

A nivel nacional se encuentra la Red de Terapia Celular Española, creada por el Instituto de Salud Carlos III en el seno del Ministerio de Sanidad y Consumo, y trata de aplicar la terapia celular en diferentes modelos experimentales. Entre ellos se encuentra el equipo que dirige el Dr. López-Barneo en Sevilla, cuyo grupo investiga en la terapia celular aplicada a la enfermedad de Parkinson. Esta enfermedad también la investiga el grupo liderado por la Dra. Fariñas en Valencia. El grupo del Dr. Alberch en Barcelona investiga con modelos de enfermedad neurodegenerativa (corea de Huntington). En Sevilla, nuevamente, se encuentra el grupo dirigido por el Dr. Bernat Soria, en modelos de diabetes. El Dr. García-Sancho lidera en Valladolid al grupo de investigación centrado en modelos de infarto de miocardio. A esta red pertenece también nuestro grupo, que investiga en el campo de las patologías óseas y articulares.

Mirando hacia el futuro

A pesar del atractivo y esperanzador uso potencial de las células madre como terapia para el tratamiento de multitud de enfermedades, hoy por hoy la aprobación para su uso clínico en determinadas enfermedades, está muy lejos de la realidad.

Actualmente existen en nuestra sociedad muchas personas con enfermedades del cartílago y los huesos, como son la artritis, la lesión de los discos articulares o intervertebrales, las fracturas que no consolidan o la pseudoartrosis, así como la necesidad de reemplazar grandes pérdidas de masa ósea por accidentes, entre otras. El procedimiento clínico diario precisa del tratamiento con autoinjertos (del propio paciente) o aloinjertos (de otro individuo); ambos presentan problemas que limitan su uso, como son la morbilidad que conlleva su extracción del paciente en el caso del autoinjerto, y el rechazo o la baja capacidad de regeneración ósea en el caso del aloinjerto. La terapia celular, utilizando células precursoras condro/osteogénicas, evitaría estos problemas, constituyendo una atractiva alternativa clínica de las enfermedades óseas.

Esta «terapia del futuro» ofrece grandes ventajas: aparte de poder regenerar un tejido u órgano dañado, elimina todos los problemas de rechazo que existen actualmente en el trasplante de órganos, ya que se utilizarían las células madre del propio individuo para regenerar la estructura dañada. Sin embargo, hay que tener en cuenta que, para una aplicación prometedora y segura de estos avances biomédicos en los seres humanos, se necesitan numerosos estudios de investigación con animales y alcanzar un conocimiento de estas células mucho mayor de lo que se tiene actualmente. Es necesario estudiar muchos factores que actúan durante el desarrollo de los organismos y que hacen que estas células se comporten de una manera determinada, para así reproducir tales condiciones *in vitro*. La aplicación de este tipo de terapia bajo el desconocimiento podría ocasionar serios problemas al paciente como, por ejemplo, el desarrollo de tumores, dado el gran poder de proliferación que poseen estas células.

Aunque todo el mundo científico está de acuerdo en la necesidad de ser cautelosos antes de iniciar estudios clínicos con células madre, existen matices entre unos y otros. Mientras que unos proponen esperar los próximos cinco años para estar seguros a la hora de introducir las células madre con fines reparativos, otros piensan, sencillamente, que es necesario saber mucho más sobre la biología básica de las células madre humanas, y responder las preguntas todavía sin respuesta, antes de explotar su valor terapéutico, independientemente de los años que deban transcurrir.

Como vemos, el debate está servido. Ahora bien, con una investigación sensata, honesta y de calidad, apoyada por unos gobiernos que revisen exhaustivamente los programas de investigación de cada país junto con un alto grado de información y transparencia hacia la sociedad, nos encontraremos más cerca de ese futuro próximo en el que las posibilidades que ofrecen las células madre tengan más de realidad que de ciencia ficción.

EL ORIGEN Y LA EVOLUCIÓN DE LOS COMPLEJOS HOMEBOX

Ramón Muñoz Chápuli

Catedrático del Departamento de Biología Animal, Universidad de Málaga.

Las «instrucciones genéticas» para construir un animal no pueden ser sencillas. El problema se complica aún más cuando consideramos en su conjunto la complejidad de las instrucciones necesarias para construir toda la ingente diversidad del reino animal, desde las esponjas hasta los vertebrados, desde los moluscos a los nemertinos, o desde los insectos a los equinodermos. Por eso constituyó una noticia tranquilizadora, además de una auténtica sorpresa, el descubrimiento de que determinados grupos de genes muy concretos participaban en las primeras etapas del desarrollo de todos los animales. De alguna forma, este descubrimiento suponía la simplificación, al menos parcial, de un problema abrumador. Estos genes

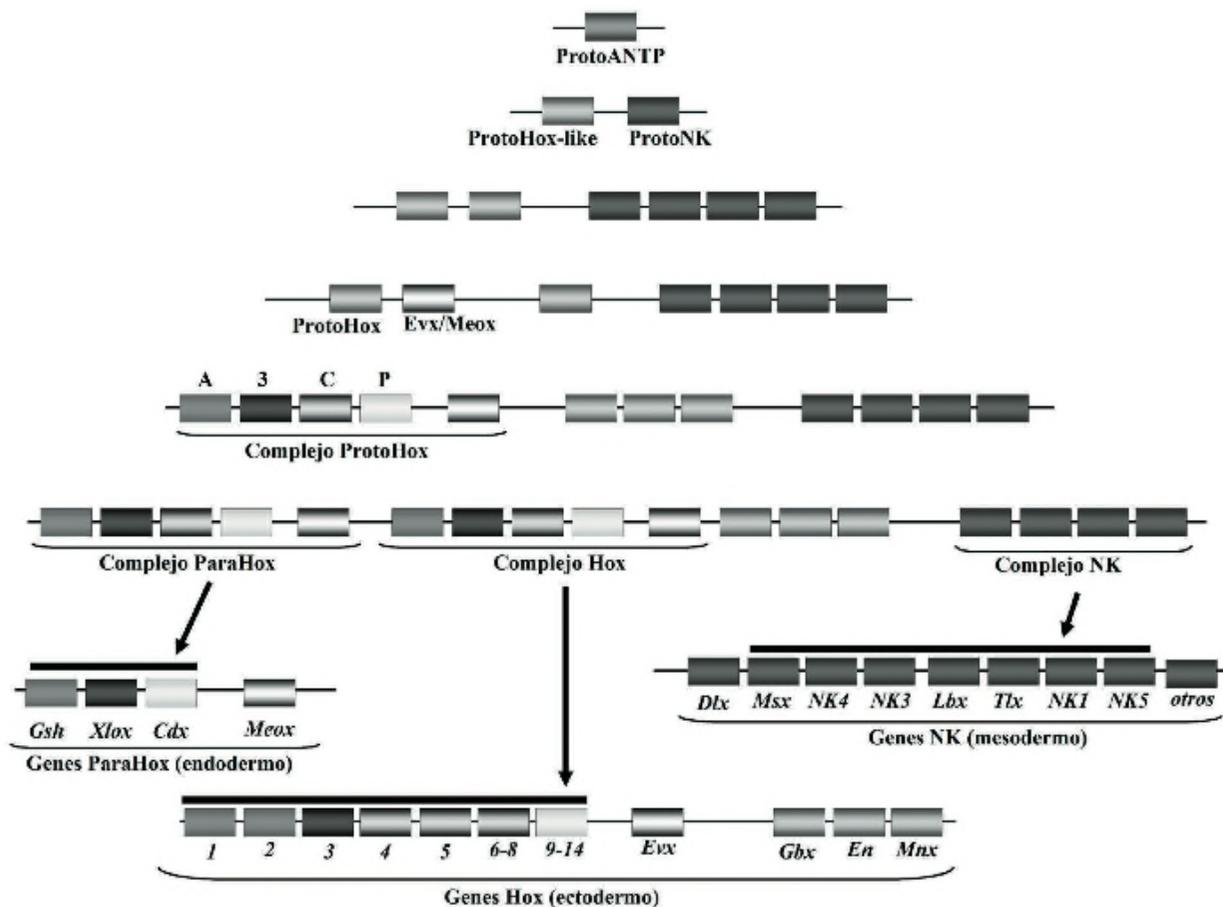
eran los llamados *Hox*, y pertenecían a una gran familia de genes codificantes de factores de transcripción (los genes *Homeobox*), caracterizados por poseer un dominio común de 60 aminoácidos, el llamado «homeodominio», a través del cual estas proteínas interaccionan con el ADN. Los genes *Hox* contribuyen al establecimiento de un patrón espacial a lo largo del eje anteroposterior del animal. Es decir, determinan lo que será «anterior», «medio» o «posterior» y, en los casos en los que existe metamería (existencia de elementos corporales repetidos, como los segmentos de los artrópodos o nuestros somitos embrionarios), los genes *Hox* participan en el establecimiento de su identidad. Por eso, determinadas mutaciones en los genes *Hox* hacen que un

segmento adquiriera las características de otro (mutaciones homeóticas).

Una sorprendente característica de los genes Hox es su ligamiento físico. En efecto, suelen estar agrupados en un mismo cromosoma, formando lo que se llama el «complejo» Hox. Es decir, que a pesar de casi mil millones de años de evolución animal, con multitud de acontecimientos evolutivos en el genoma, estos genes han permanecido generalmente agrupados, demostrando que dicha agrupación es esencial para el desarrollo. Por si eso fuera poco, los genes *Hox* muestran también el enigmático fenómeno de la «colinealidad espacial». Esto quiere decir que no sólo están en el mismo cromosoma, sino que, además, su orden en el mismo corresponde al orden de expresión en el eje anteroposterior del animal. En concreto, los genes del extremo 5' se expresan en la parte más posterior del animal, mientras que los del extremo 3' se expresan en la más anterior. En algunos animales, incluso, existe una colinealidad temporal además de la espacial. En los vertebrados, por ejemplo, los genes *Hox* se van expresando ordenadamente desde la parte anterior del cuerpo hasta la parte posterior. Otra notable característica de los vertebrados es que en sus orígenes se produjeron dos trans-duplicaciones¹ del complejo

original de genes Hox, con lo que contamos con cuatro complejos parálogos denominados HoxA, B, C y D. Los genes *Hox* proporcionan, por tanto, una base común para el estudio de la organización del cuerpo de todos los animales, al menos a lo largo de su eje anteroposterior. Sin embargo, es muy poco lo que se sabe acerca de su origen y su evolución. Por otro lado, tampoco se conocen bien las relaciones que pueden existir entre el complejo de genes *Hox* y otros genes *Homeobox* pertenecientes a la clase ANTP que recientemente se ha demostrado que también se agrupan en complejos. Me refiero a los genes *ParaHox* y a los genes *NK*, que sólo aparecen formando complejos en algunos linajes animales, pero no en otros, como luego veremos.

Sirva esta breve introducción para presentar el excelente artículo de revisión que ha publicado en *Nature Reviews in Genetics* Jordi García-Fernández, Catedrático de Genética en la Universidad de Barcelona y uno de nuestros mejores especialistas en la disciplina emergente conocida como *Evo-Devo*, que estudia las relaciones entre evolución y desarrollo embrionario. Ese artículo va a constituir, sin duda, una referencia obligada para todo lo relacionado con la evolución de los complejos de genes *Homeobox* [García-Fernández, *Nat Rev Genet*, 6:881-892 (2005)].



Pie de figura: La figura muestra un posible modelo evolutivo para los genes homeobox de la clase ANTP. Sucesivas duplicaciones a partir de un gen ancestral (proto-ANTP) dieron lugar a los genes protoHox y ProtoNK, primero, y más tarde a los complejos ParaHox, Hox y NK. Las barras gruesas horizontales indican los límites de los complejos. Modificado de García-Fernández (2005).

Vamos a resumir aquí brevemente los modelos evolutivos que propone este trabajo, cuya lectura recomendamos vivamente a todos los interesados en el tema.

El complejo Hox

Este es el complejo clásico, formado por un número variable de genes que pueden ser clasificados en cuatro grupos, Anterior, Grupo 3, Central y Posterior, denominaciones que corresponden, dado el fenómeno de colinealidad, con su posición en el cromosoma y también en el eje anteroposterior del cuerpo. Es probable que los metazoos más primitivos tuvieran sólo cuatro genes en el complejo *Hox*, correspondientes con cada uno de los grupos antes citados. Hay que señalar que en los cnidarios (pólipos y medusas) sólo hay dos genes (de los grupos Anterior y Posterior), aunque esto ha sido discutido recientemente [Chourrout et al., *Nature*, **442**:684-7 (2006)]. Por sucesivas cis-duplicaciones de los cuatro genes primitivos (en especial del Central) se originaría el patrón probablemente compartido por los bilaterales primitivos, ancestrales de protóstomos y deuteróstomos. Este patrón consistiría en 7 a 9 genes *Hox*, número que se estabiliza en ocho en la mayor parte de los protóstomos (dos anteriores, uno del grupo 3, cuatro centrales y uno posterior), y se expandiría hasta 12 o 14 en los deuteróstomos. Esta expansión del grupo Central se ha asociado al fuerte incremento en la diversidad de los bilaterales que se conoce con el nombre de «Explosión Cámbrica». La mayor parte de los vertebrados, como ya hemos dicho, tenemos además dos trans-duplicaciones consecutivas de un complejo original formado por 14 genes *Hox* (dos anteriores, uno del grupo 3, cinco centrales y seis posteriores). Así, aunque en teoría podríamos tener 56 genes *Hox* (14 x 4), la pérdida de varios de ellos nos ha dejado a los mamíferos con 39. En los peces teleosteos se han producido incluso más trans-duplicaciones, llegando a la cifra asombrosa de 14 complejos.

El complejo ParaHox

Tres genes *Homeobox* (*Cdx*, *Gsh* y *Xlox/lpf1*) se incluyen en este complejo y, durante un tiempo, se pensó que eran genes *Homeobox* «dispersos» de los que existen otros ejemplos conocidos, más o menos próximos al complejo *Hox* (p.e. *Engrailed* o *Gbx*). Sin embargo, en 1998, Nina Brooke, Jordi García-Fernández y Peter Holland descubrieron que estos genes formaban un complejo en el genoma de *Amphioxus*, probablemente con una cierta colinealidad espacial y temporal (aunque la temporal parece estar invertida: ¡El gen posterior *Cdx* se expresa antes que los demás!) [Brooke et al., *Nature*, **392**:920-922 (1998)]. La interpretación inmediata es que el complejo *ParaHox* habría surgido de una duplicación ancestral de un complejo *Hox* original, denominado «ProtoHox», antes incluso de la separación de los linajes de Cnidarios y Bilaterales. El complejo *ProtoHox* tendría probablemente cuatro genes como el *Hox* ancestral, perdiéndose el del grupo Central en el complejo *ParaHox*. A partir de la división, cada complejo habría evolucionado de forma diferente, con numerosas duplicaciones en el complejo *Hox*, mientras que el *ParaHox* no habría aumentado su tamaño, e incluso

se habría desintegrado en muchos linajes. Otras hipótesis señalan que el complejo *ProtoHox* pudo ser más pequeño, con dos o tres genes. En cualquier caso la idea es que el complejo *ProtoHox* debió originarse por cis-duplicaciones de un primer gen *Homeobox* ancestral, como más adelante veremos.

El complejo NK

Fue originalmente descubierto en *Drosophila* [Kim y Nirenberg, *PNAS*, **88**:7716-20 (1989)] como un conjunto de tres genes (*NK1*, 3 y 4, también llamados *slouch*, *bagpipe* y *tinman*) agrupados en un mismo cromosoma. Un cuarto gen de la misma familia (*NK2* o *vnd*) está separado de los demás y no pertenece al complejo. Cerca de este complejo se localizaron otros genes (*C15/Hox11* y dos genes *ladybird*) que, junto con *Msh* (*Muscle-specific homeobox*) y un *NK5* descubierto más tarde, constituyen lo que debió ser un complejo ancestral de siete genes NK, ya existente antes de la separación entre Protóstomos y Deuteróstomos. Existen genes NK en vertebrados (*Nkx*, *Msx*, *Lbx* y *Tlx*, ortólogos de los NK, *Msh*, *Ladybird* y *C15/Hox11*, respectivamente), aunque el ligamiento entre ellos se mantiene de forma muy parcial, y no forman un auténtico complejo. Entre ellos podemos destacar *Nkx2.5*, un gen clave para el desarrollo cardiaco, ortólogo de *tinman*. Por cierto, que el nombre *tinman* (hombre de hojalata) hace referencia al personaje de «El mago de Oz» que carecía de corazón, precisamente porque *tinman* es esencial para el desarrollo cardiaco en *Drosophila*.

El origen de los complejos Homeobox

Llegados a este punto, Jordi García-Fernández propone un interesante modelo para el origen y evolución de los complejos *Hox*. Este autor sugiere que en los comienzos de la evolución de los metazoos existió un gen fundador (*ProtoANTP* o *Protoantennapedia*) que por cis-duplicación dio lugar a dos genes, *ProtoHox* (el ya mencionado ancestral común de los complejos *Hox* y *ParaHox*) y *ProtoNK*. Cada uno sufrió sucesivas amplificaciones por cis-duplicación dando lugar a un «megacomplejo» que finalmente se fragmentó en los tres complejos *Hox*, *ParaHox* y NK. Este megacomplejo debió estar ya presente antes de la separación entre cnidarios y bilaterales, ya que existen representantes de los tres complejos en cnidarios. En las esponjas no se han encontrado genes *Hox* o *ParaHox* definidos aunque, sorprendentemente, sí hay genes NK, lo que sugiere que el megacomplejo pudo aparecer antes incluso de la separación entre las esponjas y los demás animales, y que los genes de los complejos *Hox* y *ParaHox* se perdieron en el linaje de las esponjas.

Complejos Homeobox y hojas blastodérmicas

Los animales bilaterales se desarrollan a partir de tres hojas blastodérmicas, ectodermo, mesodermo y endodermo. Pues bien, es sorprendente constatar que los genes de cada uno de los complejos *Homeobox* tienen una expresión predominante (aunque no exclusiva) en los derivados de una hoja blastodérmica diferente. Así, los genes *Hox* se expresan sobre todo en el ectodermo y el neuroectodermo, contribuyendo al establecimiento de patrones en el sistema

nervioso central de los vertebrados. Más tarde, también se expresan en el desarrollo de muchos otros órganos, incluidas las vísceras endodérmicas y el mesodermo de los miembros pares, donde también contribuyen a formar el patrón espacial. Los genes del complejo NK contribuyen en buena medida a establecer patrones en el mesodermo, especialmente en *Drosophila*, y son fundamentales para el desarrollo cardíaco de los vertebrados, como antes hemos dicho. Los genes ParaHox *Cdx* y *Xlox* se expresan sobre todo en endodermo posterior y medio, respectivamente, y los genes *Cdx* son esenciales para la morfogénesis del intestino en los vertebrados. *Gsh* se expresa en el páncreas adulto, aunque también lo hace en el neuroectodermo.

La idea es audaz y tentadora: tres complejos Homeobox especializados en la organización y la formación de patrones de las tres hojas blastodérmicas que caracterizan a los bilaterales. Sin embargo, esta idea se enfrenta a una dificultad inmediata: ¿Por qué hay genes de los tres complejos en cnidarios, que son animales diblásticos, es decir, sin mesodermo?

La respuesta a esta cuestión podría llevarnos a reconsiderar incluso el carácter y la posición filogenética de los cnidarios. En efecto, recientes trabajos [Finnerty et al., *Science*, **304**:1335-7 (2004); Matus et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**:11195-200 (2006)] han mostrado que los cnidarios pueden haber adquirido su simetría radial de forma secundaria a partir de ancestrales bilaterales. Como hemos dicho antes, los cnidarios sólo expresan dos genes del complejo Hox, de los grupos Anterior y Posterior. Pues bien, el Anterior se expresa cerca del blastoporo y el Posterior en el extremo contrario. Esto sugiere que el eje oral-aboral de los cnidarios debe ser homólogo al eje anteroposterior de los bilaterales. Más interesante aún, el gen *Dpp* (*Decapentaplegic*), que marca la posición dorsal de los protóstomos y la ventral de los deuteróstomos, se expresa de forma asimétrica en los cnidarios, a un lado del blastoporo [Finnerty et al., *Science* **304**:1335-7 (2004)]. El lugar de expresión coincide con uno de los extremos del llamado «eje director», una especie de atisbo de simetría bilateral que había sido poco tenido en cuenta hasta ahora y que es más aparente en los pólipos que en las medusas. Por tanto, la existencia de representantes de los tres complejos Homeobox en los cnidarios y la expresión asimétrica de los genes que determinan el eje dorsoventral de los bilaterales sugieren A) que los cnidarios podrían derivar de ancestrales bilaterales triblásticos y B) que la organización bilateral triblástica podría ser primitiva en los eumetazoos (el grupo de los animales exceptuando a las esponjas y los placozoos). Los cnidarios habrían adquirido la simetría radial de forma secundaria, del mismo modo que lo hicieron los equinodermos, y su mesodermo habría quedado fuertemente reducido en el curso de la evolución.

¿Que ocurre con las esponjas? Si los cnidarios derivan de los bilaterales, en ellas debería estar la clave del origen

de los metazoos y la pluricelularidad. Como dijimos antes, es sorprendente que los genes Homeobox de las esponjas se limiten a unos pocos genes NK, y no se hayan detectado genes que puedan encuadrarse claramente en los complejos Hox o ParaHox, bien porque se hayan perdido o porque su divergencia los haya hecho indetectables. No ha faltado quien afirme que la larva plánula de esponjas tiene una organización próxima a los bilaterales, y que todos los bilaterales podrían derivar de formas larvarias de esponjas por un fenómeno de neotenia (retención de características larvarias en el momento de la adquisición de madurez sexual) [Maldonado, *Inv Biol* **123**:1-22 (2004)]. Si esto es así, es probable que no podamos nunca identificar, entre los organismos actuales, un metazoo basal, no bilateral. La única esperanza estaría en los placozoos, organismos muy simples y presuntamente primitivos, en los que se ha identificado un único gen Hox (*Trox-2*) que podría representar un ancestral Hox o ParaHox [Jakob et al., *Dev Gene Evol*, **214**:170-5 (2004)].

Conclusión

En resumen, Jordi García-Fernández propone el siguiente modelo sobre el origen y evolución de los genes Hox. Un primer gen Homeobox fundador habría sufrido una serie de duplicaciones generando tres complejos de los cuales el complejo Hox ha mantenido más su integridad, mientras que los ParaHox y NK se han mantenido agrupados sólo en algunos linajes. Es concebible que la formación de estos tres complejos estuviera ligada al origen de las tres hojas blastodérmicas que desarrollan diferentes especificidades funcionales: ectodermo para el recubrimiento corporal y las funciones de relación (sentidos/sistema nervioso), endodermo para el procesamiento del alimento y mesodermo para la locomoción, circulación, excreción, etc. Esta propuesta va ligada a la consideración de que los cnidarios deben ser secundariamente radiales y diblásticos. Por supuesto que quedan interrogantes, en especial relacionados con el significado de la colinealidad espacial y temporal. ¿Por qué ciertos grupos de genes han permanecido unidos en el genoma en diferentes linajes a lo largo de cientos de millones de años? ¿De dónde procedió el primer gen Hox? ¿Quizá de protozoos? ¿Cuál era su función primitiva? Modelos evolutivos como los aquí expuestos podrían ser poderosas herramientas para responder a estas preguntas. En cualquier caso, lo que es seguro es que las respuestas no dejarán de sorprendernos.

Notas

¹ **Trans-duplicaciones:** duplicaciones que dan lugar a dos genes o conjuntos de genes situados en distintos cromosomas. **Cis-duplicaciones:** duplicaciones que dan lugar a dos genes situados sobre el mismo cromosoma, uno a continuación del otro.