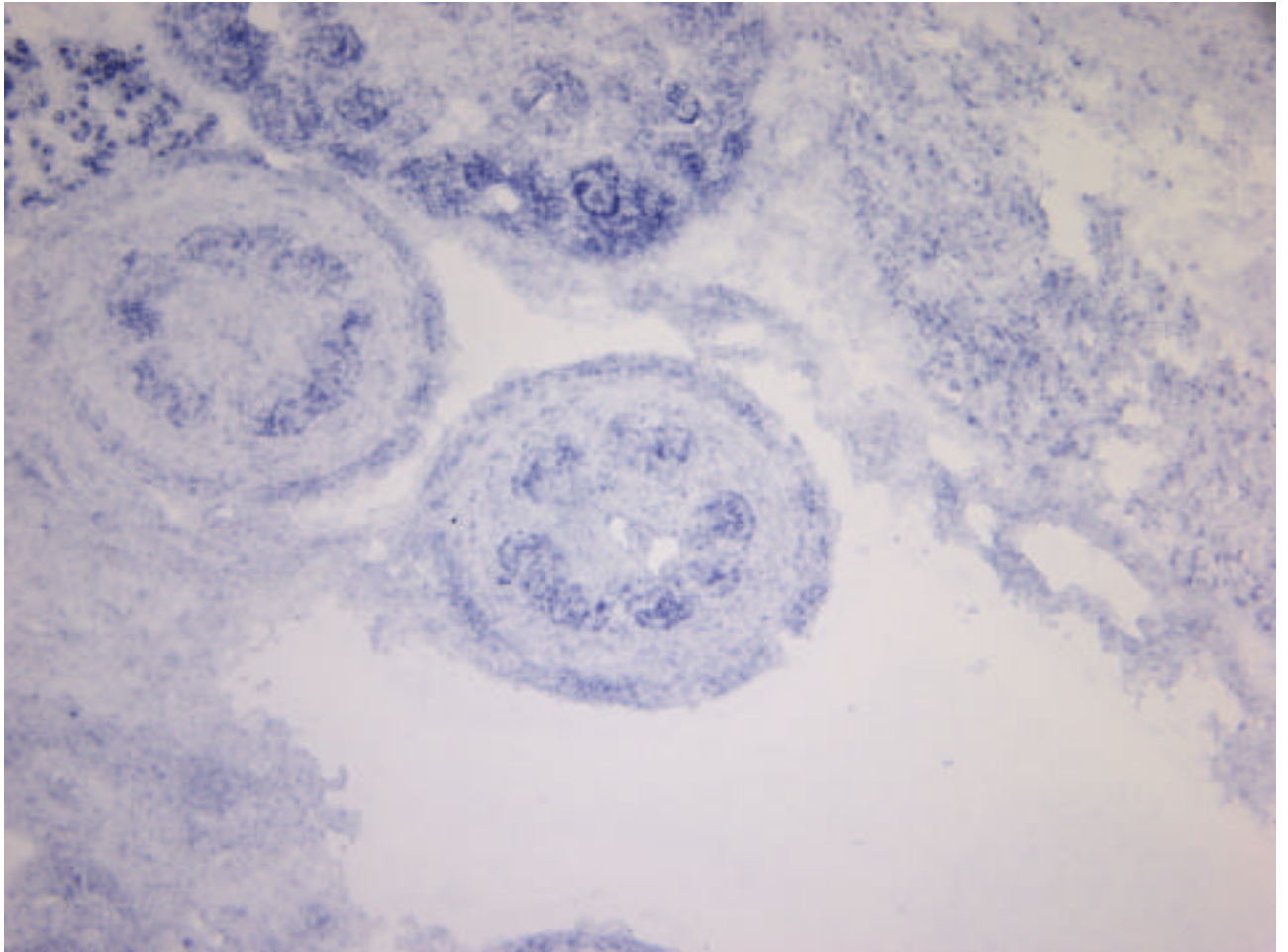


DETECCIÓ I ESTUDI DE GENS IMPLICATS EN EL DESENVOLUPAMENT PRENATAL DE LA RATA



Pere Jordi Fàbregas i Batlle

Setembre de 2001

Als meus pares

A la Glòria

Al Guillem i l'Oriol

AGRAÏMENTS

Aquest humil treball, no hagués estat possible sense tantes i tantes persones que en el seu compartir la vida amb mi m'han donat aquell goig, aquella il·lusió i aquella força sense la que no es pot treballar ni viure.

Als meus directors de tesi: el Dr. Miquel Àngel Peinado i el Dr. Josep Nebot Cegarra, que hagués fet jo sense ells?

Gràcies Miquel Àngel per acollir-me en el teu grup i des del primer dia fer-me sentir com un més, com a casa. Gràcies per tot el que m'has ensenyat, per fer-me *veure dins dels eppendorfs* per comprendre una mica el que passa a les PCRs, gràcies per la teva senzillesa, per la teva proximitat i pel teu sentit de l'humor, m'ha encantat coneixe't i espero poder continuar l'amistat i la recerca per molts anys.

Gràcies Josep per la teva il·lusió, pel teu coratge, per la teva equanimitat i rigor científic perquè has compensat la meua *despreocupació* moltes vegades excessiva, gràcies pel teu sentit de l'humor, perquè sempre m'has fet costat i per tot el que m'has ensenyat d'embriologia. Espero que puguem compartir molts anys més.

Al Dr. Gabriel Capellà, ell és el pare de la idea, ell em va engrescar a entrar en el *món molecular* quan jo no sabia el que era una PCR, ell m'ha seguit animant sempre i no ha perdut en cap moment l'esperança en el projecte, gràcies Gabi.

Ara a la *penya*: Primer GRÀCIES A TOTS I PER TOT, m'ho he passat genial, han estat uns anys de compartir i de "fer pinya" molt macos, però tampoc s'han acabat... Gràcies Jordi per la teva amistat, per la teva companyia, perquè en els moments difícils m'has fet costat, i perquè sempre has estat disposat a deixar-ho tot per donar "un cop de mà", per tants moments genials com el del John Cale i, sobretot, perquè si hi ha un problema sabem el que s'ha de fer amb el Bisulfit.

Gràcies Elisenda per la teva amistat, per la teva simpatia, per la teva disponibilitat a ajudar, per grabar *gratis* els CDs, per tantes partides de ping pong, per tantes moments *Colgate* i perquè malgrat ser de la UB, saps reconèixer els encants de la UAB.

Gràcies Gemma per ser la millor *vesina*, per la teva sinceritat i senzillesa, per ensenyar-me tantes coses al lab i per portar sempre sandàlies maques a l'ascensor.

Maria!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!, ets genial, gràcies per la marxa que portes, per ser l'espontaneïtat Eivissenca feta dona i per la teva inquietud científica, m'hi jugo un sopar a que publiques *un Nature*, va o no?.

Per les amigues d'ultramar: Rosana gracias por tu sonrisa, por tu dulzura, por tu manera de ver las cosas *con el corazón*, por tantas charlas interesantes, por los viajes en coche a la UAB i por pocas pero intensas "cantatas" de guitarra. Laia m'encanta la teva despreocupació, la teva tranquil·litat, ho contagies i gràcies també per ensenyar-me el bar "Flor de Neu". Gemma Tarafa, gràcies per la teva senzillesa i pel teu inconformisme.

Antònia, la part tècnica de la tesi l'has inspirat tu, sempre m'has ajudat a resoldre els problemes, has fet *fàcil el difícil* i m'has donat confiança. Gràcies per compartir tants moments divertits de converses i cançons i pels cafès amb gel.

A l'Anna, per la seva simpatia i sentit de l'humor, endavant Anna!!!!, al Marc i el Pedro, heu estat companys genials, m'ho he passat molt bé amb vosaltres. A l'Anna i a la Mireia, sou l'exemple de la gent *ferma que hi ha a Catalunya*, gràcies per tants bons esmorzars junts.

A la Dra. Àngels Fabra, sempre m'he trobat bé amb tu, gràcies per obrir-me les portes del CIM.

A l'Olga Mendez, a la Laura, a la Yolanda, a la Sandra, a l'Antonio i a la Dra. Àngels Sierra, gràcies per ser excel·lents companys de laboratori, per tantes *xerrades*, descansant de l'ordenata i perquè gràcies als tiquets que m'heu comprat, estic viu.

A la Mònica per donar aquella *canya de bon rollu*, per confiar en la meua capacitat estadística, je, je, seria la amiga ideal si no fos tant *punyetera* jugant al ping-pong.

Als que han passat pel laboratori i ens han deixat alguna cosa d'ells: la Bea, en Joan, en Bin Gu (Today I'm very *kasui*), en Bo Shi, en Fei Sung, en David, en Jorge,...

A l'Agnès, la mare de la HIS, gràcies per tot el que m'has ajudat i perquè, amb la teua alegria habitual, m'has fet tants espais a la teua *difícil* agenda.

A l'Olga Campos, gràcies per la teua manera de ser, passant sempre *sense fer soroll*, però acompanyant tant !!!!!!!!!!!..

A la Glòria, ets genial, gràcies per estar sempre al costat i per confiar tantes vegades en mi.

A la Sara, per tants bons consells i per estar sempre disposada *a ajudar al que no sabe*.

A l'Esther, la Mar, la Bibi, la Neus, la Mireia, el Felip, la Nayana, i a tots els que m'heu ajudat a gaudir d'hibridacions en companyia. A la Dra. Nati Rocamora, tu em vas ajudar en moments difícils de les *hibridacions*, i em vas ensenyar un bon camí, Gràcies.

A l'Aurora, per tantes converses, per tants dinars junts. A la Mari: A ver si consigues la cabra. A la Blanca, i la Mila i tanta gent de l'IRO que m'heu fet la vida més agradable.

Al professor Josep M^a Domènech i Mateu pel seu entusiasme contagiós per la ciència, gràcies. A tots els companys que m'han fet costat aquests anys i no s'ha queixat mai de que em passés més temps a l'IRO que a la UAB: Al Dr JR Sañudo, a la Dra. R Mirapeix, a la Eva Maranillo, al Dr. A Rodríguez, al Dr. J Reig, al Dr. F Reina i al Dr. M Roig, gràcies per la paciència. A la secre: la M^a del Mar, gràcies per fer-me costat en moments de trasbalsos *burrocràtics*, a la Sra. Angelita Blas pel suport tècnic, al Manel i la Isabel per la seva ajuda sempre incondicional.

Als d'Histologia perquè són els meus pares i germans en la Ciència: En Bernardo, la Berta, l'Ishar, en José, la Laia, l'Olga Sanz i l'Olga Hospital, en Jaume i en Miguel que si no fos del Madrid seria un *paio* perfecte.

Als que m'ha ensenyat a fer la HIS: El Dr. Eduardo Soriano per obrir-me les portes del seu laboratori, a la Dra. Soledad Alcántara per donar-me tant temps pel *Consultori*. A la Dra. Anna Planas, la Dra. Teresa Vilaró i en Jordi Serrat del CSIC que ens ho varen ensenyar i explicar tant bé.

Als alumnes del grup d'embriologia pel seu entusiasme i l'ajuda en les diferents fases del treball, especialment a la Roser Icard, que em va ajudar molt en les RAPs i fins i tot una nit varem *lligar* (bandes, vàrem lligar bandes!!!!)

A tots els alumnes de la Facultat de Medicina per tant de *bon rollu i tanta energia positiva* que m'han transmés.

A tots els que hem descuidat i que estimo, gràcies.

I a vosaltres, els meus pares, tot el que sóc us ho dec: Piter i Anna M^a, gràcies per donar-me la vida i estimar-me tant.

I per últim Glòria, Guillem i Oriol, vosaltres doneu llum i sentit a la meva vida. GRÀCIES.

ÍNDIX D'ABREVIATURES

DD: Differential display

FISH: Fluorescent "in situ" hybridization

HE: Tinció d'Hematoxilina-eosina

HIS: Hibridació "in situ"

HSF: Heat shock factors

hsp: Heat shock protein

ME: matriu extracel·lular

MME: molècules de la matriu extracel·lular

mRNA: Àcid ribonucleic missatger

pb: parell de bases

PCR: Polimerase chain reaction

PCR: reacció en cadena de la polimerasa

RAP-PCR: RNA arbitrarily primed PCR

rRNA : Àcid ribonucleic ribosòmic

SNC: sistema nerviós central

tRNA: Àcid ribonucleic de transferència

ÍNDIX DE FIGURES

Figura 1. Dibuix de un fetus dins l'úter. Leonardo Da Vinci	pàg 4
Figura 2. <i>Arabidopsis thaliana</i>	pàg 8
Figura 3. <i>Drosophila Melanogaster</i> amb una triple mutació	pàg 8
Figura 4. <i>Caenorhabditis elegans</i>	pàg 9
Figura 5. Peix Zebra	pàg 9
Figura 6. <i>Xenopus laevis</i>	pàg 10
Figura 7. Embrió de pollastre de 20 somites.....	pàg 10
Figura 8. Ratolí. <i>Mus musculus</i>	pàg 11
Figura 9. Rata (<i>Rattus Norvegicus</i>). Fetus de 17,5 dies.....	pàg 11
Figura 10. Comprovació de la qualitat del RNA	pàg 48
Figura 11. Gel d'Acilamida per evaluar la qualitat decDNA de les bandes	pàg 51
Figura 12. Gel d'Acilamida al 6% previ al lligatge.....	pàg 52
Figura 13. Gel d'acilamida per comprobar les característiques dels clons	pàg 53
Figura 14. Fragment de la seqüència automàtica de la banda F8	pàg 55
Figura 15. Miniprep clons congelats. Els inserts estan en Plasmidi pCR2.1	pàg 56
Figura 16. Digestió amb XbaI i Hind III dels plasmidis pCR 2.1	pàg 56
Figura 17. Clons de F8 després del lligatge.....	pàg 57
Figura 18. Plasmidis (SK), contenint l'insert, linealitzats	pàg 58
Figura 19. Comprovació de la qualitat de la <i>ribosonda</i>	pàg 59
Figura 20. Dot Blot	pàg 60
Figura 21. Patró de bandes generat amb el <i>primer</i> D4S2912-GT	pàg 67
Figura 22. Homologies de la banda F8 a 14q32.31	pàg 71
Figura 23. Fragment de 14q32.31	pàg 71
Figura 24. Homologies de G0 a 5q34 (UCSC).....	pàg 74
Figura 25. Homologies de la seqüència G1 en un idiograma humà	pàg 76
Figura 26. Homologies de M2 a 3q29 (UCSC).....	pàg 80
Figura 27. Homologies de la seqüència O1 en un idiograma humà.....	pàg 85
Figura 28. Homologies d'O1 a 3p24.1 (UCSC)	pàg 85
Figura 29. Homologies d'O1 a 19p12 (UCSC)	pàg 86

ÍNDIX DE QUADRES

Quadre 1: Moments clau de la biologia del desenvolupament	pàg 5
Quadre 2: Fases del desenvolupament.....	pàg 6
Quadre 3: Esquema del procés seguit en l'estudi.....	pàg 65

ÍNDIX DE TAULES

Taula 1. Resum dels resultats de la seqüenciació	pàg 86
Taula 2. Patró d'expressió de F8 (Hibridació "in situ")	pàg 87

ÍNDEX DE LÀMINES

Làmina 1.....	pàg. 89
Làmina 2.....	pàg. 90
Làmina 3.....	pàg. 91

ÍNDEX

PRÒLEG	2
INTRODUCCIÓ.....	4
1. INTRODUCCIÓ A L'ESTUDI DEL DESENVOLUPAMENT	4
1.1. Antecedents històrics.....	4
1.2. Biologia del desenvolupament. Punt de trobada entre l'embriologia i genètica	6
1.2.1 Concepte i marc d'actuació	6
1.2.2 Períodes del desenvolupament.....	6
1.3. El <i>material</i> per estudiar el desenvolupament	7
1.3.1. La primera elecció: humà o models biològics	7
1.3.2. Models biològics. L'elecció d'un model	8
1.4. Embriologia genètica comparada.	12
1.4.1. Embriologia descriptiva i comparada	12
1.4.2. Comparant seqüències. Bases de dades	13
2. DEL DNA A L'EMBRIÓ.....	15
2.1. Genoma. DNA genòmic i DNA mitocondrial	15
2.2. Expressió gènica. Del gen a la proteïna	16
2.2.1. El dogma de la biologia molecular: l'eix DNA-RNA-Proteïna	16
2.2.2. La maquinària de la transcripció	17
2.2.3. Regulació de la transcripció	18
2.2.3.1. Estimuladors (enhancers)	18
2.2.3.2. Factors de transcripció	18
2.2.3.3. Regulació epigenètica	19
2.2.3.3.1 Metilació	19
2.2.3.3.2. Altres	20
2.2.4. Transcripció del DNA a RNA	21
2.3. Modificacions posttranscripcionals	21

2.4. Traducció del RNA m a proteïna. Regulació postraduccional	22
3. EL PROGRAMA DEL DESENVOLUPAMENT	23
3.1. Adquisició del programa del desenvolupament	23
3.2. Diàleg cel·lular. La base del desenvolupament	24
3.2.1. Mecanisme de senyalització cel·lular	24
3.2.2. Senyals característiques del desenvolupament: Morfògens	25
3.2.3. Mecanisme de senyalització per contacte cèl·lula-cèl·lula i cèl·lula-matriu extracel·lular.	26
3.2.3.1. Epiteli i mesènquima: dues maneres diferents d'entendre la relació amb l'entorn	26
3.2.3.2. Transicions epiteli-mesènquima	27
3.3. Mecanismes del desenvolupament	28
3.3.1. Formació d'un patró corporal: organització de l'embrió	28
3.3.1.1. Determinació dels eixos corporals	28
3.3.1.2. La gastrulació. Formació de les capes germinals	30
3.3.1.3. Diferenciació segmentària de l'embrió	31
3.3.1.4. Organització axial de l'embrió	32
3.3.2. Diferenciació cel·lular	33
3.3.3. Morfogènesi	34
4. EL CONEIXEMENT DEL DESENVOLUPAMENT COM A EINA PER ENTENDRE EL CÀNCER	35
4.1. El càncer és una alteració genètica de la maquinària del desenvolupament	35
4.2. Gens del càncer-gens del desenvolupament.....	36
4.3. Stem cells: el substracte de la transformació	37
5. ESTRATEGIES DE DETECCIÓ DE NOUS GENS EXPRESSATS EN EL DESENVOLUPAMENT	37
5.1. Tècniques basades en la hibridació diferencial	37
5.2. Tècniques basades en l'estratègia del fingerprinting	38
5.2.1. Bases teòriques	38

5.2.2. Fonaments tècnics	38
5.2.3. Tècniques basades en el fingerprinting	39
5.2.4. Avantatges i desavantatges de les tècniques de fingereprinting	40
5.2.5. RNA Fingerprinting i desenvolupament	40
OBJECTIU	43
MATERIAL I MÈTODES	45
1. OBTENCIÓ DEL MATERIAL FETAL	45
1.1 Espècie i soca estudiada	45
1.2. Procediments realitzats amb rates gestants	45
1.2.1. Selecció de femelles, acoblament, gestació	45
1.2.2. Eutanàsia	46
1.2.3. Laparatomia, histerectomia i obtenció de mostres maternes	46
1.3. Procediments realitzats amb els fetus	46
1.3.1. Extracció dels fetus	46
1.3.2. Obtenció de mostres fetals. Tècnica de microdissecció. Conservació	46
1.3.4. Tractament dels fetus per a la HIS.....	47
2. EXTRACCIÓ DEL RNA	48
3. RT-PCR	49
3.1. Retrotranscripció (RT)	49
3.2. PCR	49
3.3. Electroforesi dels productes de la PCR	50
3.3.1. Característiques de l'electroforesi	50
3.3.2. Autoradiografia	50
3.3.3. Tinció de Plata	50
3.4. Anàlisi dels resultats. Retall i elució de bandes	51
3.4.1. Anàlisi dels gels d'acrilamida 4	51
3.4.2. Retall de les bandes del gel d'acrilamida. Elució	51
4. CLONACIÓ DE LES BANDES. SEQÜENCIACIÓ	51

4.1. Amplificació de les bandes	51
4.2. Lligatge	52
4.3. Transformació. Creixement de colònies i selecció de clons	53
4.4. Anàlisi dels clons seleccionats	53
4. 5. Seqüenciació	54
5. HIBRIDACIÓ IN SITU	56
5.1. Preparació de les sondes per la HIS	56
5.2. Síntesi de la Ribosonda	58
5.3. Comprovació de la quantitat i qualitat de les ribosondes.	59
5.3.1. Gel d'Agarosa a l'1%	59
5.3.2. Dot Blot	59
5.4. Protocol d'Hibridació in situ	60
6. ANÀLISI BIOINFORMÀTICA	64
RESULTATS.....	67
1. PATRÓ DE BANDES RESULTANT DE LA AMPLIFICACIÓ RAP-PCR	67
2. SEQÜÈNCIES RESULTANTS DE LA CLONACIÓ DE BANDES RETALLADES	68
2.1. Seqüència E3	69
2.2. Seqüència F8	70
2.3. Seqüència GO	73
2.4. Seqüència G1	75
2.5. Seqüència H3	77
2.6. Seqüència J2	78
2.7. Seqüència M2	79
2.8. Seqüència N0	81
2.9. Seqüència N1	82
2.10. Seqüència O1	84
3. HIBRIDACIÓ IN SITU. PATRONS D'EXPRESSIÓ	87
DISCUSSIÓ	93

1. REFLEXIONS SOBRE LA METODOLOGIA. VALORACIÓ DE LA RAP-PCR-HIS	93
2. F8. HSP.....	94
2.1. Gen-proteïna de la hsp 90	94
2.1.1. Gen de la hsp 90. Estructura i localització	94
2.1.2. Regulació de la transcripció. Factors de transcripció	95
2.1.3. Proteïna HS 90	95
2.2. Fil-ogènia de les hsp90.	96
2.2.1. Família de les hsp90.	96
2.2.2. hsp90 i hsp90	96
2.3. Funcions de les hsp 90	97
2.4. hsp90 i desenvolupament	98
2.4.1. Implicació de la hsp90 en el desenvolupament. Revisió de la literatura	98
2.4.2. Expressió de la hsp86 en el fetus de rata	99
2.5. Hs 90 i càncer	101
2.5.1. Implicació de la hsp 90 en el càncer.....	101
2.5.2. Relació existent entre tumorigènesi i localització de la sonda F8 en la HIS	102
3. G0. UNA CHAPERONINA AMB FUNCIONS DE GEN SUPRESSOR DE TUMORS ..	103
4. DESENVOLUPAMENT I PATOLOGIA CONGÈNITA. M2. GEN DE L'ATRÒFIA ÒPTICA	104
5. O1. LA COMPLEXITAT DEL GENOMA	105
6. DESENVOLUPAMENT I CÀNCER. GENS DEL DESENVOLUPAMENT I DEL CÀNCER	106
7. I ARA, CAP A ON?	107
CONCLUSIONS	109
BIBLIOGRAFIA	111

PRÒLEG

PRÒLEG

El desenvolupament és un període fascinant en la història de qualsevol ésser viu, en ell passa de ser una única cèl·lula a un organisme amb característiques pròpies i dotat d'independència dins d'un entorn del què en depèn. L'estudi del desenvolupament compta avui amb un *tandem* extraordinàriament valuós per portar a terme els seus objectius: per una banda el coneixement de la morfogènesi i l'organogènesi, procedents del camp de l'embriologia i per l'altra el de les bases de l'herència procedents de la genètica i biologia molecular. En el nostre treball hem volgut cercar respostes moleculars per a problemes morfofuncionals de manera que, a partir d'un material procedent del tub digestiu de rates en el seu període prenatal, hem cercat, amb una metodologia basada en la RAP-PCR, gens que s'expressessin durant aquests períodes. La RAP-PCR és una tècnica molt potent a l'hora de detectar l'expressió gènica diferencial, essent capaç de generar una immensa quantitat de seqüències que entapissen de dalt a baix gels d'acrilamida i de les quals inicialment només sabem si hi són o no hi són i la intensitat que tenen, però res de la seva filiació.

En aquest estudi hem seleccionat una sèrie de bandes dels gels d'acrilamida, procedents de la RAP-PCR de les mostres de tub digestiu, les hem clonat i n'hem obtingut unes seqüències que hem estudiat amb la tecnologia *in silico* al nostre abast, per poder conèixer el potencial de cadascuna d'elles i intentar comprendre la seva funció així com la seva implicació en el procés del desenvolupament. De totes aquestes seqüències, n'hem escollit una, la que corresponia a un fragment de la HSP 90 , per a realitzar la hibridació "in situ" sobre talls congelats de fetus de rata a fi de conèixer la seva expressió en tot l'organisme en l'etapa prenatal. Els resultats obtinguts ens donen diferents pistes en la implicació dels diferents gens en el desenvolupament i ens orienten d'una manera molt clara cap a la relació entre els processos del desenvolupament i el càncer. Aquest treball no es més que el començament d'una nova línia de recerca en la que, amb l'estudi interrelacionat de desenvolupament i càncer, creiem que es poden aportar respostes en ambdós camps.

Pere Jordi Fàbregas Batlle

Sabadell, setembre 2001

INTRODUCCIÓ

1. INTRODUCCIÓ A L'ESTUDI DEL DESENVOLUPAMENT

1.1. Antecedents històrics

El període més decisiu de la vida de qualsevol ésser viu és el del seu desenvolupament, quan a partir d'una única cèl·lula es forma tot l'organisme amb les característiques de la seva espècie, les pròpies de la seva ascendència familiar i les que el fan un individu únic.

L'interès pel procés del desenvolupament és ancestral. Com es pot arribar a formar un nou ésser? Durant molts segles la ciència i la filosofia, interrogant-se mútuament, poc a poc, han anat guanyant terreny a la mitologia i a la superstició en l'explicació dels mecanismes del desenvolupament. El treball il·lusionat i imaginatiu d'homes i dones, en el camp de l'embriologia i de la genètica, és el que ha posat llum a la foscor i ara podem veure amb claredat molts dels aspectes del desenvolupament; molts encara resten en la penombra esperant ésser il·luminats, però com deia Albert Einstein: "*La sensació més bella que podem experimentar és la del misteriós..., és la font de l'art i de la ciència* "



Figura 1 Dibuix d'un fetus dins l'úter. Leonardo Da Vinci

QUADRE 1: MOMENTS CLAU DE LA BIOLOGIA DEL DESENVOLUPAMENT

Hipòcrates (460-367 a.C.)

Va extrapolar el desenvolupament embrionari humà amb el de l'interior d'un ou de gallina.

Aristòtil (384-322 a.C.)

Tractat d'embriologia : Va descriure el desenvolupament del pollastre i d'altres embrions.

"L'embrió és resultat de l'activació de la sang menstrual femenina pel semen masculí"

Va proposar dues possibilitats per explicar el desenvolupament: La preformació i epigènesi

El Coràn (llibre sagrat musulmà)

"L'home es produeix com una barreja de les secrecions de l'home i de la dona"

Leonardo da Vinci (1452-1519)

1651 *De generatione animalium* : El semen masculí es transforma en un "ou" a dins de l'úter femení.

A Holanda, primera meitat del S XVII, apareixen els primers microscopis òptics

El microscopi òptic va ampliar enormement el camp de l'embriologia.

Caspar Friederich Wolf

1759 Va formular el concepte de capes embrionàries

Ham i Leeuwenhoek

1677 Van observar espermatozous humans en els que van creure que hi havia un ser humà "preformat"

Lazzaro Spallanzani

1780 Fecundació artificial. "Per a la fecundació són necessaris un òvul i un espermatozou"

Karl Ernest Von Baer (1792-1876)

Va descriure l'òcit

Llei de Baer: *Els fets generals que són comuns a un grup d'animals es desenvolupen en l'embrió abans que els fets que distingeixen als diferents membres del grup.*

Mathais Schleiden (1804-1881) i Teodor Schwann (1810-1882)

1839 Teoria cel·lular

Charles Darwin (1809-1882)

"L'origen de les espècies mitjançant la selecció natural" (24/11/1859)

Alfred Russel Wallace (1823 - 1913)

Va definir la selecció natural com la base de l'evolució però Darwin l'hi passà al davant

Wilhelm His (1834-1904)

Estudi sistemàtic d'embrions humans. Perfecciona les tècniques de microscòpia òptica i de reconstruccions embrionàries.

Franklin Mall (1862-1917)

Va iniciar la col·lecció d'embrions humans de la Carnegie

Gregor Mendel (1822-1884)

1866 Pare de la genètica. El seu treball sobre l'herència va passar completament desapercebut fins a l'any 1900

August Weismann (1834-1914)

"No s'hereten les característiques de les cèl·lules somàtiques sinó les de l'òvul i l'espermatozou (germinals)"

Eduard Van Benden

1883 Va observar que les cèl·lules germinals madures posseeixen un número reduït de cromosomes

Ernst Haeckel (1834-1919)

1899: "L'ontogènesi és una breu i ràpida recapitulació de la filogènesi"

Thomas Hunt Morgan (1866-1945) (junt amb d'altres)

Va establir que els gens es troben als cromosomes

Johann Friedrich Miescher (1844-1895)

1871. Va descriure la *nucleïna* com una substància, rica en fòsfor, en els nuclis cel·lulars

Richard Altmann (1852-1900)

1899. Rebateixa la *nucleïna* com *àcid nucleïc*

Wilhelm Johannsen (1857-1927)

1909 Va anomenar *gen* a la unitat hereditària mendeliana. Diferència entre genotip i fenotip.

Hans Spemann i Hilda Mangold

1924 Van descriure l'inducció embrionària

Avery, Mac Leod i McCarty

1944 Van identificar el DNA com el material genètic

James Watson i Francis Crick

1953 Van descriure l'estructura molecular del DNA

Rita Levi-Montalcini

1986. Premi Nobel pels seus estudis sobre factors de creixement

Edwrd B Lewis, Chirstiane Nülsslein-Volhard i Eric Wieschaus

1995. Premi Nobel pels estudis sobre el control genètic del desenvolupament

Venter et al. *The sequence of human genome. Science* 2001, 291(5507):1304-1351

1.2. Biologia del desenvolupament. Punt de trobada entre l'embriologia i genètica

1.2.1 Concepte i marc d'actuació

A la segona meitat del segle XX l'embriologia i la genètica, junt amb altres disciplines científiques, es fusionen en la biologia del desenvolupament.

La biologia del desenvolupament engloba el coneixement de tot el procés del desenvolupament, en totes les espècies vives, utilitzant metodologies que van des de les morfològiques fins a les moleculars. Avui sabem que l'estudi dels processos del desenvolupament no és complert si no relaciona els canvis morfològics amb els mecanismes biològics i moleculars subjacents.

A més, la biologia del desenvolupament és clau en la comprensió d'altres processos que comparteixen amb ella mecanismes essencials de funcionament: l'evolució de les espècies i la carcinogènesi.

1.2.2. Períodes del desenvolupament

El desenvolupament és un camí que comença a la fecundació i acaba quan el nou ésser assoleix la maduresa i és capaç de reproduir-se per perpetuar la seva espècie. El procés del desenvolupament té una durada i unes particularitats pròpies a cada espècie. No és possible fer un esquema de les fases del desenvolupament vàlid per totes les espècies però existeixen uns períodes que es mantenen amb una certa constància dins del regne animal i que descriuré en el Quadre 2.

QUADRE 2: FASES DEL DESENVOLUPAMENT

A. Desenvolupament prenatal:

1. Fecundació: Procés mitjançant el qual s'uneixen els gàmetes

2. Període embrionari

Zigot: Una cèl·lula, començament de la fase embrionària.

Segmentació: Augment exponencial del número de cèl·lules.

Blastocist: Es forma una cavitat plena de líquid a l'interior de la massa cel·lular.

Gastrulació: L'embrió passa a estar format per tres **fulles**.

Morfogènesi: Es formen les estructures corporals.

3. Període fetal: Comença quan acaba la fase embrionària. Diferenciació i creixement de les estructures corporals formades en el període embrionari.

B. Naixement: Canvi en l'entorn a on es desenvolupa l'ésser en formació.

C. Desenvolupament postnatal:

. Maduració postnatal: L'ésser viu canvia, creix i es fa progressivament independent.

. Maduració Sexual: L'ésser viu és capaç de reproduir-se

1.3. El *material* per estudiar el desenvolupament

1.3.1. La primera elecció: humà o models biològics

En el plantejament de qualsevol estudi centrat en el desenvolupament una de les qüestions més importants és decidir el material objecte de l'experimentació. La primera decisió a prendre és la de treballar amb material **humà** o utilitzar un **model biològic**.

El material humà ens proporciona un avantatge: l'ús de la nostra pròpia espècie, per tant el model ideal per la comprensió del desenvolupament humà, de la seva morfologia i de les seves anomalies congènites (O'Rahilly i Müller, 1992). El material humà, donada l'existència d'un codi ètic, no pot utilitzar-se de manera sistemàtica i el pla de treball està supeditat a les *no programables* donacions procedents d'avortaments espontanis o terapèutics. Malgrat això, existeixen excel·lents col·leccions d'embrions i fetus humans, normals i anòmals, tallats en diferents plans i tenyits amb diferents tècniques de microscòpia òptica (per exemple: Col·lecció Bellaterra, Prof. Domènech-Mateu; Col·lecció de la Carnegie de Washington o Col·lecció Boyd de la Universitat de Cambridge) que han possibilitat el desenvolupament de l'embriologia descriptiva humana i han aportat un coneixement morfogenètic a l'estudi de les malformacions congènites. Actualment s'entreu la possibilitat d'utilitzar per a la recerca embrions procedents *d'excedents* de mètodes de fertilització "in vitro", però aquesta opció encara ha de fer-se un lloc en el codi ètic i la legislació.

La segona opció és la d'utilitzar un model "no-humà" per la recerca. Aquests presenten l'avantatge d'una major versatilitat en l'experimentació que, dins també d'un codi ètic, permet realitzar tècniques d'embriologia experimental, controlar acuradament els períodes de desenvolupament i disposar d'un material en òptimes condicions de conservació. L'únic factor que pot ésser limitant és el grau de correlació entre l'espècie humana i l'espècie *objecte* de l'experimentació, però si l'objectiu és el de cercar bases biològiques del desenvolupament, realitzar estudis zoològics o estudis d'embriologia comparada, els models biològics són una eina perfecta.

1.3.2. Models biològics. L'elecció d'un model.

Quan s'ha optat per un model biològic, el següent pas és decidir quin d'ells utilitzar. Qualsevol espècie vivent pot ésser susceptible de ser utilitzada com a model, però la comunitat científica ha optat per mantenir-se "fidel" a un limitat número d'espècies doncs, d'aquesta manera, els resultats obtinguts són més comparables amb la bibliografia ja existent de la mateixa espècie.

Podem classificar els models utilitzats en desenvolupament en base a la seva localització en l'escala filogenètica.

PLANTES

Arabidopsis thaliana



Figura 2. *Arabidopsis thaliana*

L'interès per l'embriogènesi de les plantes ha augmentat en els darrers anys. Existeixen, però, marcades diferències amb els animals com són l'absència de moviments cel·lulars i d'algun procés comparable amb la gastrulació. Un model força utilitzat és *Arabidopsis thaliana*, la primera planta de la que s'ha seqüenciat el genoma complet (The arabidopsis genome initiative, 2000)

ANIMALS

Invertebrats

En el món dels invertebrats hi ha dues espècies més freqüentment emprades en estudis de desenvolupament: *Drosophila Melanogaster* i *Caenorhabditis elegans*.

Drosophila melanogaster



Figura 3. *Drosophila Melanogaster* amb una triple mutació a *abx*, *bx* i *pbx* en el complex BX

És, des de fa molts anys, el model de desenvolupament per excel·lència en invertebrats. És idoni per a fer estudis d'anàlisi de mutacions (Nüsslein-Volhard i Wieschaus, 1980) i de patrons genètics. De *Drosophila* hem après que existeix una gran conservació dels mecanismes genètics del desenvolupament entre invertebrats i vertebrats, per això després

del descobriment d'un gen a *Drosophila melanogaster* el següent pas sempre és trobar el seu *ortòleg* en altres espècies. L'exemple més espectacular d'aquest fet ens el proporcionen els gens de la família de *gens hox*, que varen ésser descoberts en *Drosophila* (McGinnis, 1984 et al.; Graham et al, 1989).

Caenorhabditis elegans



Figura 4. *Caenorhabditis elegans*

Des del punt de vista tècnic, presenta les avantatges de tenir un reduït nombre de cèl·lules i una marcada transparència dels seus embrions. És un model molt adequat per a fer estudis genètics, doncs malgrat ser un organisme filogenèticament molt primitiu, aproximadament un 50% dels seus gens estan extensament distribuïts en el regne animal i l'altre meitat presenta una distribució més restringida entre els membres propers a ell a l'escala filogenètica (Ruvkun i Hobert, 1998).

Vertebrats

En vertebrats trobem models, des del punt de vista morfològic, més propers a nosaltres.

Peixos:

Peix zebra (*Danio rerio*)



Figura 5. Peix Zebra

El peix zebra ha esdevingut un model sòlid pel desenvolupament: per la seva accessibilitat, el seu baix cost, la facilitat del seu manteniment, la facilitat amb que es reproduïx sota unes condicions adequades. A més, l'extraordinària transparència dels seus embrions permet estudiar des de l'exterior els processos que succeeixen en el seu interior, per la qual cosa és un excel·lent substrat per la Hibridació "in situ" "whole mount". Per tots aquests motius, en els darrers anys, el peix zebra s'ha convertit en un model consolidat per al desenvolupament (Kimmel, 1989; Kimmel et al., 1995).

Amfibis:

Xenopus laevis



Figura 6. *Xenopus laevis*

Xenopus laevis presenta com avantatges que els ous són molt fàcils d'obtenir en gran quantitat i poden ésser fertilitzats "in vitro", a més, aquests són molt grans i, per tant, adequats per a fer estudis de microinjecció. En *Xenopus* s'han realitzat importants estudis sobre la determinació dels eixos corporals.

Aus:



Figura 7. Embrió de pollastre de 20 somites

Els models en aus proporcionen una complexitat biològica similar a la dels mamífers amb els avantatges d'una gran facilitat d'obtenció i observació, accessibilitat per realitzar micromanipulacions i possibilitat de realitzar cultius embrionaris "in vitro". D'entre els embrions d'aus, el de Pollastre (*Gallus Gallus*) és el més emprat.

Cal destacar els experiments realitzats per **Nicole Marthe Le Douarin** utilitzant el sistema de quimeres guatlla-pollet que es basen en que les cèl·lules de guatlla japonesa (*Coturnix coturnix japonica*) tenen un prominent nuclèol que permet distingir-les amb facilitat de les de pollastre (*Gallus gallus*). Si les cèl·lules de guatlla són empeltades a un lloc homòleg de l'embrió de pollastre es desenvoluparan igual que les de pollastre però les cèl·lules que d'elles descendeixin podran ser fàcilment identificades per la *marca biològica* (Le Douarin, 1973). Amb aquesta tècnica s'ha pogut estudiar la morfogènesi del timus (Le Douarin i Jotereau, 1975), de les placodes olfàctòries, la cara i el prosencèfal (Couly i Le Douarin, 1985) o de la cresta neural (Le Douarin, 1986) entre molts d'altres.

Mamífers:

Són els models més propers al home, entre ells ratolí i rata són els més utilitzats.

Ratolí (*Mus Musculus*)



Figura 8. Ratolí. *Mus musculus*

Es el model ideal per fer estudis genètics en mamífers donada la llarga llista de treballs de genètica que s'han realitzat en ell i pel fet d'haver estat l'animal sobre el que s'han fet tots els processos de modificació genètica en vertebrats (ratolins transgènics, ratolins knock-out). El gran inconvenient del ratolí és que, com a mamífer, el seu desenvolupament es produeix dins de la mare i per tant és molt inaccessible tant per la manipulació experimental com pel seu seguiment posterior. És possible, però, realitzar cultius "in vitro" durant curts períodes de temps (Copp i Cockroft, 1990).

Rata (*Rattus Norvegicus*)



Figura 9. Rata (*Rattus Norvegicus*)
Fetus de 17,5 dies

He deixat per al final de la llista aquest model, doncs és el que nosaltres hem emprat. Com a mamífer proporciona una proximitat amb l'espècie humana. En quan al seu genoma es coneix menys que en el cas del ratolí, però en els darrers anys s'han incrementat molt els esforços en el seu coneixement (apartat 1.4.2. de la introducció). La rata ens proporciona una major similitud anatòmica, per a la microdissecció, que models animals no-mamífers i un lleuger augment de grandària, respecte al ratolí, de les diferents estructures a dissecar. Amb els embrions de rata també és possible realitzar cultiu d'embrions "in vitro" (Copp i Cockroft, 1990). Consultant la base de dades PubMed de NCBI s'evidencia que la rata és un model molt ben consolidat en estudis de desenvolupament, probablement amb una certa tendència cap als estudis morfo-funcionals, al contrari, per exemple, de *Drosophila* on, segons el recull d'aquesta base de dades, l'interès pel control genètic del desenvolupament és gaire bé exclusiu.

1.4. Embriologia genètica comparada

En els darrers anys, l'embriologia comparada ha eixamplat el seu camp d'actuació. Fa uns anys, el seu marc es centrava a comparar morfològicament embrions de diferents espècies, cercar diferències i similituds per fer taules comparatives d'òrgans, aparells o sistemes. Avui podem afegir-hi la comparació del seus genomes, transcriptomes i proteomes i d'aquesta manera cercar explicacions moleculars a les evidències morfològiques.

1.4.1. Embriologia descriptiva i comparada

L'embriologia des d'Aristòtil és comparada. L'embriologia comparada és més antiga que l'anatomia comparada probablement perquè un embrió de pollastre i un embrió humà s'assemblen més que un home i un pollastre. Això és coherent amb el fet aparent de què, en el desenvolupament, primer es formen les estructures comunes, a les diferents espècies i, a mesura que avança el procés, es van adquirint les diferències (Llei de Von Baer).

Des de fa molt temps s'ha intentat fer correlacions entre l'edat de l'embrió i/o fetus amb les seves característiques morfològiques, però, de forma similar a com succeeix durant el desenvolupament postnatal, existeixen diferències entre individus de la mateixa edat. És per això que hi ha una tendència a classificar els subjectes en desenvolupament en **estadis** que tenen en consideració el grau de desenvolupament assolit pels diferents òrgans i parts corporals.

En desenvolupament embrionari **humà** s'utilitza actualment la **classificació dels estadis embrionaris de la Carnegie** (O'Rahilly i Müller, 1987) en el que es detallen acuradament les diferents etapes de la formació embrionària.

En **rata**, el model que nosaltres hem emprat, s'han realitzat diversos treballs descriptius del seu desenvolupament entre els que cal destacar els de **Christie** (1964) i **Witschi** (1962).

El treball de **G. Christie** (1964) descriu l'aparença externa durant el desenvolupament intrauterí de la rata, mitjançant dibuixos amb cambra clara, des de l'estadi 16 (9 1/2 dies) fins a l'estadi 32 (18 1/2 dies), doncs els primers 15 estadis, des de l'òvul fins que es comença a formar-se el solc neural, a l'etapa presomítica, es refereix als descrits prèviament per Nicholas (1942).

El treball d'**E. Witschi** (1962) fa una descripció, també externa, del desenvolupament des de la fase d'una cèl·lula (estadi 1) fins als 17 dies de vida postnatal (estadi 36, post partum). En general aquest treball és el més utilitzat per definir els estadis de desenvolupament de la rata, probablement pel fet que en un únic treball s'abasta des de la

fase d'una cèl·lula fins al període postnatal. L'únic inconvenient d'aquest treball és l'absència d'anàlisi microscòpica.

Cal mencionar el treball de Brown i Fabro (1981) en el que es realitza un estudi sistemàtic de tots els paràmetres morfològics externs dels embrions de rata, enfocat molt especialment a la quantificació del grau de desenvolupament d'embrions cultivats "in vitro".

Amb l'objectiu de poder relacionar embrions de diferents espècies s'han realitzat treballs on s'ha posat especial èmfasi a trobar equivalències temporals per a un mateix estadi embrionari. Cal remarcar, en aquesta línia, el treball pioner d'**Otis i Brent (1954)** en el que es fa una correlació entre embrions de ratolí, controlats experimentalment, i les estructures equivalents en humana, segons les descripcions de la bibliografia. Altres treballs destacats són el de **Schneider i Norton (1979)** en que comparen el desenvolupament de la rata amb el del ratolí i el del pollastre des del moment de la fertilització fins al naixement i el de **Hoar i Monie (1981)** en el que exhaustivament, sistema per sistema, es compara el desenvolupament de diferents estructures en embrions d'home, macaco, cobai, conill, rata, ratolí, hámster i pollastre.

Donat que els estadis de la Carnegie són actualment els més utilitzats en humana, seria de gran utilitat posseir una correlació d'aquests amb els estadis de desenvolupament de la rata. Malauradament, només ha estat realitzat, fins al moment, en el fetge durant els estadis de la Carnegie 11-14 (Godlewski et al., 1992) i en el conjunt de l'embrió al final del període embrionari, l'estadi 23 de la Carnegie (Gaubert-Cristol i Godlewski, 1991)

1.4.2. Comparant seqüències. Bases de dades.

De la fusió de la genètica i la informàtica ha nascut una nova branca del coneixement: la bioinformàtica; és un "matrimoni" molt equilibrat, doncs no són res un sense l'altre.

En les darrers anys s'han invertit molts esforços en el coneixement del genoma, el transcriptoma i el proteoma amb un resultat clar i contundent: la seqüenciació del genoma humà i la seqüenciació total o parcial del genoma de diferents espècies vivents. Això ens permet disposar d'unes eines de treball molt poderoses a l'hora de cercar la identitat de seqüències clonades així com d'intentar conèixer el paper que realitzen dins la complexa maquinària genètica.

Alguns dels genomes que s'han seqüenciat poden ésser avui consultats a revistes científiques i a adreces electròniques.

Arabidopsis thaliana:

The arabidopsis genome initiative (2000: Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796-815

Caenorhabditis elegans:

The *C. elegans* Sequencing Consortium. Sequence and analysis of the genome of *C. elegans*. *Science* 282, 2012-2018 (1998).

http://www.sanger.ac.uk/Projects/C_elegans/WORMBASE/DNA.shtml

Drosophila melanogaster:

Adams, M. D. et al. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287, 2185-2195 (2000). | [Article](#) | [PubMed](#) | [ISI](#) |

Peix zebra (*Danio rerio*) :

Actualment hi ha en marxa importants projectes per estudiar el genoma del peix zebra

<http://zfin.org/ZFIN/>

Home (*Homo Sapiens*) :

Venter et al. The sequence of the human genome.

Science 2001 Feb 16;291(5507):1304-51 [Article](#)

Mus musculus

Mouse Genome Sequencing: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/MmHome.html>

Rattus Norvegicus

En els darrers anys està augmentant la inversió d'esforços en el genoma de la rata. En l'actualitat existeixen un bon nombre de bases de dades del genoma de la rata:

Genetic maps of the rat: <http://waldo.wi.mit.edu/rat/public/>,

ARB Rat Genetic Database: <http://www.nih.gov/niams/scientific/ratgbase/>

Rat genome resources: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/R_norvegicus.html

Rat genoma data: <http://www.informatics.jax.org/rat/index.shtml>

Rat genome database: <http://rgd.mcg.edu/>

2. DEL DNA A L'EMBRIÓ

Des del zigot, totes les cèl·lules d'un organisme porten en el seu DNA la càrrega genètica per a formar l'ésser viu, és el seu genoma. Però el genoma, per si sol, no és suficient, doncs és necessària la participació d'un conjunt de factors que, seqüencialment, activin o inhibeixin l'expressió dels diferents gens, fent possible que cadascun d'ells es posi en marxa en el lloc i moment adequats.

2.1. Genoma. DNA genòmic i DNA mitocondrial

La bicadena de DNA (Watson i Crick, 1953a i 1953b), on les cèl·lules vives guarden la seva informació genètica, és el llibre on està explicada la història de la vida al nostre planeta. Desgraciada o afortunadament aquest llibre està escrit *en clau* de quatre "lletres", A C T i G, aparentment senzilla.

El genoma, però, és molt complex. En el genoma hi trobem **seqüències úniques**, no repetides en el genoma haploid, que són les que codifiquen gens, constituint menys del 5% del genoma (International Human Genome Sequence Consortium, 2001), encara que en aquest grup, de seqüències *úniques*, també hi trobem **pseudogens** que són gens que han perdut la seva capacitat de transcriure's a RNA, *carrerons sense sortida de l'evolució* (Lewin, 2000). Esquitxant el genoma trobem **seqüències repetides** (varies vegades) que són, en ocasions, duplicacions d'un *locus* que han divergit cap a funcions diferenciades, constituint **gens paràlegs** en un mateix genoma, **seqüències moderament repetides** (10-100 vegades), que codifiquen per rRNA o per histones i **seqüències altament repetides** (10^3 - 10^6 vegades), zones riques en polimorfismes, que són seqüències curtes repetides moltes vegades "en tàndem" o en llargs *clusters*. La majoria d'aquestes seqüències repetides deriven d'elements mòbils que s'integren al DNA, són els **transposons** i els **retrotransposons**. Es calcula que, contant amb els elements repetitius que poden haver degenerat i no són detectats, més del 50% del genoma humà prové de la inserció d'elements repetitius (Li et al., 2001).

En mig d'aquest garbuix, desendreçat de gens, pseudogens, elements mòbils i seqüències repetides hi han els gens del desenvolupament, doncs s'han adquirit igual que la resta: de manera progressiva i desordenada. Només els **gens Hox** (3.3.1.3. **Diferenciació segmentària del embrió**) presenten una certa organització, doncs es troben en quatre cromosomes, en mamífers, i ordenats, en els cromosomes, segons l'ordre en que s'expressen en l'eix anteroposterior, propietat anomenada **colinealitat**.

A més del DNA genòmic hi ha, a les cèl·lules eucariotes, el DNA de les organel·les citoplasmàtiques, mitocondrial en animals i dels cloroplasts i mitocondris en les plantes, procedent, segons es creu, de la fagocitosis, i no-digestió, d'un bacteri per part d'una cèl·lula eucariota primitiva (Margulis L, 1970; Whatley, 1981). Aquest DNA, que també es transcriu a RNA té una importància en la síntesi de proteïnes relacionades amb el funcionament de l'organel·la. En el cas DNA mitocondrial, en els mamífers estudiats, s'hi troben un conjunt de seqüències que codifiquen proteïnes del cicle de la respiració cel·lular, gens que codifiquen rRNA i d'altres que codifiquen tRNA. El DNA mitocondrial és un bon marcador per estudiar l'evolució doncs té un índex de mutació constant a cada espècie i és d'herència uniparental, materna, ja que els mitocondris dels espermatozous es destrueixen poc temps després de la fecundació (Hutchinson, 1974) per proteolisi, com a conseqüència, probablement, d'una *ubiquitinització* prèvia (Sutovski, 1999).

2.2. Expressió gènica. Del gen a la proteïna.

2.2.1. El dogma de la biologia molecular: l'eix DNA-RNA-Proteïna

El DNA, aïlladament, no ens permet estudiar el fenomen del desenvolupament. El DNA és una fotografia, estàtica, i el desenvolupament, una pel·lícula, dinàmica. L'interès de l'estudi del desenvolupament és conèixer quins són els diferents *fotogrames* i quins són els factors que imprimeixen el moviment. Sabem avui que el motor del moviment és l'eix **DNA-RNA-Proteïna** (Crick, 1970); aquest és el que canvia de teixit a teixit, de cèl·lula a cèl·lula, i en el desenvolupament, d'instant a instant i és el substrat del que anomenem **expressió gènica**.

No tota la seqüència del DNA es transcriu a RNA, o sigui, que no tota té una repercussió funcional, una part d'ella es transmet de generació a generació i de cèl·lula a cèl·lula sense que "aparentment" faci cap funció, és el "DNA silenciós", probablement ens queda molt per aprendre d'ell. Dins de la seqüència dels gens també hi trobem diferències: els **exons** són el motlle per fer el mRNA i, intercalats en la seqüència de DNA, entre els exons, hi ha els **introns**, que inicialment es transcriuen i després del *splicing* es perden, sense tenir contingència en la seqüència del mRNA. Els introns ens amaguen misteris en quan al seu origen i a la seva funció. En general, el número d'exons per gen és de 7-8 i el seva grandària d'uns 100-200 pb, mentre que els introns intercalats tenen una longitud superior a 1KB.

2.2.2. La maquinària de la transcripció

Exons i introns són el motlle per fer el RNA però són DNA. Per posar en marxa l'eix DNA-RNA-Proteïna el primer pas és la transcripció del RNA i aquesta maquinària s'engega quan la RNA polimerasa s'uneix al promotor i, amb la participació dels factors de transcripció, comença la transcripció de mRNA immadur, també anomenat pre-mRNA.

Segons el tipus de RNA que es transcriu actua una RNA polimerasa diferent: la **RNA Polimerasa I** transcriu rRNA, la **RNA Polimerasa II** transcriu mRNA i la **RNA Polimerasa III** transcriu tRNA i altres RNA de petita grandària.

La **RNA polimerasa II** comença a funcionar en l'embrió a la fase anomenada **ZGA** (*Zigote gene activation*); aquesta, en l'embrió de ratolí (Schultz, 1993) es desenvolupa en dues fases: una primera de menor replicació de RNA que s'inicia entre el final del període d'una cèl·lula, i una segona fase que s'inicia al final de la fase de dues cèl·lules amb una activitat transcripcional marcada i un canvi en el patró de síntesi proteica (Van Blerkom i Brockway, 1975). En embrions bovins, aquestes dues fases coincideixen amb els nivells de dues formes de RNA polimerasa II amb diferent fosforilació, de manera que, durant la fase de dues cèl·lules, s'arriba al nivell més alt de **RNA polimerasa II A** (no fosforilada) i, a partir d'aquest moment, comença a augmentar la **RNA polimerasa II O** (hiperfosforilada) (Memili i First, 1998). En altres mamífers, com és el cas del conill, la primera fase comença igual al final de la fase d'una cèl·lula, si bé, la fase de transcripció marcada, comença més tard que en el ratolí (Manes, 1977).

El **promotor** és la seqüència de DNA que reconeix la RNA polimerasa i a la que s'uneix. És un reconeixement estructural més que per la seqüència de nucleòtids. Existeix, però, una seqüència anomenada *canònica* que és similar en els diferents promotors. Els promotors també tenen llocs específics d'unió amb els factors de transcripció, *aigües amunt* del lloc a on s'uneix la RNA polimerasa II. A nivell del punt on comença la transcripció hi trobem la **regió d'iniciació**, que està formada per una **Adenina** flanquejada per pirimidines. El **TATA-box**, que es troba en tots els eucariotes, és un septamer ric en **AT** i localitzat uns 25 pb abans d'on s'inicia la transcripció i es creu que està relacionat amb la posició de la RNA polimerasa per a la correcta iniciació de la transcripció i està considerat com un component essencial de la maquinària de transcripció (revisió a Pugh, 2000), havent-se implicat en la transcripció de les tres RNA polimerasas eucariotes.

Aigües amunt podem trobar altres seqüències que tenen una importància en la iniciació de la transcripció: **CAAT box** (-80 pb del punt d'iniciació), **GC box** (-90 pb) i l'**octamer**.

Si aquesta maquinària està sempre a l'interior de la cèl·lula, per què uns gens es transcriuen i els altres no?

2.2.3. Regulació de la transcripció

La regulació de l'expressió gènica, o sigui el fet que es sintetitzi una proteïna activa en una cèl·lula pot estar regulat a diferents nivells, d'ells el punt principal és la transcripció, si bé després encara hi ha possibilitats de regulació: la regulació posttranscripcional i la posttraduccional

2.2.3.1. Estimuladors (*enhancers*)

L'activitat del promotor pot ésser estimulada, per una seqüència aliena a ell, que s'hi troba propera, l'estimulador (*enhancer*). L'estimulador i el promotor col·laboren per a iniciar la transcripció. L'especificitat dels factors que activen la transcripció pot recaure sobre el promotor o sobre l'estimulador (o sigui que un factor de transcripció específic pot ser el que actuï sobre el promotor o sobre l'estimulador).

2.2.3.2. Factors de transcripció

Les senyals que arriben a la cèl·lula són transmeses mitjançant el citoesquelet, o a través de rutes de senyalització, fins al nucli on els *factors de transcripció* activen la transcripció dels gens *diana*. Podem classificar els factors de transcripció en tres grups:

1. Factors transcripcionals generals (GTFs):

Els GTFs necessaris per l'inici de la síntesi de RNA són: la pròpia RNA polimerasa II i com a mínim sis més: TFII D, TFII A, TFII B, TFII E, TFII F i TFII H (Tupler et al., 2001). Els GTFs s'uneixen al promotor per formar el complex de preiniciació o aparell de transcripció basal. TFII D és el factor que inicia la unió al DNA del complex de preiniciació doncs conté la TBP (TATA-binding protein) que s'uneix al TATA box i 11 diferents TAFs (TBP associated factors), que són fragments proteics amb capacitat de reconèixer diferents promotors (Burkley i Roeder, 1996) .

2. Factors que actuen "aigües amunt" i reconeixen seqüències curtes situades abans del punt d'iniciació. Augmenten l'eficàcia de la iniciació i es requereixen perquè el promotor funcioni a un nivell adequat. S'uneixen a diferents punts d'unió: CAAT box (-80 pb del punt d'iniciació), GC box (-90 pb)

3. Factors induïbles: Aquests són, en general, proteïnes d'unió al DNA seqüència-específiques que reconeixen dianes en els promotors o en els estimuladors i tenen un paper regulador. Hi ha diferents grups de proteïnes que regulen la transcripció mitjançant particulars maneres d'unió Proteïna-DNA:

- Receptors d'esteroides
- Zinc fingers
- Hèlix-volta-hèlix (una forma relacionada la trobem en els Homeodomis)
- Hèlix-loop-hèlix
- Leucine zippers

La proporció dels diferents tipus és variable entre espècies. Els més freqüents en el genoma humà són els **Zinc fingers** (també en *Drosophila melanogaster* i *S. Cerevisae*) (Tupler et al., 2001).

L'activació d'un factor de transcripció pot estar regulada per una o varies de les següents maneres:

- Un factor és **teixit-específic** perquè es sintetitza en un únic tipus cel·lular. Aquest és típic dels factors que regulen el desenvolupament, com les proteïnes amb homeodomini.
- L'activació d'un factor està controlada per una **modificació**, per exemple una fosforilació.
- Un factor és activat o inactivat per la **unió a un *ligand***, aquesta pot determinar la localització del factor a nucli o a citoplasma així com la seva habilitat d'unir-se al DNA.
- Un factor de transcripció es **produceix unit a la membrana nuclear** i al **reticle endoplasmàtic**, si no hi ha esterols (com colesterol) el **domini citoplasmàtic es trenca** i es **transloca al nucli** a on fa la seva funció de factor de transcripció.
- L'**accessibilitat del factor de transcripció**, doncs hi ha casos en que el factor de transcripció està segrestat per un altre factor que no l'hi permet anar al nucli, és el cas de NF- κ .
- Un factor **dimèric** pot tenir un **partner** que l'inactivi i un altre **partner** actiu que desplaci l'inactivador .

2.2.3.3. Regulació epigenètica

Els mecanismes epigenètics són aquells canvis heretables en l'expressió gènica que es desenvolupen sense modificacions en la seqüència del DNA. Els principals son:

2.2.3.3.1 Metilació :

La metilació del DNA és una modificació epigenètica que juga un paper molt important en el control de l'expressió gènica i l'estructura cromosòmica en els mamífers. Entre un 3-5% de les citosines presenten un grup Metil (CH₃) a la posició 5 de l'anell pirimidínic (Kafri et al., 1992) i la majoria d'elles, en mamífers i d'altres vertebrats, estan en el dinucleòtid CpG (Ehrlich et al., 1982). El dinucleòtid CpG s'ha anat perdent al llarg de l'evolució del genoma, mantenint la seva freqüència esperada en àrees determinades

anomenades illes CpG. Aquestes es troben en un 50% dels promotors dels gens, associant-se la metilació en aquestes regions amb inhibició de l'expressió gènica (Larsen et al., 1992). És per això que el patró de metilació s'havia considerat com un dels responsables de l'activació selectiva i seqüencial durant les diferents fases del desenvolupament (Bird, 1992; Levine et al., 1992). La metilació, però, no pot considerar-se un autèntic mecanisme de regulació doncs, pel que es coneix fins ara, només actua inhibint la transcripció i no s'ha pogut detectar cap situació d'activació gènica com a conseqüència de desmetilació (Jones, 1999). La importància de la metilació en el desenvolupament es va reforçar en evidenciar-se que l'onada de metilació posterior a la implantació respectava els illots CpG associats a "housekeeping gens" (Bird, 1986; Siegfried et al., 1999), però no s'ha constatat cap illot CpG que es desmetili després de la implantació ni cap gen en el desenvolupament que es regulés pel patró de metilació-desmetilació (Bestor, 2000). Hi ha alguns autors que opinen que la metilació en el desenvolupament té com a principal finalitat silenciar la transcripció de seqüències alienes o transposons, doncs la diferenciació cel·lular està controlada per xarxes reguladores molt conservades i no depèn de modificacions covalents del genoma (Yoder et al., 1997; Walsh i Bestor, 1999).

La connexió entre la metilació i el *silenciament transcripcional* en vertebrats està reconegut des dels anys 80. Tate et al. el 1993 ja va descriure que la metilació d'una regió podia interferir en la unió dels factors de transcripció. A finals dels 90 es varen descriure els primers treballs en que relacionaven la metilació del DNA amb la unió de proteïnes específiques d'unió a 5-metil-citosines juntament amb complexos d'histona desacetilases, actuant tot el complex proteic a nivell d'estructura del cromosoma (Jones et al., 1998; Nan et al., 1998; Bestor, 1998).

L'**imprinting** és el fenomen pel qual un dels dos al·lells d'un gen s'expressa o s'inhibeix depenent de quin és el gàmeta del qui s'hagi heretat. Ja fa temps ha estat demostrat que l'imprinting té la seva base en la metilació del DNA (Li et al., 1993). La metilació s'ha considerat també la responsable del mecanisme d'inactivació del cromosoma X.

2.2.3.3.2. Altres:

Hi ha d'altres canvis de tipus epigenètic que poden tenir una importància en la regulació de la transcripció però que, pel moment, semblen tenir un paper poc rellevant en la regulació de la transcripció en animals.

- **Paramutació:** En la paramutació, hi ha una interacció entre dos al·lells d'un gen i resulta en una inactivació heretable d'un d'ells. Actualment sembla molt clar que l'inactivació observada està relacionada amb la metilació del DNA que codifica aquest gen (Walker, 1998). Una altre

troballa actual és que certs elements transposables poden jugar un paper en la paramutació (Walker et al., 1997)

- Exclusió al·lèlica (*Allelic exclusion*) : En cèl·lules diploides existeixen dos al·lels (un patern i un matern) que típicament s'expressen d'una manera co-dominant i podem trobar, per tant, en una cèl·lula expressió dels dos al·lels. L'evolució ha dissenyat una estratègia que permet que el segon al·lel, ja sigui matern o patern, s'inactivi si l'altre al·lel ha completat amb èxit els seus *arregaments*, això s'anomena *exclusió al·lèlica* i s'ha demostrat en mamífers (Pernis et al., 1965; Weiler, 1965), aus (Reynaud, 1989) i també en *Xenopus* (Du Pasquier, 1983)

2.2.4. Transcripció del DNA a RNA

Quan s'han donat tots els factors necessaris per a la posada en marxa de la síntesi de RNA (formació del complex de preiniciació i activació pels factors de transcripció) la RNA Polimerasa II, comença a sintetitzar, en sentit 5'-3', el pre-mRNA que estarà format per la cadena complementària de la cadena anti-sense, 3'-5', del gen sencer, exons i introns.

2.3. Modificacions post transcripcionals

a. **Poliadenilació del extrem 3'**: El RNA és tallat per una endonucleasa, per a separar-lo de la RNA polimerasa i posteriorment una poli A polimerasa (Colgan i Manley, 1997) sintetitza una cua poli A que s'afegeix a aquest extrem.

b. **Capping de l'extrem 5'**: Després que la RNA polimerasa II hagi transcrit els primers 25-30 nucleòtids, els enzims encarregats del *capping* treuen el -fosfat del primer nucleòtid del RNA i s'inserta una Guanina, formant-se GpppN; posteriorment la guanina es metila a la posició N7. Aquestes activitats es realitzen per dos proteïnes en mamífers: Un polipèptid bifuncional amb un domini trifosfatasa aminoterminal i un altre guaniltransferasa carboxiterminal i per una metiltransferasa independent (Cramer et al., 2001). Les funcions d'aquest *cap 5'* poden ésser dues: protecció del extrem 5' de la degradació o com a senyal a ser reconeguda pels ribosomes en el procés de traducció.

c. **Splicing**: El pre-RNA ha de perdre les seqüències intròniques per poder esdevenir el motlle correcte per a sintetitzar la proteïna; el procés amb que es porta a terme és l'*splicing*. L'*splicing* és una via de regulació, doncs la seqüència dels exons que s'uneixen per formar l'RNA pot ésser variable per a un mateix gen produint d'aquesta manera proteïnes diferents, és l'anomenat *splicing alternatiu*. En humans hi ha un més alt grau d'*splicing alternatiu* que en altres espècies (Rubin, 2001), això fa possible que amb el mateix número

de gens sigui possible fer un major número de funcions diferents. Potser aquest és un dels motius pels quals hi ha tan poca diferència en el nombre de gens entre espècies distants.

2.4. Traducció del RNA m a proteïna. Regulació postraducciona

Hem vist, de manera resumida, quin és el camí que hi ha entre el genoma i el transcriptoma, del DNA al RNA. El RNA és el patró a partir del qual, en els ribosomes i amb la col·laboració del tRNA, es sintetitzaran les proteïnes. L'univers de les proteïnes és molt més complex que el del RNA, per la qual cosa, en aquest treball, centrat en l'expressió gènica, he considerat oportú no entrar-hi. Només un exemple demostratiu: les tubulines. Aquestes, formant un heterodímer (α i β) constitueixen els microtúbuls (Ladueña et al., 1992), del citoesquelet dels eucariotes. Bé, doncs la majoria d'éssers multicel·lulars tenen múltiples gens que codifiquen α i β tubulina, per exemple 2 Tubulina que no pot ser intercanviada per cap altre β tubulina en *Drosophila*. Per complicar-ho una mica més s'han descrit set membres de la família de les tubulines (α , β , γ , δ , ϵ , ζ , η) en diferents espècies (Dutcher, 2001). A la complexitat dels diferents gens que transcriuen diferents tubulines hem d'afegir una llarga llista de modificacions post-translacionals que inclouen acetilació (L'Hernault i Rosenbaum, 1985), destirosinació d' α -tubulina (Barra et al., 1988), la separació del glutamat terminal de l' α -tubulina destirosinada (Paturle-Lafanechere et al., 1994), fosforilació de β -tubulina (Luduena et al., 1988) així com poliglutamilació d' α i β -tubulines (Eddé, 1990 et al.; Rudiger et al., 1992).

3. EL PROGRAMA DEL DESENVOLUPAMENT

3.1. Adquisició del programa del desenvolupament

El desenvolupament és l'aparició d'estructures complexes a partir d'un grup simple de cèl·lules. Per aconseguir això és necessari un programa de desenvolupament que reguli, a cada moment, el que cadascuna de les cèl·lules ha de fer. Aquest programa és una adquisició de l'evolució, les primeres formes de vida, procariotes, no el posseïen, doncs no el necessitaven, la seva simplicitat estructural feia innecessària la seva aparició.

En el període Precàmbric apareixen els primers metazous, diblàstics, coneguts, però si ens basem en el registre fòssil l'autèntica explosió de diversitat és durant el Càmbric, fa 544 milions d'anys, quan en un lapse d'escassament 6-10 milions d'anys, van aparèixer la majoria dels grups moderns d'animals (excepte el grup de *Bryozoa*, que apareix en el període Ordovicià, Valentine et al., 1999). Els animals que sorgeixen en aquest període són triblàstics, o sigui, que han adquirit la tercera fulla embrionària, el mesoderma, que els animals diblàstics no posseïen. Aquest és un pas molt important en l'evolució doncs la presència de les tres fulles permet una major versatilitat en el pla corporal, com l'adquisició d'un esquelet. El fet que els gens *hox* siguin uns dels responsables del pla corporal fa absolutament versemblant que estiguin involucrats en l'explosió de formes corporals diverses en aquest període de temps.

Es creu que l'explosió Càmbrica pot ésser la conseqüència d'una metxa encesa en el període Precàmbric (Siveter et al., 2001), doncs hi ha canvis massa inicials en el període Càmbric per pensar que s'han generat dins del mateix període. Recolza aquest plantejament el fet que s'han descrit gens amb homeodomini en animals diblàstics actuals (ex. *Podocoryne carnea*, Masuda-Nakagawa et al., 2000), filogenèticament previs al Càmbric i s'han trobat restes fòssils d'organismes amb morfologia bilateral, com el cas de *Kimberella quadrata*, en el període Precàmbric (Fedonkin i Waggoner, 1997). Això ens fa pensar que els primers metazous triblàstics són previs al Càmbric així com l'aparició dels gens homeobox, si bé la seva màxima expressió es produeix durant aquest període. És també plausible l'explicació que l'esclat de diversitat que es produeix en el Càmbric sigui deguda a la diferent expressió d'uns gens idèntics (Ohno, 1996).

Des dels temps del Càmbric s'ha produït un augment progressiu de la complexitat en els diferents éssers vius amb el conseqüent augment de complexitat del programa del desenvolupament que ha conservat, però, sorprenentment, les línies mestres adquirides fa 550 milions d'anys.

3.2. Diàleg cel·lular. La base del desenvolupament

El que diferencia un ésser unicel·lular i un organisme pluricel·lular no és solament el seu número de cèl·lules sinó la comunicació que hi ha entre elles, no és possible explicar un organisme complex només com una conjunt de cèl·lules "junttes" sinó "en contacte". En el període del desenvolupament, les cèl·lules adquireixen, progressivament, graus d'ordenació i de diferenciació deguts a una expressió gènica diferencial i aquest patró està regulat per factors de senyalització i de comunicació cèl·lula-cèl·lula. Avui sabem que un organisme no pot construir-se amb la suma de canvis realitzats per cèl·lules individualment sinó com al conjunt de canvis cel·lulars que esdevenen coordinadament a conseqüència de la constant comunicació intercel·lular.

La clau està en com els senyals procedents de "l'exterior" actuen sobre la maquinària genètica **induint** o **inhibint** la transcripció.

3.2.1. Mecanisme de senyalització cel·lular

El patró d'expressió gènica pot està regulat per senyals procedents de l'exterior de la cèl·lula. El senyal pot actuar sobre receptors situats en la membrana plasmàtica, com ho fan per exemple els factors de creixement, o entrar a l'interior de la cèl·lula travessant la membrana, com els esteroides, o a través de gap junctions en el cas de molècules de petita grandària.

Els pèptids i proteïnes, que no travessen la membrana citoplasmàtica, actuen sobre la cèl·lula unint-se a un receptor de membrana, posant en marxa una via de senyalització que acaba en l'activació d'un factor de transcripció. Els passos que es segueixen són els següents: la molècula de senyalització s'uneix al receptor de membrana i el domini citoplasmàtic del receptor es fosforila, això activa a la proteïna **Ras** que, com a conseqüència, s'uneix a **Raf**, fet que provoca la fosforilació, i activació, de MEK que, a la seva vegada, fosforila i activa ERK que fosforila a un factor de transcripció i activa l'expressió gènica. D'aquesta manera es produeix l'enllaç entre el senyal extracel·lular i activació gènica.

Un altre possible via consisteix en que quan la molècula senyalitzadora s'uneix al receptor cel·lular, provoca l'activació de factors de transcripció citoplasmàtics i la seva posterior translocació al nucli.

En el cas dels esteroides, una vegada han travessat la membrana citoplasmàtica, s'uneixen al seu receptor i formen, amb ell, un complex que és capaç de translocar-se al nucli i actuar com un factor de transcripció, unint-se al DNA per activar o reprimir la

transcripció d'un gen. Altres factors que són capaços d'actuar d'aquesta manera són les hormones tiroïdals i l'àcid retinoic.

3.2.2. Senyals característiques del desenvolupament: Morfògens

Determinats mecanismes de senyalització en el desenvolupament es duen a terme mitjançant la participació de molècules anomenades **morfògens**. S'han considerat els morfògens com elements molt importants durant el desenvolupament, però, fins fa relativament poc temps, no han començat a haver-hi proves sòlides de la seva important funció durant en aquest període (Neumann i Cohen, 1997)

Un morfògen és una molècula que actua com a senyalitzador intercel·lular amb la particularitat de fer-ho de manera "concentració-depenent". Com que el destí de cada cèl·lula, en el camp d'acció del morfògen, depèn dels nivells del morfògen podem dir que el gradient de concentració d'aquest configura el patró de desenvolupament (Tabata, 2001). Aquest gradient pot ésser conseqüència de la distància a la que una cèl·lula es troba de la font d'emissió del morfògen, de manera que, mitjançant la concentració d'aquest, la cèl·lula adquireix una *informació posicional*. Aquest gradient no genera respostes absolutament progressives, doncs existeix una concentració-*dintell* a partir de la que un gen s'expressa o no s'expressa.

La molècula que més s'ha considerat com a morfògen en desenvolupament és l'àcid Retinoic (Eichele, 1989; Ruberte et al., 1990). Hi ha dades que recolzen aquest fet com són la presència d'àcid retinoic endogen, la distribució de receptors i proteïnes d'unió als retinoids en l'embrió (Marshall et al., 1996), la producció de malformacions congènites quan s'administra experimentalment a animals gestants (Hummer et al., 1990) i la seva implicació com a teratògen durant la gestació l'espècie humana (revisió a Collins i Mao, 1999)

S'han descrit molts d'altres morfògens, alguns restringits a determinades espècies. L'activina ha estat considerat com un morfògen a *Xenopus* (Thomsen et al., 1990; Gurdon et al., 1994), encara que estudis "in vivo" han suggerit que l'activina té en un petit radi d'acció i que promou la secreció de FGF en cèl·lules properes, essent aquest el que actua sobre cèl·lules a distància (Rodaway et al., 1999).

A l'embrió de *Drosophila*, *wingless* (Bejsovec i Martínez-Arias, 1991) i *dpp* (Ferguson i Anderson, 1992) han mostrat propietats de morfògens. *Wingless* presenta un gradient d'expressió que es correlaciona amb la presència o no d'elements *cuticulars* dins dels segments en què es divideix la larva i la mosca adulta (Noordermeer et al., 1992). *Dpp* s'ha vist que actua en la larva de *Drosophila* amb un patró gradient-depenent a nivell dels discs imaginals i és capdal en el desenvolupament dels seus derivats (Teleman i Cohen, 2000).

Així mateix, s'ha pogut constatar que existeix una profunda interrelació entre *wingless* i *dpp* en la seva senyalització (Maves i Schubiger, 1998, Theisen et al., 1996)

3.2.3. Mecanisme de senyalització per contacte cèl·lula-cèl·lula i cèl·lula-matriu extracel·lular

Cada cèl·lula és d'una manera determinada que l'hi condiciona una funció i també un tipus de relació amb altres cèl·lules, aquesta relació és la base de la comunicació intercel·lular i, per tant, de l'expressió gènica i és per això que quan parlem d'un tipus determinat de cèl·lula, epitelial o mesènquimatososa, estem parlant d'un tipus determinat de senyals de la cèl·lula amb el seu entorn.

3.2.3.1. Epiteli i mesènquima: dues maneres diferents d'entendre la relació amb l'entorn

Podem trobar, en l'embrió i en els organismes adults, dues maneres diferents de relacionar-se les cèl·lules entre elles i amb la matriu extracel·lular: els epitelis i els mesènquimes. La diferència fonamental recau en que en els epitelis existeix una unió entre les cèl·lules que el componen, mentre que les cèl·lules del mesènquima només s'uneixen amb la matriu extracel·lular. Això és degut a l'expressió dels gens que codifiquen les **molècules d'adhesió cel·lular**, que fan que les cèl·lules s'uneixen entre elles, formant epitelis o bé es separin, unint-se exclusivament a la matriu extracel·lular, constituint teixits mesenquimals. Les molècules d'adhesió cel·lular es classifiquen en quatre grups: **Cadherines, integrines, família de les immunoglobulines i selectines.**

Les **Cadherines** són una família de proteïnes transmembrana, calci dependents, que tenen una funció molt important en l'adhesió cel·lular. El domini extracel·lular d'una cadherina promou l'adhesió cèl·lula-cèl·lula, mentre que el domini citoplasmàtic serveix per unir-la al citoesquelet a través d'interaccions amb les catenines i l'actina (Gumbiner, 1993; Kemler et al., 1989). En les **adherent junctions**, estructures crítiques en desenvolupament, morfogènesi i manteniment de la diferenciació epitelial, les molècules d'E-Cadherina de les cèl·lules epitelials veïnes contacten entre elles (Evers et al., 2000). S'ha vist que la desestabilització de les **adherent junctions** contribueix a la invasió i la metastàsi (Birchmeier i Behrens, 1994; Bracke et al., 1996) i que les cèl·lules carcinomatoses de morfologia **pseudofibroblàstica** poden ésser convertides a cèl·lules de fenotip no invasiu mitjançant injecció de cDNA que codifica E-Cadherina (Frixen et al., 1991). A altres tipus de cadherines s'han atorgat funcions diferents com per exemple les N-cadherines que s'han correlacionat amb invasió tumoral en diferents tipus de càncer, com el de mama (Hazan et al., 1997; Hazan et al., 2000).

Les **Integrines** són una família de glicoproteïnes de superfície cel·lular que actuen com a receptors per a molècules de la matriu extracel·lular (MME) o per *membrane-bound counter receptors* d'altres cèl·lules veïnes. Les estructures en les que les integrines actuen unint les cèl·lules amb la matriu extracel·lular (ME) s'anomenen **contactes focals** o **adhesions focals**. Cada integrina és un heterodímer que conté una subunitat α i una β , cadascuna de les quals conté un llarg **domini extracel·lular** que s'uneix amb ME, a través de molècules com col·lagen, *laminina*, *vitronectina* o *fibronectina* (Hynes, 1987) i, en la majoria de casos (excepte $\alpha_4\beta_1$), un curt **domini intracitoplasmàtic** que s'uneix a proteïnes, com α -*actina* i *talina*, que connecten així les integrines amb el citoesquelet. Mitjançant aquesta connexió les integrines poden senyalitzar de manera bidireccional, de dintre a fora i de fora a dintre. La interacció de les integrines amb el citoesquelet és responsable de canvis en la forma cel·lular, en l'arquitectura intracel·lular i mobilitat cel·lular (Aplin et al., 1998). Les integrines també estan implicades en la unió de les cèl·lules epitelials a la membrana basal i és a través d'aquesta relació que les cèl·lules epitelials del tipus *stem cells* reben les senyals de creixement que les fan entrar en proliferació (Giancotti i Ruoslahti, 1999).

La família de les molècules d'adhesió de les **immunoglobulines (Ig-CAMs)** constituïda per proteïnes, que contenen un *plegament Ig*, estan implicades en moltes funcions cel·lulars de les que les més importants són en el **desenvolupament del SNC**, on N-CAM està implicada en la direcció d'axons i l'establiment de connexions neurals (Baldwin et al., 1996), en el **sistema immunitari**, junt amb selectines i integrines (Springer, 1995), exercint funcions relacionades amb reconeixement d'antígens, funcions citotòxiques de les cèl·lules T i recirculació limfocitària (Aplin et al., 1998) i, per últim, en la formació de receptors *Protein Tyrosine phosphatases* (RPTPs) (Neel i Tonks, 1997), que estan implicats en adhesió cel·lular homotípica o heterotípica mitjançant els seus dominis extracel·lulars, tal com s'ha vist que actua Ig-CAM-RPTP en *Drosophila* jugant un important paper en migració d'axons i innervació muscular (Neel i Tonks, 1997).

Les **selectines** són una petita família de receptors d'adhesió *lectin-like* composta per tres membres L-, E-, P-selectines (Lasky, 1995). Les selectines actuen en unions heterotípiques cèl·lula-cèl·lula i tenen com a principal funció coneguda l'adherència dels leucòcits a les cèl·lules endotelials durant la inflamació (Rosales i Juliano, 1995) exercint importants funcions en la comunicació entre leucòcits i cèl·lules endotelials (Zimmerman et al., 1996).

3.2.3.2. Transicions epiteli-mesènqima

En l'embrió, però, al igual que en el càncer, l'estat epitelial o mesènqimal és una situació que pot ésser transitòria i són possibles les transicions d'un tipus tissular al altre.

En la condensació i compactació, cèl·lules disperses (Patró mesenquimal) es disposen en un patró de cèl·lules cohesives (Patró epitelial). Un exemple de compactació el tenim en l'embrió de rata entre les fases de 8-16 cèl·lules quan es forma una massa cel·lular en la que es perd la delimitació de cadascun dels blastòmers (Fleming and Johnson, 1988) i en procés de diferenciació del cartílag en el que les cèl·lules s'agrupen formant grups cohesius tenim l'exemple en el que es va descriure la condensació (Fell, 1925).

Les cèl·lules amb disposició epitelial poden també canviar la seva estructura i esdevenir cèl·lules disperses de tipus mesenquimal, això és el que passa en el càncer invasiu i també en determinades situacions del desenvolupament. En situacions en que les cèl·lules epitelials adquireixen mobilitat s'ha vist que disminueix l'expressió de cadherines (Martinez Arias, 2001) i que això està mediat per d'altres gens com *slug*, un membre de la família d'*snail*, que s'expressa en la gastrulació i en la migració de cèl·lules de la cresta neural (Nieto et al., 1994), així com en el desenvolupament dels coixinets endocàrdics en el canal auriculoventricular del cor (Romano i Runyan, 1999).

3.3. Mecanismes del desenvolupament

El desenvolupament té com a finalitat la formació d'un organisme madur, capaç de reproduir-se per a perpetuar la seva espècie. La formació d'un organisme pluricel·lular és la conseqüència d'una successió de processos que fan possible que, a partir del zigot, es formi un individu amb milions de cèl·lules organitzades en aparells i sistemes encarregats de mantenir totes les funcions vitals del organisme i garantir la seva reproducció. Per a portar el desenvolupament d'un nou ésser és necessari la formació d'un **patró corporal** en el que les cèl·lules es determinin i diferenciïn (**diferenciació cel·lular**) per a formar finalment estructures funcionals (**morfogènesi**).

Per seguir un esquema de treball, que ens permeti organitzar d'una manera ordenada els diferents mecanismes implicats en el desenvolupament, els he dividit en tres grups:

1. Formació del patró corporal
2. Diferenciació cel·lular
3. Morfogènesi

3.3.1. Formació d'un patró corporal: organització de l'embrió

3.3.1.1. Determinació dels eixos corporals

En fases inicials de l'embriogènesi es defineixen els eixos de l'embrió: anterior-posterior, ventral-dorsal i, en vertebrats, dreta-esquerra. Existeixen diferents estratègies per establir aquests eixos en diferents espècies.

L'eix anteroposterior

L'eix anteroposterior es determina per l'equivalent del centre organitzador d'Spemann-Mangold, descrit inicialment en amfibis. El centre organitzador d'Spemann-Mangold està localitzat al llavi dorsal del blastopor dels amfibis i si s'empelta a la futura regió ventral d'un altre embrió és capaç de generar un embrió amb una duplicació de l'eix anteroposterior (Spemann i Mangold, 1924). En l'embrió de pollastre existeix un centre equivalent anomenat **node de Hensen**. En ratolí, a nivell de la part més anterior de la línia primitiva, s'ha localitzat un centre equivalent al d'Spemann-Mangold. Les diferències en la concentració del morfògen, secretat pel centre organitzador, a cada segment embrionari, condicionen una expressió gènica diferencial al llarg de l'eix anteroposterior.

L'eix dorsoventral

L'ou de *Xenopus* és radialment simètric i aquesta simetria només es trenca quan l'ou és fertilitzat. Després d'una successió d'esdeveniments la cara dorsal del embrió es forma al costat oposat d'on ha entrat l'espermatozou. Dins els primers 90 minuts després de la fertilització es produeix una rotació d'uns 30° del *còrtex* (una capa composta per filaments d'actina d'unes 5µ de gruix, a sota de la membrana) en direcció al punt d'entrada de l'esperma. Aquesta rotació fa que hi hagi un moviment de la regió *vegetal* cap a la regió *animal*. El fet crucial de tot això és que es forma en el pol vegetal, a la regió oposada a l'entrada del espermatozou, un centre de senyalització anomenat **Nieuwkoop center** que determinarà la polaritat dorsoventral. Experimentalment s'han empeltat cèl·lules de la regió del **Nieuwkoop center** procedents d'embrions de *Xenopus* de 32 cèl·lules a la cara ventral d'un altre embrió aconseguint un embrió amb dues regions dorsals. Aquest centre organitzador també especifica un altre centre senyalitzador tan fonamental com és el centre organitzador d'Spemann.

En *peix zebra* s'ha vist que si s'extirpa, poc després de la fertilització, la major part de la regió vegetal del vitel·lus, l'embrió es *ventralitza* fortament (Mizuno et al., 1999). A la fase mitja de la blàstula, a la part dorsal de la capa sincicial del vitel·lus i els blastòmers dorsals marginals, β -catenina està *estabilitzada* i es transloca al nucli (Schneider et al., 1996), molt probablement modulada per la via senyalitzadora de *wnt* com s'ha vist, per exemple, en *Xenopus* (Moon i Kimelman, 1998). A més s'ha vist que si s'evita l'acumulació nuclear de β -catenina es *ventralitza* l'embrió i l'augment de l'expressió de β -catenina el *dorsalitza* (Scheier, 2001a). No es coneix concretament quina és la manera com β -catenina produeix el seu efecte *dorsalitzador* però es coneixen un conjunt de gens candidats per portar a terme aquesta funció entre els que hi ha *boz* (Ryu et al., 2001), *sqt* (Schier i Talbot, 2001b),

chordin (Scheier, 2001a) i *dkk1* (Shinya et al., 2000) doncs han estat considerats *dianes* de -catenina com *boz* o pel seu perfil d'expressió com *sqt*, *chordin* o *dkk1*.

L'eix dreta-esquerra

La determinació de l'eix dreta-esquerra és un procés molt complex i no del tot conegut en el que s'ha vist que hi ha implicats diferents gens (Burdine i Scheier, 2000). En embrions de pollastre, en estadis primerencs, **Sonic Hedgehog (Shh)** s'expressa a l'esquerra i **Activin** a la dreta (Levin, 1997). S'ha vist l'expressió de **Nodal**, un membre de la família TGF β , a la banda esquerra però no a la dreta, durant la somitogènesi, a mesoderma lateral (Ramsdell i Yost, 1998). En ratolí, **Nodal** actua sobre **Pitx2** (Yoshioka et al., 1998) que és un gen de la família dels homeobox que podria exercir la seva acció de determinació dreta-esquerra en relació amb els nivells dels diferents al·lels *Pitx2a*, *Pitx2b* i *Pitx2c*, a diferents òrgans (Liu et al., 2001). Altres molècules que han estat implicades en la determinació de l'eix dreta-esquerra són: **FGF8**, **àcid retinoic** i **BMP** (Burdine i Scheier, 2000)

També s'ha implicat la participació de la rotació dels cilis en la formació de l'eix dreta-esquerra, com orienta a pensar la incidència d'un 50% de "situs inversus" existent a la Síndrome de Kartagener a on hi ha, com a principal alteració, un defecte en els cilis (Brueckner, 2001).

3.3.1.2. La gastrulació. Formació de les capes germinals

La gastrulació és un procés molt conservat en l'evolució, doncs és la manera com els éssers triblàstics adquireixen la tercera capa. En la gastrulació les cèl·lules del embrió es diferencien en tres fulles: l'**ectoderma**, el **mesoderma** i l'**endoderma**, posteriorment en la unió entre el neuroepiteli i l'ectoderma de superfície es formarà una "quarta fulla" que és la **cresta neural**.

El dia 8 1/2 de desenvolupament intrauterí, en la rata (Schneider i Norton, 1979), el dia 15 en embrions humans, es forma la **línia primitiva** en la superfície de l'epiblast. Al costat d'aquesta les cèl·lules de l'epiblast comencen a proliferar, a perdre la cohesió i a migrar a través de la línia primitiva a l'espai entre epiblast i hipoblast. En una primera onada algunes d'aquestes cèl·lules van a substituir a les cèl·lules de l'hipoblast formant l'**endoderma** definitiu i altres, en una segona onada, van a formar una nova capa, el **mesoderma**, entre l'**ectoderma** (fins a aquest moment havia estat epiblast) i endoderma. No està del tot clar si les cèl·lules surten de la línia primitiva ja determinades per formar endoderma o mesoderma o bé si la determinació es fa "in situ" per acció de determinants de l'entorn a on migren. S'ha vist que algunes cèl·lules del mesoderma comencen a expressar **Fibroblast growth factor 4 (FGF4)**, un gen de la línia mesodèrmica, quan estan sortint de la línia primitiva (Niswander i Martin, 1992). No està prou clar quins gens poden ésser els

responsables de la diferenciació a endoderma, només es coneixen en *Xenopus* en el que s'han trobat factors de transcripció (*mixer* i *sox* /) capaços de provocar la diferenciació a endoderma (Henry i Melton, 1998; Hudson et al., 1997). El node primitiu i la línia primitiva produeixen molts factors solubles com *Fibroblast growth factor* (FGF), *Transforming growth factor* β (TGF β), gens de la família *Wnt* (Beddington i Smith, 1993; Conlon et al., 1994; Faust i Magnusson, 1993; Tam i Behringer, 1997; Yamaguchi i Rossant, 1995) i *àcid retinoic* (Hogan et al, 1994). Aquests factors actuant aïlladament o en combinació poden decidir el destí de les cèl·lules cap a endoderma o mesoderma. Estudis amb marcadors mostren que les cèl·lules que formen l'endoderma provenen de la part anterior de la línia primitiva (Lawson i Pedersen, 1987; Rosenquist 1971), aquestes cèl·lules desplacen lateralment a les cèl·lules del sac vitel·lí que no formaran part del intestí embrionari. A partir d'aquest punt les diferents fulles embrionàries comencen a formar els primordis dels teixits que es formaran de cadascun d'ells.

3.3.1.3. Diferenciació segmentària del embrió

Quan es completa la gastrulació, en l'embrió de moltes espècies, hi ha un procés de segmentació corporal, establert pels *segment polarity gens* (com *Engrailed*), que és morfològicament més aparent a nivell dels somites en els vertebrats o en els parasegments de *Drosophila*, però en altres estructures, com tub neural o intestí primitiu, encara que no puguin delimitar-se morfològicament, estan ja delimitats genèticament. Els gens homeòtics no són els responsables d'aquesta segmentació sinó del destí final de cadascun d'aquests segments.

Els gens de la família Homeobox codifiquen factors de transcripció amb una regió d'unió al DNA, hèlix-volta-hèlix, d'aproximadament 60 aminoàcids, anomenada Homeodomini. Aquest domini està codificat per una seqüència de DNA de 180 pb anomenada Homeobox (caixa homeòtica). Les proteïnes codificades pels gens de la família homeobox poden ser activadores o repressores depenent de la funció d'altres dominis, l'homeodomini només és responsable de la unió al DNA.

Els gens hox en mamífers, i molt possiblement en tots els animals, estan organitzats en *clusters* tal i com es troben en *Drosophila melanogaster* en el complex bithorax-Antennapedia. En mamífers, molt probablement degut a les dues reduplicacions succeïdes des del complex ancestral comú a mamífers i mosques (Kappen et al., 1989), es troben localitzats en quatre "clusters" (Hoxa, Hoxb, Hoxc, Hoxd) localitzats en quatre cromosomes. La conseqüència d'aquest fet és que podem trobar en un mateix genoma la presència gens paràlegs que són gens molt similars doncs provenen de l'evolució separada d'un mateix gen en un precursor ancestral. S'ha vist que si manca un dels gens Hox, la seva funció pot ser

substituïda, al menys parcialment, per gens paràlegs presents en el seu genoma, minimitzant així els efectes de la mutació.

L'ordre en el que els gens es troben en els *clusters*, es manté constant al llarg de l'evolució de les espècies i és el mateix en què els gens s'expressen al llarg de l'embrió (colinealitat) i també en el temps, de manera que els que estan en situació 3' s'expressen més anteriorment (en l'eix anteroposterior) i abans en el temps (Dubole i Morata, 1994). Aquest ordre s'ha vist en mesoderma paraxial, tub neural, cresta neural, segments del cervell posterior i arcs branquials (Beck i Chawengsaksoaphak, 2000).

El patró d'expressió dels gens homeobox és deguda a la informació posicional proporcionada a les cèl·lules per un morfògen, probablement l'àcid retinoic o una molècula relacionada doncs s'ha detectat la presència de "elements de resposta a l'àcid retinoic" (RAREs) a Hoxa-1 (Dupé et al., 1997), a estimuladors (enhancers) de Hoxb-1 (Langston et al., 1997), al Promotor de Hoxa-4 (Doerksen et al., 1996) i al promotor de Hoxd-4 (Popperl i Featherstone, 1993). La conseqüència del gradient de morfògen és que en la part més anterior de l'embrió s'expressen només els més anteriors, mentre que en la regió posterior s'expressen tots.

Els gens homeobox són els primers esglaons d'una cadena gènica que produeix com a resultat final estructures diferents, però equivalents, en diferents espècies. El gen que senyalitza la formació d'una extremitat és homòleg en mosca i en home, però els gens que porten a terme aquesta tasca són diferents a home i a mosca doncs l'extremitat de cadascuna d'aquestes espècies és molt diferent de la de l'altre.

3.3.1.4. Organització axial de l'embrió

Com a conseqüència de la **gastrulació**, que forma les tres capes germinals; de la **segmentació**, que divideix l'embrió en segments delimitats genèticament i de la **determinació regional** que confereixen, fonamentalment, els gens *hox* es forma l'embrió amb tres fulles genèticament determinades però sense diferències regionals a nivell morfològic. En vertebrats, el mesoderma es constitueix en un cordó axial, el **notocordi**, unes estructures paraxials, els **somitòmers** i **somites**, un **mesoderma intermedi** i en una part més lateral, el **mesoderma lateral**. El notocordi envia senyals a l'ectoderma que respòn a la inducció formant la **placa neural**. El paper del notocordi en la inducció de la placa neural ha estat extensament estudiat des del punt de vista experimental per exemple en estudis a on mitjançant la irradiació d'ous de *Xenopus* s'aconseguien embrions als que s'havia alterat la formació del notocordi, i posteriorment mostraven marcades alteracions en la formació del terra del tub neural (Youn i Malacinski, 1981). La inducció de la placa neural per part del notocordi, es creu que es senyalitza per *shh* que s'expressa en notocordi i pot induir neurulació "in vivo" i "in vitro" (Echelard et al, 1993; Fan i Tessier-Lavigne, 1994) La

placa neural, passant per la fase de **canal neural**, es constituirà en **tub neural** que es diferenciarà en l'eix anteroposterior formant l'encèfal i la medúla espinal. Al mateix temps el notocordi envia senyals al mesoderma paraxial que produeixen la diferenciació d'esclerotom i dermatomiotom, les diferents parts dels somites, que constituiran les estructures axials característiques dels vertebrats: les vèrtebres i la resta del sistema músculoesquelètic axial. En aquest sentit s'ha vist que embrions d'amfibis als que s'ha alterat la formació del notocordi presenten alteracions marcades de la somitogènesi (Lehmann, 1926, 1928) o embrions de pollastre als que s'ha extret el notocordi mostren fracàs en la formació de l'esclerotom i consegüent engrandiment del dermatomiotom (Goulding et al., 1994). Aquesta inducció també es creu que està regulada per *shh* secretat pel notocordi (Munsterberg et al., 1995).

La segmentació i la regionalització són responsables de la diferenciació de la resta d'estructures corporals, mitjançant uns mecanismes semblants als descrits pel sistema nerviós central i l'esquelet axial en els que el diàleg entre els derivats de les diferents fulles embrionàries tenen un paper fonamental com comentaré posteriorment a l'apartat de morfogènesi.

3.3.2. Diferenciació cel·lular

Simultàniament a la formació del patró embrionari, les cèl·lules van adquirint unes propietats diferencials com a conseqüència, en primera instància, de la ubicació que els hi ha correspost en el pla corporal. Durant el desenvolupament dels éssers pluricel·lulars, les cèl·lules tendeixen a adquirir progressivament, mitjançant múltiples generacions de cèl·lules, les característiques específiques de cada tipus cel·lular en el procés anomenat **diferenciació cel·lular**. En aquest camí cap a la diferenciació hi ha una *estació* prèvia de **determinació** en la que la cèl·lula, tot i no mostrar encara les característiques d'un tipus cel·lular madur, ja ha activat els mecanismes genètics i epigenètics que condicionen el seu destí.

El zigot i les cèl·lules resultants de les primeres divisions d'aquest són **totipotencials**, en espècies en les que aquestes són cèl·lules independents, després progressivament van restringint el seu potencial i van determinant el seu destí.

Mitjançant tècniques de "marcatge cel·lular" es pot conèixer el **destí cel·lular** d'aquestes cèl·lules en el desenvolupament normal. El destí cel·lular no és equivalent a determinació doncs, fins el moment en que estan genèticament determinades, el destí pot canviar si canvien les condicions normals de desenvolupament. Amb empelts cel·lulars de la mateixa espècie, amb cèl·lules marcades, o d'una altra espècie, en determinats casos (Le Douarin, 1973), podem saber si les cèl·lules que trasplantem estan o no determinades,

observant si després del empelt esdevenen el tipus cel·lular corresponent a la localització en l'embrió d'origen (cèl·lules ja determinades) o de la localització en l'embrió "destí" (cèl·lules encara no determinades).

És possible la "marxa enrera" en la diferenciació quan ja s'ha arribat a la maduració cel·lular?. Es va realitzar un experiment en *Xenopus laevis* en el que es van trasplantar nuclis de cèl·lules intestinals, diferenciades, a ovòcits als que, mitjançant irradiació, s'havia destruït el nucli (Gurdon, 1986) per saber si nuclis *diferenciats* podien comportar-se com nuclis totipotents. El resultat va ésser, si bé no en tots els casos, l'obtenció d'embrions sencers, fet que va demostrar que els canvis que es produeixen en el nucli cel·lular durant la diferenciació no són irreversibles.

Una particularitat del camí lineal de la totipotencialitat a la diferenciació són les **stem cells**, cèl·lules pluripotencials en l'organisme madur, no són desviacions en el camí cap a la diferenciació, són simplement aturades. El concepte que actualment està en debat és el grau de pluripotencialitat que aquestes cèl·lules posseeixen. Són cèl·lules **determinades** per a generar derivats específics del òrgan a on es troben o pel contrari mantenen una potencialitat més enllà d'aquesta limitació? En els darrers anys s'ha pogut evidenciar que **stem cells** hematopoètiques són capaces de contribuir a la formació de múscul, fetge, cor, sistema nerviós i endoteli vascular (Blau et al., 2001) i s'ha vist experimentalment que poden transitar pel torrent circulatori i entrar a diferents òrgans com SNC (Brazelton et al., 2000), cor (Jackson et al., 2001), múscul esquelètic (Bittner et al., 1999) o d'altres òrgans (Krause et al., 2001). Aquests fets fan pensar en l'existència d'una població d'**stem cells** homogènia, en que les cèl·lules pluripotencials es diferencien cap als diferents tipus cel·lulars responen a estímuls del microentorn a on maduren (Blau et al., 2001).

3.3.3 Morfogènesi

La morfogènesi és la responsable d'ajuntar poblacions cel·lulars per a produir noves interaccions inductives i per a construir un organisme format per estructures tridimensionals, com cor, pulmons, ulls o extremitats a partir de làmines de cèl·lules epitelials i masses de cèl·lules mesenquimals (Hogan, 1999).

De la combinació d'elements procedents d'ectoderma, endoderma, mesoderma i cresta neural, mitjançant la morfogènesi, es formen les diferents estructures que donen lloc a l'organisme. La formació de qualsevol estructura o òrgan no és, però, només el cúmul o barreja de cèl·lules sinó la conseqüència d'un seguit d'interaccions cèl·lula-cèl·lula i cèl·lula-matriu extracel·lular (veure 3.2.3. Mecanisme de senyalització per contacte cèl·lula-

cèl·lula i cèl·lula-matriu extracel·lular), del creixement diferencial de les seves parts, de migracions cel·lulars, de remodelació per apoptosi i potser, de l'adaptació a un espai.

Des de fa temps es coneix que l'epiteli i el mesènquima no s'estableixen de manera independent dins d'una víscera sinó que, en el procés de formació, la comunicació entre ambdós és essencial per a un correcte resultat final (Haffen et al., 1983; Haffen et al., 1987).

Un exemple molt clar d'aquest fet el trobem en la interacció endoderma-mesoderma. Inicialment en la formació del tub digestiu, l'endoderma indueix al mesoderma subjacent a formar mesoderma visceral a través de l'acció de *shh* sobre *Bmp-4* i gens *Hox* de la classe Abd-B (Roberts et al., 1995) i posteriorment, un cop les cèl·lules mesodèrmiques estan ja especificades indueixen el patró diferencial del endoderma (Haffen et al., 1983). Aquesta regulació del endoderma per part del mesoderma s'ha vist en diferents espècies, entre les que hi ha la rata (Fukamachi i Takayama, 1980).

S'ha implicat també la senyalització del mesènquima sobre l'endoderma en la formació dels brots que formaran els diferents òrgans derivats del intestí primitiu (pulmons, fetge, ...), com *Fibroblast growth factors*, procedents del mesoderma, en l'origen del brot hepàtic (Jung et al., 1999) i el *factor Fgf10*, que s'expressa en el mesoderma, en la formació de les gemes pulmonars a E9.5 en el ratolí (Bellusci et al., 1997).

I així qualsevol estructura o òrgan corporal presenta la seva pròpia *història* d'interaccions i relacions que fan que sigui necessària aquella perfecta sincronització d'estar "en el lloc adequat, en el moment adequat" per a aconseguir passar de la primera cèl·lula a un organisme adult.

4. EL CONEIXEMENT DEL DESENVOLUPAMENT COM A EINA PER ENTENDRE EL CÀNCER

4.1. El càncer és una alteració genètica de la maquinària del desenvolupament

Es va començar a pensar que el càncer és una malaltia de base genètica al comprovar-se que hi havia una certa associació familiar d'alguns tipus de càncers. Les primeres troballes de gens alterats en el càncer daten del començament dels anys 80 quan es va veure, amb una certa sorpresa, que els gens implicats en el procés carcinogènic eren alteracions de gens cel·lulars normals (Bishop, 1983; Ramsay et al., 1984). En els darrers anys, al principi amb una certa perplexitat, s'ha vist que gran part dels gens alterats en el càncer són gens, i vies, del desenvolupament.

El càncer és un desordre cel·lular de gran magnitud, com a tal necessita eines de gran magnitud, potents, i quines són més potents que les que transformen una sola cèl·lula

en un organisme en un espai molt reduït de temps?. Es, per tant, atractiva la hipòtesi que la cèl·lula cancerígena "s'apropia" de la maquinària del desenvolupament, aparentment adormida, per a portar a terme el seu "pla conqueridor". No és que el càncer recapituli el desenvolupament sinó que "l'utilitza"

Des del punt de vista funcional les característiques dels teixits tumorals: independència cel·lular dels factors de creixement, insensibilitat a les senyals inhibitories del creixement, evasió del programa de mort cel·lular programada, angiogènesi sostinguda, invasió tissular i metàstasi (Hanahan i Weinberg, 2000) són transgressions de les bases cel·lulars del desenvolupament (Martínez Arias, 2001), és desenvolupament "sense control".

4.2. Gens del càncer-gens del desenvolupament

Qualsevol gen és susceptible de ser mutat en el càncer però probablement però només els que confereixin un avantatge es seleccionaran en el *procés evolutiu* anomenat càncer (Nowell, 1976). Podem parlar d'alteracions de la maquinària genètica del desenvolupament a dos nivells: alteració de gens i alteració de vies genètiques. En el càncer no muten vies sinó gens però l'alteració d'un sol gen pot produir el trastorn de tota una via amb conseqüències funcionals molt importants pel funcionament cel·lular (Sager, 1997). S'ha vist que Delta/Notch, Wnt/Frizzled, Hedgehog/Patched, TGF /BMP i RTKs, les vies més importants en el període del desenvolupament, presenten alteracions en diferents tipus de càncer produint diferents tipus d'avantatges a les cèl·lules tumorals (Martínez Arias, 2001). D'elles, utilitzaré com exemple la via *Wnt/β-catenina*, essencial durant el desenvolupament (Cadigan i Nusse, 1997). En cèl·lules no estimulades per *wnt*, *β-Catenina* (*Armadillo*, en *Drosophila*) forma complexos amb *Axina*, *Glycogen sintasa kinasa 3β* (*GSK3β*) i *APC* (Hart et al., 1998), en aquests complexos la interacció entre Axina i GSK3 facilita la fosforilació de *β-Catenina* per part de GSK3 (Ikeda et al., 1998) i aquesta fosforilació *marca* *β-Catenina* per a ser ubiquitinitzada i posteriorment degradada. Quan una proteïna codificada per un gen de la família *wnt*, l'homòleg de *wingless* en *Drosophila*, actua sobre un receptor propi de la membrana es produeix una translocació a la membrana d'una proteïna citoplasmàtica de la família Dishevelled (Axelrod et al., 1998) que, unint-se a Axina (Smalley et al., 1999), inhibeix el complex format per *β-catenina*/Axina/GSK3 /APC i permet *l'estabilització* de *β-Catenina* que s'allibera del complex i es transloca al nucli (Yokoya et al., 1999) a on unint-se a membres de la família TCF (Behrens et al., 1996) serveix de co-activador per estimular la transcripció dels gens *diana* de Wnt. Quan APC està mutat, com passa en el 85% dels tumors esporàdics i hereditaris de colon (Kinzer i Vogelstein, 1996), el complex *β-catenina*/Axina/GSK3 /APC no és funcional i *β-catenina* s'*estabilitza* (Morin et al.,

1997) amb la conseqüent activació dels gens *diana* de wnt, com *c-myc* (He et al., 1998), un proto-oncogen, que estimula el creixement cel·lular. Fins aquí l'exemple, APC és el gen mutat i Wnt/ -catenina la via alterada i autèntica responsable del efecte carcinogètic de la mutació d'APC.

4.3. Stem cells: el substracte de la transformació

Les *stem cells* posseeixen les característiques adequades per pensar que és en elles on s'origina el càncer: poden perpetuar-se i autoreplicar-se i la seva vida és el suficientment llarga per acumular les mutacions necessàries per què es produeixi el genotip tumoral (Taipale i Beachy, 2001). I en aquest fet trobem un altre punt de connexió entre desenvolupament i càncer perquè les *stem cells* no deixen de ser la resta del embrió que cadascun de nosaltres portem a dins.

5. ESTRATEGIES DE DETECCIÓ DE NOUS GENS EXPRESSATS EN EL DESENVOLUPAMENT

L'estudi de gens diferencialment expressats és molt important l'estudi del desenvolupament, de la diferenciació cel·lular o del càncer doncs aquestes situacions es caracteritzen per canvis en l'expressió gènica, amb un genoma permanent en el cas del desenvolupament o amb un genoma canviant en el cas del càncer.

Per a estudiar aquesta expressió gènica, diferencial, s'han desenvolupat, al llarg del temps, diferents tècniques.

5.1. Tècniques basades en la hibridació diferencial

Aquest grup de tècniques es basa en la capacitat de hibridar-se dues seqüències d'àcid nucleic que tenen la mateixa, però complementària, seqüència de nucleòtids. Són molt específiques, però presenten els inconvenients de ser complicades de realitzar i en determinats casos, com el de la hibridació substractiva, només és possible comparar les mostres de dos en dos.

Les principals tècniques desenvolupades utilitzant l'estratègia de la hibridació diferencial són:

1. Cribratge diferencial de gens: Consisteix en construir sondes radioactives procedents de dues fonts diferents de RNA i hibridar-les amb una llibreria de cDNA. Quan un cDNA només hibrida amb la sonda procedent d'una de les dues fonts podem dir que hi ha una expressió diferencial d'aquell gen.

2. Hibridació subtractiva: Hibridar una població de DNA o cDNA, que es troba en excés, amb una altre relacionada, present en defecte, per eliminar de la segona població les seqüències presents també en la primera i enriquir-la amb seqüències diferents. Si s'hibrida cDNA-mRNA es poden trobar diferències en l'expressió gènica entre dos poblacions (teixit normal-tumor, tumor localitzat-tumor metastàtic, dos estadis del desenvolupament...). Si s'hibrida DNA-DNA es trobaran diferències a nivell genòmic.

3. Anàlisi de les diferències representacionals Combina l'estratègia de l'hibridació subtractiva amb la força amplificadora de la PCR (Wieland et al., 1990)

5.2. Tècniques basades en l'estratègia del fingerprinting

5.2.1. Bases teòriques

Moltes de les limitacions de les tècniques basades en l'hibridació han estat superades per les **tècniques de fingerprinting**, que utilitzen, com a estratègia, l'amplificació de cadenes nucleotídiques mitjançant *primers* arbitraris. Aquestes tècniques varen ser establertes inicialment en DNA, i posteriorment emprades en l'anàlisi de RNAs procedents de diferents fonts (Welsh et al., 1992 i Liang i Pardee, 1992). La gran avantatge d'aquestes tècniques és la seva simplicitat i que és possible treballar amb poca quantitat d'àcids nucleics (DNA o RNA) gràcies al poder amplificador de la PCR.

Per a l'estudi de l'expressió gènica diferencial és molt important que les mostres a comparar siguin el més semblants possible doncs d'aquesta manera reduïm el número de gens diferencialment expressats a comparar (Shen, 2001)

5.2.2. Fonaments tècnics

Les tècniques d'RNA fingerprinting, parteixen, com a motlle, de RNA total o mRNA. El primer pas és la transcripció inversa amb la que, amb l'addició d'un *primer* arbitrari, es selecciona la subpoblació d'RNA amb la que aquest hi troba un cert grau de complementarietat. El següent pas consisteix en la realització d'una PCR, amb un *primer* també arbitrari, el mateix que el de la *retrotranscripció* o no, que te dues fases ben delimitades:

1ª fase: PCR de baixa astringència (5 cicles): Es realitza en condicions de baixa astringència per a que el *primer* s'uneixi a les cadenes de cDNA amb les que, sense necessitat de ser perfectament complementàries, mostri un cert grau d'homologia. El resultat d'aquesta fase són un número variable de productes de PCR que contenen la seqüència del *primer* a ambdós extrems.

2^a fase: PCR d'alta astringència (20-35 cicles) El *primer* arbitrari troba ara una seqüència perfectament complementària a ambdós costats de la seqüència amplificada pel qual, en els cicles d'alta astringència, s'augmentarà exponencialment el número de còpies de cDNA que s'han generat a la fase de baixa astringència.

El producte final d'aquesta PCR es sotmet a una electroforèsi en un gel desnaturalitzant d'Acilamida a on s'obté un patró de fingerprinting en el que s'observa la presència d'un determinat número de bandes, presents o no en totes les mostres, i amb una intensitat diferencial entre elles. Amb aquests resultats podem conèixer:

1. La **presència** o no d'un determinat transcrit en cadascuna de les mostres estudiades
2. La **quantitat relativa** d'RNA que hi ha en les diferents mostres. Les tècniques de fingerprinting són semiquantitatives (McClelland i Welsh, 1994), això és, que permeten comparar la intensitat d'una banda a diferents mostres però no diferents bandes a una mateixa mostra. El motiu d'aquest fet és que la quantitat de producte final, per una determinada seqüència, depèn de la quantitat inicial que n'hi ha a la mostra però també del grau de complementarietat que existeix amb el *primer* (a major homologia, més amplificació).

5.2.3. Tècniques basades en el fingerprinting

Existeixen dues tècniques diferents basades en el fingerprinting: El **differential display** (Liang and Pardee, 1992) i la **RNA arbitrarily primed PCR (RAP-PCR)** (Welsh et al., 1992). Entre elles l'única diferència està en el *primer* utilitzat en la transcripció inversa en la RAP-PCR és un *primer* arbitrari i en el cas del DD és un oligo-dT amb un o dos nucleòtids (no timines) en l'extrem 3' perquè el *primer* s'uneixi al a començament de la seqüència codificant, en cas contrari podria ser que el *primer* només amplifiqués adenines.

S'han plantejat estratègies alternatives com la de realitzar la transcripció inversa amb un *primer* arbitrari de 6 nucleòtids produint d'aquesta manera una població de cDNAs que corresponen a totes les molècules d'RNA (Sokolov i Prockop, 1994).

Una altre modificació de la tècnica és la **Targeted RNA fingerprinting** en la que la PCR es realitza amb el *primer* arbitrari utilitzat en la transcripció inversa i un altre corresponent a una regió conservada present en els membres d'una determinada família de gens, d'aquesta manera fem una selecció de RNAs de gens de la família que hem escollit (Stone i Warthon, 1994)

5.2.4. Avantatges i desavantatges de les tècniques de fingerprinting

Entre les avantatges de les tècniques del RNA fingerprinting destaquen:

1. La velocitat i simplicitat amb que és possible realitzar la tècnica
2. Una petita quantitat de RNA pot ésser suficient, donat que el cDNA que comparem és amplificat mitjançant una reacció de PCR.
3. El número de mostres a comparar pot ésser tant gran com es vulgui.
4. Permet comparar l'expressió d'un transcrit, des del punt de vista quantitatiu, entre dues mostres diferents doncs la proporció d'intensitat de les bandes, dins d'un patró, es manté constant a les diferents mostres.

Respecte als inconvenients de la tècnica el principal és que els transcrits poc abundants són mal representats en el patró de fingerprinting. Aquest problema pot ésser parcialment solucionat fent una RAP-PCR "nested" que consisteix en fer dues amplificacions consecutives, utilitzant en la primera amplificació el mateix *primer* que en la RT i en la segona un *primer* igual però modificant-hi una o dues bases en el seu extrem 3', de manera que disminueix el número de transcrits susceptibles de ser amplificats augmentant l'eficàcia en tots ells (Ralph i Welsh, 1993)

5.2.5. RNA Fingerprinting i desenvolupament

El RNA fingerprinting compara expressió gènica per la qual cosa és una tècnica molt adequada per a l'estudi del desenvolupament. S'han realitzat estudis en diferents espècies per a estudiar expressió gènica diferencial durant el desenvolupament. Podem destacar, per la similitud amb el nostre, el treball en el que s'ha estudiat l'expressió gènica diferencial en el budell del fetus de rata (Duluc et al., 2001) cercant diferències entre epiteli i mesènquima, però sense realitzar estudis de localització histològica dels gens. En rata també s'han realitzat altres treballs en els que s'estudiava la transició epiteli-mesènquima en el desenvolupament del metanefros (Plisov et al., 2000), la condrogènesi (Dietz i Sandell, 1996) i la neurogènesi en la medulla espinal (Pazman et al., 2000), entre d'altres.

En ratolí entre els treballs que han utilitzat les tècniques de fingerprinting destaquen els realitzats per detectar gens expressats en el període preimplantacional (Zimmermann i Schultz, 1994). Durant el període de la gastrulació destaca el que va detectar el gen *Cryptic* expressat en el mesoderma axial i lateral (Shen et al., 1997). En fases més avançades del desenvolupament s'ha analitzat l'expressió diferencial d'òrgans com hipòfisi (Douglas i Camper, 2000), timus (Pascolo et al., 1999), mesènquima pulmonar (Kaplan et al., 1999) o cervell (Loones et al., 2000).

En pollastre s'ha estudiat amb tècniques de differential display l'expressió gènica a la notocorda (Liaubet et al., 2000), al cervell mig i posterior (Chambers et al., 2000) o a l'otocist (Gong et al., 1997). En el porc destaca un treball en que es va estudiar l'expressió gènica diferencial del trofo-ectoderma (Wilson et al., 2000), en *Xenopus* a diferents estadis del desenvolupament (Adati et al., 1995) i en *Zebrafish* durant la gastrulació (Conway, 1995). Per parlar d'una espècie citada en l'apartat de models biològics dir que també s'han fet estudis differential display en el desenvolupament d'*Arabidopsis Thaliana* com el que va identificar els gens ATS1 i ATS3 (Nuccio i Thomas, 1999)