

Evo-Devo: avances en la embriología molecular y la evolución

Evo-Devo: Advances in Molecular Embryology and Evolution

Evo-Devo: Avanços na Embriologia Molecular e na Evolução

EDWARD M. DE ROBERTIS⁽¹⁾

(1) Department of Biological Chemistry, David Geffen School of Medicine, University of California, Los Angeles, CA 90095-1662, USA.

ORCID: 0000-0002-7843-1869

RESUMEN

En esta revisión examinaremos estudios sobre biología molecular que revolucionaron los conceptos actuales sobre la evolución animal, generando una nueva disciplina llamada Evo-Devo en inglés, o evolución y desarrollo molecular en castellano. Primero, discutiremos el descubrimiento de los 39 genes Hox, que determinan la identidad del eje anteroposterior (A-P) del cuerpo en los vertebrados e invertebrados. Segundo, examinamos como un gradiente morfogenético determina el eje dorsoventral (D-V) y la diferenciación de tejidos típica de todos los vertebrados. Este gradiente se forma durante la gastrulación a través de la secreción de Chordin, una proteína que se une a y antagoniza Bone Morphogenetic Proteins (BMPs), generando un flujo facilitado por la degradación de Chordin por la proteinasa Tolloid que libera BMPs en su forma activa en el lado ventral. Examinaremos como la actividad de estas redes genéticas que regulan la comunicación celular en el embrión son responsables de múltiples patologías como malformaciones congénitas y cáncer. Confirmando el aforismo de que la oncogénesis recapitula la ontogénesis, HoxA9 impulsa la leucemia mieloide aguda; β -Catenina promueve el cáncer colorrectal; Nodal causa la formación de células madre intratumorales; Chordin está amplificada en tumores broncopulmonares; y Goosecoid causa transformación epitelio-mesenquimatoso por tanto metástasis. Finalmente, discutiremos como estos descubrimientos modificaron los conceptos actuales sobre la evolución darwiniana por selección natural. No todas las morfologías animales imaginables fueron posibles, porque debieron ser compatibles con la utilización de las redes genéticas universales del desarrollo embrionario heredadas de *Urbilateria*, el antecesor común de todos los animales bilaterales.

Palabras clave: genes Hox, Chordin, Tolloid, BMP4, β -Catenin, cáncer, malformaciones congénitas

ABSTRACT

Here we review how molecular biology studies revolutionized our present understanding of animal evolution, founding a new discipline called Evo-Devo, or molecular Evolution and Development. First, we discuss the discovery of the 39 Hox genes, which determine the identity of the antero-posterior (A-P) axis of the body in both vertebrates and invertebrates. Second, we examine how a morphogenetic gradient determines the dorsal-ventral (D-V) axis and tissue differentiations typical of all vertebrates. This gradient is formed during gastrulation through the secretion of Chordin, a protein that binds to and antagonizes Bone Morphogenetic Proteins (BMPs), generating a diffusion gradient facilitated by the degradation of Chordin by the Tolloid proteinase that liberates active BMPs on the ventral side. We examine how the activity of these genetic networks that regulate cell communication in the embryo are responsible for multiple pathologies such as congenital malformations and cancer. Confirming the adage that oncogenesis recapitulates ontogenesis, HoxA9 drives acute myeloid leukemia; β -Catenin drives almost all colorectal cancers; Nodal causes formation of tumor stem cells; Chordin is amplified in broncho-pulmonary epithelial tumors; and Goosecoid drives epithelial-mesenchymal transition and metastases. Finally, we discuss how these discoveries have modified our understanding of Darwinian evolution through natural selection. Not all imaginable animal morphologies were possible, because they had to be compatible with the use of the universal genetic networks of embryonic development inherited from *Urbilateria*, the last common ancestor of all bilateral animals.

Keywords: Hox genes, Chordin, Tolloid, BMP4, β -Catenin, cancer, congenital malformations

RESUMO

Nesta revisão, examinamos estudos de biologia molecular que revolucionaram os conceitos atuais sobre a evolução animal, dando origem à disciplina conhecida como Evo-Devo (biologia evolutiva do desenvolvimento). Primeiramente, discutimos a descoberta dos 39 genes Hox, que determinam a identidade corporal ao longo do eixo anteroposterior (A-P) tanto em vertebrados quanto em invertebrados. Em seguida, examinamos como um gradiente morfogenético determina o eixo dorsoventral (D-V) e a diferenciação tecidual característica de todos os vertebrados. Esse gradiente forma-se durante a gastrulação por meio da secreção de Chordin, uma proteína que se liga às Proteínas Morfogenéticas Ósseas (BMPs) e as antagoniza; gera-se um fluxo através da degradação da Chordin pela proteinase Tolloid, a qual libera as BMPs em sua forma ativa no lado ventral. Analisamos como a atividade dessas redes gênicas — que regulam a comunicação celular embrionária — está na base de diversas patologias, como malformações congênitas e câncer. Confirmando o aforismo de que a oncogênese recapitula a ontogênese, o HoxA9 impulsiona a leucemia mieloide aguda; a β -catenina promove o câncer colorretal; a Nodal desencadeia a formação de células-tronco intratumorais; a Chordin encontra-se amplificada em tumores broncopulmonares; e a Goosecoid induz a transição epitélio-mesênquima, levando, assim, à metástase. Por fim, discutimos como essas descobertas modificaram os conceitos atuais sobre a evolução darwiniana por seleção natural. Nem todas as morfologias animais concebíveis eram possíveis; elas precisavam ser compatíveis com o uso de redes genéticas universais de desenvolvimento embrionário herdadas de *Urbilateria**, o ancestral comum de todos os animais bilaterais.

Palavras chave: genes Hox, Chordin, Tolloid, BMP4, β -catenina, câncer, malformações congênitas

INTRODUCCIÓN

La biología molecular revolucionó la biomedicina. Aquí discutiremos como estas nuevas técnicas avanzaron nuestra comprensión de la evolución animal generando una nueva disciplina llamada Evolución y Desarrollo Molecular, o Evo-Devo como es más comúnmente conocida, y como estos estudios han contribuido a las ciencias médicas.

LO VISIBLE Y EL PODER DEL RAZONAMIENTO HUMANO

El concepto de la evolución surgió de la curiosidad humana por comprender el mundo que nos rodea. El mundo de lo visible fue interpretado a través del poder del razonamiento humano. Un evento importante sucedió en 1822 cuando Étienne Geoffroy Saint-Hilaire disecó una langosta de mar y la invirtió 180 grados de modo que en esa posición la disposición de los órganos se asemejaba a la de los mamíferos^(1, 2). En sus propias palabras: “Cuál fue mi sorpresa, y añadido, mi admiración en percibir un orden que presentó bajo mis ojos todos los sistemas de órganos de esta langosta en el orden en que están arreglados en los mamíferos”. En esa posición el corazón quedaba debajo, el tubo digestivo en el medio y el sistema nervioso en la parte de arriba (ubicada normalmente hacia el suelo en los artrópodos) (Figura 1).



Figura 1. La famosa langosta de mar disecada por Étienne Geoffroy Saint-Hilaire. Cuando invertida con respecto a la orientación del suelo, el corazón queda abajo, la cuerda neural arriba, y el tubo digestivo en el medio, como es el caso en los mamíferos. Los artrópodos también tienen cabeza, tórax y abdomen. Geoffroy propuso que los animales comparten una unidad de plan. Reproducida con permiso de referencia 2.

Geoffroy Saint-Hilaire propuso que una unidad de plan existía en el reino animal. Esto condujo a un famoso debate con Georges Cuvier en las sesiones semanales de la Academia de Ciencias de Francia. Cuvier ganó el debate, pero este concepto de una unidad de plan o diseño entre los animales, no solo en el eje D-V, pero también en el eje A-P con cabeza, tórax, y abdomen, quedó en la conciencia intelectual europea. Por ejemplo, en 1842 Henri de Balzac en La Comedia Humana escribió: “No hay más que un animal. El creador se ha servido de un único y mismo patrón para todos los seres organizados.” El extraordinario poder del razonamiento humano analizando lo visible por nuestros sentidos llegó a su máximo exponente con la publicación del Origen de las Especies en 1859, donde Charles Darwin propuso que las especies evolucionaron por variaciones seleccionadas a través de la selección natural. La selección natural actúa sobre variaciones espontáneas que

ocurren con alta frecuencia, resultando en la reproducción diferencial de los individuos mejor adaptados al medio ambiente. La reproducción es enormemente abundante, como había sido propuesto anteriormente por Malthus, y la competición del más fuerte resulta en adaptaciones positivas a través de largos periodos de tiempo.

La maravillosa diversidad de animales surgió por la acción de la selección natural actuando como un ingeniero constantemente mejorando una maquinaria genética invisible heredada de nuestros antecesores. Como bien sabemos en medicina y por nuestra experiencia vital, cuando terminamos el periodo reproductivo la presión benéfica de la selección natural desaparece y la vejez nos trae una multitud de dolencias.

LO INVISIBLE Y LA MAQUINARIA GENÉTICA DEL DESARROLLO EMBRIONARIO

La identificación de la invisible maquinaria genética de la evolución surgió de estudios de la genética de la mosca de la fruta *Drosophila* y de estudios de la embriología pura. Dividiremos nuestro análisis en tres partes.

Primero, el descubrimiento de los genes Hox a partir de homologías a nivel del ADN entre *Drosophila* y los vertebrados. Estos genes reguladores de la transcripción están agrupados en el genoma de acuerdo con su orden de expresión en el eje

anteroposterior del cuerpo.

Segundo, como el descubrimiento de la inducción embrionaria por un grupo de células dorsales del embrión de anfibios hecho hace 100 años llevó a la identificación de una vía de señalización que determina la diferenciación histotípica del eje dorsoventral. Esta vía Chordin/Tolloid/BMP forma un gradiente morfogenético

utilizado en la gastrulación de prácticamente todo el reino animal.

Tercero, como el uso de redes genéticas conservadas en el desarrollo embrionario encauzaron la evolución por selección natural.

LOS COMPLEJOS DE GENES HOX

La llave provino del estudio de mutaciones homeóticas a través de la genética. Las transformaciones homeóticas transforman la identidad de una parte del cuerpo en la de otra similar. El caso más famoso es el de *bithorax*, una mutación de *Drosophila* descubierta en 1923 por Thomas Hunt Morgan (premio Nobel de Medicina en 1933), que causa la formación de cuatro alas en moscas en vez de dos.

En humanos ejemplos de transformaciones homeóticas son las costillas flotantes lumbares o cervicales. Un estudiante en

Caltech llamado Edward Lewis estudió la genética de *bithorax* por cuatro décadas y encontró que la mutación involucraba múltiples genes que estaban agrupados en el genoma de *Drosophila* en el mismo orden que afectaban el desarrollo del abdomen de la mosca. Esta propiedad de llamada colinearidad y propuso que quizás provenía de duplicaciones de un gen ancestral que reprimía la formación de patas en el abdomen de un antecesor similar a un milpiés⁽³⁾. Por estos estudios Lewis recibió el premio Nobel de Medicina en 1995. Walter Gehring en el Biozentrum de Basilea, Suiza, pudo clonar un gen homeótico llamado *Antennapedia* en 1984 y decidió investigar la posible duplicación propuesta por Lewis. Su grupo encontró que los genes homeóticos, incluyendo *bithorax*, tenían una región de 180 pares de bases conservada en genes homeóticos que llamaron el homeobox^(4, 5).

En aquel momento yo era el otro profesor titular del departamento de biología celular en el Biozentrum y teníamos seminarios comunes. Un momento memorable fue cuando el grupo de Gehring presentó que *Antennapedia* se expresaba en neuronas de los dos segmentos tórax que regula. Por razones equivocadas, yo propuse con gran excitación que teníamos que probar si este gen estuviese presente en vertebrados, pues había antecedentes de un péptido en *Hydra* conservado con un neuropéptido bovino (esto décadas más tarde se supo era debido a un artefacto). Gehring pacientemente me explicó que no podía ser, porque los genes homeóticos son autónomos en las células que afectan (o sea que no son secretados), pero en mi ignorancia no comprendí y seguí insistiendo. Finalmente decidimos hacer el experimento por la simple razón de que en mi laboratorio ya teníamos las bibliotecas genómicas de la rana *Xenopus laevis*, el modelo vertebrado con el que trabajamos, ya preparadas y prontas para hibridar con sondas radioactivas. En el primer intento aislamos un gen, hoy llamado HoxC6, que codificaba 56 de 60 aminoácidos idénticos con el homeo dominio de *Drosophila*⁽⁶⁾. La secuencia del homeobox está extremadamente conservada porque codifica un dominio de proteína que encaja justo en la hélice mayor del ADN. Por alguna razón que aún no conocemos el homeo dominio fue conservado en forma excepcional, de tal forma que resultó fácil aislar HoxC6. En el resumen del trabajo que publicamos en Cell en 1984 dijimos: "Un gen de *Xenopus laevis* fue clonado en base a homología con genes homeóticos de *Drosophila*... Este gen podría tal vez representar el primer gen que controla el desarrollo embrionario identificado en los vertebrados." Y así fue.

Con la perspectiva de cuarenta años más tarde, este fue un descubrimiento fundamental. En aquel momento nadie sospechaba que organismos tan

diferentes como una mosca y un vertebrado podían tener mecanismos del desarrollo embrionario similares. Cuando logramos obtener anticuerpos contra HoxC6, encontramos que su proteína se expresa en 8 segmentos torácicos en el ratón (Figura 2). No había ninguna razón *a priori* para pensar que estos 8 segmentos iban a ser distintos de los del resto del eje A-P.

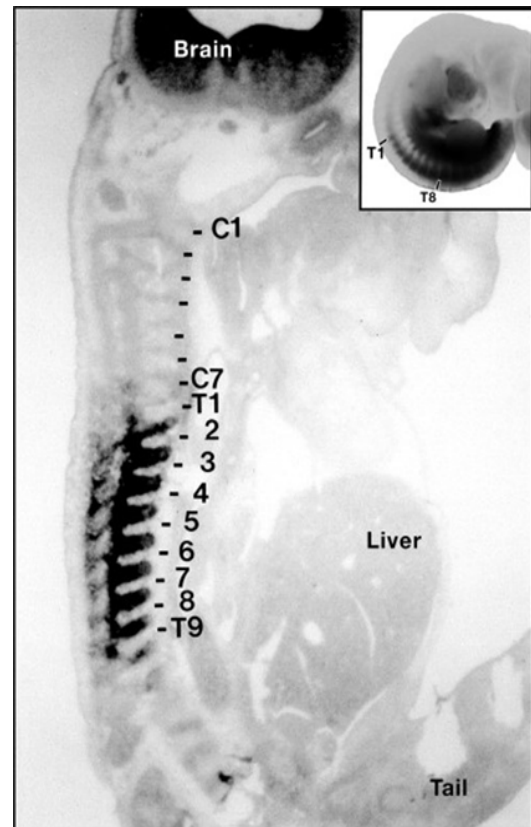


Figura 2. La proteína de HoxC6 se expresa en 8 segmentos tórax del embrión de ratón. El ARN de Hoxc6 se extiende hasta la cola (recuadro) pero la proteína no, porque su traducción es inhibida por un microARN. Imunolocalización original por Guillermo Oliver.

Con el tiempo, a través del trabajo de otros laboratorios, no del nuestro, se encontró que los genes homeóticos están agrupados y ordenados en el ratón en el mismo orden en que están presentes en *Drosophila* y otros organismos (Figura 3).

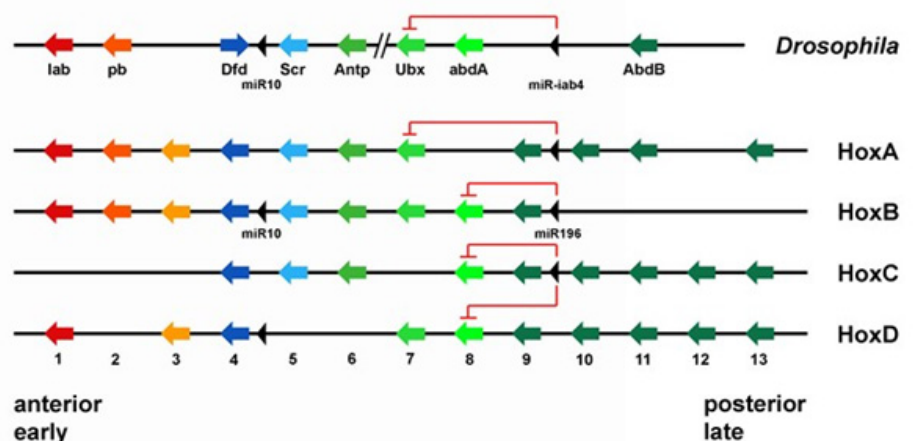


Figura 3. Los humanos tenemos 4 complejos de Hox genes, agrupados de acuerdo con la región del cuerpo donde se expresan. Estos genes llamados parálogos se originaron por dos duplicaciones completas del genoma en los vertebrados. Los genes Hox se numeran a partir de un complejo ancestral que consistía de 13 genes. Los invertebrados tienen un solo complejo Hox. miRNA denota un microARN que inhibe la traducción de genes Hox en regiones más posteriores.

El homeobox se asemeja más entre los genes anteriores o posteriores de *Drosophila* y los mamíferos con otros miembros del complejo. De modo que la colinearidad se mantuvo entre especies muy distantes lo cual no pudo ser por casualidad.

La organización de genes Hox en los vertebrados es complicada por el hecho de que ocurrieron dos duplicaciones del genoma completo a partir de los peces óseos en adelante. Mientras que los invertebrados tienen un solo complejo Hox, los humanos tenemos cuatro. El antecesor de los cordados, *Amphioxus*, tiene 13 genes Hox ordenados en el genoma, pero los humanos tenemos 39 genes Hox agrupados en cuatro cromosomas diferentes. Como puede verse en la **Figura 3**, cada uno de los complejos Hox se denominan A, B, C, D y se numeran de Hox 1 al 13 de acuerdo con el complejo ancestral. Genes de la misma numeración se llaman parálogos porque se originaron de duplicaciones de un gen original. De modo que el primer gen aislado fue HoxC6 (sexto gen del tercer complejo).

En vertebrados, al igual que en invertebrados, los genes sucesivos se expresan en regiones progresivamente más posteriores (**Figura 3**). Cada flechita en esta figura representa un gen entero. Los genes Hox se mantuvieron agrupados en la misma región del ADN porque son activados en manera secuencial, primero los más anteriores y luego los más posteriores^[7]. Los humanos deberíamos tener 52 genes Hox

(13 X 4) pero tenemos solo 39 pues muchos se perdieron en el curso de la evolución^[8]. En realidad, los humanos deberíamos tener 4 copias de todos los genes, pero si ahora tenemos sólo uno es porque se perdieron tres, si dos se perdieron dos (e.g., los receptores de estrógenos α y β), y si tres se perdió sólo uno (e.g., receptores de ácido retinoico α , β , γ). Los genes duplicados que adoptan nuevas funciones beneficiosas se mantienen, pero de no ser así se pierden rápidamente en la evolución de los genomas^[9].

Como es imaginable, 39 nuevos genes dan lugar a muchas enfermedades cuando no funcionan bien. Los genes Hox causan múltiples malformaciones congénitas. Como es de esperar debido a las duplicaciones, no son tan dramáticas como en

Drosophila, pero, por ejemplo, causan polidactilia, sindactilia, braquidactilia, hipospadias, útero bicornue, sorderas, defectos cardíacos y muchos otros tipos de malformaciones^[10]. El caso más saliente es el de la leucemia mieloide aguda (LMA), en que fusiones en el ADN de HoxA9 y HoxD13 con otros genes expresados en el linaje mieloide (como nucleoporinas o nucleofosmina1) generan proteínas quiméricas que expresan el homeo dominio entero^[11]. La elevada expresión de genes HoxA lleva a muy mal pronóstico de la LMA y es un marcador muy útil en la medicina de precisión^[12]. Las células cancerosas piensan que son embrionarias y continúan dividiéndose y evitan la apoptosis o muerte celular. De modo que los genes Hox tienen relevancia médica. Con esto dejamos el eje A-P y pasamos al eje D-V.

EL EJE DORSOVENTRAL Y EL ORGANIZADOR DE SPEMANN

El descubrimiento de la maquinaria molecular del eje D-V no provino de la genética sino del experimento más famoso de la embriología experimental. Hace 100 años Hans Spemann y Hilde Mangold trasplantaron el labio dorsal del blastoporo, donde comienza la invaginación del mesodermo en el embrión de anfibios, a la región ventral de un embrión huésped^[13]. Cuando se reproduce este experimento en la rana *Xenopus laevis*, la región dorsal es fácilmente identificable debido a

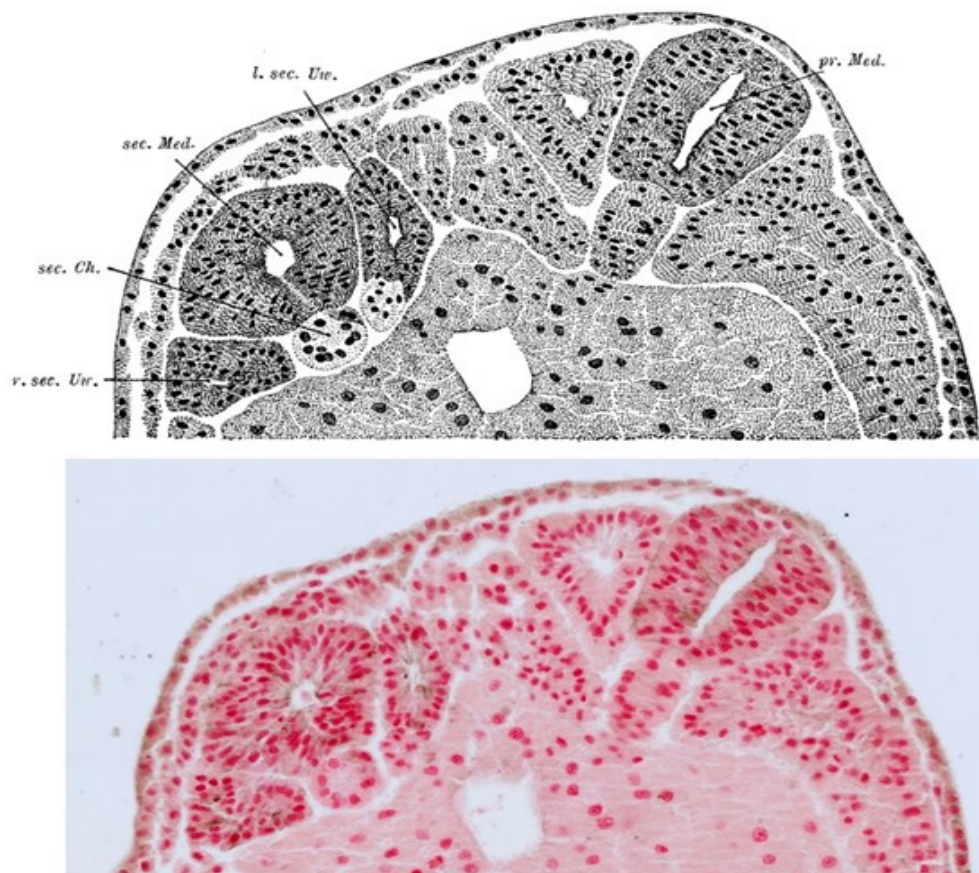


Figura 4. Experimento original de Hans Spemann y Hilde Mangold de un eje dorsal gemelo (izquierda) inducido por un trasplante de tejido organizador de un embrión de salamandra no pigmentada. **A)** Exquisito dibujo de Hilde Mangold mostrando que la notocorda y una pequeña parte de la somita provienen de tejido trasplantado mientras que el segundo sistema nervioso central y somitas se diferenciaron por inducción embrionaria. **B)** Los cortes histológicos fueron preservados y esta fotografía muestra los gránulos de melanina del huésped y la exactitud del dibujo original. Este es el experimento más famoso de la embriología. Reproducido, con permiso, de la referencia 14.

que la parte dorsal adquiere una pigmentación más pálida debido a una rotación de la corteza del huevo causada por la entrada del centriolo que en todos los animales es contribuido por el espermatozoide. Un fragmento de tejido es trasplantado a mano libre bajo el microscopio y con un empujoncito cicatriza perfectamente una hora después y en dos días se obtiene un gemelo siamés con un segundo eje embrionario. La genialidad de Spemann fue que usó células marcadas, de una especie más pálida a otra más pigmentada.

Como puede verse en la **Figura 4**, encontraron que las células del donante, que carecían gránulos de melanina, dieron lugar solo a la notocorda y una parte de la somita (futuro músculo). Pero, por ejemplo, el sistema nervioso central, la mayoría de las somitas y el sistema genitourinario, se diferenciaron a partir de células pigmentadas del huésped (**Figura 4A**). De tal forma que el cerebro, ojo y la médula espinal fueron inducida por células vecinas.

Por este descubrimiento de la inducción embrionaria Hans Spemann recibió el premio Nobel de medicina del año 1935. Para los que nos interesa la historia de la medicina, resulta asombroso que Wolfgang Driever haya podido encontrar recientemente los cortes histológicos originales de Hilde Mangold⁽¹⁴⁾. Como puede verse en la foto de la **Figura 4B**, las contribuciones celulares fueron exactamente como descritas en los dibujos hechos 100 años antes. Una maravilla.

Cuando la biología molecular, el gran igualador en la biología, permitió clonar genes con facilidad, construimos librerías de ARN mensajero del fragmento del organizador de Spemann que contiene la actividad inductora. Comenzamos por estudiar genes de homeobox y el primero que clonamos lo llamamos *goosecoid*, que resultó ser un marcador universal del organizador de Spemann⁽¹⁵⁾. Gracias a las nuevas técnicas de secuenciación masiva hoy podemos identificar el repertorio completo de genes expresados en la parte dorsal o ventral de la gástrula de *Xenopus* (**Figura 5**). Hay múltiples genes enriquecidos en el organizador dorsal o en el polo opuesto en la parte ventral⁽¹⁶⁾. Nuestras investigaciones actualmente están dirigidas a tratar ubicar estos genes en una vía metabólica secuencial.

El gen dorsal más informativo fue Chordin⁽¹⁷⁾. Su ARNm se expresa muy abundantemente en el organizador de Spemann, exactamente en la región que tiene actividad inductora del sistema nervioso central. Chordin es una proteína secretada que difunde y crea un gradiente. Es un antagonista de BMP4 (Bone Morphogenetic Protein 4), un factor

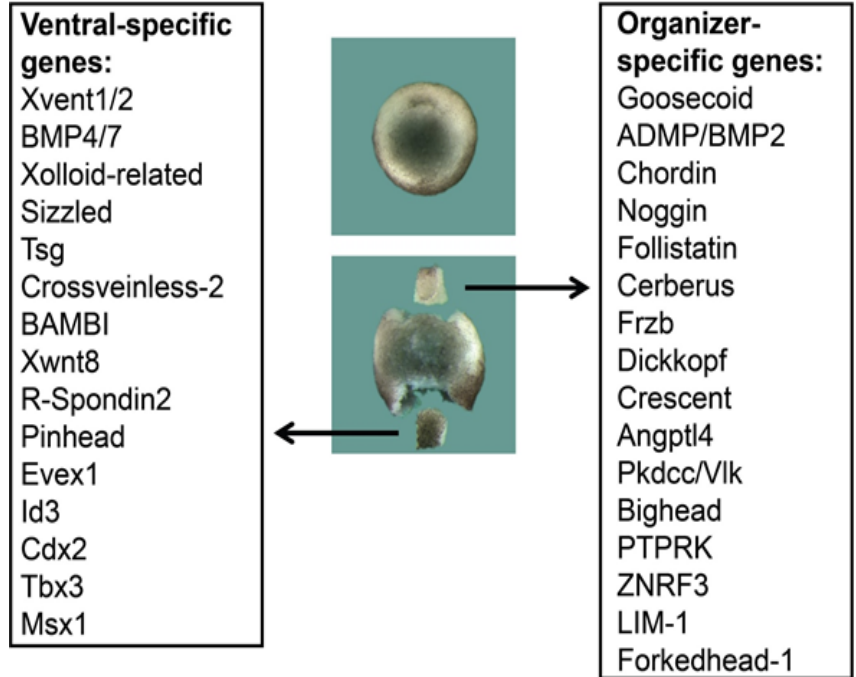


Figura 5. Genes enriquecidos en la región dorsal o ventral del embrión de *Xenopus laevis*. Notar el labio dorsal del blastoporo donde se forma el organizador de Spemann. Los más informativos fueron Chordin y BMP4. Reproducido, con permiso, de referencia 16.

de crecimiento originalmente descubierto porque cuando implantado subcutáneamente en el conejo tiene la propiedad de inducir la diferenciación de hueso⁽¹⁸⁾. En el embrión, Chordin se une a BMP4 y lo inhibe en el lado dorsal. Esto forma un gradiente inverso de actividad de señalización que se puede visualizar en el embrión a través de la fosforilación del factor de transcripción Smad1/5/8 visible en el núcleo celular que es efectuada por receptores de BMP (**Figura 6**).

El gradiente de Chordin se forma en la matriz extracelular que separa el ectodermo del mesodermo (indicada en la **Figura 6**, panel izquierdo) desde donde puede regular el ectodermo y el mesodermo simultáneamente. Cuando el BMP está unido a Chordin no puede señalizar, pero en el lado ventral existe una metaloproteínasa llamada Tolloid que corta específicamente Chordin en dos sitios, resultando en la liberación de BMP que puede entonces señalizar a través de sus receptores⁽¹⁹⁾.

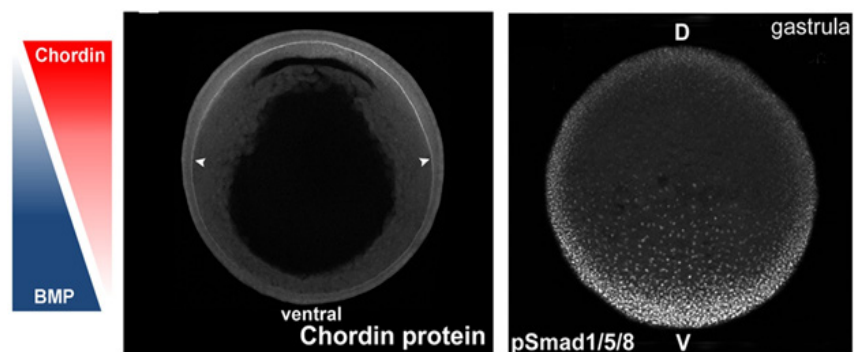


Figura 6. El gradiente morfogenético de Chordin es máximo en la región dorsal de la gástrula y genera un gradiente recíproco de señalización por BMP. Un anticuerpo anti-Chordin muestra un gradiente que se forma en el estrecho espacio que separa el ectodermo del mesodermo (indicado) que se extiende por una semicircunferencia de 2 mm en el embrión de *Xenopus* que en esta etapa consiste de 10,000 células. La señalización por BMP es visualizada a través de la fosforilación del factor de transcripción Smad1/5/8 en el panel de la derecha. El gradiente se mantiene estable a pesar de las extensas migraciones celulares durante la gastrulación. Modificado, con permiso, de la referencia 16.

El gradiente requiere proteínas adicionales (tales como Noggin descubierta en Berkeley) pero lo fundamental es el eje Chordin-Tolloid-BMP que es utilizado en todos los vertebrados⁽²⁰⁾. En el lado dorsal, donde BMP es bajo, se induce sistema nervioso central en el ectodermo y notocorda y somitas en el mesodermo. A niveles crecientes, cresta neural y epidermis en el ectodermo y sistema genitourinario, placa lateral (pared toracoabdominal con celoma en el medio) y finalmente islotes de sangre (que en el humano se forman

en el saco vitelino). Es necesario tener una vía Chordin-Tolloid-BMP compleja para poder formar un embrión perfecto cada vez, porque hay solo una oportunidad de alocar los tejidos y consecuentemente el sistema es altamente regulado.

Además de determinar la diferenciación de tejidos, el gradiente Chordin-Tolloid-BMP regula la morfología del cuerpo⁽¹⁶⁾. Los pescaditos de colores de agua fría (*Carassius auratus*) tienen dos copias de Chordin. Cuando una de ellas es mutada tienen la cola doble. Pero no solamente la cola cambia, sino también la forma del cuerpo, siendo estas mutantes más cortas y panzonas. Esta mutación apareció en China hace más de 500 años y se han mantenido porque a estos pescaditos les gusta dar vueltas en pequeñas peceras. Esto demuestra que Chordin establece un gradiente morfogénico además del histotípico. Desde el punto de vista de la evolución lo que importa es como las células, que son como los ladrillos del animal, se disponen con respecto unas a otras construyendo la forma del cuerpo con la finalidad de adaptarse al medio ambiente. Un gradiente morfogénico puede ser modificado, cambiando la forma del cuerpo fácilmente.

Hoy día estamos investigando como poner los genes dorsoventrales en una vía secuencial de su función en el embrión^(21, 22). Utilizamos estudios llamados epistáticos. Por ejemplo, si uno introduce dos mutaciones a la vez el fenotipo que predomina es el que corresponde al gen que actúa después en la vía genética. Hacemos inyecciones dobles y examinamos el fenotipo en el renacuajo de *Xenopus*. Todos los martes hacemos microinyecciones con una postdoc llamada Yagmur Azbazdar. Por ejemplo, si inyectamos el embrión con un oligonucleótido antisense (llamado morpholino) que inhibe β -Catenina, se pierde todo el desarrollo dorsal. Pero si inyectamos una célula con un poquito de ARN mensajero

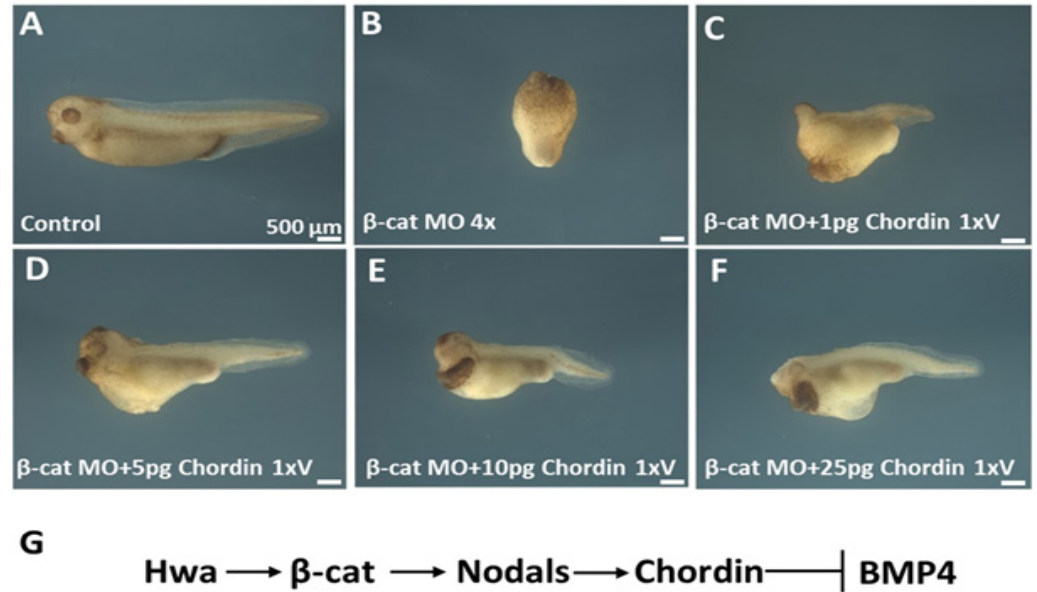


Figura 7. Chordin puede rescatar el eje dorsal en embriones ventralizados por depleción de β -Catenina. A) Renacuajo control; B) embrión ventralizado por falta de β -Catenina; C) rescate por 1 pg de ARNm de Chordin en ausencia de β -Catenina; D) 5 pg; E) 10 pg; F) 25 pg; G) esquema mostrando la conclusión de que Chordin actúa después de β -Catenina. Experimentos similares de doble microinyecciones demostraron que Hwa funciona antes, y Nodal después, de β -Catenina. Barras de escala: 500 μ m. Reproducido, con permiso, de referencia 21.

de Chordin, se forma un eje aún en ausencia de β -Catenina (Figura 7).

Este rescate depende de la dosis inyectada, como se puede juzgar por el tamaño de los ojos o de la glándula de cemento (un órgano que usan los renacuajos para pegarse debajo de hojas y esconderse de sus predadores) a medida que aumenta la dosis. Este experimento demuestra que Chordin funciona después de β -Catenina. Haciendo experimentos similares pudimos establecer que primero viene una proteína materna de membrana llamada Hwu (Hwa, descrita por un grupo en China⁽²³⁾), la cual Hwa estabiliza β -Catenina en el lado dorsal, que activa el factor secretado Nodal, que activa Chordin, que inhibe BMP4 (Figura 7G). La Figura 8 esquematiza una vía genética más completa de los reguladores de la gastrulación⁽²¹⁾. Cada una de estas flechitas activadoras o inhibitoras resulta de doble inyecciones para establecer el orden en que estos componentes dorsoventrales funcionan.

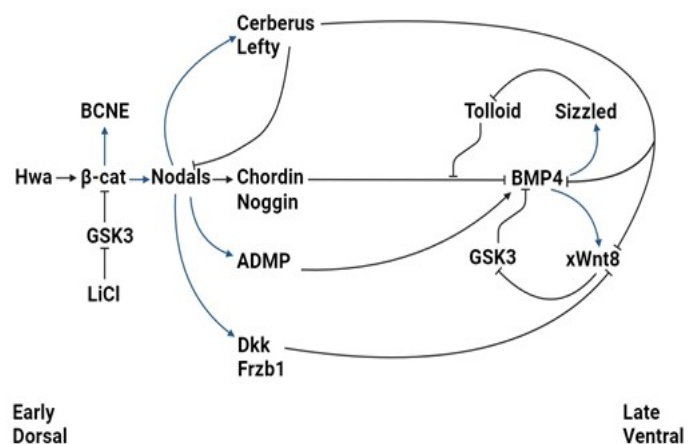


Figura 8. Vía de señalización dorsal sugerida por microinyecciones dobles en embriones de *Xenopus*. Flechas azules indican regulación transcripcional, flechas negras regulación a nivel de interacción de proteínas. Reproducida, con permiso, de referencia 21.

Desde el punto de vista médico, dado que la gastrulación ocurre muy tempranamente en el desarrollo, las alteraciones graves de este proceso suelen ser incompatibles con la viabilidad embrionaria y, por ello, con frecuencia no llegan a manifestarse como malformaciones congénitas. Sin embargo, como señala el aforismo de que la oncogénesis recapitula la ontogénesis, muchos de los genes que regulan la gastrulación desempeñan un papel importante en el cáncer. La β -Catenina está elevada en muchísimos tumores en que se activa la vía de señalización Wnt y en particular en casi todos los cánceres colorrectales. Nodal es menos conocido, pero es un miembro de la familia TGF- β (Transforming Growth Factor-beta). Los TGF- β son famosos por su rol en las fibrosis, pero Nodal es altamente específico del desarrollo temprano. En tumores las células que expresan Nodal (o su correceptor llamado Cripto) se tornan células madre tumorales que son muy difíciles de eliminar. La expresión de Goosecoid induce transición epitelio-mesenquimatoso (EMT en inglés) y está elevada en muchísimas metástasis. Chordin está amplificado en el ADN en varios tumores epiteliales broncopulmonares. De modo que estos genes, muchos descubiertos hurgando en la gástrula de rana, han contribuido a la medicina.

EVOLUCIÓN Y DESARROLLO

Retornando al problema de la evolución, la inversión propuesta por Geoffroy Saint-Hilaire fue completamente apoyada por las investigaciones moleculares. La vía morfogenética de Chordin/Tolloid/BMP esta invertida entre embriones de rana y de la mosca de la fruta. El lado dorsal del embrión de *Xenopus* expresa Chordin y en el ventral BMP4. En *Drosophila*, sus homólogos Short-gastrulation y DPP tienen la orientación inversa. La vía Chordin/Tolloid/BMP es una maquinaria molecular usada para establecer un gradiente de difusión D-V que cubre todo el embrión. Ha sido utilizada en prácticamente en todos los embriones de animales bilaterales, los cuales constituyen la mayor parte de los miembros del reino animal^[24]. Los embriones tienen diferentes tamaños y se desarrollan a distintas temperaturas. Sin embargo, todos utilizan la misma maquinaria, incluyendo las anémonas de mar, que ni siquiera son animales bilaterales, las cuales como embriones expresan Chordin en un polo, la cual difunde y es cortada por Tolloid para generar un máximo de BMP en el polo opuesto. Los descubrimientos de la profunda conservación evolutiva de redes genéticas como los genes Hox y Chordin-Tolloid-BMP fueron muy importantes porque fundaron una nueva disciplina de la evolución y desarrollo molecular (Evo-Devo) que le dio un gran impulso los estudios modernos de la evolución.

En 1996 con Yoshiki Sasai tuvimos la buena idea de proponer que el antecesor común de todos los animales bilaterales debería ser un animal muy complejo al cual llamamos *Urbilateria*⁽²⁾.

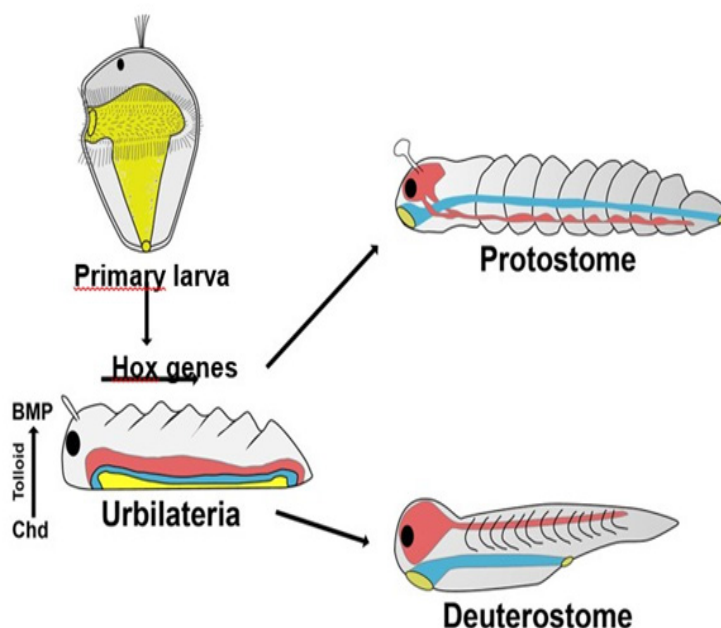


Figura 9. *Urbilateria* es el antecesor común de todos los animales bilaterales. Contenía por lo menos 6 genes Hox y el sistema Chordin/Tolloid/Bmp. Estudios zoológicos indican que también tenía una fase de vida larvaria en el plancton para difundir la especie en los océanos.

Esto estimuló importantes discusiones en el campo de la evolución. De 35 filos, 30 son de animales bilaterales, es decir constituyen la enorme mayoría de los animales que nos rodean. Como indica la **Figura 9**, los animales bilaterales se dividen en Protostomos (del griego *proto* primero, *stoma* boca) y Deuterostomos (del griego *deutero* segundo, *stoma* boca) de acuerdo con su modo de la gastrulación. Nosotros somos deuterostomos, pero provenimos de un antecesor común que tenía por lo menos 6 genes Hox agrupados en un complejo en el ADN para regular el eje A-P y el sistema Chordin-Tolloid-BMP para regular el eje D-V.

La vida animal comenzó en el mar. Una consideración importante es que muchos Protostomos (como los anélidos) y Deuterostomos (como los equinodermos) tienen un ciclo vital que comienza con larvas primarias, de morfología similar, que flotan y se alimentan en el plancton del océano antes de establecerse en una vida sedentaria en el fondo del mar^(25, 26). La fase planctónica sirve el propósito de difundir la especie en el océano. Las larvas este tipo llamado trocófora se caracterizan por tener un órgano sensorial apical, un ojo primitivo, y dos bandas de cilios que batan en direcciones opuestas para dirigir comida a la boca (**Figura 9**). De modo que la evolución de *Urbilateria* siguió un hilo muy finito, muy finito, con una etapa larvaria flotando en las corrientes del mar y una vida adulta en el fondo del mar. Es casi milagroso que a partir de estos antecesores remotos el hilo no se cortó hasta llegar al *Homo sapiens*.

CONCLUSIONES

Los estudios de la embriología molecular sugieren que una red ancestral de genes conservados fue utilizada para construir la inmensa variedad de formas animales bajo el estricto control

de la selección natural a través de la reproducción diferencial darwiniana. Una vez que una buena vía genética es hallada, la naturaleza sigue utilizándola y modificándola. El uso obligatorio de estas redes genéticas ancestrales ha canalizado los resultados de la evolución. No todas las morfologías animales fueron posibles: tuvieron que ser compatibles con la función de los genes utilizados durante el desarrollo embrionario. Es posible que muchas de las morfologías que pensábamos se originaron por convergencias debidas a la selección natural de necesidades funcionales, puedan ser explicadas por una unidad de plan como sugerido originalmente por Geoffroy Saint-Hilaire.

AGRADECIMIENTOS

El autor agradece a la Academia Nacional de Medicina del Uruguay, a través de su presidente Oscar Noboa, vicepresidente Pablo Muxi y académico Hamlet Suarez, la distinción como Miembro de Honor. También a los profesores Patricia Cassina (Histología) y Rafael Radi (Bioquímica) por sus comentarios, como es la tradición en las sesiones bisemanales de la Academia de Medicina del Uruguay, antes de abrir la discusión general de las exposiciones. Este artículo está dedicado a su alma mater la Facultad de Medicina de Udelar. Las investigaciones aquí descriptas fueron financiadas por muchos años por los National Institutes of Health y el Howard Hughes Medical Institute, y actualmente por la cátedra Norman Sprague para oncología molecular.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Appel TA. The Cuvier-Geoffroy debate: French biology in the decades before Darwin. Oxford University Press; 1987.
2. De Robertis EM, Sasai Y. A common plan for dorsoventral patterning in Bilateria. *Nature*. 1996 Mar 7;380(6569):37-40.
3. Lewis EB. A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature*. 1978 Dec 7;276(5688):565-70.
4. McGinnis W, Levine MS, Hafen E, Kuroiwa A, Gehring WJ. A conserved DNA sequence in homoeotic genes of the *Drosophila Antennapedia* and *bithorax* complexes. *Nature*. 1984 Mar 29;308(5958):428-33.
5. McGinnis W, Garber RL, Wirz J, Kuroiwa A, Gehring WJ (1984b). A homologous protein-coding sequence in *Drosophila* homeotic genes and its conservation in other metazoans. *Cell*. 1984 Jun 1 37(2); 403-8.
6. Carrasco AE, McGinnis W, Gehring WJ, De Robertis EM. Cloning of an *X. laevis* gene expressed during early embryogenesis coding for a peptide region homologous to *Drosophila* homeotic genes. *Cell*. 1984 Jun 1;37(2):409-14.
7. Duboule D. The (unusual) heuristic value of Hox gene clusters; a matter of time?. *Dev. Biol.* 2022 Apr 1;484:75-87.
8. De Robertis EM. Evo-devo: variations on ancestral themes. *Cell*. 2008 Jan 25;132(2):185-95.
9. De Robertis E.M. 2016 The role of gene loss in animal evolution from an ancestral genetic toolkit. *Pontif. Acad. Sci. Acta*, 2016 23:1-9.
10. Quinonez SC, Innis JW. Human HOX gene disorders. *Molecular genetics and metabolism*. 2014 Jan 1;111(1):4-15.
11. Ayton PM, Cleary ML. Transformation of myeloid progenitors by MLL oncoproteins is dependent on Hoxa7 and Hoxa9. *Genes & development*. 2003 Sep 15;17(18):2298-307.
12. Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, et al. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *science*. 1999 Oct 15;286(5439):531-7.
13. Spemann H, Mangold H. Über Induktion von Embryonalanlagen durch Implantation artfremder Organisatoren. *Roux's Archiv für mikroskopische Anatomie und Entwicklungsmechanik*. 1924 Sep;100(3):599-638. Translated and reprinted as: Induction of embryonic primordia by implantation of organizers from a different species. in *Cells & development*. 2024 178, 203940.
14. De Robertis EM, Driever W, Mayor R. Celebrating the centennial of the most famous experiment in embryology: Hilde Mangold, Hans Spemann and the organizer. *Cells & Development*. 2024 Jun 1;178:203921.
15. Cho KW, Blumberg B, Steinbeisser H, De Robertis EM. Molecular nature of Spemann's organizer: the role of the *Xenopus* homeobox gene goosecoid. *Cell*. 1991 Dec 20;67(6):1111-20.
16. De Robertis EM, Tejeda-Munoz N. Evo-Devo of Urbilateria and its larval forms. *Developmental biology*. 2022 Jul 1;487:10-20.
17. Sasai Y, Lu B, Steinbeisser H, Geissert D, Gont LK, De Robertis EM. *Xenopus* chordin: a novel dorsolateralizing factor activated by organizer-specific homeobox genes. *Cell*. 1994 Dec 2;79(5):779-90.
18. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science*. 1965 Nov 12;150(3698):893-9.
19. Piccolo S, Agius E, Lu B, Goodman S, Dale L, De Robertis EM. Cleavage of Chordin by Xoloid metalloprotease suggests a role for proteolytic processing in the regulation of Spemann organizer activity. *Cell*. 1997 Oct 31;91(3):407-16.
20. De Robertis EM, Kuroda H. Dorsal-ventral patterning and neural induction in *Xenopus* embryos. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2004;20:285-308.
21. Azbazar Y, De Robertis EM. Molecular analysis of a self-organizing signaling pathway for *Xenopus* axial patterning from egg to tailbud. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2024 Jul 9;121(28):e2408346121.
22. Azbazar Y, De Robertis EM. Double assurance in the induction of axial development by egg dorsal determinants in *Xenopus* embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2025 Feb 18;122(7):e2421772122.
23. Yan L, Chen J, Zhu X, Sun J, Wu X, Shen W, et al. Maternal *Huluwa* dictates the embryonic body axis through β -catenin in vertebrates. *Science*. 2018 Nov 23;362(6417):eaat1045.

24. Bier E, De Robertis EM. BMP gradients: A paradigm for morphogen-mediated developmental patterning. *Science*. 2015 Jun 26;348(6242):aaa5838.
25. Jagersten G. Evolution of the metazoan life cycle. A comprehensive theory. Academic Press. 1972.
26. Nielsen C, Brunet T, Arendt D. Evolution of the bilaterian mouth and anus. *Nature ecology & evolution*. 2018 Sep;2(9):1358-76.