende dalla linea pettinata all'orifizio anale; dal punto di vista chirurgico, comunque, il suo margine superiore è determinato dal margine del muscolo puborettale ossia dal margine superiore dell'anello anorettale. Quindi considerando questo punto di vista, le strutture intrinseche della parete rettale si allungano fino alla cute, e il canale anale è quella parte di esso che si trova all'interno dello sfintere anale esterno (6).

Lo strato longitudinale muscolare anale è una struttura ben evidente nella parte alta del canale anale. Le fibre terminali di tale muscolo si inseriscono nella sottomucosa del canale e altre trasversali allo sfintere esterno anale fino alla cute, creando le fibre muscolari del muscolo corrugatore della cute anale. Esso si connette e si attacca insieme alla parte viscerale e somatica del complesso sfinteriale anale.

Lo sfintere esterno, muscolo striato volontario, è costituito da 3 componenti; dall'estremo caudale a quello craniale si identificano: 1. Lo sfintere esterno superficiale (sottomucoso). Esso circonda la parte più bassa del canale anale ed è attraversato dallo strato longitudinale muscolare del canale anale. Istologicamente, esso può essere visto come delle bienne muscolari parallele sul piano assiale chiamate fibre parasagittali (confermate alle immagini di risonanza magnetica). 2. Lo sfintere esterno profondo che circonda il canale anale nella porzione media e, che si continua, cranialmente, con le fibre puborettali del muscolo elevatore dell'ano. 3. Le fibre puborettali del muscolo elevatore dell'ano. La contrazione di tale parte forma l'anello anorettale. Durante la sua contrazione, non è identificabile dallo sfintere esterno caudalmente e dal resto dell'elevatore dell'ano cranialmente. Il suo bordo inferiore definisce l'estensione superiore del canale anale alto, che il quale sulla sua superficie anteriore non è presente, nella femmina, lo sfintere esterno. Il muscolo puborettale si continua con lo sfintere esterno ma è una parte anatomicamente distinta con distinta innervazione (7).

### **4.3 Embriologia dell'intestino posteriore e della cloaca**

#### **4.3.1 La linea primitiva e l'allantoide**

La prima prova di orientamento craniocaudale nell'embrione in via di sviluppo si verifica alla fine della seconda settimana di sviluppo, con la formazione della linea primitiva. All'estremità caudale del disco germinativo costituito dall'ectoderma e dall'endoderma, sulla superficie dorsale, compare un solco, appena accentuato denominata linea primitiva. In seguito, analogamente a quanto avviene negli animali inferiori, si ritiene avvenga anche nell'embrione umano, le cellule dello strato ectodermico migrano verso la superficie del disco in direzione della linea primitiva, ove divengono globose. Questo spostamento di dislocazione noto con il termine invaginazione, determina lo spostamento laterale delle cellule interessate tra l'ectoderma e l'endoderma costituendo il terzo strato, il mesoderma (8). Dalla primitiva linea, prima le cellule mesodermiche si sviluppano e migrano tra gli strati del disco bilaminare e poi si estendono per tutto l'embrione, ad eccezione della regione cefalica e caudale dove l'endoderma e l'ectoderma si fondono a livello delle membrane del disco protocordale e cloacale. Le cellule del mesoderma migrano fino al disco protocordale dando esito ad una formazione cilindrica, cava, nota come processo notocordale o notocorda. Nel frattempo le cellule del mesoderma migrano in direzione laterale in maniera da commettersi al mesoderma extraembrionale che copre sacco e cavità amniotica. Inizialmente il mesoderma si costituisce come un sottile foglietto formato da elementi scarsamente stipati e posti da ciascun lato della linea mediana. Verso il diciassettesimo giorno di sviluppo dell'embrione umano tuttavia, le cellule della parte cefalica dell'embrione immediatamente laterali alla notocorda, proliferano e formano una massa ispessita di tessuto noto come mesoderma parassiale. Per contro, di lato permane sottile e prende il nome di disco laterale; quest'ultimo in seguito al confluire di numerose cavità intercellulari, si delimita in due strati: uno in continuità con il mesoderma extraembrionale che ricopre l'amnios ed indicato come mesoderma somatico o parietale; l'altro, in continuità con il mesoderma che ricopre il sacco vitellino e, noto come mesoderma splancnico o viscerale. Nell'insieme questi due strati delineano una cavità di nuova formazione, la cavità celomatica intraembrionale. Il tessuto che inizialmente connette il mesoderma parassiale ed il disco laterale è noto quale mesoderma intermedio. La membrana cloacale può essere trovata subito caudalmente alla linea primitiva. Dorsalmente

alla notocorda è la piastra neurale, precursore del tubo neurale e del futuro del midollo spinale. Il disco embrionale inizialmente rotondo od ovale, si allunga e presenta al XVIII° giorno una larga porzione cefalica ed una stretta porzione caudale; lo sviluppo della linea primitiva in seguito comincia a regredire. Come l'embrione si allunga rapidamente con lo sviluppo del mesoderma e lo sviluppo della notocorda e del tubo neurale, la linea primitiva diventa relativamente più piccola e infine lascia alla caudal eminence e al tail bud, che poi è la fonte della maggior parte del mesoderma caudale, il tailgut e il midollo spinale distale (9).

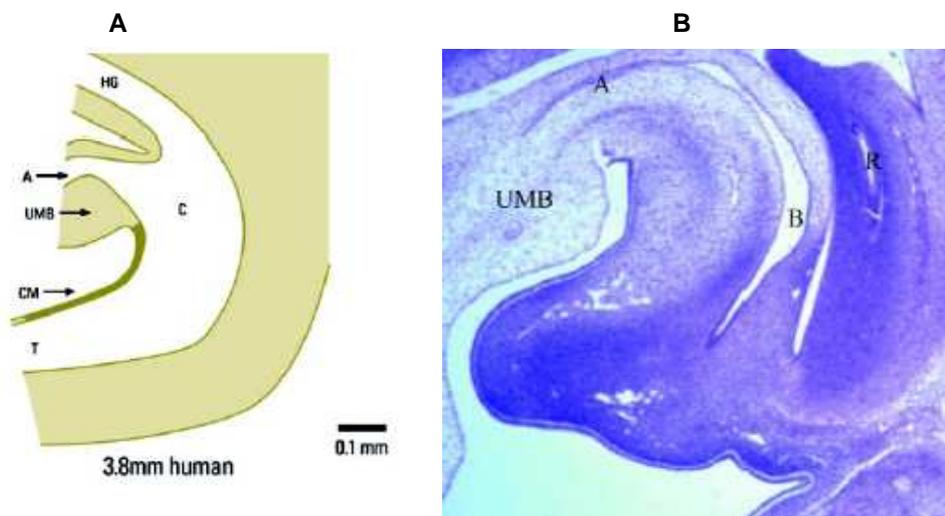


Figura 4 A. Diagramma 3.8-mm embrione umano. Allantoide: l'allantoide si sviluppa come un'estroflexione endodermica e mesodermica del sacco vitellino all'interno del cordone.

B. Fotografia embrione umano 18mm; HG Hindgut, T tailgut, C cloaca,

CM membrana cloacale, UMB cordone ombelicale, A allantoide , B vescica in via di sviluppo, R retto

L'attuarsi a livello del disco embrionario di movimenti di flessione, cefalica e caudale, comporta che la cavità rivestita da endoderma si divide in una porzione intraembrionale (intestino primitivo) e in due extraembrionali, il sacco vitellino e l'allantoide. Il termine "allantoide" è spesso usato per descrivere l'estroflexione endoermica del sacco vitellino dorsale che viene visualizzato vicino alla membrana cloacale e che si estende all'interno del peduncolo embrionale (figura 4). Tuttavia, esso è la combinazione di un pouch endodermico con il mesenchima specializzato che lo circonda, che è il vero allantoide, comune a rettili, uccelli e mammiferi. Il mesenchima specializzato dell'allantoide è anche derivato

dall'ectoderma della linea primitiva (9). Nei mammiferi l'allantoide è fondamentale per lo sviluppo del cordone ombelicale, oltre ad essere un sito di angiogenesi e il primo sito di formazione delle cellule del sangue. La struttura è altamente variabile. Nell'uomo la componente endodermica dell'allantoide è piccola, mentre nei roditori l'allantoide è interamente una struttura mesenchimale (9).

L'allantoide si sviluppa in quella che è inizialmente la più caudale dell'estremità della membrana cloacale, ma con la sproporzionata crescita dorsale dell'embrione e lo sviluppo delle strutture di coda, la membrana cloacale viene spostata ventralmente, insieme con il cordone ombelicale in via di sviluppo, che pertanto si trova sull'estremità craniale della membrana cloacale sulla superficie ventrale dell'embrione.

Il sacco vitellino è limitato e inizia a sviluppare un collegamento più stretto con la parte media del tubo intestinale in via di sviluppo. L'epitelio intestinale deriva dall'ectoderma e dall'endoderma. L'epitelio della parte più anteriore dell'intestino (cavità orale) e posteriore (ano) è di derivazione ectodermica, il resto dell'epitelio intestinale è di derivazione endodermica. Il muscolo liscio della parete intestinale origina dal disco laterale del mesoderma che darà origine al mesodema splancnico. Parte dell'intestino è composto da un arrangiamento tubulare tra l'endoderma e il mesoderma splancnico. Sul piano morfologico, la formazione dell'intestino embrionale lungo l'asse anteroposteriore dell'embrione avviene similmente in molti animali ed essenzialmente in maniera identica in tutti i vertebrati (8).

#### **4.3.2 Formazione AIP e CIP**

Nella fase iniziale dello sviluppo c'è una coreografia di movimenti di rotazione e flessione che l'embrione esegue durante la gastrulazione. La blastula forma attraverso una complessa serie di movimenti, un embrione tridimensionale polarizzato, che porta all'internalizzazione degli organi, incluso l'intestino. Cruciale risulta, nella fasi precoci di sviluppo, il processo di invaginazione dell'endoderma primitivo e la successiva crescita e differenziazione del mesenchima splancnico. Gli iniziali eventi includono in sequenza due invaginazioni, la prima all'estremità anteriore dell'embrione (anterior intestinal port AIP) seguita da un'invaginazione ventrale posteriore (caudal intestinal port CIP) formando due estremità aperte tubulari. I meccanismi di invaginazione non sono stati chiariti; si pensa che AIP sia conseguenza della rapida crescita del sistema nervoso centrale che indurrebbe una flessione ventrale

dell'estremità craniale con spinta all'interno dell'endoderma. Di conseguenza il mesoderma splacnico strettamente associato con l'endoderma, subisce una differenziazione in cellule muscolari lisce, formando una struttura tubulare attorno all'endoderma. Tale struttura tubulare cresce come un cilindro aperto, chiudendosi anteriormente durante l'allungamento posteriore. Tale fenomeno avviene con le stesse modalità all'estremità caudale dell'embrione. La formazione del AIP e del CIP sono attive funzioni specifiche dell'endoderma. Il tubo intestinale successivamente continua a crescere, e si estende sia dall'estremità craniale che caudale, fino ad incontrare e a fondersi con il sacco vitellino nella parte media dell'embrione. Questo primitivo tubo intestinale è suddiviso, sull'asse anteroposteriore, in 3 distinti domini: foregut (intestino anteriore), midgut (intestino medio) e hindgut (intestino posteriore) (Figura 5).

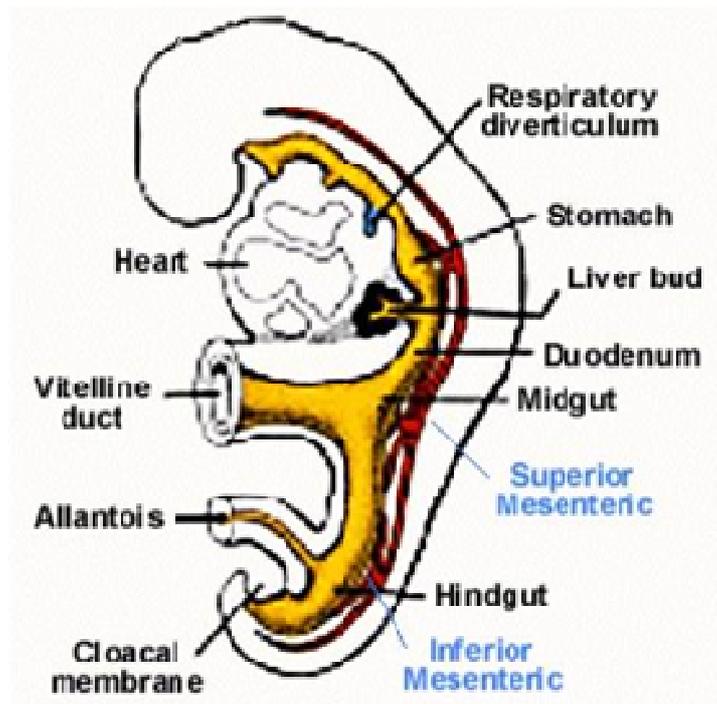


Figura 5. Disegno riproducente embrione umano alla fine della quarta settimana di gestazione

Al termine, l'intestino anteriore darà origine all'esofago, stomaco e organi derivati (tiroide, polmoni, pancreas e fegato); l'intestino medio forma il piccolo intestino e l'intestino posteriore (Hindgut) si estende, dall'area porto-intestinale posteriore alla membrana cloacale. Esso dà origine al terzo distale del colon trasverso, al colon discendente e sigma e al retto e parte superiore del canale anale; inoltre partecipa alla formazione del seno urogenitale (8). Il

primitivo tubo intestinale è rivestito da un singolo strato di epitelio di origine endodermica cuboidale-colonnare e circondato da un sottile strato di mesoderma splancnico.

La cloaca forma la porzione terminale dell'intestino posteriore; la sua estremità cefalica si continua con l'allantoide, mentre il suo rivestimento endodermico è in diretto contatto con la superficie ectodermica dove si costituisce la membrana cloacale. L'embriologia dell'intestino posteriore è da sempre dibattuta. Due maggiori teorie esistono per spiegare la differenziazione dell'intestino posteriore in parte urogenitale (ventrale) e anorettale (dorsale):

1. Teoria della divisione della cloaca
2. Teoria della migrazione del retto

Quest'ultima teoria venne modificata da van der Putte nel 1986 (10). Altre controversie esistono sulla modalità di fusione del setto urorettale con la membrana cloacale (CM) nello sviluppo normale e anormale.

#### **4.3.3 Il setto "urorettale" dell'intestino posteriore**

Negli embrioni molto giovani, l'intestino posteriore è una struttura semplice. Cranialmente, è in continuità con l'intestino medio; caudalmente, è a diretto contatto con l'ectoderma, formando così la "membrana cloacale". Quando lo sviluppo progredisce, la parte caudale del hindgut, la "cloaca", si differenzia in due sistemi separati, – il tratto urogenitale e il tratto anorettale. Come accennato nel lavoro di Tourneux (11) e Retterer (12) sino alla fine del XIX secolo, è stato generalmente accettato che il normale sviluppo di questi tratti dipenda dalla corretta suddivisione della cloaca da un setto, il cosiddetto setto urorettale.

In accordo con questa teoria, lo sviluppo anormale del setto urorettale dovrebbe sempre risultare in anomalie dello sviluppo della cloaca. Tuttavia, non c'è nessun accordo tra gli autori circa la natura di questo setto e il modo in cui esso si sviluppa. Secondo alcuni autori (11) il setto si forma e si muove in senso craniocaudale fino alla membrana cloacale, altri (12) hanno speculato che esso deriva da delle pieghe o creste laterali che appaiono nel lume della cloaca e che andrebbero a fondersi sulla linea mediana, così da formare il setto, iniziando a livello craniale e terminando caudalmente a livello della membrana cloacale. In passato, numerosi ricercatori hanno sostenuto una o l'altra di queste teorie. Stephens [6] le combinò entrambe, credendo che questo avrebbe potuto spiegare meglio le varie forme di MAR. Egli ha sostenuto che il setto, cranialmente doveva crescere verso il basso, come spiegato da

Tourneux, mentre caudalmente derivasse dalle pieghe laterali che fondendosi andavano a formare in questa zona il setto. Nel 1986, van der Putte (10) per primo ha dimostrato che il ruolo del setto nel processo di differenziazione della cloaca era in realtà molto minore.

In uno studio morfologico effettuato in neonati affetti da varie forme di MAR, Bill e Johnson (14) e più tardi Gans e Friedman (15) hanno affermato che nella maggior parte delle forme di MAR la fistola può rappresentare un'apertura anale ectopica. Essi hanno concluso da queste osservazioni che il retto, effettivamente migra durante lo sviluppo normale, da una posizione piuttosto alta fino all'area normale di apertura anale. Se questo processo di migrazione viene interrotto prima che l'ano abbia raggiunto la sua posizione definitiva nella zona del perineo, si crea un canale anale ectopico. Sebbene questa speculazione è piuttosto attraente, né questi investigatori né altri ricercatori sono stati in grado di dimostrare qualsiasi prova embriologica di questa migrazione. Nel 1986, van der Putte ha modificato la teoria della migrazione rettale o anale. Studiando embrioni normali e anomali di maiale, propose che la cloaca dorsale subisce uno spostamento o una rotazione. Questo spostamento dovrebbe portare verso il basso la cloaca dorsale, verso la zona del tail groove, stabilendo in quel punto la zona della futura apertura anale.

#### **4.3.4 La Cloaca e la membrana cloacale**

Come il mesoderma embrionale cresce e si diffonde dall'aspetto dorsale del disco embrionale l'allantoide viene fornito per collegare la cloaca in via di sviluppo al cordone ombelicale in via di sviluppo, sul piano ventrale dell'embrione. Nell'uomo la componente endodermica dell'allantoide diventa un'estroflexione a livello cranioventrale della neoformata cloaca e si estende nel peduncolo embrionale. La membrana cloacale limita la cloaca ventralmente e il tail gut si estende come una proiezione stretta dalla cloaca all'interno dell'aspetto ventrale della coda embrionale. Il hindgut è quella parte del tubo intestinale endoderma-allineato tra il sacco vitellino e l'allantoide che si è sviluppato come un risultato di una crescita mesenchimale in quella zona. I dotti mesonefrici si aprono in entrambi i lati del hindgut; la loro presenza e quella del diverticolo allantoideo segna l'inizio della cloaca corretta.

La membrana cloacale si estende, in questa fase iniziale fino al cordone ombelicale e caudalmente ad esso non vi è ancora nessuna parete addominale ventrale.

Il primo mesenchima a svilupparsi tra il cordone ombelicale e la membrana cloacale è quello dei tubercoli genitali (noto anche come eminenza cloacale), che normalmente si sviluppa come un singolo rigonfiamento infraombelicale di mesenchima distintivo densamente cellulare che sposta la membrana cloacale caudalmente nella linea mediana e circonda lateralmente su ogni lato la porzione ventrale della cavità cloacali (figura 6). La membrana assume le caratteristiche di piano multistrato epiteliale orientato nel piano sagittale (16).

Ciò si verifica soprattutto in seguito alla laterale compressione delle pareti della cloaca conseguente la proliferazione del mesenchima circostante, ma anche in misura minore, vicino alla punta del tubercolo genitale, da infiltrazione di cellule ectodermiche dalla superficie dentro la porzione urogenitale del piano nella regione del glande in via di sviluppo (16).

#### **4.3.5 Il seno urogenitale e canale anale**

Come cresce il tubercolo genitale, la cavità cloacale è spostata e la sua forma alterata. Allo stesso tempo la crescita del mesenchima che circonda l'intestino posteriore porta ad un allungamento del tratto stesso. La crescita della parte ventrale della cloaca e del mesenchima, circostante e adiacente all'endoderma dell'allantoide, segna l'inizio dello sviluppo della vescica e dell'uretra (Figura 6). Questa parte è comunemente chiamata seno urogenitale. Il Tail gut viene riassorbito da un processo di apoptosi o morte programmata delle cellule e la parete dorsale della cloaca si riduce dallo stesso processo (17).

Mentre il mesenchima che circonda le varie strutture associate alla cloaca cresce, la cloaca diventa relativamente più piccola. Il mesenchima compreso tra hindgut e la vescica in via di sviluppo sembra fondersi con il piano cloacale; tuttavia, l'apparente "discesa del setto urorettale" o "fusione delle pareti laterali della cloaca" descritti nel passato sono un'illusione creata dai cambiamenti nella relativa dimensione e posizione delle strutture mesenchimali in crescita che circondano la cloaca, e dal loro esame in sezioni bidimensionali (18).

Come la cloaca si sviluppa, il piano cloacale diventa rapidamente più sottile nella parte dorsale fino a farlo, ancora una volta riprendere l'aspetto di una membrana. L'aspetto del piano cloacale e della riformata membrana e il loro rapporto con il mesenchima compreso tra il seno urogenitale e del retto, varia ampiamente attraverso la specie e questo conduce all'errata convinzione che il "setto urorettale" si fonda con la membrana cloacale durante lo

sviluppo normale (come appare avvenire in alcune specie). Nell'uomo, tuttavia, è chiaro che la membrana cloacale abbatte senza mai fondersi con il setto, esponendo così entrambi i compartimenti anali e urogenitali e la comunicazione intermedia, diventa così il solco mediano cloacale, ossia il futuro medio perineo e la sede del futuro rafe (19).

Da uno studio di microscopia elettronica (SEM) eseguito su 245 embrioni di ratto tra la X<sup>a</sup> e

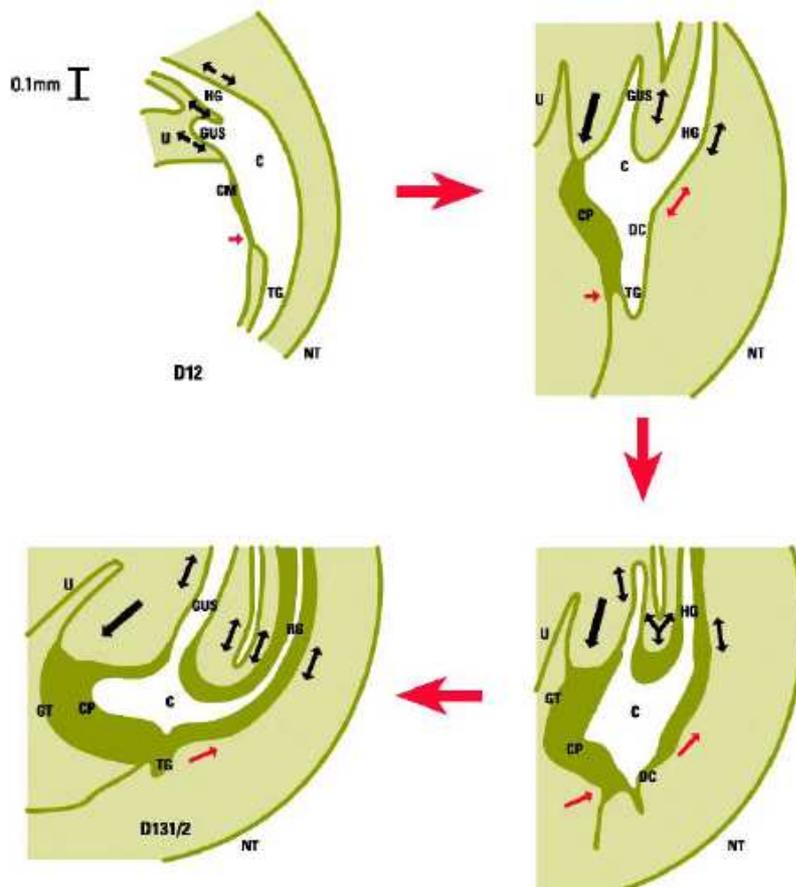


Figura 6. Diagramma che mostra lo sviluppo della parte ventrale infraombelicale dell'embrione. La crescita ventrale del mesenchima che circonda la cloaca, combinata con l'accorciamento della parete della cloaca dorsale e la regressione del tailgut da parte dell'apoptosi, determina fondamentali cambiamenti dell'aspetto della cloaca e delle relazioni con le strutture associate, durante il normale sviluppo.

Frecce rosse: indicano aree di regressione e programmata apoptosi. Frecce nere: aree di intensa crescita mesenchimale.

Embrioni da 12 a 13 giorni

NT tubo neurale,

U ombelico, DC cloaca dorsale

XV<sup>a</sup> giornata di gestazione (corrispondenti alla 3-7 sg umana) si sono ottenute le seguenti osservazioni (9):

- A 12.5 giorni di gestazione: tutti gli aspetti della cloaca sono presenti. L'intestino posteriore entra nell'area dorsocraniale della cloaca mentre l'allantoide viene identificata come un diverticolo cranioventrale. Tra i due viene osservata una piega urorettale. Questa piega segna il limite caudale dell'intestino posteriore indifferenziato chiamato cloaca.

I dotti mesonefrici entrano nella cloaca nella sua parte craniale ma in una posizione relativamente dorsale. Caudalmente, la cloaca continua direttamente all'interno del tailgut. La

membrana cloacale (MC) si estende come una curva concava dal bordo craniale della cloaca fino al tailgut. Fino a questo stadio la cloaca ha un aspetto triangolare ed appoggia sul suo apice. Non sono ancora presenti i tubercoli genitali.

- Negli stadi successivi ; l'aspetto della cloaca comincia a cambiare. Questo è causato dalla crescita ventrale del tubercolo genitale, processo che può essere facilmente evidenziato a 14 gg di vita dell'embrione. Questo processo di crescita porta a 2 conseguenze: aumentata crescita in direzione ventrale della cloaca e una dislocazione rettangolare della membrana cloacale con suo successivo slittamento della posizione da una verticale ad una orizzontale.

A 12.5 gg una debole depressione viene notata tra il diverticolo dell'uraco e il retto, tale depressione è la prima indicazione del setto urorettale. Tale setto si approfondisce durante gli stadi successivi fino ad incontrare la membrana cloacale. In tale punto di congiunzione la MC si disintegra. Durante il periodo di crescita ventrale della cloaca, la parte dorsale della cloaca e quella dorsale della MC rimangono sempre in stretto contatto con la regione del tail gut. Questa regione è quella che individua il futuro orifizio anale, ed è un punto cardine nello sviluppo cloacale.

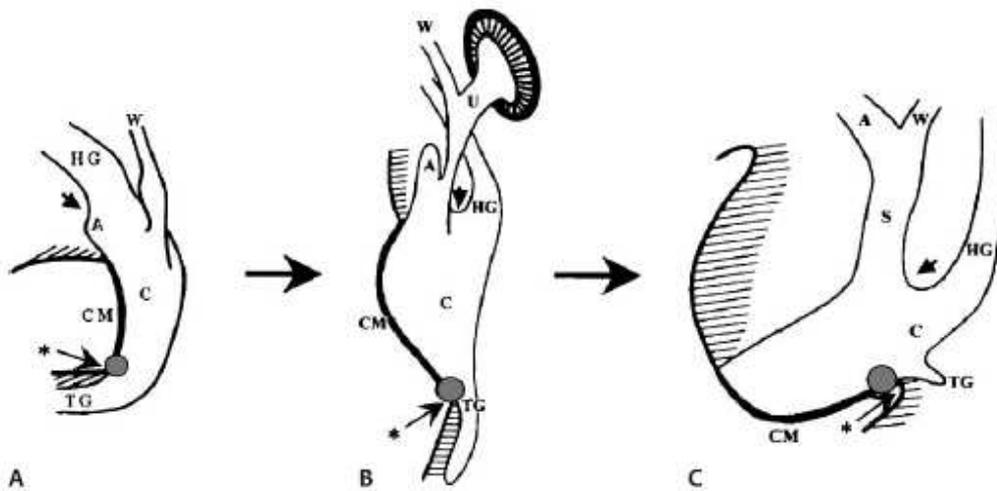


Figura 7. Diagramma schematico del normale sviluppo della cloaca nel ratto. **A** Embrione di 12.5 giorni . **B** Embrione di 14 giorni. **C** Embrione di 15 giorni. Notare il movimento della membrane cloacale (CM) da verticale a orizzontale.

Notare la discesa della piega urorettale (freccie corte). La parte dorsale della CM (line grigie) è l'area della future aperture anale. La freccia asteriscata segna l'area del tail groove zona fissa nello sviluppo della cloaca. S Sine urogenitale, W Dotto di Wolff, U uretere.

#### 4.3.6 Le interazioni epitelio-mesenchimali

Ogni regione dell'asse anteroposteriore dell'intestino è caratterizzato da un unico pattern di differenziazione endodermica e mesodermica, che può avere distinzioni morfologiche ed istologiche. Per esempio, l'endoderma del piccolo intestino contiene numerosi tipi di cellule arrangiate in strutture morfologiche chiamate villi che svolgono una funzione digestiva e di assorbimento; il mesoderma del piccolo intestino contiene due tipi di strati muscolari lisci, i quali usano la peristalsi per muovere il contenuto intestinale.

Il più importante tra i fenomeni noti della morfogenesi sono le interazione epitelio mesenchimali; è ben noto che l'intestino non può normalmente svilupparsi senza l'interazione tra endoderma e mesoderma. Infatti, quando il tessuto endodermico viene disseccato dal primitivo tubo intestinale e messo in coltura, il tessuto cresce senza differenziarsi. Invece, quando l'endoderma viene messo in coltura con il mesoderma, lo sviluppo morfologico non solo è possibile ma assume anche una morfologia intestinale. La diversificazione dell'intestino lungo l'asse AP in distinte zone e la coordinazione degli strati tissutali, così come la corretta associazione tra un istotipo endodermico e il corrispettivo tessuto mesodermico, dipendono da un segnale esteso tra endoderma e mesoderma. Nella fasi iniziali dello sviluppo intestinale come il tubo intestinale si forma da AIP e CIP, dei segnali endodermici al mesoderma splancnico, lo arruolano e lo inducono a subire una differenziazione a costituire il mesoderma viscerale (20). In seguito, i segnali di derivazione endodermica, sono, anche, in parte responsabili della differenziazione regione-specifica dell'adiacente mesoderma. Per esempio, la differenziazione del mesoderma dell'intestino medio in cellule muscolari lisce dipende da segnali che originano dall'adiacente endoderma (21). In seguito alla determinazione del tipo di mesoderma, i segnali che originano da esso inducono un pattern specifico di differenziazione morfologica dell'endoderma sovrastante (22). Per esempio, quando il mesoderma dell'intestino medio è unito con l'endoderma dell'intestino medio, il mesoderma reindica (respecifica) l'endoderma ad assumere la morfologia dell'endoderma dell'intestino medio. Questa regolazione mesodermica del fenotipo endodermico è stata dimostrata usando combinazioni di intestino anteriore e medio nel pollo (22), ratto e topo. Molti lavori hanno dimostrato che c'è una finestra temporale dello sviluppo, oltre la quale l'endoderma intestinale primitivo, che fino ad allora risultava morfologicamente

indifferenziato, risulta committed e se coltivato con tessuti diversi anche non intestinali, svilupperà delle specificità epiteliali proprie.

L'endoderma primitivo quindi messo in coltura con mesoderma non intestinale (fibroblasti della cute) induce a sua volta lo sviluppo di cellule muscolari lisce, identificate attraverso l'espressione di proteine del mesoderma viscerale come tenascina e actina muscolare liscia. Dunque l'endoderma è capace di indurre in senso intestinale la differenziazione del mesoderma non splancnico (come derivati dal mesoderma dei somiti). Le modalità con le quali tale mesoderma trasformato sia in grado di indurre a sua volta l'endoderma precommitted a differenziarsi non sono ancora note. Molti studi hanno dimostrato che l'endoderma intestinale indifferenziato coltivato con mesoderma di una determinata regione intestinale, si differenzierà in un epitelio tipico di quella regione mesodermica. Ciò significa che anche il mesoderma, come l'endoderma ha una capacità di indurre una differenziazione regione-specifica (23).

In un semplice modello di sviluppo intestinale, l'endoderma primitivo prima induce un invaginazione ventrale e poi una differenziazione intestinale specifica del mesoderma splancnico.

In seguito, il mesoderma induce una differenziazione epitelio-specifica dell'endoderma sovrastante. Questo semplice modello non spiega alcune funzione autonome epiteliali presenti in specifiche regioni anteroposteriori dell'intestino. Esiste una differenza tra l'endoderma dell'intestino medio e quello anteriore in quanto quello del piccolo intestino sembra essere autodeterminato in quanto se messo in coltura con mesoderma di tratti intestinali differenti si allinea con questi dal punto di vista morfologico, ma non esprime alcune specifiche funzioni cellulari. Lo sviluppo della differenziazione morfologica epiteliale può essere indipendente (in alcune regioni) dalla citodifferenziazione epiteliale. L'influenza del mesenchima sull'endoderma può essere limitato alla determinazione della morfologia che può non includere la citodifferenziazione (24,25).

E' quindi assodato che per la formazione di ogni complesso organo è richiesto un alto grado di coordinazione tra i differenti strati di tessuto dei quali esso è formato. Il modello intestinale ha mostrato, durante le fasi di sviluppo, il coinvolgimento reciproco di segnali da e tra l'endoderma e il mesoderma (20).

Per esempio durante il periodo della gastrulazione, nel topo, il precoce mesoderma è modellato dall'adiacente endoderma attraverso delle molecole di segnale. Il fattore di crescita

fibroblastico 4 (FGF-4) è uno dei più precoci segnali caratterizzato: la sua funzione persiste dopo la formazione del tubo GI, quando esso guida l'adiacente endoderma lungo l'asse anteroposteriore, inibendo l'anteriore e promuovendo quella posteriore in maniera dose dipendente (26). Tale funzione è tempo-dipendente perciò, mentre lo sviluppo procede, FGF-4 perde l'abilità a reprimere l'accrescimento anteriore.

#### **4.3.7 Sonic Hedgehog**

Una delle molteplici vie di segnalazione basilari nello sviluppo embrionale è quella della famiglia di ligandi *Hedgehog* (Hh). Essa comprende tre proteine, *Sonic Hedgehog* (SHH), *Desert Hedgehog* (DHH) e *Indian Hedgehog* (IHH), le quali sono implicate nei processi di *fate specification*, ovvero di determinazione del destino di una cellula, di definizione degli assi corporei, di proliferazione e di sopravvivenza cellulare (27).

In seguito al suo clonaggio molecolare e la scoperta nei primi anni '90 della sua controparte nei vertebrati, sono stati compiuti enormi progressi nell'individuazione del ruolo di Hh e della sua via di segnalazione nello sviluppo degli organismi e di patologie. Il malfunzionamento della Hh, infatti, può contribuire a diverse patologie umane, tra cui malformazioni durante sviluppo embrionale, quali le MAR. Un segno contraddistintivo di Hh è la sua abilità di agire ad ampio raggio e di controllare il destino delle cellule in funzione della concentrazione di Hh, attraverso la formazione di gradienti.

#### **4.3.8 Via di segnalazione di Hedgehog durante l'embriogenesi**

Hedgehog esercita la sua azione biologica attraverso una cascata di segnali che culmina in un'alterazione del bilancio tra le forme attivatrici e repressorie della famiglia Gli, una famiglia di fattori di trascrizione zinc-finger, denominate GliA e GliR.(28).

Il sistema recettoriale di Hedgehog consiste in Patched (Ptc), una proteina costituita da 12 domini transmembrana che funge da recettore, e da Smoothed (Smo), una proteina anch'essa transmembrana ma formata da soli 7 domini, che ha il ruolo di trasduttore obbligato attraverso la membrana plasmatica. In assenza di Hh, Ptc blocca l'attività di Smo provocando di conseguenza il processamento proteolitico delle proteine Gli, il quale genera una forma di GliR troncata all'estremità Cterminale che reprime attivamente un insieme di

geni *target* di Hh. Il legame di Hh a Ptc libera Smo e gli permette di svolgere il suo ruolo, bloccando la produzione di GliR e promuovendo l'attivazione di GliA. In presenza invece di Shh, il suo legame con Ptc non inibisce Smo, aumenta i livelli di fosforilazione e a livello citoplasmatico non viene indotta la proteolisi del complesso proteico che viene dissociato dai microtubuli; esso andrà ad attivare a livello nucleare i geni targets Shh. E' chiaro che l'attività di Ci è regolata a multipli livelli: proteolisi, fosforilazione e trasporto nucleare (29). Mentre in *Drosophila* è presente un solo gene *hh* e un solo omologo di Gli, denominato *Cubitus interruptus* (Ci), la traduzione del segnale di Hh nei vertebrati coinvolge sia tre ligandi (Sonic hedgehog, Indian hedgehog e Desert hedgehog), sia molteplici fattori di trascrizione Gli (Gli1, Gli2 e Gli3) (29). La funzione repressoria di Gli nei vertebrati è principalmente svolta da Gli3, mentre la primaria attività di GliA è operata in larga parte da Gli2. Gli1 è un *target* trascrizionale di Hh e agisce come attivatore trascrizionale per rinforzare la funzione di GliA.

#### 4.3.9 La via di segnalazione Hh

La via di segnalazione di Hh è attivata dal legame, nelle cellule rispondenti, del ligando Hh alla proteina transmembrana *Patched1* (Ptch1) e *Patched2* (Ptch2), promuovendo l'internalizzazione e il rilascio dell'inibizione che Ptch esercita costitutivamente su un'altra

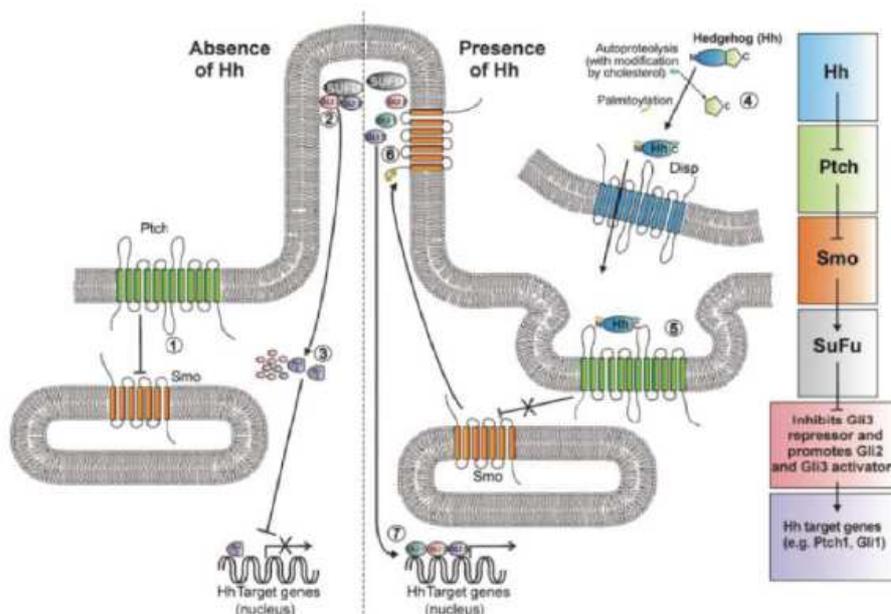


Figura 8. Schema della via di segnalazione di Hh in assenza o presenza del ligando

proteina transmembrana denominata *Smoothed* (Smo).

Smo viene quindi fosforilata e subisce una traslocazione dagli endosomi nei quale usualmente risiede alla membrana plasmatica (figura 8).

Smo e Ptch agiscono attraverso un segnale di trasduzione a cascata che culmina nella modulazione dei fattori di trascrizione di tipo zinc finger della famiglia Gli. Nei mammiferi essa è composta da tre geni che hanno in parte funzioni ridondanti: Gli1, Gli2 e Gli3. In assenza di Hh, Gli2 e Gli3 sono espresse a livelli significativi, mentre in cellule non indotte questi fattori sono fosforilati da tre differenti chinasi e successivamente ubiquitinati. In questo modo la maggior parte di Gli2 viene degradata via proteasoma alla base del cilium, mentre una limitata proteolisi di Gli3 e di Gli2 porta alla rimozione di un dominio di attivazione con la conseguente produzione di due forme proteiche troncate che reprimono i geni target di Hh. 72 L'attivazione di Smo, come già accennato precedentemente, inibisce questo processo e promuove la produzione di proteine intere che fungono da attivatori trascrizionali che, una volta nel nucleo, possono quindi attivare la trascrizione dei geni target. Gli1 è trascritto esclusivamente in risposta al segnale proveniente da Hh ed è dotato unicamente di funzione attivatrice per aumentare e/o prolungare l'espressione dei geni bersaglio di Hh. Gli1 agisce così insieme a Gli2 e Gli3, sebbene sia stato osservato che la perdita di Gli1 non causa difetti nella segnalazione di Hh (31).

Una sindrome clinica ha fatto luce sull'importanza di SHH nel corretto sviluppo dell'intestino posteriore, la sindrome di Pallister-Hall in essa è stata riportata la presenza di ano imperforato con fistola retto-urinaria, dovuta a mutazioni di Gli3.

#### **4.4 Shh e le interazione epitelio-mesenchimali**

Sonic hedgehog (Shh) è un eccellente candidato come mediatore nelle interazione tra endoderma e mesoderma perchè di derivazione endodermica e perché presente già nella fasi precoci dello sviluppo intestinale. E' quindi un importante via di segnale implicata nella prima fase delle interazioni tra endoderma e mesoderma. Shh è espressa nei vertebrati, nell'endoderma definitivo intestinale, sin dal primo momento dello sviluppo del AIP e CIP (Roberts et al 1995). Durante lo sviluppo e la morfogenesi dell'intestino, il dominio di espressione del Shh si espande e si mantiene in tutta l'estensione rostro-caudale dell'endoderma intestinale. (32, 33). La risposta alla Shh si autolimita regionalmente. Il

bersaglio dei segnali delle Hedgehog endodermiche è l'adiacente mesoderma, come dimostrato dall'intensa e specifica espressione del gene target *Ptc* in tutto il mesoderma viscerale (34). *Ptc* è un universale target delle hedgehog signaling, così la sua espressione può indicare i tessuti che rispondono alle hedgehog durante lo sviluppo. Un gene target che fornisce maggiori informazioni a questo riguardo è il *BMP4*; esso codifica un fattore di secrezione della superfamiglia delle transforming growth factor (TGF)  $\beta$ , il quale viene espresso nel mesoderma viscerale durante la fasi iniziali di formazione dell'intestino facendo capo all'espressione di *Shh* attraverso gli strati del tessuto (32). Misexpression di *Shh* nell'intestino primitivo conduce all'induzione ectopica di *Bmp4* nel mesoderma intestinale suggerendo che essa è un normale bersaglio del segnale *Shh* endodermico. *Bmp4* a sua volta, può comportarsi, in una cascata induttiva, come un secondario segnale a valle della *Shh* nel reclutare il mesoderma viscerale per la formazione dell'intestino (35). L'espressione mesodermica della *Bmp4* è precoce, è espressa a livello del AIP e CIP nelle fasi iniziali dello sviluppo, in maniera simultanea a *Shh*; con il progredire della morfogenesi intestinale, quando CIP assume una morfologia ben distinta e si allunga anteriormente per formare il lume intestinale, la sua espressione, a livello del CIP si restringe al mesoderma intestinale immediatamente adiacente ad esso (figura 9).

In termini di espressione spaziale, i due fattori sono simili nella loro disposizione osservata nella fasi iniziali dello sviluppo intestinale, con *Shh* nell'endoderma e *Bmp4* nel mesoderma adiacente.

La sovraespressione di *Shh* nel polmone del topo transgenico produce una massiva sovrapproliferazione del tessuto mesenchimale del polmone (36). A sua volta, la sovraespressione di *Bmp4* nel polmone causa una diminuita più che aumentata proliferazione cellulare (37). Rimane poco chiaro, se questa differenza nelle interazioni tra *Shh* e *Bmp4* riflette una differenza stage-specifica o riflette una sottostante regionalizzazione del mesoderma nella sua risposta a questi fattori. A livello del presunto mesoderma dell'intestino posteriore l'assenza di *Bmp-4* promuove un'aberrante proliferazione endodermica, quindi dell'epitelio, e del sistema nervoso enterico, indicando che *Bmp-4* non ha solo un ruolo di induzione dello sviluppo del muscolo liscio ma anche di regolazione della proliferazione epiteliale. Studi in embrioni di pollo hanno mostrato che le molecole di segnale endodermiche *Shh* attivano l'espressione di *BMP-4* nel mesoderma laterale dove i mediatori intracellulari delle *Bmps* regolano la proliferazione del mesoderma e più tardi la differenziazione in SMC

(38). Shh attraverso Bmp4, controlla il pattern anche radiale della parete intestinale in quanto dall'epitelio induce l'espressione di patched e Bmp4 nell'adiacente mesoderma intestinale, il quale differenzia in lamina propria e/o sottomucosa; inoltre inibisce cFKBP/SMAP, molecole regolatrici la differenziazione muscolare, inibendo così la presenza di tessuto muscolare liscio vicino all'epitelio. Shh inibisce anche la differenziazione neuronale enterica. Di conseguenza il muscolo liscio e il tessuto neuronale enterico sono confinati negli strati più lontani dall'epitelio (39). Un'importante interazione di segnale, che appare essere conservata tra le specie, è quella esistente tra Shh, Bmp-4 e Foxf1, indispensabile per una corretta morfogenesi del mesoderma viscerale. (Figura 10).

Nell'embrione di *Xenopus*, Bmp-4 attiva l'espressione di Foxf1, fattore di trascrizione richiesto per la formazione del disco laterale e del mesoderma viscerale. La più precoce funzione di Foxf1 è lo specificare il mesoderma viscerale dal mesoderma somatico. Non si conosce il preciso ruolo dei Foxf geni; quello che si conosce allo stato attuale è che i componenti del mesoderma viscerale (SMC, matrice extracellulare e sistema nervoso enterico) sono estremamente vulnerabili a manipolazioni di tali geni i quali stimolano la produzione da parte dei fibroblasti intestinali di matrice extracellulare. Gli embrioni Foxf1-null presentano un'incompleta separazione tra il mesoderma viscerale e quello somatico, e muoiono a metà gestazione per difetti vascolari. Per il normale sviluppo del mesoderma viscerale sono richiesti entrambi gli alleli di Foxf1, gli embrioni Foxf1 +/- presentano severe malformazioni dell'intestino anteriore, colecisti e polmonari (40). Il vicino gene Foxf2 è differentemente espresso durante lo sviluppo GI nel topo, con espressione predominante nel tratto posteriore dell'intestino. Questo suggerisce alcune ridondanze funzionali tra Foxf1 e Foxf2 nel mesenchima distale, che potrebbe spiegare il predominante fenotipo nell'intestino anteriore di Foxf1 e di Foxf2 nell'intestino posteriore. In accordo con questo gli embrioni Foxf2 null presentano dilatazioni coliche ed atresia anali, mentre l'intestino anteriore risulta nella norma. Recenti studi hanno investigato il rapporto esistente, durante lo sviluppo GI, tra i geni Foxf1 e Foxf2 e la via di segnale Wnt.

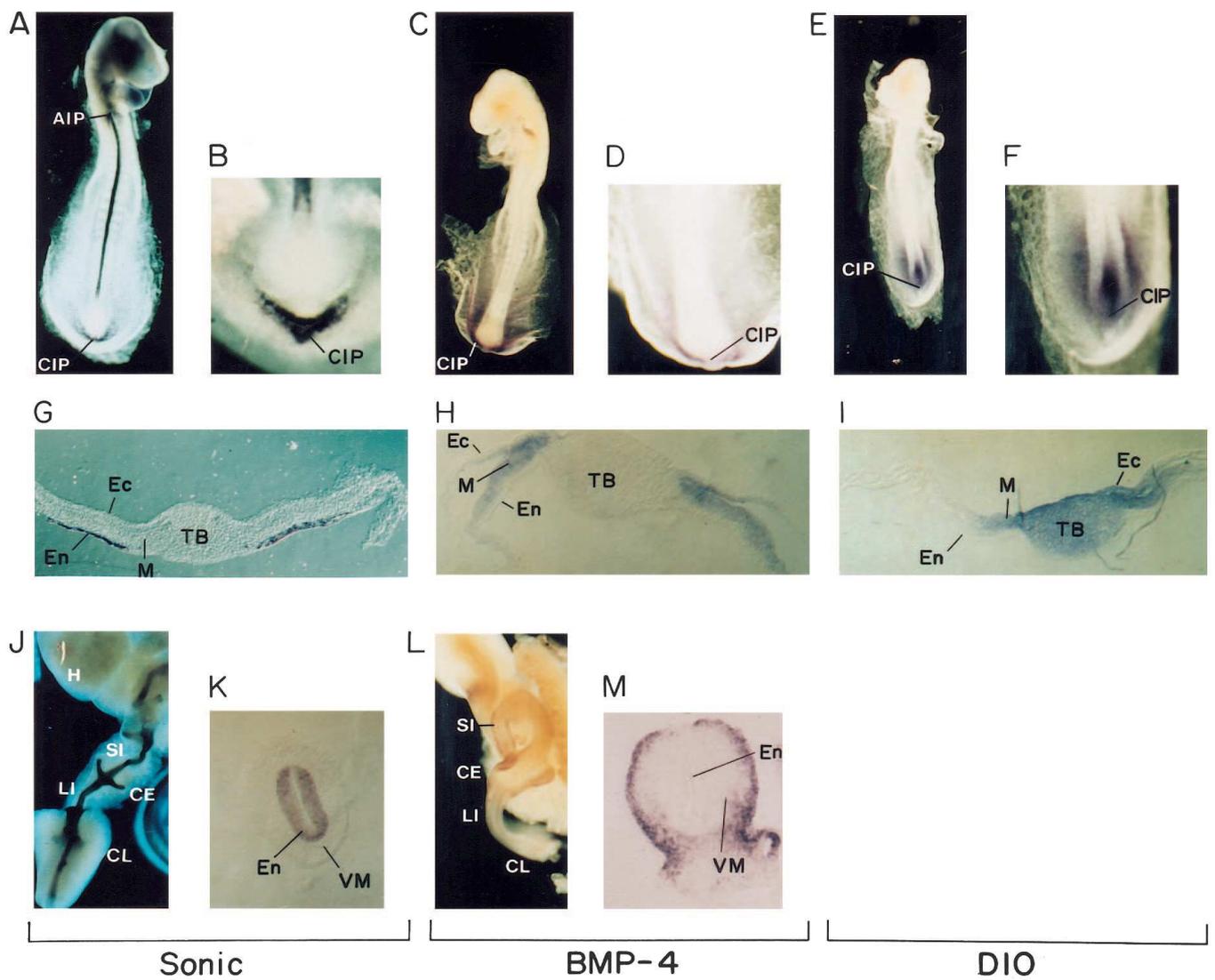


Figura 9. Espressione di Shh/Bmp-4 e Hoxd-10 nell'embrione di pollo a livello di AIP e CIP; A-B) particolare dell'espressione di Shh a livello di CIP con espressione endodermica di Shh; C-D espressione nel mesoderma viscerale di Bmp-4; E-F Hox-d è espresso a livello estremità caudale e nel mesoderma periferico intorno al CIP.

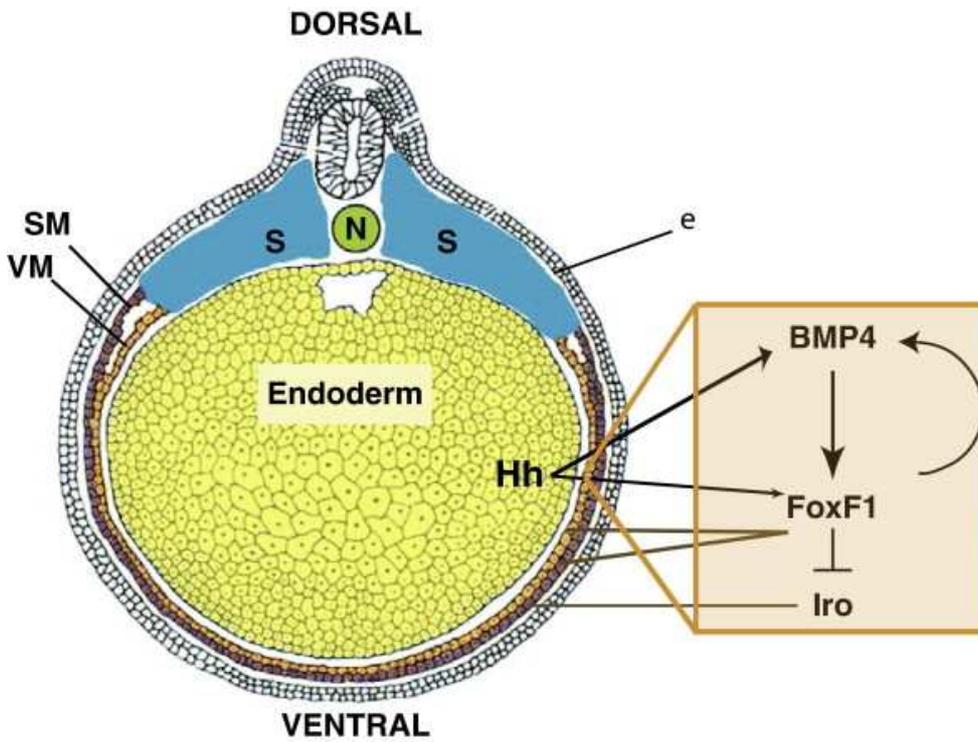


Figura 10. Sviluppo iniziale del disco laterale del mesoderma. Sezione trasversale di *Xenopus nerula*. Il mesoderma viscerale (VM) e il mesoderma somatico (SM) sono in continuità con il mesoderma parassiale (S). Shh prodotto dall'endoderma del futuro tubo intestinale induce l'espressione di Bmp-4 nel MV. A sua volta il Bmp-4 attiva l'espressione del fattore FoxF1 che a sua volta induce l'espressione del Bmp-4. FoxF1 inibisce Iroquois (Iro) che inibisce il programma cellulare del mesoderma destinato a diventare VM. N, notocorda (McLin et al, 2009).

Un altro importante set di geni targeted della via di segnale delle Shh, coinvolti nella regionalizzazione dell'intestino, sono i geni Hox. Sono essenzialmente geni dei eumetazoi che determinano l'identità delle regioni embrionali lungo l'asse antero-posteriore. Gli esseri umani generalmente contengono i geni Hox in quattro cluster genetici: Hox-A; Hox-B, Hox-C e Hox-D (41). Il primo gene Hox dei vertebrati venne isolato nel genere *Xenopus* nel 1984; nei vertebrati, i quattro cluster paraloghi sono parzialmente ridondanti nella loro funzione, ma hanno anche acquisito diverse funzioni derivate. In particolare, i geni HoxA e HoxD specificano per l'identità del segmento (ad es. braccio, avambraccio, carpo, metacarpo, ecc.) lungo l'asse dell'arto.

Il principale interesse in questo insieme di geni deriva dal loro comportamento unico. Si trovano tipicamente in un cluster organizzato. L'ordine lineare dei geni all'interno di un cluster correla direttamente all'ordine delle regioni sulle quali esse influiscono come correlano anche alla sequenza cronologica durante lo sviluppo embrionale quando vengono attivati. Questo fenomeno si chiama co-linearità. A causa di questa relazione lineare, qualsiasi cambiamento nel cluster genico dovuto a mutazioni generalmente risulta in cambiamenti simili nelle regioni che essi affettano. Ad esempio, quando un gene viene perduto il segmento si sviluppa dando luogo ad un segmento con le proprietà di uno più anteriore, mentre una mutazione che porti ad avere un segmento ulteriore causa che il segmento si sviluppi come uno più posteriore. Questo fenomeno viene chiamato ectopia. Esempi famosi sono i geni *Antennapedia* e *Bithorax* della *Drosophila*, che possono portare allo sviluppo di zampe sulla testa al posto delle antenne e rispettivamente allo sviluppo di un torace duplicato in cui sono presenti due paia di ali (quindi il moscerino della frutta in totale avrà 4 ali invece di 2).

L'espressione dei geni *Hox* inizia insieme all'espressione della *Shh*, quando nell'intestino iniziano a formarsi AIP e CIP; essi sono coinvolti, come chiave regolatrice del pattern anteroposteriore, nella crescita degli arti, tessuto assiale e romboencefalo (41). In studi eseguiti su embrioni di pollo (32), è stato dimostrato che *Hoxa 13* e *Hoxd13* sono espressi nella parte più posteriore del mesoderma ventrale circondante la cloaca.

#### **4.5 Ruolo del mesoderma viscerale nello sviluppo del tratto gastrointestinale**

Questo periodo di rapida crescita caratterizzato da segnali locali, largamente di derivazione mesodermica, il futuro intestino viene modellato lungo 4 assi (figura 11): antero-posteriore, dorso-ventrale, sinistro-destro e radiale. Il mesoderma invia e riceve segnali istruttivi o permissivi, all'adiacente endoderma; i segnali istruttivi sono sufficienti a direzionare il destino cellulare nei tessuti bersaglio, mentre i segnali permissivi sono in grado di attivare dei programmi genetici innescati (42).

Il mesoderma, pertanto, ha un ruolo importante nell'iniziale morfogenesi del tratto gastrointestinale (GI), ma tale ruolo richiede segnali che originano dall'endoderma, mediati in parte dalle molecole di segnale della famiglia Hedgehog (Hh). Le differenti risposte regionali al segnale Hh lungo l'asse craniocaudale porta alla formazione dell'intestino, anteriore, medio e posteriore (32).

Successivamente alla morfogenesi, le caratteristiche cellulari gastrointestinali tipiche originano da un endoderma indifferenziato e il mesoderma viscerale differenzia in specifici componenti.

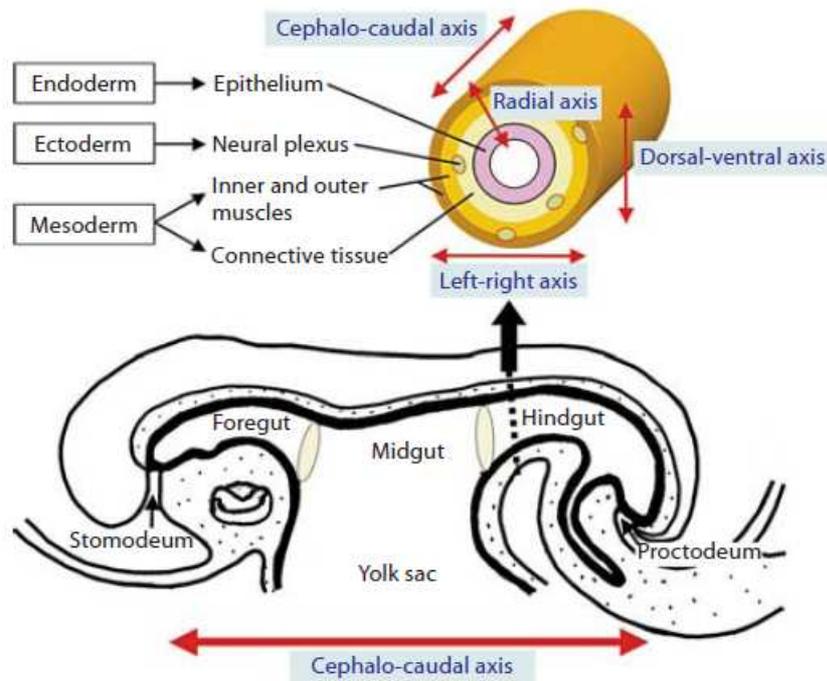


Figura 11. Regionalizzazione dell'intestino lungo i 4 assi

Questa fase, che inizia attorno al XV<sup>o</sup> giorno nel topo e continua in epoca postatale, e nell'uomo coincide alla fine del terzo trimestre, con la formazione del quinto asse del tratto gastrointestinale, l'asse villo-cripta. Tale asse è l'unità funzionale dell'intestino, ed è caratterizzato da un'estroffessione a dito all'interno del lume, comprendente un cordone mesenchimale e una copertura epiteliale composta da precursori delle differenti linee epiteliali. Il mesenchima contiene miofibroblasti subepiteliali intestinali (ISEMFs) sia nel cordone che nell'adiacente spazio intervilloso; essi sono importanti regolatori di segnali mesenchimali. In aggiunta, il mesenchima, oltre derivare dal mesoderma viscerale, forma la lamina propria, insieme ai vasi sanguigni e linfatici, cellule immunitarie residenti e la muscolare propria. Un breve accenno allo sviluppo di tali componenti di derivazione mesodermica, è obbligatorio prima di esaminare il network molecolare che regola lo sviluppo del mesoderma viscerale. ISEMFs sono localizzati, lungo tutta l'estensione dell'intestino,

appena sotto l'epitelio sia del villo che della cripta. Sono caratterizzati dall'espressione della  $\alpha$ -actina muscolare liscia ( $\alpha$ SMA) e sono organizzati in sincizi tra l'epitelio e la muscularis mucosa, dove contribuiscono alla composizione della matrice extracellulare (ECM) che della membrana basale. Nonostante la loro incerta origine, essi chiaramente risiedono all'interno degli strati mesenchimali alla base della cripta, vicino alla muscularis mucosa, iniziando circa alla 21<sup>a</sup> settimana di gestazione umana. ISEMFs differenziate migrano dalla cripta al villo e giocano uno dei ruoli maggiori nello sviluppo GI.

Il muscolo liscio viscerale deriva dal mesoderma viscerale, e rappresenta un larga componente dell'intestino. Gli strati muscolari dell'intestino includono uno strato circolare interno e uno strato longitudinale esterno. Insieme essi costituiscono la muscularis propria. Non molto si conosce circa il ruolo dello strato muscolare liscio nello sviluppo GI durante l'ontogenesi. I più precoci progenitori delle cellule muscolari lisce enteriche sono i mioblasti muscolari lisci, che esprimono  $\alpha$  actina muscolare liscia (SMA), in contrasto con le cellule muscolari lisce (SMC) differenziate che esprimono sia  $\alpha$  che  $\gamma$  SMA (43).

## 4.6 Classificazione delle MAR

Le classificazioni proposte per tali malformazioni sono state varie ed anche molto complesse. Quella riconosciuta e più utilizzata a livello internazionale è quella di Peña. L'autore sostiene che i termini "alte, intermedie e basse" utilizzate in passato per classificare i difetti in tale malformazioni siano arbitrarie e non correlate all'outcome, al piano terapeutico e alla prognosi.

La classificazione di Peña (44) è costruita sul concetto di esigenza alla nascita di confezionare o meno una colostomia per le lesioni alte o basse, creando un algoritmo di trattamento nei neonati; tale classificazione è basata sul difetto anatomico e come esso sia correlato con il management chirurgico.

### MASCHIO

- Fistola perineale (no colostomia)
- Fistola retto uretrale
  - Retto-bulbare
  - Retto-prostatica
- Fistola Retto-vescicale
- Ano imperforato senza fistola
- Atresia rettale

### FEMMINA

- Fistola perineale (no colostomia)
- Fistola retto vestibolare
- Cloaca
  - Con canale <3cm
  - Con canale >3cm
- Ano imperforato senza fistola
- Atresia rettale

### 4.6.1 MASCHIO

#### Fistola perineale

Questo tipo di malformazione più basso, conosciuto come ano imperforato. Il retto è collocato all'interno della maggior parte dei meccanismi sfinteriali. Solo l'ultima parte del retto si apre anteriormente al centro del complesso sfinteriale (figura 12).

Le manifestazioni cliniche possono includere un'apertura subepiteliale mediana a livello del raphe perineale, dello scroto o anche alla base del pene. Si possono osservare palline di meconio attraverso un sottile strato di cute. In questo difetto il complesso sfinteriale e il sacro sono usualmente normosviluppati (45). Il trattamento consiste in una anooplastica durante il

periodo neonatale senza confezionamento di colostomia. Circa il 28% ha una malformazione genitourinaria associata.

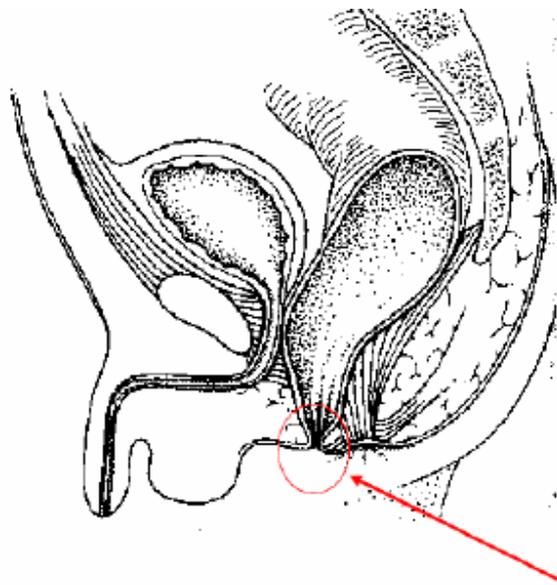


Figura12. Fistola perineale

### **Fistola rettouretrale**

In queste malformazioni il retto potrebbe comunicare con la parte più bassa dell'uretra (fistola bulbare) o con la parte più alta dell'uretra (fistola prostatica). Immediatamente sopra la fistola, il retto e l'uretra condividono una parete comune.

I pazienti con fistola rettobulbare (figura 13) di solito hanno un sacro normale e un perineo "di buon aspetto" con un solco in mezzo ai glutei, mentre i pazienti con fistola rettoprostatica (figura 14) tendono ad avere un'incidenza maggiore di un sacro anormale con un perineo piatto. I pazienti con fistola retto-bulbare sviluppano una normale funzione intestinale nell'81% dei casi dopo 3 anni di età. Circa il 46% hanno associato difetti urologici. I pazienti con fistola retto-prostatica sviluppano una normale funzione intestinale nel 70% dei casi. Circa il 60% dei pazienti hanno associato difetti urologici (44).

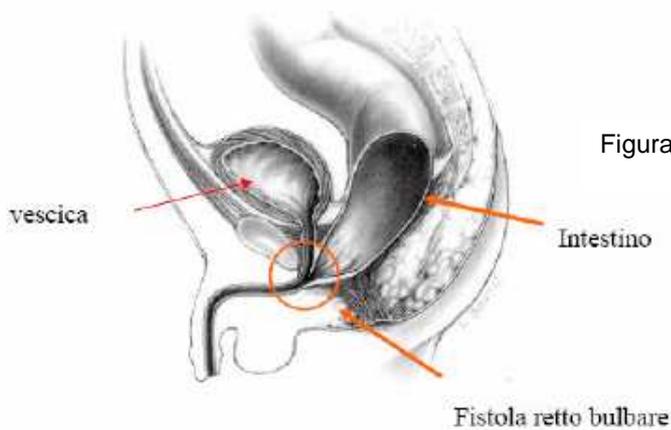


Figura 13. Fistola rettobulbare

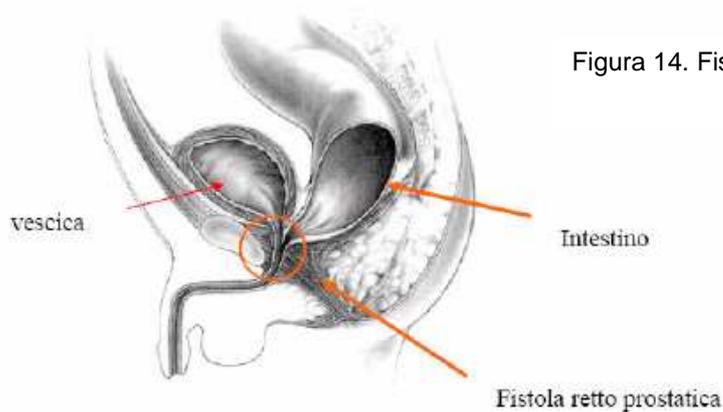


Figura 14. Fistola rettoprostatica

### **Fistola al collo della vescica**

In queste malformazioni il retto comunica con il tratto urinario a livello del collo vescicale (figura 15). La fistola si trova al di sopra del piano dell'elevatore dell'ano. Il muscolo elevatore, complesso sfinteriale e le fibre parasagittali sono spesso poco sviluppati. Il sacro è spesso deformato o assente. L'intera pelvi sembra essere poco sviluppata. Di solito il perineo è piatto. Per tutte queste ragioni la prognosi funzionale è minima (elevata incidenza di incontinenza fecale).

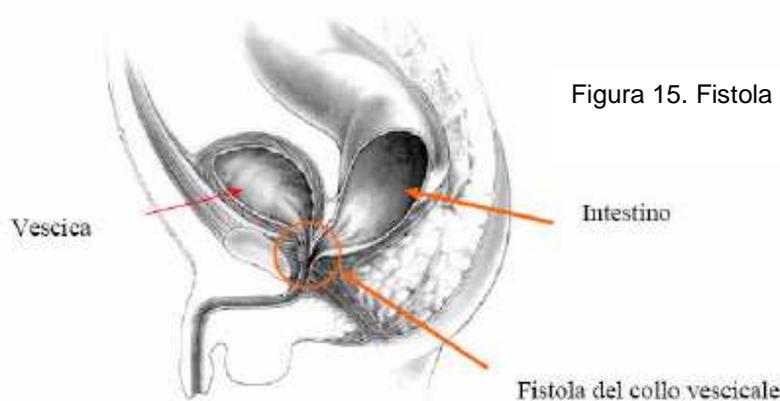


Figura 15. Fistola rettovescicale

E' il più grave difetto nel gruppo dei maschi. Solo il 30% dei pazienti sviluppano una normale funzione intestinale. Fortunatamente questo gruppo rappresenta solo il 10% dei pazienti maschi con MAR. Questo è l'unico tipo di malformazione che richiede una laparotomia in addizione all'approccio sagittale posteriore. L'incidenza di altre anomalie associate è molto elevata (circa 80%).

### **Ano imperforato senza fistola**

In questi casi il retto finisce a fondo cieco, circa 2cm sopra la cute perineale; di solito si situa allo stesso livello di una fistola bulbare rettouretrale. Il sacro e i meccanismi sfinteriali di solito sono normali e quindi questi bambini hanno una buona prognosi. Circa il 50% di questi pazienti presenta una sindrome di Down. L'altra metà sono frequentemente affetti da altre sindromi, come l'assenza del corpo calloso, la sindrome di Apert o altri disordini neurologici. Circa 38% dei casi hanno associato difetti genitourinari. In questo difetto lo sviluppo del complesso sfinteriale è buono, c'è un buon sviluppo del sacro e quindi hanno nel 80- 90% un buon controllo della funzione intestinale, anche se affetti da sindrome di Down.

### **Atresia rettale**

Questa è una malformazione molto inusuale che ha un'incidenza solo dell'1% dei casi. Questi sono gli unici pazienti con ano imperforato che nascono con un canale anale normale. Esternamente, l'ano e il perineo appaiono normali. A livello della giunzione anorettale, c'è una completa atresia o stenosi severa del retto; in alcuni casi ano e retto possono essere

separati da una sottile membrana. Il sacro è normale e i meccanismi sfinteriali sono normali, quindi la prognosi è eccellente.

#### 4.6.2 FEMMINA

##### **Fistola perineale**

Questa malformazione è equivalente alla fistola perineale descritta nel maschio. Il retto e la vagina sono ben separati, e il retto si apre usualmente attraverso un sottile tratto fistoloso in un'area localizzata tra i genitali esterni e il centro sfinteriale. Il meccanismo sfinteriale è molto buono e quindi anche la prognosi è buona.

##### **Fistola vestibolare**

Questa è la malformazione più frequente vista nelle bambine. Il retto si apre immediatamente dietro la vagina, a livello dei genitali esterni, nel vestibolo, posteriormente all'imene (figura 16). La caratteristica anatomica di questa malformazione è che immediatamente sopra la fistola il retto e la vagina condividono una parete molto sottile.

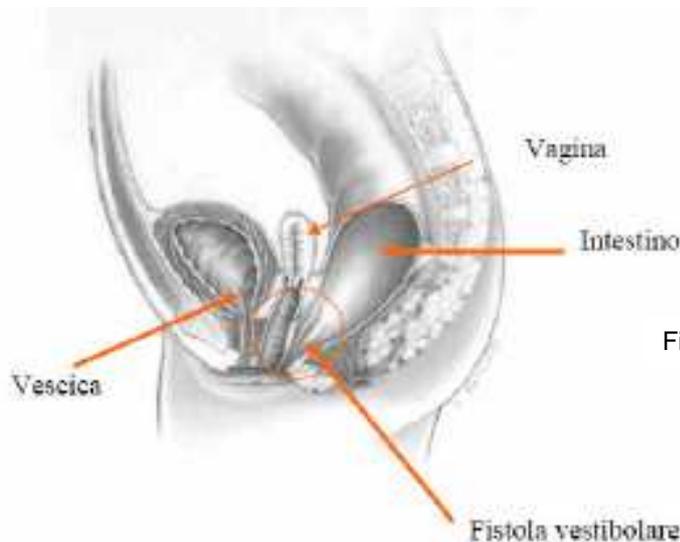


Figura 16. Fistola rettovestibolare

Queste bambine di solito hanno un buon complesso sfinteriale e un sacro normale. La sua prognosi è eccellente, quando l'intervento chirurgico è condotto correttamente. Circa il 90% di questi pazienti un normale controllo intestinale. Il 60% dei pazienti hanno stipsi. Sfortunatamente occorre sottolineare che nei casi trattati chirurgicamente in maniera errata

(con approccio addominale soprattutto), le sequele sono severe. Circa il 40% di queste pazienti presentano anomalie urologiche associate.

## Cloaca

L'incidenza è pari a 1 ogni 20.000 bambine nate. La cloaca rappresenta la forma più complessa di MAR: è esclusiva del sesso femminile. È rappresentata dalla confluenza del retto, della vagina e dell'uretra in un singolo canale comune (figura 17). La vagina e il retto condividono una parete comune così come il tratto urinario e la vagina. Le bambine con malformazione cloacale hanno un orifizio perineale unico, non c'è l'ano e i genitali esterni sono iposviluppati. La lunghezza del canale comune va da 1 a 10 cm, la lunghezza si correla con la complessità della malformazione e quindi con la prognosi funzionale (44). Ci sono molte varianti anatomiche in questo complesso tipo di malformazioni. Alcune volte il retto può aprirsi in una zona molto alta della vagina; molto spesso la vagina è enormemente distesa di liquido mucoso condizione nota con il termine di idrocolpo.

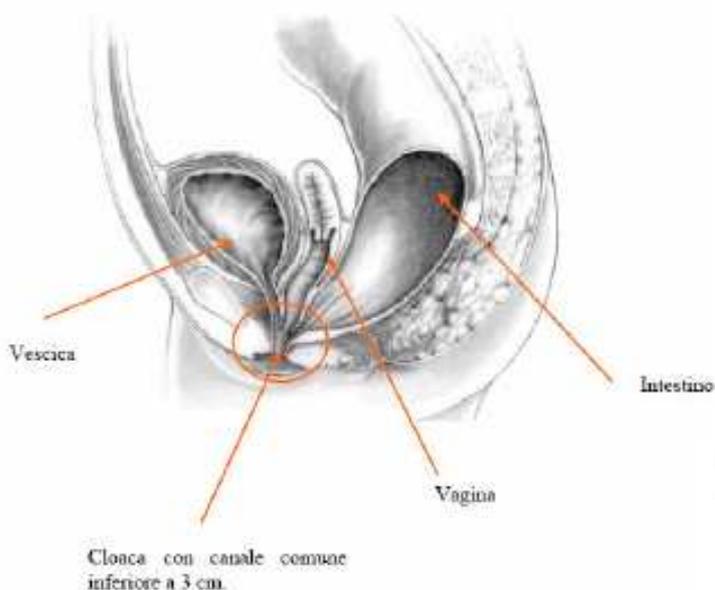


Figura 17 . Cloaca con canale comune inferiore ai 3 cm

L'idrocolpo, spesso comprime il trigone vescicale, ed interferisce con il drenaggio ureterale nella vescica, provocando megauretere bilaterale e idronefrosi.

Alcune volte vi sono duplicità del sistema mülleriano: questo comporta uno spettro di differenti gradi di divisione della vagina e dell'utero. In alcuni casi il retto si apre nella parte più bassa del setto che separa le due emivagine. Alcune volte è presente anche un'atresia della cervice o delle tube di fallopio. Le femmine con cloaca, idrocolpo, megauretere e idronefrosi dovrebbero essere trattate inizialmente con decompressione vaginale (semmai nello stesso tempo operatorio del confezionamento della colostomia). Ciò spesso crea una decompressione ureterale e quindi la non necessità di diversione urinaria (46).

Le pazienti che hanno un canale comune corto hanno un buon meccanismo sfinteriale, un sacro normale e una relativa bassa frequenza di anomalie associate e quindi una prognosi funzionale buona.

Inoltre occorre fare una valutazione di una possibile atresia esofagea (presente nel 5% dei casi) e di anomalie cardiache. Può essere presente anche una displasia sacrale. In caso di presenza di emisacro è probabile l'associazione con massa presacrale (più comunemente dermoidi, teratomi, meningocele) (47).

#### **4.6.3 Anomalie congenite associate**

L'incidenza globale di malformazioni associate si aggira intorno al 50-60%. Sono più frequenti nei casi di MAR alte raggiungendo anche il 92% di incidenza (2)(46).

Le anomalie sono di tipo:

- Genito-urinario 38% ( Reflusso Vescica Ureterale, Agenesia Renale, Criptorchidismo)
- Scheletriche 31% (Emivertebre, Spina Bifida, Agenesia sacrale parziale/completa)
- Intestinali 16% (Labiopalatoschisi, atresia esofagea, malrotazioni, m. di Hirschprung)
- Cardiache 9%
- Neurologiche 4%
- Polmonari 1%

Le malformazioni associate possono essere singole o multiple.

È importante citare l'associazione VATER, acronimo che individua una situazione polimalformativa che interessa completamente: Vertebre, Anoretto, Cuore, Trachea, Esofago, o l'associazione VACTERL (malformazione anche di Rene e Arti). Raramente queste sindromi si presentano complete (incidenza del 20% per le forme incomplete)(3).

#### **4.6.4 Diagnosi**

Non esiste la possibilità di una diagnosi in utero. La semplice ispezione del perineo del neonato è di solito sufficiente a rivelare la presenza dell'anomalia. Nei casi in cui la clinica appare dubbia, per l'assenza di comunicazioni fistolose con la cute, il perineo o le vie urinarie, è necessario eseguire una radiografia addominale in proiezione latero-laterale. Si tratta di una semplice radiografia del bacino e dell'addome a paziente prono con un repere metallico posto sul perineo che permette di stabilire la distanza tra il cul di sacco rettale e la cute perineale. Se la distanza del cul di sacco rettale è maggiore ad 1 cm si dovrà considerare la malformazione come forma alta e dovrà perciò essere confezionata la colonstomia; se è minore ad 1 cm ci si trova di fronte ad una forma bassa che può essere corretta in un unico tempo con l'anorettoplastica (47).

#### **4.6.5 Terapia**

Deve necessariamente tener conto della sede e del tipo di malformazione. Seguendo la classificazione di Peña (44) (49) distinguiamo le malformazioni quelle che necessitano della colonstomia e quelle che possono essere operate alla nascita.

1.M.A.R. che necessitano di colonstomia: è necessario per queste forme un trattamento chirurgico in tre tempi (colonstomia alla nascita, ricostruzione anale dopo qualche mese il confezionamento della colonstomia temporanea. Generalmente si tende a confezionare la colonstomia separando le due estremità del colon ("ad anse divise") alla cute dell'addome, evitando il passaggio del materiale fecale nell'ansa a valle. In questo modo si possono evitare infezioni delle vie urinarie, dato che il retto comunica frequentemente con le vie urinarie, e una infezione della regione operata una volta effettuato l'intervento di

ricostruzione dell'ano. L'intervento correttivo vero e proprio si esegue preferibilmente tra i 6-9 mesi di vita e la tecnica ovunque più diffusa è quella introdotta da Peña e De Vries nel 1982 nota come PSARP (48) (Posterior Sagittal AnoRectal Plasty). Nelle malformazioni molto alte (fistola rettovescicale) si deve aggiungere una laparotomia per isolare il retto per via addominale, che necessariamente non si riuscirebbe a raggiungere dal basso.

2.M.A.R. che non necessitano di colostomia: in questi casi la prognosi è molto migliore in quanto il retto è molto vicino alla cute ed è già all'interno della fionda puborettale, che è generalmente ben costituita, lo sfintere interno è efficiente e quello esterno è sufficientemente ben rappresentato. Pertanto il chirurgo esegue una P.S.A.R.P senza la colostomia, intervento meno impegnativo per il bambino.

## **4.7 MAR e vie patogenetiche**

### **4.7.1 MAR e geni HOX**

In un recente studio è stata osservata l'espressione dei geni HOX durante lo sviluppo normale e non dell'intestino posteriore, in particolare dei geni Hoxd-13 (50); è risultato che i livelli di espressione di Shh, BMP4 ed HOX geni sono differenti nell'intestino posteriore dei ratti esposti a etilentiourea (ETU).

Nel ratto normale i livelli di espressione della BMP4 sono correlati con quelli della Shh per tutto lo sviluppo intestinale; nel ratto ETU esposto, si osserva una riduzione, quasi simultanea e, consensuale dei livelli della Shh e BMP4. La riduzione dei segnali induttivi provenienti dall'endoderma, che stimolano ad attivare l'espressione di BMP4 determina una minima crescita del mesoderma viscerale nella regione del CIP. Inoltre nei ratti ETU esposti, i livelli di Hox geni concordano con quelli di Shh. Quindi, quando Shh è downregulated anche questi ultimi risultano affetti. La misexpression delle Shh può attivare un'ectopica espressione dei geni Hox nel mesoderma dell'intestino posteriore, suggerendo che l'espressione di tali geni sia la risposta ad un segnale Shh endodermico (32). L'importanza di questi domini di espressione ai fini della differente morfogenesi intestinale è supportata da esperimenti su topi transgenici nei quali delle mutazioni inattivanti o che alterano la normale espressioni di tali geni comportano un anomalo

sviluppo dell'intestino. Nel topo una delezione del Hoxd-13 cluster, il quale è normalmente espresso nel mesoderma, comporta un'assente formazione sfinterica del piloro e dell'ano (51). I geni Hox conferiscono informazioni di posizione lungo l'asse bocca-ano integrando multipli input di regolazione. Attraverso le varie fasi dello sviluppo GI essi sono sequenzialmente attivati in ordine temporale, co-linearmente con il loro ordine nel cromosoma. Hoxd-9 è espresso prima del Hoxd-10 e così via. Nell'embrione del pollo il segnale BMP4 nel mesoderma viscerale è necessario per l'induzione dei geni Hox; le successive interazioni mesenchima-epitelio controllano la morfogenesi dello stomaco e del polmone, e i segnali dell'acido retinoico controlla l'espressione endodermica degli Hox geni come il Pdx1 (homeobox 1 pancreatico e duodenale) o Cdx2 (fattore di trascrizione 2 homeobox tipo caudale). I Cdx geni sono regolati da Wnts ed è stato ipotizzato che la Wnt pathway co-opti con Hox per eseguire il loro programma anteriore-posteriore. In ultimo, considerando che il mesoderma risponde diversamente ai segnali Shh lungo il suo asse antero-posteriore, Shh potrebbe indurre i prodotti dei geni Hox mesodermici a formare la struttura sfinterica. Questo è dimostrato da topi Shh  $-/-$  che presentano una trasformazione intestinale dello stomaco, un pancreas anulare, stenosi duodenale ed ano imperforato. Questa trasformazione homeotica del fenotipo supporta il concetto di una via di segnale da Shh a Hox che è stata dimostrata nell'intestino anteriore e posteriore negli embrioni di pollo, topo e ratti (32) (52) (50). I geni Hoxa/d13 risultano espressi nella parte posteriore del mesoderma intestinale, ma anche in tutto l'endoderma dell'intestino posteriore. Questo aspetto è unico solo dei geni Hox 13th, mentre tutti gli altri sono espressi unicamente nella componente mesodermica. La prova è che topi mutanti nulli sia per gli alleli di Hoxa-13 e Hoxd-13 presentano anomalie degli strati epiteliali del retto oltre che delle malformazioni mesodermiche (53).

La distribuzione spaziale dei geni coinvolti nella differenziazione del mesoderma viscerale lungo l'asse cranio-caudale è parzialmente illustrata nella figura seguente.

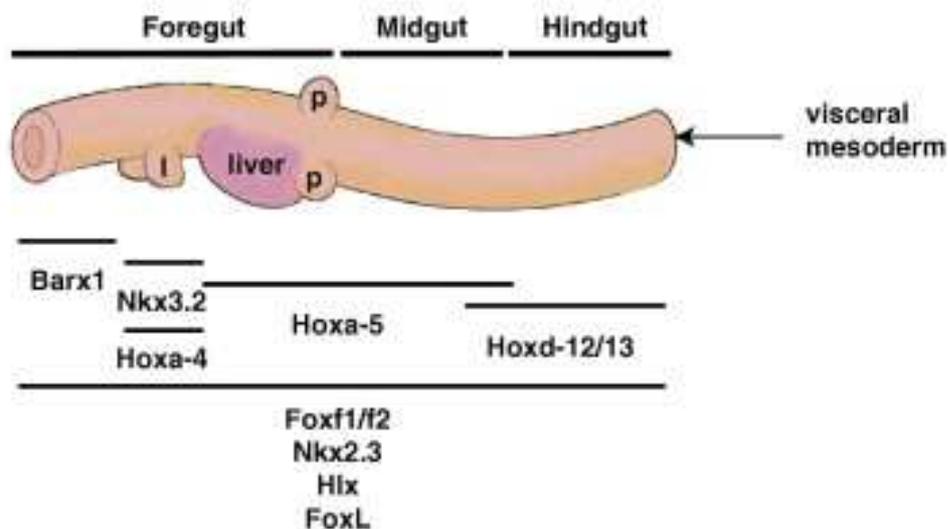


Figura 18. Distribuzione spaziale di geni homeobox mesodermici coinvolti nella differenziazione gastrointestinale, utilizzando nomenclatura del topo.

#### 4.7.2 MAR e Shh-Fattori Gli

Oltre al suo ruolo potenziale nell'arruolare il mesoderma viscerale, Shh agisce anche nello stabilire i differenti destini dei tessuti di derivazione intestinale in risposta a questi fattori.

In uno studio del 2001 (54) è stata eseguita un'analisi sistemica dell'intestino posteriore in topi  $Shh^{-/-}$  come in topi mutanti con deficit di Gli2 e/o Gli 3. Vi sono tre membri della famiglia Gli; Gli1, Gli2 e Gli3: sono tutti fattori di trascrizione nella Shh pathway. I geni Gli1, Gli2 e Gli3 codificano per fattori di trascrizione che contengono conservati domini a dito di zinco tandem C2-H2 e una sequenza linker consenso istidina/cisteina tra le dita di zinco.

Studi biochimici e genetici hanno dimostrato che i tre fattori di trascrizione (Gli1, Gli2, e Gli3) sono coinvolti nella trasduzione del segnale Shh (55)(56)(57). Nei topi transgenici mutanti Gli1 mancando le estremità a dita di zinco non è in grado di indurre i targets di Shh. I fattori di trascrizione Gli attivano/inibiscono la trascrizione legandosi ai geni sensibili Gli e interagendo con il complesso di trascrizione. I fattori di trascrizione Gli hanno DNA associazione zinco dito domini che si legano alle sequenze consenso sui loro geni bersaglio per avviare o reprimere la trascrizione (56). Liu et al ha mostrato che mutando il dominio a dito di zinco Gli inibisce l'effetto di proteine, dimostrando il suo ruolo come fattore di trascrizione (57). Nei topi, il primo segno esterno di sviluppo di ano, retto e del tratto urinario inferiore è la comparsa degli orifizi anale e uretrale nel futuro perineo su E14.5. Tra E12.5 ed E13.5, la parte più distale dell'intestino posteriore e il compartimento uretrale più anteriore, condividono una cavità cloacale residua comune (contrassegnata come c nella figura 1e). La cavità è coperta da una sottile membrana cloacale, che scompare a circa E14.5 (figura 19). L'insorgenza della partizione della cloaca nella

porzione anorettale dorsale e, del seno urogenitale ventrale, si osserva chiaramente da E10.5 (figura 19). Tuttavia, una partizione completa non si verifica fino a quando l'uretra e ano E14.5 non si aprono indipendentemente nel perineo. L'aspetto dei genitali maschili e femminili esterni nel perineo rimane indistinguibile fino a E14.5. Tra E14.5 e la nascita (E19.5 a E20.5), la distanza tra l'orifizio anale e uretrale si allunga con la crescita del tubercolo genitale rivelando di più le caratteristiche maschili e femminili. I tre fattori di trascrizione Gli sono tutti altamente espressi nel mesoderma viscerale di sviluppo dell'intestino posteriore.

Le conclusioni dello studio di Mo et al (54), stabiliscono che il segnale Shh è essenziale per sviluppo del hindgut distale. Inoltre, questa è la prima dimostrazione di uno specifico percorso genetico in grado di riprodurre l'ampio spettro di malformazioni ano-rettali degli esseri umani. Dimostrano che le mutazioni in Shh e i suoi mediatori a valle, Gli2 e Gli3, determinano le differenti forme di malformazioni ano-rettali (riassunte nella figura 6). Inoltre, il dosaggio del gene di Gli2 e Gli3 è stato fatto per modulare la gravità della malformazione suggerendo che un preciso grado di segnalazione di Shh è necessaria per il normale sviluppo del retto e dell'ano. I fenotipi mutanti suggeriscono fortemente che un difetto nel segnale Shh può essere coinvolto nella patogenesi umana di tale malformazione. È interessante notare che il gene SALL1, che è mutato nella sindrome di Townes-Brocks, è anche un gene putativo target di Shh signaling. (60).

Gli2 sembra essere il mediatore principale di Shh in vivo. Apparentemente nell'intestino anteriore in via di sviluppo, Gli2 è necessaria per lo sviluppo dell'esofago, trachea e polmone. Topi Gli2<sup>-/-</sup> presentano difetti che sono simili, ma più modesti di quelli osservati nei topi null Shh: stenosi dell'esofago e trachea e difetti nella lobatura del polmone. Gli3 gioca apparentemente un ruolo minore nello sviluppo intestinale; topi Gli3<sup>-/-</sup> sviluppano trachea ed esofago normali e solo una lieve ipoplasia polmonare. Analogamente all'intestino anteriore, Gli2 è importante per lo sviluppo dorsale dell'anoretto da hindgut distale, mentre topo mutante Gli3 presenta una stenosi anale, un fenotipo meno grave, ma anche comune nell'uomo. In relazione al loro ruolo specifico nello sviluppo del hindgut distale, un effetto gene dose-dipendente è stato osservato in Gli2;Gli3 doppio mutante suggerendo un conservato ruolo del segnale Shh in entrambe le estremità dello sviluppo intestino anteriore e posteriore (54).

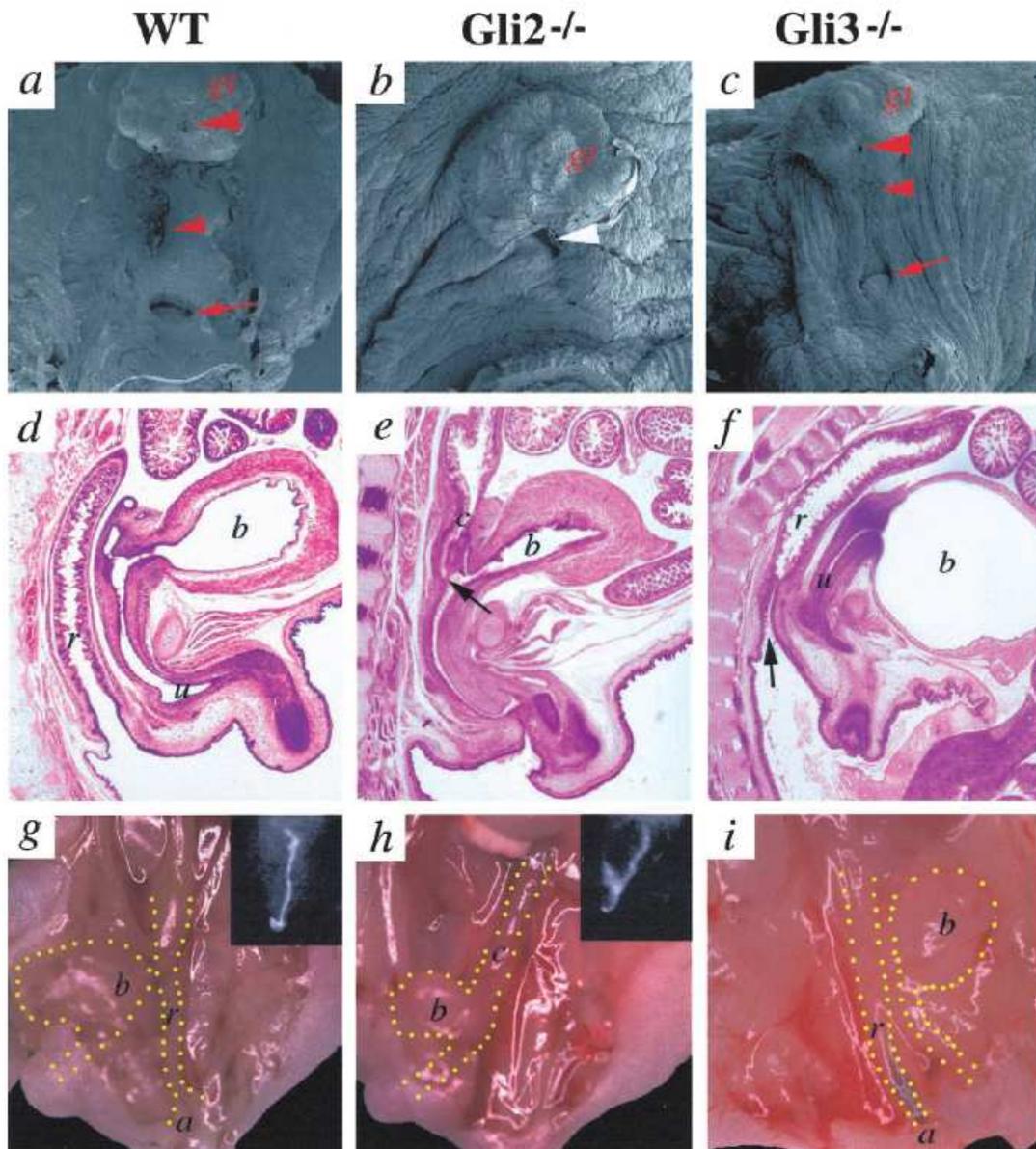


Figura 19. Ano imperforato in topi Gli2<sup>-/-</sup> e stenosi anale in topi Gli3<sup>-/-</sup>. Microscopia elettronica della regione anorettale in topi normali di 18.5 giorni (a), Gli2<sup>-/-</sup> (b), Gli3<sup>-/-</sup> (c) con individuazione delle regioni delle future aperture uretrali, vaginali e anali (freccia intera). Le sezioni sagittali (d-f) rivelano l'assenza di ano con fistola (indicata dalla freccia) tra il tratto intestinale distale e l'uretra prossimale in Gli2<sup>-/-</sup> (e), e un canale anale stretto (indicato dalla freccia) con normale tratto urinario e retto in Gli3<sup>-/-</sup> (f). Dimostrazione della fistola retto-urinaria attraverso mezzo di contrasto iniettato nell'intestino distale (h) in Gli2<sup>-/-</sup>. Microdissezione en-bloc degli embrioni (g-i).  
 Abbreviazioni: a, ano, b, vescica, c, cloaca, gt, tubercolo genitale, r, retto, u, uretra.

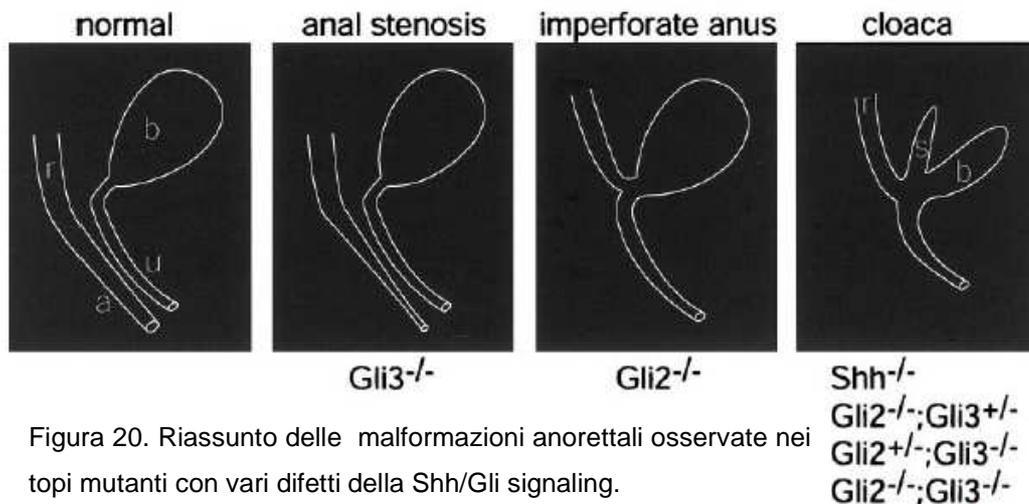


Figura 20. Riassunto delle malformazioni anorettali osservate nei topi mutanti con vari difetti della Shh/Gli signaling.

Studi condotti su embrioni di pollo hanno dimostrato che Gli2 svolge un ruolo di mediatore del segnale Shh ma non è sufficiente, da solo a determinare la divisione della cloaca sull'asse dorso-ventrale. La sovraespressione di Gli2 induce a sua volta l'espressione del recettore Ptch1, Gli2, Bmp-4, Wnt5a, e Hoxd-13. Inoltre esso aumenta la proliferazione cellulare a livello dell'endoderma ma anche del mesoderma, ma non è in grado di indurre la differenziazione cellulare; riduce l'apoptosi (61).

#### 4.7.3 MAR e geni Foxf

In un recente lavoro (62) è risultato che negli embrioni di topo vi è un'alta espressione, a soprattutto a livello del tratto distale del colon e del retto, di Wnt5a: essa è membro della famiglia delle Wnt, e regola il fattore di crescita fibroblastico 10 (Fgf10) durante lo sviluppo del polmone. È stato sviluppato un nuovo modello di MAR in topi Wnt5a knock-out;. Gli embrioni Wnt5a<sup>-/-</sup> presentano multiple anomalie congenite come disrafismi, zampe più corte, coda tagliata e ipoplasia del tubercolo genitale ed a 15.5 giorni dopo il concepimento, è presente in tutti gli embrioni una fistola tra retto e vie urinaria, mentre a 18.5 giorni si osserva solo nel 25% dei casi. La scomparsa della fistola può essere il risultato di un'apoptosi non bilanciata. In un precedente lavoro gli stessi autori avevano dimostrato che Fgf10 era implicato nello sviluppo della regione anorettale (63). Infatti i topi mutanti Fgf10<sup>-/-</sup> presentano ano imperforato. Le conclusioni degli autori sono che Wnt5a, Shh e Fgf10 rappresentano mediatori di una via patogenetica coinvolta nella sviluppo delle MAR. In un successivo lavoro viene ipotizzata una pathway alterata nella genesi delle

MAR, coinvolgente diversi mediatori a valle della Shh (64). La figura 21 illustra le variazioni morfologiche nella parete di intestino distale in embrioni *Foxf* mutanti che presentavano un megacolon agangliare con ipoplasia del muscoli liscio ed atresia anale. Interessante sono le conclusioni di questo lavoro che ipotizza un modello di interazioni paracrine tra Hh, Bmp-4 e geni *Foxf* (figura 23).

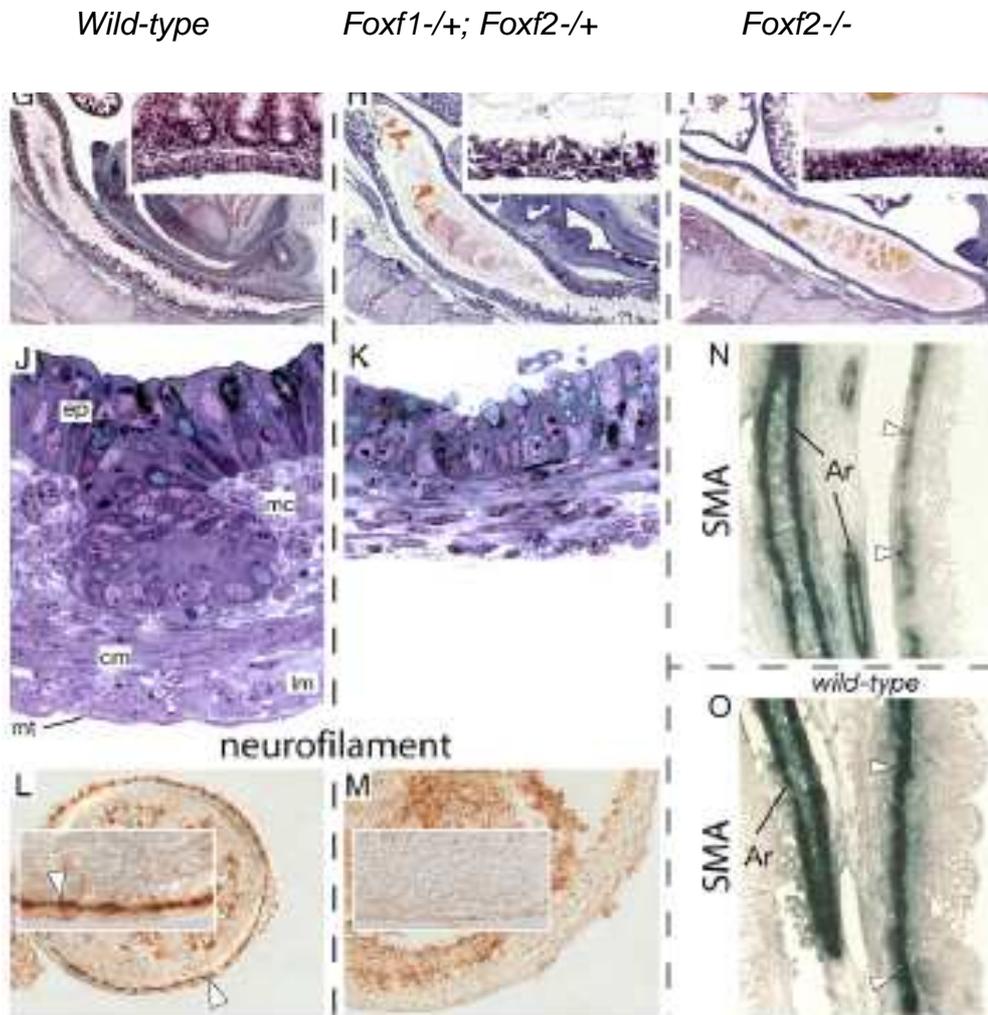


Figura 21. G-I: Sezioni sagittali del retto/colon distale con colorazione ematossilina ed eosina, in wild type e mutanti: si nota che la parete colica appare sottile e piatta nei mutanti. J-K: La sezione J mostra un colon con normale stratificazione della parete con epitelio (ep), mesenchima (mc), muscolatura circolare (cm) e longitudinale (lm) e mesotelio (mt). In K lo strato mesodermico è ipoplastico e consiste di SMCs dissociate e poco differenziate. L-M: immunohistochimica con anticorpi anti neurofilamenti N-O: immunohistochimica con anti SMA rivela un ipoplasia delle SMCs (freccia) in *Foxf2*<sup>-/-</sup>

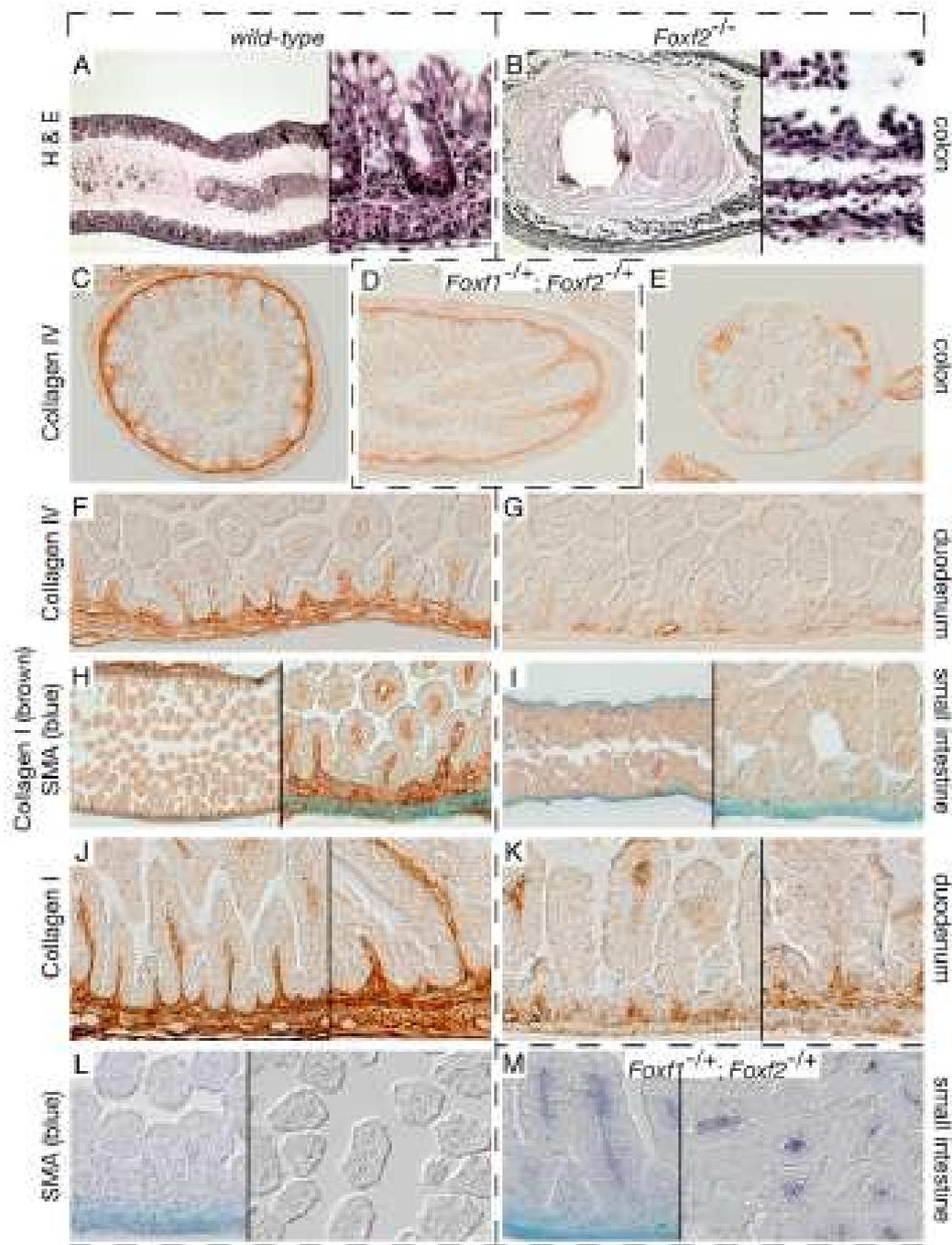


Figura 22. Disgregazione tissutale dovuta a riduzione della matrice extracellulare intestinale in embrioni *Foxf2*<sup>-/-</sup>. **A,B** Sezioni di colon di embrione normale (**A**) e *Foxf2*<sup>-/-</sup> (**B**). **(C-K)** Immunoistochimica con anticorpi anti collagene (tipo IV), collagene fibrillare (tipo I) e SMA. **(L-M)**. Immunoistochimica con anti-SMA in tipo normale (**L**) e *Foxf1*<sup>-/+</sup>;*Foxf2*<sup>-/+</sup> (**M**).

Nello sviluppo normale, i geni *Foxf* sono entrambi attivati nelle cellule mesenchimali da parte delle *Shh* prodotta dall'epitelio. La produzione autonoma della matrice extracellulare (EC) da parte delle cellule mesenchimali è più dipendente dai *Foxf2* che dai *Foxf1*, mentre entrambe le proteine attivano *Bmp-4*. *Bmp-4* inibisce l'espressione mesenchimale di *Wnt5a*, e probabilmente gli stessi *Foxf* restringono l'espressione di *Wnt5a* (64).

La matrice extracellulare provvede a mantenere degli stretti rapporti tra epitelio e mesenchima, mantenendo una polarità delle cellule e garantendo un efficiente segnale di sia *Shh* che *Wnt* proteine. La perdita di entrambi gli alleli di *Foxf2* risulta in una ridotta *Bmp-4* e un incremento dell'espressione di *Wnt5a*, ma soprattutto in una radicale diminuzione dei componenti della matrice extracellulare. La diminuzione della EC matrice porta alla perdita della polarità delle cellule, ma non in questo stadio, alla perdita dell'apoptosi, perché la  $\beta$  catenina nucleare stabilizza le cellule come risultato di un'aumentata espressione di *Wnt*.

Successivamente, l'adesione scarsa tra le cellule, in particolare tra le cellule epiteliali, e l'indebolimento della membrana basale, creano una situazione instabile, ove moderati eventi come lo stiramento (peristalsi) può separare ulteriormente l'epitelio dal mesenchima. Una volta divise, le cellule mesenchimali sperimentano un ridotto *Shh* segnale ed un'ulteriore riduzione dell'attivazione dei *Foxf* alleli con ulteriore deterioramento del fenotipo. Quando la produzione di EC cade al di sotto di un determinato livello, la disintegrazione dei tessuti e le cellule epiteliali cadono troppo lontano dalla fonte di *Wnt5a* per resistere all'apoptosi.

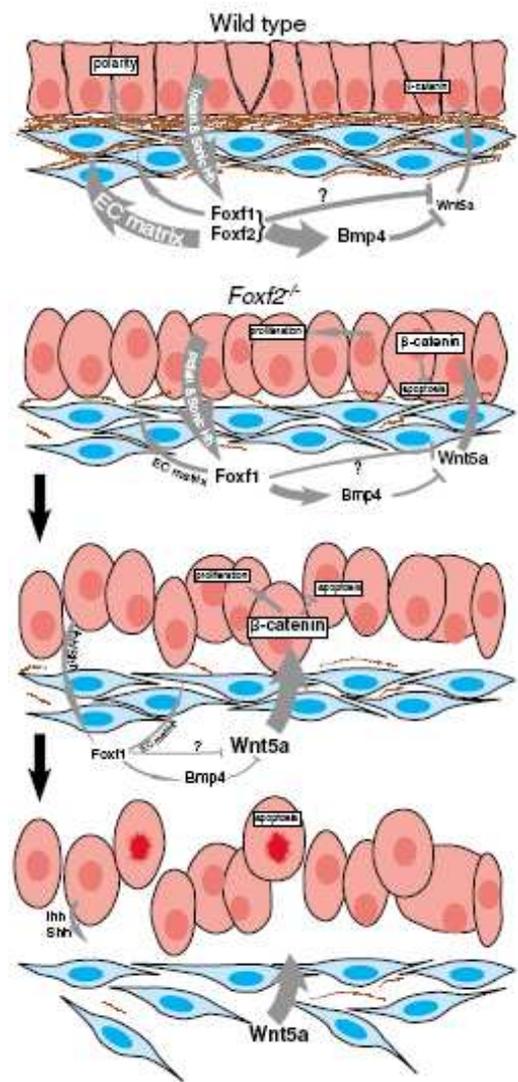


Figura 23.

Riassunto delle interazioni paracrine e modello di degenerazione che potrebbe spiegare le variazioni locali del fenotipo nell'intestino di *Foxf* mutanti.

## 4.8 Istologia e MAR

Precedenti lavori di analisi morfologica/istologica (65) eseguiti su pazienti affetti da MAR hanno evidenziato a livello della parete del tragitto fistoloso nel 41% dei casi anomalie della muscularis propria e/o dello sfintere anale interno e nel 59% dei casi anomalie del sistema nervoso enterico. In specifico l'analisi istologica eseguita su 41 casi di MAR suddivisi, in base alla lunghezza del tragitto fistoloso prelevato in forme alte se >3cm, forme intermedie compresa tra 1 e 3cm e forme basse se < a 0.5-1cm. (10 basse, 105 intermedie e 10 basse, 6 cloache) ha evidenziato che: nelle forme alte e cloacali, l'estremità distale del retto presentava un'aplasia della tonaca muscolare circolare e/o un'ipoplasia dello sfintere anale interno mentre l'estremità prossimale del retto evidenziava un normale pattern muscolare. In vicinanza delle anomalie muscolari si osservavano delle focali duplicità del plesso mioenterico con una discontinuità, nella muscolatura longitudinale, della rete di tessuto connettivale. In 3 casi era evidente un'importante disorganizzazione del tessuto connettivale, con ipo/aplasia dello stesso tra gli strati di muscolatura circolare e longitudinale. Per quanto riguarda l'innervazione della parete, le anomalie sono correlate con i differenti tipi di MAR: le forme intermedie sono più frequentemente associate con l'aganglia, e la displasia neuronale focale del plesso sottomucoso è osservata principalmente nelle forme alte (tabella seguente). In questo report le biopsie e le fistole provenienti dalle forme basse non hanno permesso la valutazione del pattern muscolare e neuronale. Il rivestimento epiteliale conteneva ghiandole del canale anale e la fistola appariva circondata da cellule nervose come diretta conseguenza dell'assenza di muscolo liscio (65). In un lavoro preliminare, gli stessi autori sulla base dei loro riscontri istopatologici consigliavano di non utilizzare ai fini ricostruttivi, e come in passato era stato per lungo tempo sostenuto sulla base di riscontri di uno sfintere interno conservato in tutte le forme di MAR, il tratto più distale del pouch rettale e della fistola stessa.

Tabella 1. Incidenza delle malformazioni della muscularis propria e del sistema nervoso enterico nelle differenti forme di MAR

Form of anal atresia	Anomaly of muscularis propria and/or internal sphincter of the anus	Hirschsprung's disease	Intestinal neuronal dysplasia of submucous plexus	Hypoganglionosis of myenteric plexus proximal to anal floor	Immaturity of enteric nervous system
High ( <i>n</i> = 12)	12	–	5	2	1
Intermediate ( <i>n</i> = 12)	–	5	2	4	–
Low ( <i>n</i> = 11)	–	2	–	1	–
Cloacal malformation ( <i>n</i> = 6)	6	–	1	–	1
Total ( <i>n</i> = 41)	18	7	8	7	2

In un successivo lavoro (66) vengono esaminate, con la colorazione ematossilina-eosina, le sezioni ottenute dal tratto distale del pouch rettale e dalla fistola rettourogenitale o retto-perineale in 60 casi di MAR; suddivisi in 30 forme alte, 20 forme intermedie di cui nelle femmine erano comprese la fistola rettovaginale (2) e retto-vestibolare (2), 10 forme basse. I risultati evidenziavano la presenza dello sfintere interno nel 93% dei casi, che risultava disorganizzato o atrofico nel 67% dei casi, normale nel 27% e assente nel restante 6%. Lo sfintere interno risultava sempre atrofico o disorganizzato nelle forme intermedie e basse. Altri aspetti analizzati comprendevano le caratteristiche dell'epitelio di rivestimento e del tessuto nervoso: nel 50% di casi la fistola era rivestita da un epitelio di transizione, soprattutto nelle forme alte; erano presenti aspetti ghiandolari anali nel 83% delle fistole con cripte anali e presenza nel 100% di aganglia. Presente inoltre una marcata fibrosi subepiteliale nella zona epiteliale di transizione.

Un altro interessante studio istologico, in questo caso della fistola colon-vescicale, in pazienti affetti da "congenital pouch colon" (67) è quello morfologico con colorazioni ematossilina-eosina eseguito su 6 pazienti. In 4/6 l'epitelio della fistola era stratificato di transizione; in 2/6 l'epitelio risultava di tipo squamoso stratificato non cheratinizzato. In 1/6 era presente una fibrosi nella sottomucosa e sottosierosa, e in 3/6 una congestione ed edema della sottomucosa. Si osservò l'assenza di cellule gangliari in 2/6 e sempre in 2/6 un ispessimento della muscolare circolare che presentava vari gradi di disorganizzazione. In questo studio, il tipo di rivestimento epiteliale ritrovato nella fistola è simile a quello riportato nei precedenti lavori (68)(69). Interessante l'osservazione fatta in due casi,

entrambi bambini grandi, non neonati, nei quali la fistola era rivestita da epitelio squamoso stratificato non cheratinizzato. Questo dato potrebbe essere causato da cambiamenti metaplasici (70).

Nel 1961 Gans et al (68) riporta uno studio istologico della fistola rettogenitourinaria e perineale in pazienti affetti da MAR e trovò che la fistola mostrava caratteristiche di un canale anale normale con caratteristiche istologiche, che sono un epitelio di transizione con strutture ghiandolari e presenza della muscolatura sfinteriale. L'autore affermò che la fistola sarebbe stata denominata ano ectopico. Uno studio simile eseguito su maiali affetti da MAR, trovò che la regione prossimale della fistola aveva molti aspetti del normale canale anale (71). Il moncone rettale terminale e la fistola prossimale erano agangliari e circondati da uno sfintere interno. La fistola prossimale era rivestita da epitelio di transizione con ghiandole di tipo anali. Rintala et al (69) studiò i campioni tissutali derivanti dalla fistola rettourogenitale e del moncone rettale cieco, provenienti da pazienti affetti da MAR e trovò che la fistola era rivestita da epitelio stratificato con ghiandole tipiche del canale anale. In addizione, quest'area dimostrava una marcata fibrosi della sottomucosa e degli strati muscolari, agangliosi con aumentata attività acetilcolinesterasica, ispessimento degli strati muscolari suggerendo la presenza di uno sfintere interno, inoltre vi era un'evidenza manometrica di un riflesso inibitorio, positivo rettoanale con un'onda di contrazione a bassa pressione, caratteristico del canale anale.

In un recente lavoro, Van der Putte et al (70) descrive 2 differenti tipi istologici di fistole: la comunicazione "anourogenitale" che consiste solo di aspetti tipici della parte profonda del canale anale; e la comunicazione "anocutanea" con aspetti sia della parte profonda che di quella superficiale del canale anale. I campioni rivelarono una linea epiteliale pseudostratificata colonnare con ghiandole anali, una lamina propria di stroma orientato longitudinalmente e una tonaca muscolare che era un'estensione della muscularis propria del retto. In un altro studio eseguito su fistola colon-vescicale Kureel et al (72) trovarono entrambi gli strati muscolari attorno alla fistola e lo strato circolare ispessito. Nel lavoro di Van de Putte viene riportato che nella comunicazione anourogenitale c'è una graduale transizione all'interno del sistema urogenitale e soprattutto il territorio del trigono vescicale-uretrale, all'interno del quale la fistola si apre, presenta un simile epitelio pseudostratificato e altri aspetti istologici. E' stato ipotizzato che la fistola anourogenitale e il territorio trigono-uretrale entro il quale la fistola si apre, fossero di origine cloacale, mentre il resto della vescica fosse di derivazione allontoidea. E' chiaro che, accettando le più recenti teorie riguardo l'embriogenesi delle MAR che affermano che tutte le MAR sono il risultato di

difetti di formazione della cloaca dorsale di grado differente, con incompleta sviluppo della porzione dorsale della membrana cloacale (9) non è possibile avere un segmento della parete posteriore della vescica, tra l'apertura della fistola colon-vescicale e l'area trigonale, con epitelio urinario transizionale e sottostante muscolo detrusoriale. I risultati di Chadha et al, (73) potrebbero suggerire che il livello di terminazione non corretto dell'intestino posteriore, la porzione terminale della fistola e dell'intestino posteriore sono geneticamente programmati a sviluppare le caratteristiche anatomiche ed istologiche del normale canale anale.

Un altro importante aspetto associato alle MAR è l'ipoplasia della muscolatura striata del pavimento pelvico che, insieme alla sua anomala innervazione, a quella del retto, alle anomalie delle vertebre sacrali e del midollo spinale sembra essere responsabile dello scarso outcome funzionale della regione anorettale, determinando in tali pazienti problemi anche molto rilevanti di controllo della continenza fecale, costipazione e disturbi minzionali. In studi su modelli di MAR è stato dimostrato che il complesso muscolare striato (SMC) nei ratti presentava differenti gradi di ipoplasia.

## **5. SCOPO DELLO STUDIO**

La prima parte dello studio è per la maggior parte retrospettivo, ed ha lo scopo di classificare dal punto di vista genetico e clinico, i pazienti affetti da MAR seguiti presso il reparto di chirurgia pediatrica fino all'anno 2011 (periodo 1991-2011), suddividendoli in forme sindromiche e non, in casi sporadici o familiari.

Un ulteriore parte dello studio ha lo scopo di identificare anomalie cromosomiali quali delezioni interstiziali (delezioni interstiziale braccio lungo cromosoma 6 e braccio corto cromosoma 7) o terminali, duplicazioni (piccolo cromosoma ad anello circolare soprannumerario) o traslocazioni (traslocazione 11;22; traslocazione 6;17), associati alle MAR.

L'ultima parte del lavoro è focalizzata sulla comprensione della patogenesi di questo ampio spettro di malformazioni che ancora oggi è ben lontana dall'essere chiarita.

Partendo dall'ipotesi che alla base del difetto di sviluppo dell'ano e della parte distale del retto vi sia un'alterazione nello sviluppo della formazione della cloaca, soprattutto la mancata formazione della cloaca dorsale e la presenza di una membrana cloacale poco

svilupata o completamente assente nella sua componente dorsale e che ai fini della normale morfogenesi intestinale sono indispensabili delle normali interazioni epitelio-mesenchimali questo studio si propone di effettuare una caratterizzazione morfologica e immunoistochimica del tessuto fistoloso asportato dal sito della malformazione con lo scopo di evidenziare quali alterazioni morfologiche e strutturali siano presenti e di valutare l'espressione di alcuni marker coinvolti nel normale e complesso meccanismo della morfogenesi intestinale.

## **6. MATERIALI E METODI**

La prima parte del lavoro retrospettivo è stato ottenuto rivalutando la storia clinica di tutti i pazienti seguiti presso il reparto di chirurgia Pediatrica dall'anno 1991 fino al 2011.

Per il conseguimento del secondo obiettivo è stata effettuata l'analisi citogenetica classica ed molecolare (mediante FISH: Fluorescence in situ Hybridization o con array-CGH: array based-comparative genomic Hybridization), del sangue periferico dei pazienti seguiti dall'anno 2000, con eventuale estensione ai genitori o altri familiari.

### **6.1 Campioni per lo studio morfologico ed immunoistochimico (IHC)**

A tal fine è stato utilizzato il materiale proveniente dalla sede della malformazione, che corrisponde alla parete della fistola anocutanea, retto-urinaria, retto-genitale identificata e rimossa al momento dell'intervento ricostruttivo perineale prelevato nel periodo 2004-2011.

Abbiamo ottenuto 12 campioni idonei per l'analisi morfologica ed immunoistochimica riassunti nella tabella 2. I motivi di esclusione degli altri campioni sono stati: modalità di prelievo e di conservazione non idoneo, campioni quantitativamente non sufficienti o campioni non disponibili.

**Tabella 6.1** Campioni utilizzati per lo studio morfologico/immunoistochimico

<b>Campioni</b>	<b>Età</b>	<b>Sede del prelievo</b>	<b>Sesso</b>
1	2 mesi	Fistola rettobulbare	M
2	3 mesi	Fistola perineale	F
3	4 mesi	Cloaca	F
4	3 mesi	Fistola rettoprostatica	M
5	3 mesi	Fistola rettobulbare	M
6	3 mesi	Fistola rettovestibolare	F
7	3 mesi	Fistola rettovestibolare	F
8	4 mesi	Fistola rettovestibolare	F
9	3 giorni	Fistola rettobulbare	M
10	3 mesi	Fistola rettoprostatica	M
11	3 mesi	Fistola rettoprostatica	M
12	4 mesi	Fistola rettoprostatica	M

## 6.2 Controlli

Come controlli sono stati utilizzati 5 campioni di tessuto anorettale autoptico proveniente da bambini di età inferiore ai 6 mesi che non presentavano patologie a carico dell'apparato gastrointestinale.

## 6.3 Colorazione ematossilina-eosina

Tutti i campioni sono stati dapprima immersi in formalina per 12 ore, poi inclusi in paraffina secondo il protocollo specifico:

- disidratazione :

- 3 passaggi in etanolo al 50% per 10 minuti;
- 3 passaggi in etanolo al 70% per 10 minuti;
- 3 passaggi in etanolo al 90% per 10 minuti;
- 3 passaggi in etanolo assoluto per 10 minuti;

- diafanizzazione: 3 passaggi in Xilolo;

- inclusione in paraffina fusa a 70°C

-raffreddamento su piastra fredda nell'inclusore e formazione del blocchetto.

Per ogni campione sono stati preparati 8 vetrini per colorazione immunoistochimica, un vetrino con colorazione ematossilina-eosina e un vetrino con colorazione Van Gieson per la valutazione istologica.

## 6.4 Immunoistochimica (IHC)

Sono stati studiati i seguenti marcatori

- CD133 e CD 34: sono due glicoproteine di membrana che identificano rispettivamente, cellule staminali indifferenziate e che hanno intrapreso un percorso differenziativo.
- Actina muscolare liscia (SMA): filamento di tipo contrattile presente nelle cellule muscolari lisce della parete vascolare, della muscularis propria intestinale e di altri tessuti. Reagisce anche con miofibroblasti e con cellule mioepiteliali di varie ghiandole, particolarmente delle ghiandole salivari e la mammella.
- Miogenina. Fattore di regolazione della miogenesi, espressa dalle cellule satelliti attivate in mioblasti.
- SHH: espressione della glicoproteina di derivazione endodermica.

Per ciascuna delle inclusioni si è proceduto secondo le fasi di seguito esplicate.

- Taglio al microtomo di fette di 2  $\mu\text{m}$ .
- Montaggio su vetrino "Super frost" della ditta Biotica.
- Asciugatura delle sezioni per 24 ore a 37°C in stufa a secco.

La colorazione immunoistochimica è stata effettuata grazie al moderno sistema di determinazione Bond™ Max Polymer Refine Detection (Menarini), un sistema coniugato di anticorpi linker di perossidasi di tafano polimeriche (HRP) senza biotina, per il riconoscimento delle IgG di topo e coniglio legate ai tessuti e di alcuni anticorpi primari IgM di topo su tessuti fissati in formalina o inclusi in paraffina.

La metodica consta di diverse fasi molto importanti:

La sparafinizzazione e reidratazione dei tessuti, attraverso 2 lavaggi in una soluzione specifica a 72°C, 3 lavaggi in alcool a concentrazione e temperatura scalare, 3 lavaggi in una soluzione specifica per la reidratazione

Bond™ Epitope Retrieval Solution: 20/30 min a 95-100°C in una soluzione contenente tampone citrato/EDTA ed un surfattante. La fissazione con formalina tende a mascherare i determinanti antigenici impedendone il loro riconoscimento da parte dell'anticorpo. Gli enzimi proteolitici operano una digestione scoprendo i siti antigenici.

Bond™ Polymer Refine Detection: è la fase centrale della procedura, consta di 6 passaggi:

- Peroxide Block: incubazione del campione con perossido di idrogeno per inibire l'attività perossidasi endogena; essa è normalmente presente negli eritrociti e granulociti e se non viene inibito prima di aggiungere il cromogeno può dare una colorazione di fondo che disturba la lettura del preparato. Con l'immersione in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i siti enzimatici vengono saturati e non possono più reagire [5 minuti in soluzione di perossido di idrogeno al 3.0%].
- Primario: applicazione dell'anticorpo primario specifico [15 minuti].
- Post Primary: incubazione in una soluzione di anticorpi post-primari per favorire la penetrazione del successivo polimero reagente, garantendo l'eliminazione della colorazione di fondo non specifica: si tratta di una colorazione positiva di un preparato che non è conseguenza del legame Ag-Ac. La causa più comune è l'adesione non specifica della proteina anticorpale al collagene e ad altri elementi connettivali presenti nella sezione. Per eliminare questo inconveniente si applica una soluzione proteica sul tessuto prima dell'Ac primario. Questa proteina satura i siti non specifici, così non ci sarà assorbimento da parte dell'Ig [8 minuti in soluzione contenente 10% (v/v) di siero animale in soluzione tamponata salina tris e Proclin™ 950 allo 0,09%].
- Polymer: localizzazione dell'anticorpo primario tramite un reagente anti-IgG di topo o coniglio polimerico HRP [ 8 minuti in : 8µg/ml di IgG in Poli-HRP di Polymer contenente 10% (v/v) di siero di animale in soluzione tamponata salina tris e Proclin™ 950 allo 0,09%].
- Mixed Dab Refine: il complesso di substrato cromogeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB), visualizza il complesso tramite un precipitato di color marrone [ 8 minuti in tre soluzioni in sequenza: DAB1 3,3'-diaminobenzidina tetraidrocloruro in soluzione stabilizzante; DAB2 0,05% (v/v) perossido d'idrogeno in soluzione stabilizzante; DAB3 0,05% (v/v) perossido d'idrogeno in soluzione stabilizzante]
- Hematoxylin: controcolorazione all'ematossilina per permettere la visualizzazione in blu dei nuclei cellulari [5 min in ematossilina allo 0,2%].

Nella tabella seguente sono indicati gli anticorpi utilizzati nello studio, la diluizione ed il pretrattamento utilizzato.

**Tabella 6.2** Anticorpi utilizzati per l'analisi immunohistochimica.

	<b>Ditta</b>	<b>Diluizione</b>	<b>Pretrattamento</b>
<b>SMA</b>	Dako	1.400	No pretrattamento
<b>Miogenina</b>	NOVOCASTRA	1:20	Tampone citrato pH 6 30 min a 100°C
<b>CD133</b>	Abnova	1:100	Tampone citrato pH 6 30 min a 100°C
<b>CD34</b>	IMMUNOTECH	1:20	No pretrattamento
<b>SHH</b>	Novius biologicals	1:300	Tampone in EDTA ph 8 30 minuti a 100°C

## 6.5 Analisi morfologica

Per tutti i campioni sono state valutate al microscopio ottico le seguenti caratteristiche morfologiche alla colorazione Ematossilina-Eosina: presenza di mucosa e tipo di rivestimento, presenza di erosione e/o di ulcerazione, edema della lamina propria, architettura strutturale sia della tonaca muscolare interna che esterna, con valutazione della disposizione delle fibrocellule muscolari, delle fibre, la presenza della trama connettivale e della sua disposizione. Sono stati valutati inoltre: presenza di un infiltrato infiammatorio e presenza di neoangiogenesi, presenza di tronchi nervosi ipertrofici e di cellule gangliari.

## 6.6 Analisi IHC

Per la valutazione dell'actina muscolare liscia si sono considerati dei caratteri puramente qualitativi come la distribuzione di tale marker nelle zone epitelio/subepiteliali, nella lamina propria, nei due strati di tonaca muscolare e nelle zone perivascolari soprattutto considerando la distribuzione di questo marker nelle aree di alterazione strutturale. Per quanto riguarda CD34 e CD133 è stata fatta una valutazione quantitativa in tutti e tre gli strati parietali (lamina propria, tonaca muscolare e sottosierosa); la positività è stata

espressa o come percentuale di cellule positive o come la media di un range delle cellule positive per 10 campi /HPF a 40X di ingrandimento. La valutazione dell'espressione della miogenina è di tipo semiquantitativo in quanto è stata valutata la presenza/assenza di positività tale marker nella componente muscolare; mentre per l'espressione di Shh è stata eseguita una valutazione qualitativa della positività cellulare dell'epitelio, della tonaca muscolare e dei tronchi nervosi, differenziando la positività citoplasmatica da quella perinucleare nei primi due casi. Inoltre, nelle zone di alterazione della struttura della tonaca muscolare, la positività per Shh è stata espresso come percentuale rispetto alle cellule presenti.

## **6.7 Quantitativa real-time PCR**

I campioni biotipici fissati in formalina ed inclusi in paraffina sono stati deparaffinati con xilene a 50 °C per 3 min. RNA totale è stato isolato dai campioni e controlli mediante il reagente Trizol. La sintesi del primo filamento di DNA complementare (cDNA) è stata eseguita con 5 µg di RNA totale usando Superscript III trascrittasi inversa (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). La real-time trascrizione inversa (RT)-PCR è stata effettuata utilizzando Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Miscele di campioni (20 × SYBR green mix, 10 mmol / L ciascuno, primers appropriati, e cDNA) sono state incubate in RT-PCR 7500 con sistema di denaturazione iniziale a 95 °C per 2 minuti, seguita da 40 cicli di PCR. Ciascun ciclo consisteva di 95 °C per 10 secondi, 60 °C per 30 secondi, e 70 °C per 45 secondi. Per confermare l'amplificazione dei trascritti specifici, sciogliendo profili di curve (raffreddamento del campione a 70 °C per 15 secondi e riscaldamento lento a 95 °C con misurazione continua della fluorescenza) sono stati prodotti alla fine di ogni ciclo di PCR. I primer oligonucleotidici utilizzati sono stati i seguenti: SHH 5'-GCTCGGTGAAAGCAGAGAACT-3' e 5'-CG TCTCGATCACGTAGAAGACC-3'.

## **6.8 Analisi statistica**

Al fine di valutare se esiste una correlazione tra CD34 e CD133 nell'ambito della tonaca muscolare è stato utilizzato il coefficiente di Spearman ( $\rho$ ) ed è stata testata l'ipotesi  $p=0$ . Per controllare l'associazione tra CD34 e tonaca muscolare, stratificando per stato del paziente (caso-controllo), è stato utilizzato il test di Mantel-Haenszel. Lo stesso test è

stato utilizzato per valutare l'associazione tra CD133 e tonaca muscolare, tra Shh citoplasmatica e tonaca muscolare e tra percentuale di membrane nucleari positive a Shh e tonaca muscolare.

## **7. Risultati**

### **7.1 Studio clinico**

Sono stati individuati nel periodo 1991-2011, 143 pazienti affetti da MAR. I tipi di difetti sono differenziati in base al sesso: 85 sono maschi (60%) e 58 (40%) femmine, suddivisi nel maschio in: 39 fistole rettouretrali, 29 fistole perineali, 10 fistole rettovescicali, 3 ano imperforato senza fistola, 4 non identificati. Nel sesso femminile i difetti (58) sono così divisi: 24 fistole perineali, 23 fistole rettovestibolari, 9 cloache e 2 non identificati. Le MAR vengono suddivise in forme isolate 56, forme associate 82, con 6 forme sindromiche, 4 associazioni cliniche; 5 casi non sono classificabili. Nel maschio sono 50 forme associate e 32 forme isolate; nella femmina sono 32 forme associate e 24 forme isolate. Il tipo di malformazione più frequente è stata la fistola rettouretrale, seguita dalla fistola perineale e dalla fistola rettovestibolare. Invece analizzando la frequenza del tipo di difetto all'interno delle due classi di malformazioni (associate o isolate) possiamo dire che nella femmina la fistola retto vestibolare in 15 casi su 23 è associata ad altre malformazioni, mentre nel maschio la fistola rettouretrale in 28 casi su 39. Invece la fistola perineale in più del 50% dei casi è un difetto isolato in entrambi i sessi. Le malformazioni "più gravi" risultano essere nel 70-80% dei casi sempre associate ad altre malformazioni. L'analisi citogenetica è stata completata in 82 pazienti che ad inizio del progetto non presentavano un esame del cariotipo. Le forme sindromiche riscontrate sono: 2 sindromi cromosomiche, 4 sindromi genetiche. Non è stata identificata nessuna forma familiare.

Le 2 forme cromosomiche, trisomia 21 e 14 sono appartenenti al sesso maschile, facenti nel primo caso era presenta un difetti tipo ano imperforato senza fistola, malformazioni vertebrali con lipoma del filum e un difetto interventricolare; il secondo è una trisomia 14 con fistola rettouretrale prostatica senza altre malformazioni riportate.

Le 4 sindromi genetiche identificate sono: Cat Eye Sindrome (sindrome degli occhi da gatto), sindrome di George e sindrome di Wolf .

I due casi di Cat Eye Sindrome sono rappresentati da due pazienti di sesso femminile, la prima affetta da difetto del setto interatriale, coloboma dell'iride, fossetta ed appendice preauricolare destra, fistola retto-vestibolare, anomalie vertebrali, tethered cord e ritardo mentale. L'analisi citogenetica molecolare ha dimostrato un cariotipo 47,XX+ der(22). Il

secondo caso presenta aspetti dismorfici inclusi palato ogivale, appendici e fossetta preauricolari, minima deviazione della rima labiale ed angiomi multipli e fistola retto-vestibolare, difetto interatriale e un lieve ritardo psicomotorio. L'analisi citogenetica ha rivelato un cariotipo 47XX+mar.ish der(22)(wcp22+; TUPLE1-).

Abbiamo riscontrato un paziente affetto da Sindrome di George, di sesso femminile con difetto interventricolare, MAR perineale ed ipoplasia timica. L'analisi citogenetica identificò VCFS/DGS, si trattava di una delezione de novo; nessun altro caso in famiglia e nessuna anomalia del cariotipo dei genitori. L'ultimo caso riscontrato è quello di una bambina affetta da la Sindrome di WolfHirschhorno con fistola rettovestibolare, lipoma del filum, stenosi polmonare, agenesia timica, reflusso vescicoureterale monolaterale ed esodattilia, L'analisi FISH ha evidenziato la presenza di un su microscopica delezione della banda 4p 16.3; l'analisi FSH è stata eseguita anche sui genitori ma non ha evidenziato delezioni.

Le MAR che rientrano nel quadro di un complesso malformativo maggiore sono state 4. Si tratta di associazioni cliniche tipo VACTERL. Abbiamo rilevato: 1 sindrome di VACTERL completa, 1 sindrome di VACTER e 2 sindromi di VATERL. Si tratta di due pazienti di sesso maschile e due di sesso femminile. Le tipologia dei difetti anorettali associati sono: 1 cloaca, 1 fistola rettovescicale e una fistola rettovestibolare e 1 caso di fistola perineale. In tutti questi paziente l'analisi citogenetica ha dimostrato un cariotipo normale; tutte le sindromi sono risultate sporadiche

## **7.2 Studio morfologico ed istologico**

Come illustrato nelle tabelle seguenti, nei campioni di MAR la mucosa di rivestimento presenta aree di disepitelizzazione frammiste ad aree rivestite con epitelio prevalentemente di tipo transizionale quasi sempre associato ad epitelio di tipo squamoso, tranne nei casi di cloaca e in 2 casi su 3 di fistola rettovestibolare e rettoprostatica in cui è solo di tipo transizionale. In un caso (fistola rettoprostatica) vi è presenza di tre tipi di epitelio, transizionale, squamoso e di tipo colico. Nell'ambito della mucosa si osservano in 7 casi aree di erosione fino a profonde ulcerazioni, la cui presenza non è associata a tipi particolari di MAR. Presente in tutti i casi di fistola, un infiltrato infiammatorio con edema della lamina propria. Le osservazioni più interessanti riguardano la tonaca muscolare valutata sia nella sua componente circolare interna che longitudinale esterna: nella maggior parte dei difetti si osserva un importante disarrangiamento delle fibre muscolari con rilevante dissociazione da parte della componente fibrosa. Nei casi di cloaca, fistola

rettoprostatica e rettovestibolare, si osserva un quadro di anomalia strutturale che varia da un quadro di assenza focale delle fibre muscolari con sostituzione da parte di tralci di tessuto connettivale fibroso ad un importante alterazione dell'architettura muscolare/giunzionale con assoluta dissociazione e frammentazione delle fibrocellule muscolari. In questi casi si osserva maggiormente un importante aumento della componente fibrosa. Ma anche nelle altre tipologie di MAR vi è la presenza di una minima dissociazione fibrosa tra le fibre muscolari con normale mantenimento di "overall architecture". In nessun caso si identifica una tonaca muscolare che preserva una completa e normale struttura con normale disposizione delle fibre muscolari. Nelle zone di disarriangiamento muscolare si osserva a livello della lamina propria una proliferazione sia vascolare che di fibrocellule muscolari. L'analisi effettuata a livello dei tronchi nervosi periferici ha evidenziato un calibro conservato, le cellule gangliari sono risultate assenti in quasi tutti i prelievi; la presenza di cellule gangliari è stata valutata solo nell'area più prossima alla componente rettale (alta) della malformazione, mentre dove c'era l'epitelio squamoso di tipo anale tali cellule risultavano sempre assenti. Tuttavia sempre nella sede dove era presente il disarrangiamento muscolare si osservava un incremento delle fibre nervose che si presentavano di piccole dimensioni.

**Tabella 7.1 Risultati Istologia (fistole)**

Casi	Mucosa/Tipo di Rivestimento	Erosione/ Ulcerazione	Cellule gangliari	Tonaca muscolare interna	Tonaca muscolare esterna
1	Aree disepilizzazione transizionale/ squamoso	Assente	Assenti	minima dissociazione fibrosa tra le fibre muscolari	minima dissociazione fibrosa tra le fibre muscolari
2	Transizionale/ squamoso	Presente	Assenti	minima dissociazione fibrosa tra le fibre muscolari	minima dissociazione fibrosa tra le fibre muscolari
3	Transizionale	Presente	Assenti	importante diasarrangiamento delle fibre	importante diasarrangiamento delle fibre
4	Aree disepilizzazione transizionale/	Presente	Presenti	focale completa assenza delle fibre muscolari	focale completa assenza delle fibre muscolari

**Tabella 7.1 Risultati Istologia (fistole)**

Casi	Mucosa/Tipo di Rivestimento	Erosione/ Ulcerazione	Cellule gangliari	Tonaca muscolare interna	Tonaca muscolare esterna
5	Transizionale /squamoso	Presente	Presenti	focale completa assenza delle fibre muscolari	minima dissociazione fibrosa tra le fibre muscolari
6	Transizionale	Assente	Assenti	importante diasarrangiamento delle fibre	minima dissociazione fibrosa tra le fibre muscolari
7	Transizionale /squamoso	Presente	Presenti	minima dissociazione fibrosa tra le fibre muscolari	n.v
8	Transizionale	Assente	Assenti	minima dissociazione fibrosa tra le fibre muscolari	importante diasarrangiamento delle fibre
9	Transizionale /squamoso	Presente	Assenti	minima dissociazione fibrosa tra le fibre muscolari	minima dissociazione fibrosa tra le fibre muscolari
10	Transizionale /colico	Presente	Assenti	minima dissociazione fibrosa tra le fibre muscolari	importante diasarrangiamento delle fibre
11	Transizionale /squamoso/colico	Assente	Assenti	importante diasarrangiamento delle fibre	minima dissociazione fibrosa tra le fibre muscolari
12	Transizionale	Assente	Presenti	minima dissociazione fibrosa tra le fibre muscolari	normale

Nei casi controllo l'epitelio di rivestimento appare normale di tipo transizionale/colico. Non appare la presenza di erosioni o ulcerazioni. La tonaca muscolare conserva l'architettura tipica della regione. Sono presenti le cellule gangliari. Non vi sono aspetti di neoangiogenesi né di ipertrofia dei tronchi nervosi.

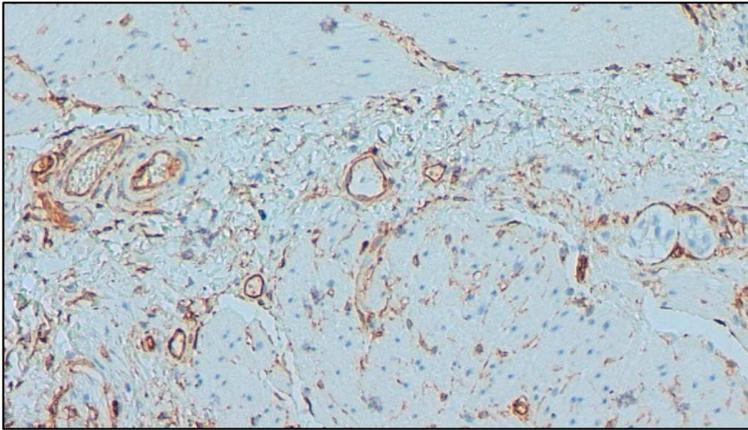


Figura 24 . Espressione di CD34 ( in rosso) nella zona perivasale e nella tonaca muscolare (campioni) a 10X.

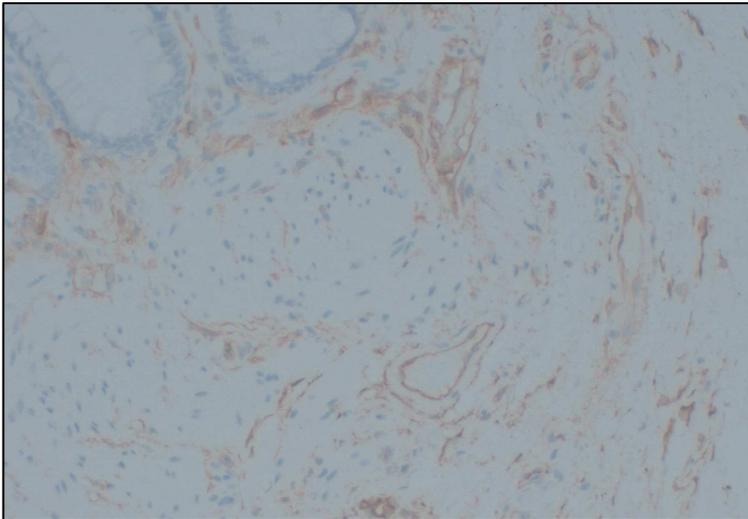


Figura 25. Dettaglio espressione CD34 (in rosso) nella lamina propria direttamente al di sotto dell'epitelio, dove formavano una sorta di strato "cambiabile"

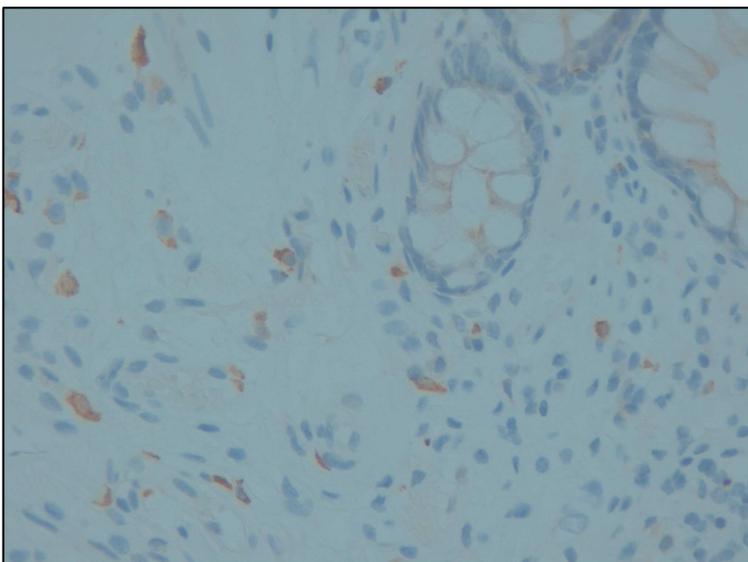
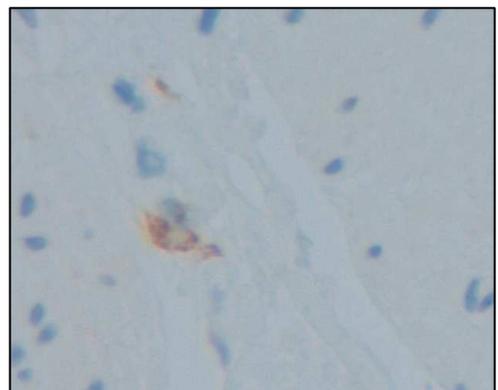


Figura 26. Positività nella LP di CD133 (campioni) a 40X;

Figura 27. positività a livello muscolare



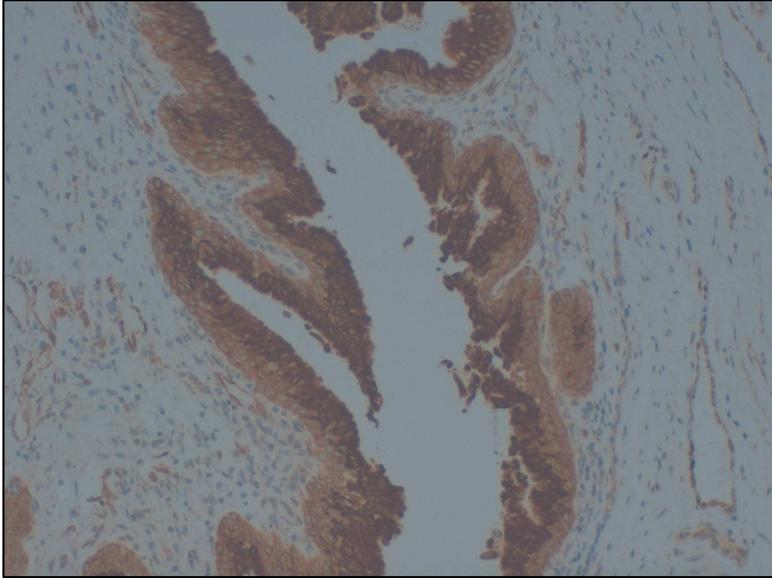


Figura 28. Shh. positività citoplasmatica e di membrana delle cellule epiteliali (campioni) a 20X

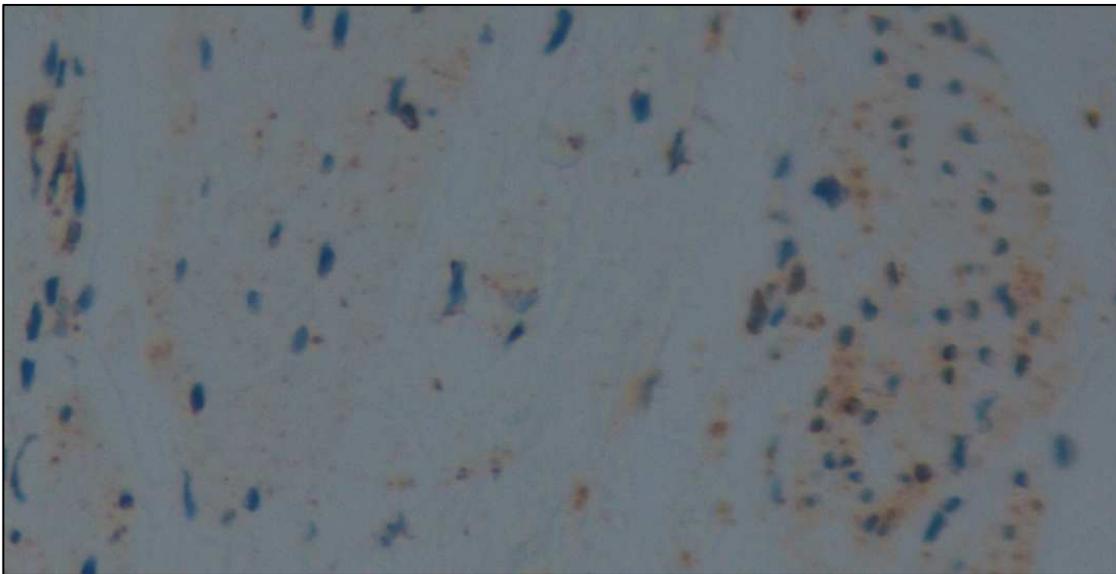


Figura 29. Shh : Positività citoplasmatica con rinforzo nucleare delle cellule presenti nella tonaca muscolare (campioni) a 40X.

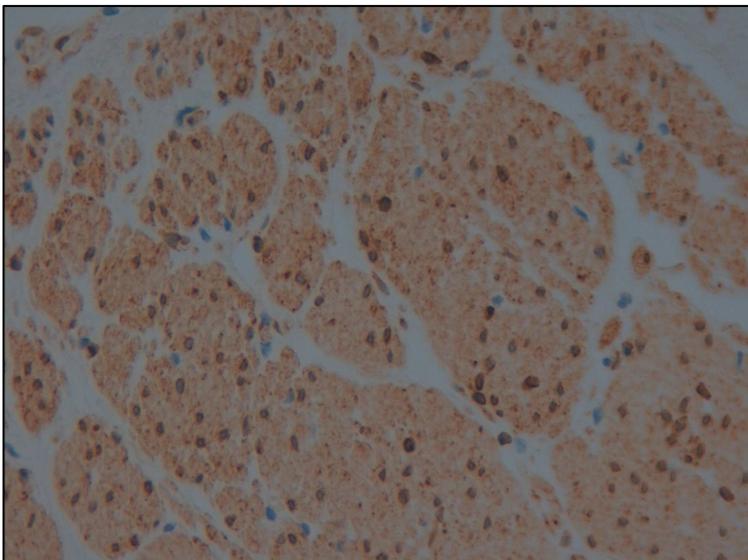


Figura 30. Shh : Positività citoplasmatica con rinforzo nucleare delle cellule presenti nella tonaca muscolare (controllo) a 20X.

### 7.3 Studio ICH

L'actina muscolare liscia identificante le cellule muscolari lisce risulta, nelle zone di maggiore disarrangiamento muscolare, particolarmente rappresentata a livello della lamina propria e attorno ai vasi sanguigni neoformati. Nell'ambito della tonaca muscolare viene confermato l'aspetto strutturale alterato anche dalla disposizione di tali cellule che appaiono, disordinate, distanti le une dalle altre con intercalato tessuto non positivo all'actina muscolare come se una parte di esso fosse stato sostituito o comunque dissociato. Il CD133 è un marker che identifica, piccole cellule molto primitive corrispondenti alle cellule staminali mesenchimali (87). L'espressione di CD133 è stata valutata nei diversi livelli della parete intestinale e si vede che, laddove vi è un'intensa espressione di tale marker, per esempio nella tonaca muscolare, anche nelle tonache sovra e sottostanti cioè nella sierosa e nella lamina propria si osserva una sorta di gradiente di positività; la positività al CD133 si identifica in tutti gli strati parietali sia nei campioni patologici che nei casi controllo, con range (xx) che esprime il numero di cellule positive su 10 campi/HPF a 40X. L'espressione di CD133 risulta concentrata, in alcuni casi anche a livello del tessuto adiposo periviscerale.

**Tabella 7.2 Risultati IHC (fistole)**

Casi	Actina Muscolare liscia	CD34 Tonaca muscolare	CD133 Tonaca muscolare	Miogenina	Shh Epitelio Intensità citoplasmatica	Shh Muscolo Intensità citoplasmatica	Shh % M.N positive
1	Ricca nella LP	5	4;(0-9)	0	3	1	30
2	Ricca nella LP	10	3;(2-6)	0	3	1	20
3	Ricca nella periferia e perivascolare	20	4;(0-7)	0	2	1	40
4	Ricca nella LP	70	9;(5-11)	0	3	1	60
5	Ricca nella LP	30	7;(4-13)	0	2	2	40
6	Ricca nella LP	30	1;(0-1)	0	3	1	30

**Tabella 7.2 Risultati IHC (fistole)**

Casi	Actina Muscolare liscia	CD34 Tonaca muscolare	CD133 Tonaca muscolare	Miogenina	Shh Epitelio Intensità citoplasmatica	Shh Muscolo Intensità citoplasmatica	Shh % M.N positive
7	Ricca nella LP	50	3;(0-5)	0	3	1	30
8	Ricca nella LP	40	3;(0-6)	0	3	1	40
9	Ricca nella LP	30	4;(3-5)	0	3	2	15
10	Ricca nella LP	60	4;(3-6)	0	3	1	20
11	Ricca nella LP e nella diss. fibrosa	40	8;(6-13)	0	3	2	40
12	Ricca nella LP	20	8;(3-12)	0	3	1	20

Le immunocolorazioni per CD34 identificano delle cellule staminali che hanno intrapreso un percorso differenziativo. La positività al CD34 viene valutata nei tre strati parietali del difetto; nelle zone di alterazione strutturale della muscolare si identificano una forte concentrazione di cellule CD34+ con un'inversione, rispetto ai casi controllo del rapporto cellulare CD133+/CD34+ a favore di queste ultime. Il CD34 presenta un'intensa positività in tutti gli strati, soprattutto nella lamina propria direttamente al di sotto dell'epitelio, dove formavano una sorta di strato "cambiale". Le cellule CD34 non sono distribuite in maniera costante in tutti i casi; in alcuni, quelli in cui era evidente un maggior sovvertimento nella parete, si reperta una consistente presenza di tali cellule, soprattutto a livello della lamina propria, nella zona di dissociazione fibrosa ed intorno alle strutture vascolari. La miogenina è costantemente negativa, a documentare che le fibre muscolari striate alla periferia dei difetti non hanno alterazioni riferibili ad aspetti rigenerativi del muscolo striato (sfinteriale). L'espressione di Shh è stata valutata a livello delle cellule epiteliali e del tessuto mesodermico sia a livello citoplasmatico che a livello nucleare. A livello epiteliale Shh è altamente espressa nelle fistole, senza differenze tra il livello nucleare e il livello citoplasmatico, con intensità paragonabile a quella dei casi controllo. Invece a livello della tonaca muscolare e soprattutto nelle zone di maggiore alterazione strutturale, i livelli di intensità del segnale è notevolmente più basso. Inoltre il numero delle cellule che presentano un rinforzo positivo della membrana nucleare è nettamente inferiore nei casi di

MAR rispetto ai casi controllo. Infatti come si vede dalla tabella precedente il numero di cellule positive varia dal 15% al 60% contro il 100% dei casi controllo. In tutti i campioni invece, Shh risulta essere espressa a livello dei tronchi nervosi. Nel complesso quindi nel sito della malformazione c'è una sostanziale riduzione di Shh. Nel complesso tali reperti indicano: che è presente una componente di elementi mesenchimali "staminali" CD133+ e fibroblasti muscolari CD34+ coinvolta nella fibrogenesi che determina una complessa destrutturazione della tonaca muscolare e fibrosi a diversi livelli.

**Tabella 7.3 Risultati IHC (controlli)**

Casi	Actina muscolare liscia	CD34 tonaca muscolare	CD133 tonaca muscolare	Miogenina	Shh epitelio intensità citoplasmatica	Shh muscolare Intensità citoplasmatica	Shh % M.N positive
1	Ricca nella MM, MP	20	12;(10-18)	0	3	1	100
2	Ricca nella MM, MP	30	8;(0-13)	0	3	1	100
3	Ricca nella MM, MP	20	5;(3-9)	0	3	1	100
4	n.v	n.v	n.v	n.v	n.v	n.v	n.v
5	Ricca nella MM, MP	10	0	1	2	1	50

MM muscularis mucosae, MP muscularis propria, n.v non valutabile

#### 7.4 Risultati statistici

Nello studio della correlazione tra CD34 e CD133 con il coefficiente di correlazione di Spearman ( $\rho$ ), è risultato  $\rho=-0.05096$  ( $p\text{-value}=0.8513$ ). La relazione è di tipo inverso ma non risulta statisticamente significativa.

Nella valutazione dell'associazione tra CD34 e tonaca muscolare il p-value associato al test è risultato pari a 0.9245, confrontato con un livello di significatività fissato a pari 0.05, evidenzia dunque come non vi sia associazione tra le variabili. Il p-value nell'associazione CD133 e tonaca muscolare è risultato pari a 0.1128, quindi non vi è associazione tra le due variabili, come neppure tra Shh citoplasmatica e tonaca muscolare con p-value di 0.3315. Lo stesso test usato per l'associazione tra membrane nucleari e tonaca muscolare non ha evidenziato un'associazione tra le due variabili ( $p\text{-value}=0.2367$ ). I limiti riscontrati

in questo lavoro sono: i pochi controlli e al loro interno l'assenza di variabilità, nei casi la variabilità seppur presente è ridotta e non sufficiente per giustificare un'associazione tra le variabili testate.

## 8. Conclusioni

La percentuale riportata in letteratura, di pazienti con MAR che presentano uno o più difetti congeniti associati, varia dal 40% al 78%. La fistola rettovestibolare risulta essere il difetto maggiormente associato ad altre anomalie. Inoltre essa insieme alla cloaca è più frequentemente associata con le anomalie vertebrali e spinali; mentre le fistole rettovescicali hanno l'associazione più alta con le anomalie genitourinarie (74). I risultati di questo lavoro indicano, in accordo con la letteratura, che il 60% dei pazienti con MAR ha un difetto associato; si tratta nel 33% di fistola rettouretrale, nel 24% di fistola perineale e nel 18% di fistola rettovestibolare, nel 9% fistola rettovescicale e nel 8% da cloaca. Inoltre la fistola rettovescicale nel 80% dei casi si associa ad altre malformazioni seguita da: cloaca (78%), fistola rettouretrale (71%), fistola rettovestibolare (65%), fistola perineale (49%). L'ano imperforato senza fistola nella nostra casistica si associa sempre ad altri difetti e in un caso a sindrome cromosomica. Quindi nel 75% dei casi le forme associate presentano un difetto di tipo "alto" cioè nel quale alla nascita è richiesta l'esecuzione di una colostomia e che in linea generale sono associate ad un outcome funzionale minore.

Le MAR non sono malformazioni associate con elevata frequenza con forme sindromiche. Sono comunque descritti in letteratura sindromi ed associazioni cliniche in pazienti con MAR. Per quanto riguarda i casi sindromici si tratta nel 67% dei casi di femmine e nel 50% dei casi è presente la fistola rettovestibolare. In merito alle forme sindromiche diagnosticate, la sindrome da occhi da gatto (CES) è un disordine genetico associato ad un marker soprannumerario cromosomiale dicentrico e bisatellite del cromosoma 22 (75)(76). Sono stati descritti due tipi di CES e il range fenotipico varia da forme lievi a severe. La sindrome di diGeorge (VCFS/DGS) è definita come la Sindrome da delezione di 22q11.2 è una malattia causata dalla delezione di un pezzo del cromosoma 22. Avviene vicino al centromero ed è situata in 22q11.2. La regione deleta contiene 30 geni, non tutti bene caratterizzati. Alcuni di questi geni sono in condizione di aplosufficienza, dunque non danno problemi clinici in quanto supplisce alle loro funzioni il cromosoma omologo sano;

altri, invece, sono aploinsufficienti, e sono questi a provocare i danni fisici. Colpisce 1 ogni 4.000 nati vivi. Di norma la sindrome è causata da una nuova mutazione, tuttavia può esserci anche una trasmissione familiare autosomica dominante (<5% dei casi) che produce sintomi più lievi. Il gene più importante per l'insorgenza dei sintomi della sindrome è TBX1, un fattore di crescita, particolarmente espresso nelle tasche branchiali III e IV, durante la vita embrionale, ciò spiega le modificazioni degli organi che origineranno in questa area (faccia, bocca, timo, cuore). Le caratteristiche e i risultati della sindrome variano ampiamente e sintomi caratteristici includono: difetti cardiaci, anomalie facciali, immunodeficienza T, palatoschisi ed ipocalcemia. La sindrome di Wolf-Hirschhorn (WHS) è caratterizzata dall'associazione tra un fenotipo cranio-facciale peculiare (microcefalia, ipertelorismo oculare, glabella prominente, naso largo e/o "a becco", filtro corto, micrognazia, angoli della bocca rivolti verso il basso, orecchie displastiche, appendici preauricolari) e ritardo mentale con convulsioni, cardiopatia congenita, anomalie dei genitali e dei reni. La prevalenza stimata nella popolazione generale è di 1/50.000. La sindrome è causata dalla delezione della banda 4p16.3, che può essere submicroscopica. Nel 5-13% dei pazienti la delezione origina dalla malsegregazione di una traslocazione parentale. Gli altri casi presentano delezioni de novo, di solito del cromosoma 4 paterno, o traslocazioni de novo (1,6%). Per evidenziare le delezioni submicroscopiche si utilizzano tecniche molecolari, come l'analisi dei microsatelliti, tecniche di citogenetica molecolare, sonde fluorescenti ibridizzate in situ (FISH). La FISH dovrebbe essere eseguita sia sul paziente che sui genitori, per confermare/escludere le traslocazioni. Il rischio di ricorrenza è basso per le delezioni e le traslocazioni de novo, ma è notevolmente più alto per le traslocazioni familiari. Per tali motivi risulta importante conoscere i segni fenotipici delle sindromi associate alle MAR, per poterle individuare e indirizzare i pazienti verso uno studio di citogenetica molecolare avente lo scopo di individuare delezioni, cromosomi soprannumerari o anche traslocazioni nei genitori che potrebbero essere associate ad una certa ereditarietà.

Gli studi di microscopia elettronica condotti su embrioni di topo SD mutanti (9)(Danforth's short tail) che presentano uno spettro di anomalie anorettali e genitourinarie simili a quelle umane e i numerosi studi effettuati su altri modelli animali (50)(54)(77)(etilentiourea, all-trans acido retinico, adriamicina) hanno permesso di avanzare delle importanti nozioni sull'embriogenesi di tali malformazioni. Il normale sviluppo dell'intestino posteriore dipende principalmente dalla normale formazione della membrana cloacale (MC). In tutti gli embrioni normali è possibile identificare la regione della futura apertura anale nella parte

dorsale della MC dove essa è a contatto con il tail groove. La crescita del setto urorettale è il risultato della normale formazione della cloaca non la causa. In tutti i casi di anomalie anorettali la MC risulta anormalmente corta, la parte dorsale della cloaca è assente, con travolgente apoptosi nella parte dorsale. (9). In conclusione la parte dorsale della MC e la cloaca dorsale sono strutture essenziali per la normale formazione dell'orifizio anale e del retto distale.

La diversificazione dell'intestino lungo l'asse AP in distinte zone e la coordinazione degli strati tissutali, così come la corretta associazione tra un istotipo endodermico e il corrispondente tessuto mesodermico, dipendono da un segnale esteso tra endoderma e mesoderma. Nella fase iniziale dello sviluppo intestinale come il tubo intestinale si forma da AIP e CIP, dei segnali endodermici al mesoderma splancnico, lo arruolano e lo inducono a subire una differenziazione a costituire il mesoderma viscerale (20)(32). Shh è un eccellente candidato come mediatore nelle interazioni tra endoderma e mesoderma perché di derivazione endodermica e perché presente già nella fase precoce dello sviluppo intestinale e i fattori Gli sono alcuni degli effettori del segnale Shh. Topi Shh null-mutant o che presentano varie anomalie di espressione dei fattori Gli presentano uno spettro di MAR variabile dalle forme più gravi, persistenza della cloaca nei Shh null, Gli2<sup>-/-</sup>; Gli3<sup>+/-</sup> o Gli3<sup>-/-</sup>;Gli2<sup>+/-</sup>, alle forme minori come ano imperforato (Gli2<sup>-/-</sup>) alla stenosi anale (Gli3<sup>-/-</sup>) (54)(78). Ad ulteriore supporto che i fattori Gli sono i principali mediatori del Shh signaling è l'evidenza che alcuni pazienti con la sindrome di Pallister-Hall causata da mutazione frameshift nel gene GLI3, presentano delle forme di MAR, come ano imperforato e fistola rettouretrale (79). Shh è importante non solo per la regionalizzazione dell'intestino sull'asse anteroposteriore ma anche sull'asse radiale. Un altro fattore trascrizionale a valle di Shh che potrebbe essere coinvolto nella patogenesi delle MAR risulta essere Bmp-4. Nel ratto normale i livelli di espressione nel mesoderma di BMP4 sono correlati con quelli della Shh per tutto lo sviluppo intestinale; nel ratto ETU esposto, si osserva una riduzione, quasi simultanea e, consensuale dei livelli della Shh nell'endoderma e di BMP4 nel mesoderma. Quindi, la riduzione dei segnali induttivi endodermici di SHH determina con la minor induzione di BMP-4 e quindi una minima crescita del mesoderma viscerale nella regione del CIP. Questa down-regulation può fornire un supporto molecolare all'ipotesi che l'incompleta formazione e divisione della cloaca può determinare un'ampia varietà di malformazioni dell'intestino posteriore. (50). Non è noto il meccanismo molecolare coinvolto ma è noto che Shh induce BMP-4 nel mesoderma, il quale attiva la differenziazione delle cellule mesenchimali in sottomucosa e lamina propria ed inibisce

quelle cellule più vicine all'epitelio a differenziarsi in SMC. L'effetto però è limitato alle zone limitrofe all'epitelio. Inoltre Shh tramite Bmp-4 inibisce anche la differenziazione neuronale enterica. In questo modo promuove solo le cellule mesodermiche degli strati più esterni a differenziare in SMC e in tessuto neuronale (77). Shh signaling tramite Bmp-4 è fondamentale nella costituzione di una normale parete a strati concentrici intestinale.

Come già evidenziato in precedenza anche i livelli di Hox geni concordano con quelli di Shh. Quindi, quando se Shh è downregulated anche i geni Hox risultano affetti. Tali geni, regolando anch'essi la modellazione della parete intestinale lungo l'asse antero-posteriore se affetti riducono la potenza del segnale SHH. Inoltre controllando anche lo sviluppo del tipo, grandezza e del numero di ossa specifiche potrebbero fornire una spiegazione molecolare della presenza di anomalie vertebrali e degli arti spesso osservate nei casi di MAR. In particolare la mancata espressione di Hoxa-13 e Hoxd-13, normalmente espressi nel mesoderma del retto, porta ad un'alterazione dello strato muscolare dello sfintere, consistente in una parziale e anteriore trasformazione di tale regione (53). Ulteriori riscontri che supportano queste conclusioni sono stati ritrovati nei topi con Hoxa 4<sup>-/-</sup> che presentavano anomalie della muscolatura del colon (80) e topi Hoxa5<sup>-/-</sup> che mostravano un anomalo sviluppo dello stomaco (52). Questi riscontri indicano che i prodotti dei geni Hox partecipano alla regionalizzazione dell'intestino, in parte attraverso la regolazione del destino dei precursori delle SMC e in parte attraverso la loro proliferazione.

I nostri risultati si discostano in parte dai risultati avuti sui modelli animali che indicano una ridotta espressione Shh a livello dell'epitelio (77); nel nostro lavoro, in tutti i casi di fistola e nei controlli, Shh è ben espressa a livello epiteliale. L'osservazione però a nostro parere più importante è che a livello della tonaca muscolare, soprattutto nelle aree di maggior sovvertimento strutturale, la sua espressione è notevolmente inferiore con un numero di cellule con rinforzo nucleare minore rispetto ai caso-controlli. Mettendo insieme un insieme di osservazioni quali: nei campioni vi è una sottoespressione di Shh, Shh svolge un ruolo chiave nella regolazione del mesoderma, quindi anche nella differenziazione delle cellule mesenchimali primitive, presenza di cellule CD133 positive ma soprattutto CD34 positive concentrate principalmente laddove vi è una diminuita espressione di Shh e un'alterazione della componente muscolare parietale e aumento della componente fibrosa-connettivale. Si può ipotizzare perciò che la ridotta espressione di Shh dovuta o, ad un'alterazione che colpisce direttamente Sonic o i suoi mediatori a valle, in assenza di un suo ottimale gradiente parietale crea un alterato modellamento degli strati parietali intestinali, in funzione dell'alterata concentrazione di Shh nel mesoderma con alterati i meccanismi di

trasduzione del suo segnale (ridotto Bmp-4, ridotta attivazione del fattore Gli2, ridotta espressione dei geni, Hox, Foxf1 e Foxf2, Wnt) che a sua volta comporta una ridotta differenziazione delle cellule mesenchimali in cellule muscolari lisce (81) con un aumento della quota di cellule CD34+ corrispondenti a fibroblasti immaturi (88). I quali, fibroblasti si differenzieranno in forme mature andando a costituire l'aumento del tessuto fibroso tra le fibrocellule muscolari, responsabile di un ulteriore deterioramento del Shh signaling. Quindi queste osservazioni potrebbero suggerire che Shh risulta alterato sicuramente nella sua espressione a livello del tessuto fistoloso; non si tratterebbe comunque di un'alterazione del tipo on-off, perché comunque Shh non è completamente assente, ma sufficiente a determinare un'alterazione dei suoi meccanismi di traduzione del segnale a valle o tramite un'alterazione dei fattori Gli, o tramite la diminuita induzione a livello del mesoderma di Bmp-4 o attraverso un'alterazione dell'induzione di altri geni come i geni Hox, Foxf1 che, come evidenziato in molteplici lavori sono tutte alterazioni associate ad un anomalo sviluppo dell'intestino posteriore e della cloaca e quindi in grado di determinare le anomalie anorettali. Nella parte introduttiva del manoscritto sono state riportate evidenze anatomo-istologiche di alterazioni della tonaca muscolare con aumento della componente fibrosa parietale, ispessimento della lamina basale e alterata angiogenesi (65-67), ma in nessun studio antecedente era stata valutata l'espressione di Shh in ambito umano nel contesto della malformazione.

Un'altra osservazione importante è l'assenza di miogenina nei campioni: tale assenza è indice di presenza di cellule muscolari che hanno già completato il processo differenziativo, e quindi l'assenza di aspetti rigenerativi delle fibrocellule muscolari. In questo studio non è stata valutata l'espressione di Pax7 e quindi resta da dimostrare se il danno sfinteriale presente sia collegato ad una incapacità delle fibre, per una carenza di Pax7 a rigenerare le fibre muscolari o in qualche modo sia Shh signaling alterato che determina un grado di fibrosi tale da arrestare il processo differenziativo. La stessa espressione di CD34 potrebbe indicare la presenza di cellule satelliti quiescenti. In un recente lavoro del 2011 Chen et al (82), hanno valutato, negli embrioni di ratti con MAR, il pattern di cellule satelliti e della loro nicchia nel complesso muscolare sfinteriale striato (SMC), attraverso l'espressione di marker specifici per le cellule satelliti quiescenti come Pax7 e per le cellule muscolari differenziate come miogenina. Nel ratto normale è stato osservato che l'espressione di Pax 7 aumenta a partire da E17(17 giorni dall'inizio della gestazione) e di riduce a partire da E21, mentre l'espressione di miogenina aumenta con l'età gestazionale. Nel gruppo MAR l'andamento temporale di espressione di Pax7 è lo

stesso del gruppo controllo ma con livelli di espressione molto più elevati; invece l'espressione di miogenina risulta notevolmente ridotta rispetto al gruppo controllo. Inoltre, all'immunofluorescenza si osserva una maggiore espressione di vimentina, che coincide con la massiva presenza di tessuto fibroso intercalato lungo le fibre muscolari; inoltre si riscontra una notevole riduzione di neurofilamenti e di vWF che indicano rispettivamente, la componente neurale e vascolare del tessuto. Queste osservazioni concordano con i nostri risultati.

I muscoli del panno perineale si sviluppano dalla massa ventrale premuscolare del limb bud. Le cellule progenitrici nel limb bud iniziano la miogenesi quando una piccola parte di loro, si estende all'interno della regione perineale. Dopo aver raggiunto il pavimento pelvico questi progenitori "migranti" iniziano i processi di specificazione, proliferazione e differenziazione, e una porzione di essi differenzieranno in miofibre mentre altri daranno origine a cellule satelliti dopo lo sviluppo della membrana basale. In accordo con l'espressione temporale di Pax7 e della miogenina, gli autori propongono che durante il periodo critico di sviluppo del SMC tra E17 e E19, in aggiunta alla morfogenesi del SMC, le cellule satelliti proliferano rapidamente, invece, dopo E9, le cellule satelliti proliferate vengono incorporate all'interno delle miofibre. La proporzione di cellule satelliti diminuisce e conduce alla maturazione del piano muscolare pelvico. Invece nel gruppo MAR le cellule satelliti a E16 risultano già intensamente positive al Pax7, ancora prima della produzione di sufficienti precursori miogenici, ciò significa che una parte delle cellule progenitrici muscolari adottano un destino differente diventando cellule satelliti riducendo la quota destinata a diventare mioblasti e quindi fibre muscolari, con la conseguente ipoplasia delle miofibre primarie. Le fibre muscolari nel gruppo MAR, presentano notevoli cambiamenti anche a livello ultrastrutturale, con fasci muscolari disordinati, meno evidenza delle striature trasversali, maggiore spazio tra la membrana basale delle cellule satelliti e delle cellule muscolari, ispessimento della membrana basale. Incremento dell'eterocromatina nucleare espressione di una parziale inattività trascrizionale o inibizione di espressione genica. Le cellule satelliti presentano inoltre una ritardata transizione MyoD-miogenina, con un ritardo nella fusione dei miotubi, suggerendo un difetto nella capacità differenziativa e un difetto intrinseco nel programma miogenico. La ridotta competenza miogenica delle cellule satelliti potrebbe interferire con la loro capacità di integrazione con le fibre muscolari preesistenti al fine di sostenere la crescita muscolare e dare origine ad un pavimento pelvico malformato. Inoltre precluderebbe la crescita muscolare del SMC da parte di cellule satelliti stimolate dopo il trattamento chirurgico delle MAR. E' stato riportato

che la sovraespressione di Pax7 inibisce Myo-D e previene l'induzione della miogenina, inibendo così la biogenesi (83). In accordo con ciò, si è presunto che l'accumulo delle cellule satelliti non differenziate aumenti l'indice di cellule Pax7 positive.

E' noto che i cambiamenti del microambiente in cui si trovano le cellule satelliti possono alterare la funzione delle cellule staminali ed indebolire la competenza miogenica delle cellule satelliti; questi cambiamenti strutturali si sono osservati anche nei nostri campioni quali ispessimento della lamina basale (edema), incrementata fibrosi tra le fibre muscolari, ridotta componente nervosa, neoangiogenesi nelle aree di maggior disarrangiamento muscolare. Chen et al (82) hanno dimostrato che la diminuzione significativa di vWF e dei neurofilamenti e l'aumento delle vimentina, indicano che la rete di microvasi e di neurofilamenti si è sviluppata in maniera ridotta, mentre i fibroblasti sono proliferati in maniera abnorme. Così la ridotta innervazione e l'alterata vascolarizzazione non produce solo profonde influenze trofiche ma anche diminuisce la disponibilità di fattori solubili prodotti dalle cellule endoteliali vascolari e delle fibre nervose, come vascular endothelial growth factor (VEGF), insulin-like growth factor-1 (IGF-1), platelet-derived growth factor (PDGF) che promuovono la crescita delle cellule progenitrici muscolari. Questi cambiamenti insieme all'ispessimento della lamina basale, all'aumento dello spazio tra le cellule satelliti e le cellule muscolari, la presenza di fasci muscolari disordinati, possono perturbare la comunicazione tra le cellule satelliti e la loro nicchia attraverso le proteine di membrana, i recettori di superficie cellulari, fattori solubili, componenti della matrice extracellulare ma anche attraverso gli scambi elettrici e meccanici. Inoltre i cambiamenti del microambiente, non solo sono in grado di inibire la competenza miogenica delle cellule satelliti (87) ma anche di indurre la differenziazione in fibroblasti aumentando così la quota di tessuto fibroso (84). Durante il periodo critico di formazione delle cellule satellite e delle loro nicchie, partecipano numerosi segnali molecolari. I meccanismi molecolari sottostanti l'attivazione delle cellule satelliti e il loro "commissionamento" sono estremamente oscuri. Recentemente molti studi hanno rilevato che multipli segnali sono coinvolti nella regolazione di tale processo (84-85), come il TGF- $\beta$ , FGF, HGF/C-met, Shh, Notch e superfamiglia delle Wnt; tutti sono profondamente coinvolti sia nell'embriogenesi muscolare che nella specificazione e proliferazione delle cellule satelliti. E' stato dimostrato che Shh è coinvolta nella proliferazione delle cellule progenitrici miogene prima dell'attivazione dei MRF, essa promuove la proliferazione delle cellule satelliti, anche prevenendo la loro differenziazione in miotubi multinucleati, mantenendo così uno stato indifferenziato.

L'attivazione della Notch signaling, nello stadio precoce della miogenesi, promuove la proliferazione delle cellule progenitrici miogene, bloccando la prematura differenziazione miogena. In seguito, nelle fasi più tardive, l'attenuata espressione di Notch porta all'attivazione di Wnt che a sua volta induce il passaggio delle cellule progenitrici da una fase proliferante ad uno stato di differenziazione. Sfortunatamente non c'è letteratura concernente le vie di segnale che mediano lo sviluppo dei muscoli del pavimento pelvico. Rimane ancora da chiarire come questi fattori siano rilevanti nello sviluppo del complesso muscolare striato e come la loro anomala espressione sia in grado di indurre un alterato sviluppo di tale complesso muscolare nei casi di MAR. (85-86).

Shh, Bmp-4, Gli, Wnt, FGF sono tutti importanti tasselli di una via o di più vie di segnale importanti ed estremamente complesse di cui poco ancora si conosce; gli stessi fattori di regolazione dell'embriogenesi muscolare in parte regolano e convergono sulla stessa pathway coinvolta anche nella regolazione delle interazioni epitelio-mesenchimali che abbiamo visto essere indispensabili per la corretta morfogenesi dell'intestino posteriore. Molte ombre sono ancora presenti riguardo alle modalità con le quali queste vie di segnale siano alterate e come esse possano spiegare i vari aspetti presenti in tali malformazioni. Le osservazioni prodotte in questo lavoro preliminare giustificano tutte le conclusioni presenti in letteratura che considerano Shh il punto chiave nella regolazione della morfogenesi intestinale e quindi nella patogenesi del danno osservato in questo tipo di malformazione. Uno degli obiettivi futuri può essere quello di andare ad analizzare nell'ambito dei tessuti umani prelevati dal sito di tali malformazioni, l'espressione dei mediatori a valle del segnale Shh quali per esempio Gli2, Bmp-4, Hox geni e le proteine Wnt, con lo scopo di valutare la modalità con la quale la cascata dei segnali Shh contribuisce al normale e anormale sviluppo dell'intestino posteriore ma anche delle componenti muscolari sfinteriali associate.

## 9. Bibliografia

1. Cuschieri A. Descriptive epidemiology of isolated anal anomalies: a survey of 4.6 million births in Europe. *Am J Med Genet* 103:207-215, 2001.
2. Lerone M, Bolino A, Martuciello G. The genetics of anorectal malformations: a complex matter. *Sem Ped Surg* 6: 4, 170-79, 1997.
3. Cuschieri A. Anorectal anomalies associated with or as part of other anomalies. *Am J Med Genet* 110:122–130, 2002.
4. Benninga, MA, Wijers OB, Van Der Hoeven CW, Taminiou JA, Klopper PJ, Tytgat GN, Akkermans LM (1994) Manometry, profilometry and endosonography: normal physiology and anatomy of the anal canal in healthy children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 18:68–77.
5. Rociu E, Stoker J, Eijkemans MJ, Lameris JS (2000) Normal anal sphincter anatomy and age - and sex-related variations at high-spatial-resolution endoanal MR imaging. *Radiology* 217:395–401.
6. Shafik A (1975). New concept of the anatomy of the anal sphincter mechanism and physiology of defecation. *Invest Urol* 12:412.
7. Anorectal Malformations in Children Embryology, Diagnosis, Surgical Treatment, Follow-up. Holschneider A.M, Hutson JM. Editors Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2006.
8. Langman J, *Medical Embriology*, 1972; 25-27.
9. Kluth D, Hillen M, Lambrecht W (1995) The principles of normal and abnormal hindgut development. *J Ped Surg* 30:1143–1147.
10. van der Putte SCJ. Normal and abnormal development of the anorectum. *J Pediatr Surg* 1986;21:434-40.
11. Tourneux F (1888) Sur les premiers développements du cloaque du tubercule génital et de l'anus chez l'embryon de mouton. *Anat Physiol* 24:503–517.
12. Retterer E (1890) Sur l'origin et de l'évolution de la region ano-gentiale des mammiferes. *J Anat Physiol* 26:126–210.
13. Stephens FD (1963) *Congenital Malformations of the Rectum, Anus, and Genitourinary Tract*. Livingstone, Edinburgh,UK.
14. Bill AH, Johnson RJ (1958) Failure of migration of the rectal opening as the cause for most cases of imperforate anus. *Surg Gynecol Obstet* 106:643–651.

15. Gans SL, Friedman NB (1961) Some new concepts in the embryology, anatomy, physiology and surgical correction of imperforate anus. *West J Surg Obstet Gynecol* 69:34–37.
16. Penington EC, Hutson JM (2002) The cloacal plate: the missing link in anorectal and urogenital development. *BJU Int* 89:726–732.
17. van der Putte SC (2005) The development of the perineum in the human. A comprehensive histological study with aspecial reference to the role of the stromal components. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 177:1–131.
18. Airhart MJ, Robbins CM, Knudsen TB, Church JK, Skalko RG (1996) Developing allantois is a primary site of 2'-deoxycoformycin toxicity. *Teratology* 53:361–373.
19. Penington EC, Hutson JM (2003) The absence of lateral fusion in cloacal partition. *J Pediatr Surg* 38:1287–1295.
20. van der Putte SCJ, Neeteson FA (1983) The normal development of the anorectum in the pig. *Acta Morphol Neerl Scand* 21:107–132.
21. Kedinger M, Simon-Assman PM, Bouziges F, et al. (1988) Epithelial-mesenchymal interactions in intestinal epithelial differentiation. *Scand J Gastroenterol. Suppl.* 151;62-69.
22. Kedinger, M., Simon-Assmann, P. M., Bouziges, F., Arnold, C., Alexandre, E. and Haffen, K. (1990). Smooth muscle actin expression during rat gut development and induction in fetal skin fibroblastic cells associated with intestinal embryonic epithelium. *Differentiation* 43, 87-97.
23. Yasugi, S. (1993). Role of epithelial-mesenchymal interactions in differentiation of epithelium of vertebrate digestive organs. *Dev. Growth Differ.* 35, 1-9.
24. Aufderhede E, Ekblom P. Tenascina during gut development: apparence in the mesenchyma, shift in the molecular forms, and dependence on epithelial-mesenchymal interactions. *J Cell Biol* 1988; 107:2341- 9.
25. Yasugi S, Takeda H, Fukuda K. Early determination of developmental fate in presumptive intestinal endoderm of the chicken embryo. *Dev Growth Differ* 1991;33:235-41.
26. Duluc I, Freud J-N, Leberquier C, et al. Fetal endoderm primarily holds the temporal and positional information required for mammalian intestinal development. *J Cell Biol* 1994;126:211-21.
27. Wells JM, Melton Da. Early mouse endoderm is patterned by soluble factors from adjacent germ layers. *Development* 2000;127:1563-1572.
28. McMahon, A.P., P.W. Ingham, and C.J. Tabin, Developmental roles and clinical

- significance of hedgehog signaling. *Curr Top Dev Biol*, 2003. 53: p. 1-114
28. Nieuwenhuis, E. and C.C. Hui, Hedgehog signaling and congenital malformations. *Clin Genet*, 2005. **67**(3): p. 193-208.
  29. Ingham, P.W. and A.P. McMahon, Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev*, 2001. 15 (23): p. 3059-87.
  30. Mc Mahon AP. More surprises in the Hedgehog signaling pathway. *Cell* 2000;100;185-188.
  31. Bai, C.B., et al., Gli2, but not Gli1, is required for initial Shh signaling and ectopic activation of the Shh pathway. *Development*, 2002. 129(20): p. 4753-61.
  32. Roberts D.J, Johnson R.L, Brke A.C, et al. Sonic hedgehog is an endodermal signalling inducing Bmp-4 and Hox genes during induction and regionalization of the chick hindgut. *Development* 1995; 121;3163-3174.
  33. Bitgood, M.J. and McMahon, A.P. Hedgehog and Bmp genes are coexpressed at many diverse sites of cell-cell interaction in the mouse embryo. *Dev. Bio* 1995: 172:126-138.
  34. Marigo V., Scott M.P., Johnson R.L, et al. Conservation in hedgehog signalling: induction of a chicken patched homology by Sonic hedgehog in the developing limb. *Development* 1996;122:1225-1233.
  35. Winnier G., Blessing M., Labhosky P.A., et al. Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes Dev* 1995;9:2103-2116.
  36. Bellusci S., Furuta Y, Rush MG., et al. Evidence from normal expression and targeted misexpression that BMP-4 plays a role in mouse embryonic lung morphogenesis. *Development* 1996;122:1693-1702.
  37. Bellusci S, Furuta Y., Rush M.G, et al. Involvement of sonic hedgehog (Shh) in mouse embryonic lung growth and morphogenesis. *Development* 1997;124:53-63.
  38. Roberts DJ, Smith DM, Goff DJ, et al. Epithelial-mesenchymal signaling during the regionalization of the chick gut. *Development* 1998;125:2791-2801.
  39. Sukegawa A, Marita T, Kameda T, et al. The concentric structure of the developing gut is regulated by Sonic hedgehog derived from endodermal epithelium. *Development* 2000;127;1971-1980.
  40. Mahlapuu M, Enerback S, Carlsson P. Haploinsufficiency of the forkhead gene *Foxf1*, a target for sonic hedgehog signaling, causes lung and foregut malformations. *Development* 2001;128:2397-2406.

41. Krumlauf R. Hox genes in vertebrate development. *Cell* 1994;78:191-201.
42. Gilbert SF. *Developmental Biology*. Sunderland, MA: Sinauer Associates; Inc, 2000.
43. McHugh KM. Molecular analysis of gastrointestinal smooth muscle development. *J Pediatr gastroenterol Nutr* 1996;23:379-394.
44. Peña A. Anorectal malformation. *Semin Pediatr Surg* 1995;4(1):35-47.
45. P. Puri · M. E. Höllwarth. *Pediatric Surgery*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2006. 27:289.
46. Hendren WH. Urogenital sinus and cloacal malformations. *Semin Pediatr Surg* 1996;5:72-79.
47. Hendren WH. Cloacal malformation: experience with 105 patients. *J Ped Surg* 1992;27:890-901.
48. Peña A., deVries PA. Posterior sagittal anorectoplasty. Important technical considerations and new applications. *J Ped Surg* 1982;17:796-811.
49. Pena A, Levitt MA. Anorectal malformations. In: Grosfeld JL, O'Neill JA, Fonkalsrud EW, Coran AG, editors. *Pediatric Surgery*, 6th ed. Philadelphia: Mosby; 2006. p. 1566-89.
50. Mandhan P, Quan QB, Beasley S, et al. Sonic hedgehog, Bmp4, and Hox genes in the development of anorectal malformations in Ethylenethiourea-exposed fetal rats. *J Ped Surg* 2006;41:2041-2045.
51. Zakany J, Duboule D. Hox genes and the making of sphincters. *Nature* 1999;401:761-762.
52. Aubin J, Dery U, Lemieux M, et al. Stomach regional specification requires Hoxa-5-driven mesenchymal-epithelial signaling. *Development* 2002;129:4075-4087.
53. Warot X, Fromental-Ramain C, Fraulob V, et al. Gene dosage-dependent effects of the Hoxa-13 and Hoxd-13 mutations on morphogenesis of the terminal parto of the digestive and urogenital tracts. *Development* 1997;124:4781-4791.
54. Mo R, Kim JH, Zhang J, et al. Anorectal malformation caused by defects in sonic hedgehog signaling. *Am J Pathol* 2001;159:765-774.
55. Sasaki H, Nishizaki Y, Hui C, Nakafuku M, Kondoh H: Regulation of Gli2 and Gli3 activities by an amino-terminal repression domain: implication of Gli2 and Gli3 as primary mediators of Shh signaling. *Development* 1999, 126:3915–3924;
56. Mo R, Freer AM, Zinyk DL, Crackower MA, Michaud J, Heng HH, Chik KW, Shi XM, Tsui LC, Cheng SH, Joyner AL, Hui C: Specific and redundant functions of Gli2

- and Gli3 zinc finger genes in skeletal patterning and development. *Development* 1997, 124: 113–123.
57. Motoyama J, Liu J, Mo R, Ding Q, Post M, Hui CC: Essential function of Gli2 and Gli3 in the formation of lung, trachea and oesophagus. *Nat Genet* 1998, 20:54–57.
  58. Sasaki H,; Hui C; Nakafuku M; Kondoh H. (April 1997). "A binding site for Gli proteins is essential for HNF-3beta floor plate enhancer activity in transgenics and can respond to Shh in vitro". *Development* 124 (7): 1313–22).
  59. Liu CZ; Yang JT; Yoon JW; Villavicencio E; Pfendler K; Walterhouse D; Iannaccone P (March 1998). "Characterization of the promoter region and genomic organization of GLI, a member of the Sonic hedgehog-Patched signaling pathway". *Gene* 209 (1-2): 1–11.
  60. Kohlhase J, Wischermann A, Reichenbach H, Froster U, Engel W: Mutations in the SALL1 putative transcription factor gene cause Townes-Brocks syndrome. *Nat Genet* 1998, 18:81–838.
  61. Liu G, Moro A, Zhang J.R, et al. *Developmental Biology* 2007;303:448-460.
  62. Tai C.C, Sala F.G, Ford H. R, et al. Wnt5a knock-out mouse as a new model of anorectal malformation. *J Surg Res* 2009;156:278-282.
  63. Fairbanks TJ, De Langhe S, Sala FG, et al. Fibroblast growth factor 10 (Fgf10) invalidation results in anorectal malformation in mice. *J Pediatr Surg* 2004;39:36.
  64. Ormestad M, Astorga J, Landgren H, Wang T, et al. *Foxf1* and *Foxf2* control murine gut development by limiting mesenchymal Wnt signaling and promoting extracellular matrix production. *Development* 2005; 133:833-843.
  - 65 Meier Ruge WA, Holschneider AM. Histopathologic observations of anorectal abnormalities in anal atresia. *Pediatr Surg Int* 2000;16:2–7.
  66. A.N. Gangopadhyay, V. D. Upadhyaya, D.K. Gupta, et al. Histology of the Terminal End of the Distal Rectal Pouch and Fistula Region in Anorectal Malformations. *AJS* 31 2008.
  67. Chadha R, Agarwal K, Choudhury S.R, et al. The colovesical fistula in congenital pouch colon: a histologic study. *J Pediatr Surg* 2008;43:2048-2052.
  68. Gans SL, Friedman NB. Some new concepts in the embryology, anatomy, physiology and surgical correction of imperforate anus. *West J Surg Obstet Gynec* 1961; 69:34-7.
  69. Rintala R, Lindahl H, Sariola H, et al. The rectourogenital connection in anorectal malformations is an ectopic anal canal. *J Ped Surg* 1990;25:665-8.

70. Van der Putte SCJ. Anal and ano-urogenital malformations: a histopathological study of "imperforate anus" with a reconstruction of the pathogenesis. *Pediatr dev Pathol* 2006;9:280-96.
71. Lambrecht W, Lierse W. The internal sphincter in anorectale malformations. Morphologic investigations in neonatal pigs. *J Pediatr Surg* 1987;22:1160-8.
72. Kureel SN. Dushyant: surgical anatomy and configuration of sphincter muscles in pouch colon. Presented at the 33<sup>rd</sup> Annual conference of the Indian Association of Pediatric Surgeons (IAPSCON-2007), Jaipur, India, October 4-7, 2007.
73. Chandha R., Agarwal K, Choudhury S. R, et al. The colovesical fistula in congenital pouch colon: a histologic study. *JPS* 2008, 43: 2048-2052.
74. Nah SA, Ong CC, Lakshmi Nk, et al. Anomalies associated with anorectal malformations according to the Krickenbeck anatomic classification. *J Ped Surg* 2012;47(12):2273-8.
75. Schinzel A, Schmid W, Fraccaro M, et al. The cat eye syndrome: decenteric small marker chromosome probably derived from a 22 (tetrasomy 22pter;q11) associated with a characteristic phenotype. Report of 11 patients and delineation of the clinical picture. *Hum Genet* 1981; 57:148-158.
76. Liehr T, Pfeiffer RA, Trautmann U. Typical and partial cat eye syndrome: identification of marker chromosome by FISH. *Clin Genet* 1992; 42:91-96.
77. Sasaki Y, Iwai N, Tsuda T, et al. Sonic hedgehog and bone morphogenetic protein 4 expressions in the hindgut region of murine embryo with anorectal malformations. *J Ped Surg* 2004;39:170-73.
78. Ruiz i Altaba A. (June 1999). "Gli proteins encode context-dependent positive and negative functions: implications for development and disease.". *Development* 126 (14): 3205–16).
79. Kang S, Graham JMJ, Olney AH, et al. Gli3 frameshift mutations cause autosomal dominant Pallister-Hall Syndrome. *Nat Genet* 1997;15:266-268.
80. Tennyson VM, Gershon MD, Sherman DL, et al. Structural abnormalities associated with congenital megacolon in transgenic mice that overexpress the Hoxa-4 gene. *Dev Dyn* 1993;198:28-53.
81. Ramalho-Santos M, Melton DA, McMahon P. Hedgehog signals regulate multiple aspects of gastrointestinal development. *Development* 2000;127:2763-2772.

82. Chen Q. J, Jia H.M, Niu Z.X, et al. The development of satellite cells and their niche in straited muscle complex of anorectal malformations rat embryos. *Journal of Surg Res* 2011;168:e71-e80.
83. Olgion HC, Yang Z, Tapscott SJ, et al. Reciprocal inhibition between Pax7 and muscle regulatory factor modulates myogenic cell fate determination. *J Cell Biol* 2007;177:769.
84. Brack AS, Conboy MJ, Roy S, et al. Increased Wnt signaling durino aging alters muscle stem cell fate and increases fibrosis. *Science* 2007;317:807.
85. Conboy IM, Rando TA. The regulation of Notch signaling controls satellite cell activation and cell fate determination in postnatal myogenesis. *Dev Cell* 2002;3:397.
86. Otto A, Schmidt C, Luke G, et al. Canonical Wnt signaling induces satellite-cell proliferation during adult skeletal muscle regeneraton. *J Cell Sci* 2002;121:2939.
87. Seale P. Runicki A. A new look at the origin, function and “Stem-Cell” status of muscle Satellite Cells. *Development Biol* 2000;218:115-124.
88. Spence JR, Mayhew C.N, Rankin S. A, et al. Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue in vitro. *Nature* 2011;470:105-110.