

Evo-Devo experimental

Recensión sobre el texto: Key Experiments in Practical Developmental Biology (2005) Mari-Beffa, M. y Knight, J. eds. Cambridge University Press: Cambridge, UK.

Dedicatoria: Dedicado a los brillantes catedráticos D. José María González Donoso y D. Paul Palmqvist Barrena que imparten de forma extraordinaria la asignatura de Teoría Evolutiva en nuestra Facultad. Quiero dar merecido honor a estos profesores en activo y a tantos otros, en activo o jubilados, que han sembrado el buen nombre de nuestra Universidad de Málaga por todo el mundo.

En este primer año post-conmemorativo del nacimiento de Charles Darwin (1809) y de la publicación de su obra fundamental *"On the Origin of Species"* (1859), creo que es el momento de proponerles la lectura de un libro que edité en el año 2005. El legado de Darwin supuso un revulsivo filosófico que salpicó muchos aspectos de la cultura del ser humano como propuesta de la reinterpretación de nuestro origen y la redefinición del sentido último del mismo en la Tierra. A lo largo de los años, esta teoría ha sufrido infinidad de modificaciones, pequeñas y grandes, hasta llegar a una emergente teoría Evo-Devo (del inglés Evolution and Development) en su versión actual. De modo simplificado, la teoría de Darwin proponía, básicamente, que las adaptaciones de los más aptos, que son seleccionados naturalmente por un entorno hostil para permanecer o para desaparecer (Ver F.X. Niell en el *"Encuentros en la Biología"* n°123), son el verdadero motor de la diversificación de los organismos en la Tierra. Desde la perspectiva de la Evo-Devo, se empieza ahora a dar más importancia a los mecanismos de generación de las innovaciones que al mero aspecto de su adaptación ecológica. Es decir, ahora también se estudia el modo en el que aparece el cambio, algo a lo que Darwin no prestó atención. Esto no es de extrañar, pues en tiempos de Darwin poco se sabía sobre el desarrollo y tan sólo comenzaban a atisbarse los mecanismos de la herencia. Para empezar, estas innovaciones pueden ocurrir en cualquier parte del organismo, en cualquier módulo, entendido este último como unidad sujeta a cambio. Independiente del nivel de organización estudiado, todos y cada uno de los módulos de una especie, desde las unidades anatómicas o tipos celulares a las rutas de transducción de señal, pudieron haber aparecido en momentos muy diferentes. Aunque la especie apareciera en la Tierra hace cinco millones de años (Ma), sus módulos pudieron aparecer 10, 100 o 1000 Ma atrás. Las distintas innovaciones se habrían ido incorporando secuencialmente en los organismos ancestrales que vivieron en cada periodo temporal. Sin embargo, muchos otros procesos evolutivos, vg. la radiación no adap-

tativa, quedaban fuera de esta primera aproximación.

En la teoría de la evolución originalmente propuesta por Darwin, la única presión de selección era ejercida por el ambiente ecológico. Este perfilaba la forma adaptando la morfología y función de las partes de los organismos --o mejor dicho, los organismos en las poblaciones-- a dicho entorno, como los seleccionadores de razas de perros o vacas hacen en la actualidad (y hacían en los tiempos de Darwin, sirviéndole como motivo de inspiración). La incorporación de la teoría genética de la herencia añadió una fuente aleatoria de mutación, intensificada mediante la meiosis y la fertilización, pero seguía siendo la selección natural ejercida por el nicho ecológico la que, inmutable, seleccionaba la forma y función óptimas. Sin embargo, la última versión de esta Teoría de la Evolución introduce un cambio de perspectiva para explicar dichos cambios morfológicos y de función, implicando al desarrollo (*development*) de éstos. En ella se reinterpreta la evolución de los organismos como la evolución de sus desarrollos ontogenéticos y esta nueva concepción permite incorporar una explicación a la paradoja temporal anterior.

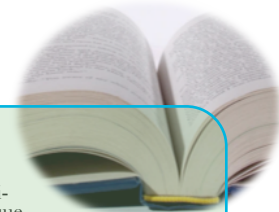
La idea sustancial que esta emergente Evo-Devo ha aportado reza que la causa del perfilado anatómico y funcional se encuentra en las modificaciones de los genes del desarrollo. Los genes del desarrollo serían un recuerdo del pasado, de aquellos genes que, millones de años atrás, fueron seleccionados, unos antes y otros después, por la presión ecológica al jugar su papel en la adaptación de los organismos simples y que ahora regulan el desarrollo neontológico (de los organismos actuales). En general, el origen mismo de algunos genes de las bacterias parece estar asociado a la reducción de un ruido transcripcional, que debió existir ya en los primeros protobiontes (ver Raser y O'Shea, 2010; Batada y Hurst, 2007). Los genes irían estructurando gradualmente la vida, reduciendo la entropía reinante. Pero, además, la extrema estructuración impuesta por estos "sargentos" moleculares permitió un aumento gradual en la complejidad, donde los procesos adaptados, millones de años atrás, quedaron inmersos en una red de nuevos procesos y estructuras. Esta complejidad creciente fue reduciendo la posibilidad de cambio a un mínimo, el llamado "constreñimiento del desarrollo" que defendiera en 1980 el español Pere Alberch (un importante científico, tristemente desaparecido, sobre el que el Institut de d'Estudis Catalans acaba de publicar un interesante libro *"Pere Alberch: The Creative Trajectory of an Evo-Devo Biologist"*). Este mismo concepto fue cambiando y, en su versión más moderna, propone también un condicionante positivo o "direccionado del desarrollo" (*developmental drive*, Arthur, 2001). Los mundos del ARN, del ADN, de los organismos unicelulares o de los organismos pluricelulares han ido perviviendo, como recuerdo del pasado, en los organismos actuales, pero esta complejidad creciente ha

restringido la versatilidad de la innovación evolutiva. Pat Simpson, de la Universidad de Cambridge, ha demostrado en *Drosophila melanogaster* y *Drosophila simulans* que es compatible una estasis morfológica (el mantenimiento de una morfología durante millones de años) con un aumento considerable de mutaciones en los genes del desarrollo (ver Mari-Beffa y Knight, 2005). Así, un organismo puede albergar innumerables mutaciones sin modificar su morfología, simplemente porque no se está perturbando sustancialmente el ambiente molecular generador y resistente al cambio: los genes del desarrollo, sus ARNm, las proteínas codificadas, sus productos catalíticos y las interacciones establecidas. Quizás debamos en el futuro hacer más caso a las interacciones que establecen las proteínas, los lípidos, los glúcidos y la matriz extracelular durante el desarrollo, que van restringiendo, junto a las mutaciones previas del ADN, la adaptabilidad de cada nueva mutación. Ellos tienen la responsabilidad del equivoco término "función génica", porque el término ciertamente parece decir que la funcionalidad se debe sólo al ADN cuando no es ese el caso. Además, las biomoléculas de acción temprana en el huevo, o en el espermatozoide, también se heredan aunque tan solo sea como implementadores y reductores graduales del ruido transcripcional a lo largo del desarrollo. De este modo, este estudio bioquímico que les propongo, podría permitir la mejor comprensión del esquivo concepto "innovación evolutiva", más allá de los cambios obligados en los genes del desarrollo ante el entorno molecular, celular, orgánico y ambiental hostil en favor de la estasis morfológica y su adaptación. Para empezar, en el estudio de las proteínas en *Drosophila melanogaster* se ha encontrado una cascada jerarquizada de factores reguladores de la transcripción, que a lo largo del desarrollo van dirigiendo al mismo, poniendo en acción las proteínas ejecutoras (ver Mari-Beffa, 2010) y reduciendo el ruido transcripcional subsiguiente (ver Houchmandzadeh, 2005). Pero, ¿cómo estudiar la Evo-Devo?

Hace ya 23 años, colaboré en el estudio de las proteínas que participan en la determinación de las neuronas y glía, problema que había estudiado, emulando a nuestro venerado Santiago Ramón y Cajal, tres años antes en mi tesina de licenciatura (bajo la co-dirección de la actual Rectora de la Universidad de Málaga Adelaida de la Calle y uno de sus estudiantes doctores). Este estudio lo realicé en colaboración con el profesor Antonio García-Bellido y uno de sus estudiantes de doctorado en el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. Tan sólo cambiaba de especie, de la lagartija a la mosca del vinagre. Se puede estudiar el cerebro de la lagartija, pero no se podían estudiar sus genes del desarrollo, para esto era mejor utilizar la conocida *Drosophila melanogaster*.

Durante mis años en Madrid, bien es cierto, se respiraba la idea de que era el ADN el único responsable del desarrollo, no sólo de su herencia. Tras experimentos de modificación de la dosis génica se observaban cambios morfológicos. Con estos experimentos se obtienen tres o más versiones de un gen del desarrollo en una mosca, cuando solo hay dos versiones en la condición diploide del individuo. Este cambio de dosis de algunos genes del desarrollo sí indicaba que el ADN tenía que ver con la generación de los detalles morfológicos, no sólo con la herencia. Después, se observó que el ADN vecino a los genes del desarrollo regulaba, al igual que ocurría con los demás genes estudiados hasta entonces, la transcripción de sus ARNm y esto ciertamente también implicaba al ADN en la regulación del desarrollo. Pero esos genes de la determinación neuronal y glial, los genes del complejo *achaete-scute*, codificaban para factores de transcripción que contenían un dominio bHLH que no sólo los unía al ADN para regular la transcripción de otros genes, sino que permitía la dimerización de estas proteínas (dos mejor que una) para poder ejercer su acción. Esa dimerización, fundamental para la función de estas proteínas, no implicaba al ADN, salvo para la aparición de dichas proteínas, regulando el desarrollo en un juego complejo de asociaciones y disociaciones. Se demostró que estos homodímeros y heterodímeros regulaban fuera del núcleo celular muchísimos procesos fundamentales del desarrollo, como la proliferación celular, el control de la forma de los órganos y la diferenciación celular. Esos días de inquietud

55



56

tud científica venían acompañados por las conversaciones con José Antonio Campos-Ortega, un investigador de Valencia que trabajaba en Colonia, que se había nacionalizado alemán, que conocía muy personalmente a García-Bellido, y que me había introducido en estos temas a través de un curso en la Rábida. Este investigador, prematuramente desaparecido, había descubierto otros genes que modificaban también la diferenciación del sistema nervioso, determinando el número de neuroblastos embrionarios, precursores de las primeras neuronas y células gliales, unos tipos especiales de células madre. Como resultado de las investigaciones de estos grupos españoles, Cajal empezaba a ser comprendido desde el punto de vista de la Evo-Devo y sus genes del desarrollo. Campos-Ortega estaba proponiendo que la ruta de *Notch* era un grupo de proteínas que mediaban la señalización entre células en un proceso de inhibición lateral, importante para la formación espaciada de dichos neuroblastos y de acción extranuclear mayoritariamente (Campos-Ortega, 1988). La inhibición lateral era un mecanismo celular que había sido propuesto tras estudios experimentales de la embriogénesis del saltamontes. En esta animal, se observó que, tras eliminar selectivamente un neuroblasto de su embrión, alguna de las células vecinas, precursoras de células epidérmicas, se diferenciaba en neuroblasto. Esto indicaba que estas células vecinas estaban siendo inhibidas durante dicha fase del desarrollo del neuroectodermo. Campos-Ortega y sus colaboradores encontraron que los mutantes nulos en el gen *Notch* de *D. melanogaster*, y en genes relacionados, mostraban hiperplasia neural en su neuroectodermo (un número muy elevado de neuroblastos, probable causa de su muerte). Además, *Notch* y *Delta*, un miembro de la ruta, codificaban para proteínas transmembrana que presentaban dominios extracelulares que permitían su interacción recíproca. De este modo, se supuso que una anomalía en la inhibición lateral podía ser la causa de dicho fenotipo mutante. Debido a esta nueva colaboración con García-Bellido y su colaborador, publicamos tres trabajos donde todas esas proteínas, las proteínas con dominio bHLH, codificadas por el complejo *achaete-scute*, y las de la ruta de *Notch*, además de otras proteínas reguladoras, explicaban, en sus interacciones, el patrón de quetas de la mosca del vinagre, una arquitectura del sistema nervioso periférico. Esta era la primera explicación detallada y completa de una hipótesis de interacciones proteicas que generaba un patrón morfológico, una citoarquitectura neuronal y glial, la idea perseguida por nuestro insigne genetista, e imprecisamente por nuestro admirado Cajal, desde muchos años atrás (de Celis et al., 1992a y 1992b; Mari-Beffa et al., 1992). Las células utilizaban estas proteínas para competir durante una fase "reversible" de su determinación. Fruto de esta competición por inhibición recíproca, unas tomaban el destino neuronal, otras el de células de la glía y otras el epidérmico. Mientras que para la diferenciación de los dos primeros tipos celulares, las proteínas con dominios bHLH codificadas por el complejo *achaete-scute* actuaban, el tercer tipo parecía depender de otras proteínas bHLH del complejo *Enhancer of split*, un miembro de la emergente ruta de *Notch* que estudiaba Campos-Ortega. El resultado de estas actividades proteicas era una distribución espaciada de estos tipos celulares. Si, seleccionado en el pasado por el entorno hostil competitivo, un mecanismo de desarrollo (un módulo proteico simple como éste) ha pervivido en grupos diferentes de organismos descendientes debido a la presión de selección molecular-celular, la comparación de dichos mecanismos ha de mostrar alguna constancia, ha de haberse conservado, aunque sea sólo en parte.

Este método intuitivo mío, estudiar en otra especie de manejo más fácil, como la mosca del vinagre frente a la lagartija, un problema importante como es la arquitectura del sistema nervioso, ocurrió al mismo tiempo que la iniciativa mundial para la creación de una sólida base experimental comparada de

los desarrollos de especies modelo, la base de datos de la emergente Evo-Devo. Ahora, 18 años después de la publicación de estos trabajos, se puede estudiar el patrón neuronal y glial del cerebro de los vertebrados, donde sus genes, de secuencia nucleotídica similar a todos los estudiados en Madrid por nosotros y por Campos-Ortega en Colonia, empiezan a revelar la conservación de éste módulo proteico.

En resumen, en esta nueva Evo-Devo es posible estudiar, mediante la manipulación de los genes de desarrollo o sus productos codificados en distintas especies, la conservación de éstos en los módulos proteicos, no sólo de sus secuencias nucleotídicas o proteicas. Aquellos que permanecen similares en organismos diferentes se suponen que existieron en el ancestral común, habiéndose conservado durante todo el tiempo desde su aparición, desde la innovación que los originó. Este es un estudio antiguo, utilizado por la Zoología, Botánica y Paleontología, al que se añaden estos caracteres estructurales y funcionales de las biomoléculas del desarrollo. De esta manera, la Biología del Desarrollo está dando lugar a una nueva disciplina, la Biología Evolutiva Experimental o la Evo-Devo, donde encuentra su mayor sentido y donde se dan cita muchos biólogos de origen diverso.

Con estos estudios, se irá creando una base de datos que permita una redefinición de la filogenia propuesta a partir de la anatomía. En la nueva filogenia y sistemática se irán utilizando no sólo las secuencias de los genes del desarrollo, sino las funciones que las proteínas codificadas realizan. Fruto de este estudio, también se podrá hipotetizar la condición genética y los módulos de los ancestrales comunes a los organismos-modelo estudiados, por ejemplo la anatomía molecular de Urbilateria, el ancestral común a protóstomos y deuteróstomos. El silenciado del ruido transcripcional, la regulación del patrón de tagmósis, o los fenómenos de comunicación y competición celular, directores de la proliferación o la diferenciación, fueron originalmente "seleccionados" por una presión externa al organismo. Sin embargo ahora se conservan en los organismos por una presión de selección interior, por el desarrollo de éstos. Esta nueva "ecología molecular", actuará "tamponando" los cambios y dirigiendo la innovación. Quizás bajo esta idea sea posible comprender las miles de mutaciones inheridas por Pat Simpson, que en principio fueron aceptadas por ser compatibles con dicho "tamponamiento" del desarrollo, con la ansiada estasis morfológica. Quizás, también sea posible comprender por qué, después de tantos miles de genes del desarrollo hasta ahora comparados en sus secuencias, sigamos sin entender todavía el controvertido término "innovación evolutiva".

Fruto de esta relación científica y de mi interés por la descripción molecular comparada del desarrollo de los organismos, edité en el año 2005 un libro de docencia de la Evo-Devo Experimental. Dicho libro está escrito en inglés, es apto para los nuevos programas bilingües de nuestra Universidad, se puede comprar todavía y hay un proyecto de re-edición del mismo. Con este libro del 2005 pretendo introducirles en el método científico, en su apartado Evo-Devo experimental, donde los libros de teoría sirven de algo, si uno no sabe nada, pero muy poco si uno se lo sabe ya. Es un libro para trabajar en el laboratorio y para enseñar esta disciplina. Reproduce muchos de los experimentos que la humanidad ha venido realizando durante más de cien años. Es cierto que algunos no están, como el célebre experimento que realizó Hilde Mangold bajo la dirección de Hans Spemann y que llevó al descubrimiento del organizador que lleva sus nombres, pero una cadena de desaciertos me lo impidió imperdonablemente. En su favor, se relatan 27 experimentos diferentes, a cual más relevante y con todo lujo de detalles, realizados por Driesch, Nüsslein-Volhard, Hörstadius, Lewis, Meyerowitz, Horvitz, Campos-Ortega o García-Bellido, entre otros padres de la disciplina, y donde se utilizan

nueve especies animales modelo y la planta herbácea *Arabidopsis thaliana*. Son los experimentos de bajo coste que construyeron la disciplina, hechos para todos los públicos

en Centros de Investigación, Universidades, Colegios o Institutos. Si estos experimentos son difíciles o no, sólo la experiencia de cada uno lo determinará. Sólo el alumno y el científico insigne, uno junto al otro a través de la descripción del experimento en este ingenio que inventó Gutenberg, podrán dar su veredicto. Su título es "Key Experiments in Practical Developmental Biology" y fue editado por el autor de este artículo y Jennifer Knight de la Universidad de Colorado, estando dirigido a los estudiantes de Biología, Medicina, Veterinaria, Ingeniería Agrónoma, Ciencias del Mar y una lista importante de licenciaturas o grados en el mundo (Mari-Beffa, 2009).

Aquí están, en nuestro libro de prácticas, casi todos los importantes para ser emulados y quien sabe si quizás para ser vencidos. Los genios se ofrecen, como García-Bellido se ofreció a este humilde investigador, para que cada uno encuentre respuesta a sus preguntas del pasado. La traducción espera a su demostración de interés.

Lecturas recomendadas:

- Alberch, P. (1980) Ontogenesis and morphological diversification. *Amer. Zool.* 20, 653-667.
- Arthur, W. (2001) Developmental drive: an important determinant of the direction of phenotypic evolution. *Evol. Dev.* 3, 271-278.
- Batada, N. N. y Hurst, L. D. (2007) Evolution of chromosome organization driven by selection for reduced gene expression noise. *Nat. Genet.* 39, 945-949.
- Campos-Ortega, J. A. (1988) Cellular interactions during early neurogenesis of *Drosophila melanogaster*. *Trends Neurosci.* 11, 400-405.91.
- Darwin, Ch. (1859) Origen de las especies. Akal bolsillo. Ediciones Akal, S. A: Madrid. ISBN: 84-7600-018-9.
- de Celis, J. F., Mari-Beffa, M. y García-Bellido, A. (1991) Cell autonomous role of Notch, an epidermal growth factor homologue, in sensory organ differentiation in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1991) 88, 5, 632-636.
- de Celis, J. F., Mari-Beffa, M. y García-Bellido, A. (1991) Function of trans-acting genes of the achaete-scute complex in sensory organ patterning in the mesonotum of *Drosophila*. *Roux's Arch. Dev. Biol.*, (1991) 200, 64-76.
- Houchmandzadeh, B (2005) Filtering the noise of embryonic development. *J. Phys.: Condens. Matter* 17, S1245-1258.
- Mari-Beffa, M. (2009) The teaching of Developmental Biology in Spain: future challenges. *Int. J. Dev. Biol.* 53: 1245-1252.
- Mari-Beffa, M. y Knight, J. eds. (2005) Key Experiments in Practical Developmental Biology. Cambridge University Press: Cambridge, UK.
- Mari-Beffa, M., de Celis, J. F. y García-Bellido, A. (1991) Genetic and developmental analyses of chaetae pattern formation in *Drosophila tergites*. *Roux's Arch. Dev. Biol.*, 200, 132-142.
- Raser, J. M. y O'Shea, E. K. (2010) Noise in gene expression: Origins, consequences, and Control. *Science* 309, 2010-2013.
- Rasskin-Gutman, D. de Renzi, M. eds. (2009) Pere Alberch: The Creative Trajectory of an Evo-Devo Biologist. Institut d'Estudis Catalans and Universitat de València. Valencia. España.