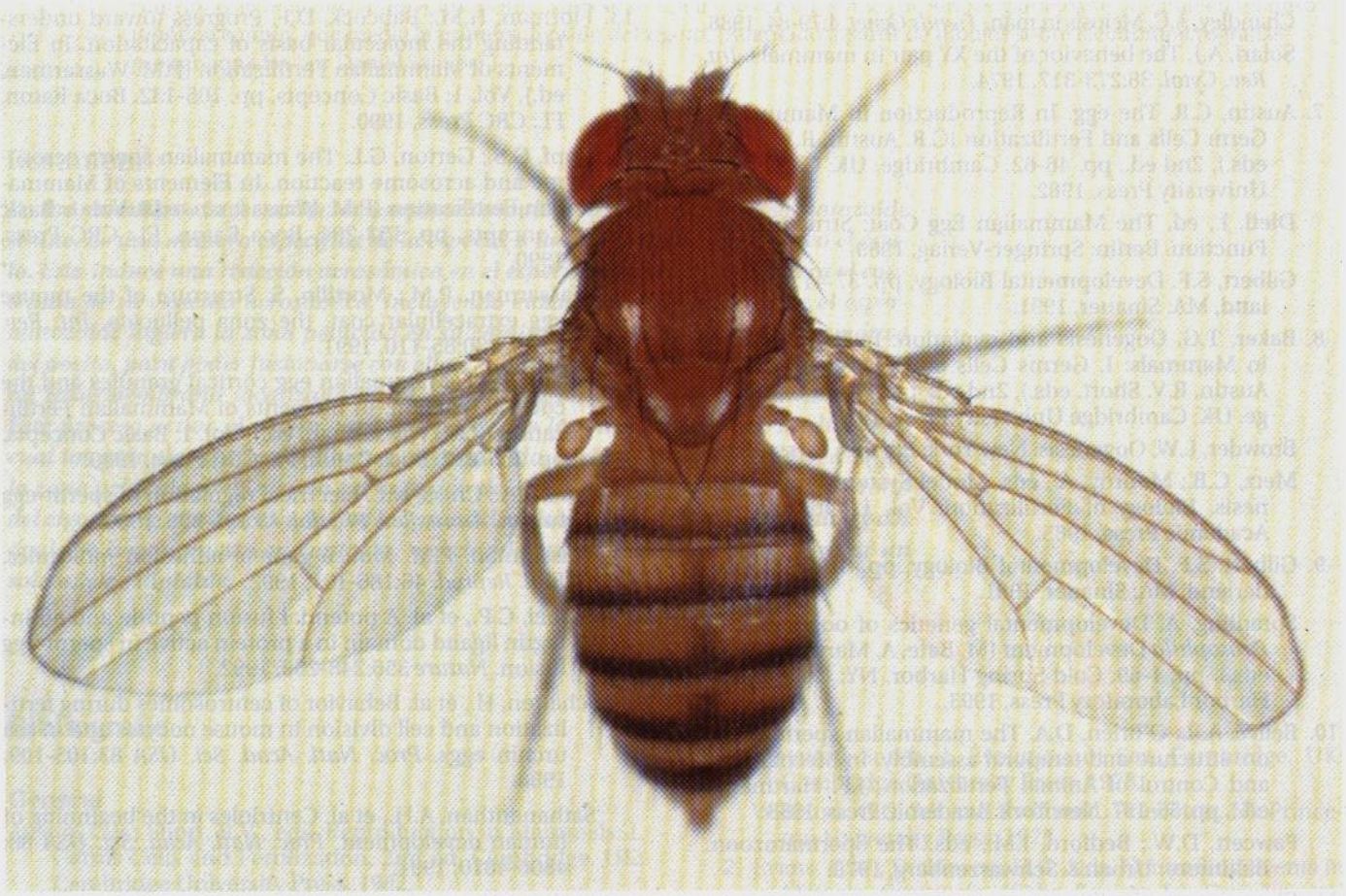


La mosca *Drosophila melanogaster*. (Por cortesía de E.B. Lewis.)

Mecanismos celulares del desarrollo

21

- Movimientos morfogénicos y la forma del mapa corporal
- Diversificación celular en el embrión animal temprano
- Memoria celular, determinación celular y el concepto de valores posicionales
- El gusano nemátodo: los genes controladores del desarrollo y las leyes del comportamiento celular
- *Drosophila* y la genética molecular del patrón de formación. I. Génesis del mapa corporal
- *Drosophila* y la genética molecular del patrón de formación. II. Genes selectores homeóticos y modelaje de las partes del cuerpo
- El desarrollo vegetal
- El desarrollo neural

Un animal o una planta pluricelulares son un clon ordenado de células que contienen el mismo genoma pero que presentan especializaciones distintas. La estructura final puede ser enormemente compleja pero se genera por un limitado repertorio de actividades celulares. Las células crecen, se dividen y mueren. Forman uniones mecánicas y generan fuerzas para sus desplazamientos y movimientos. Se diferencian mediante la expresión o inhibición de determinados grupos de proteínas. Producen señales moleculares que afectan a las células vecinas y a su vez responden a señales que las células vecinas les envían. El genoma, repetido de forma idéntica en todas las células, define las reglas según las cuales las diferentes actividades celulares posibles entrarán en juego. Mediante este proceso, en cada célula se establecen las directrices que conducirán el complicado proceso del desarrollo pluricelular por el que se genera un organismo adulto a partir de un huevo fecundado.

En este capítulo, en lugar de estudiar un organismo en detalle, ilustraremos los principios generales del desarrollo mediante referencias a las especies que mejor ilustren cada principio. Primero veremos cómo los movimientos y las divisiones celulares dan forma al embrión animal y cómo se establecen las diferencias entre células según un patrón espacial. Después consideraremos cómo actúa la memoria celular para perpetuar dicho patrón espacial de diferenciación y permite el almacenaje de nuevos detalles a medida que crece el animal. En la parte central del capítulo examinaremos los mecanismos genéticos fundamentales de control, tomando como ejemplo el nemátodo *Caenorhabditis elegans* y la mosca *Drosophila melanogaster*. Veremos cómo la genética molecular ha revelado similitudes notables en el desarrollo de las más diversos grupos de animales. Debido a que las lombrices y las moscas son primos nuestros, lo que aprendamos a partir de ellos nos proporciona una información crucial sobre el desarrollo de los mamíferos.

Las dos últimas partes de este capítulo se pueden leer como módulos separados: revisamos el desarrollo de plantas con flores y nos preguntamos hasta qué punto siguen los mismos principios que rigen el desarrollo animal, y luego revisamos los mecanismos especiales mediante los cuales el sistema nervioso desarrolla su extraordinaria red.

Movimientos morfogénicos y la forma del mapa corporal[1]

Empezaremos considerando cómo se forma la estructura geométrica de un embrión temprano de vertebrado. Nos centraremos en el desplazamiento de las cé-

lulas hacia sus posiciones correctas. En los apartados siguientes consideraremos la adopción por parte de las células de los caracteres diferenciados correctos. Tradicionalmente se distinguen tres fases en el desarrollo de un vertebrado –y por supuesto de muchas otras clases de animales. Durante la primera fase el huevo fecundado *se segmenta* y forma muchas células más pequeñas, las cuales se organizan formando un epitelio y realizan una compleja serie de desplazamientos, llamados *gastrulación* y *neurulación*, que determinan el mapa básico del cuerpo –una cavidad intestinal y un tubo neural rudimentarios. Durante la segunda fase se forman los rudimentos de los diversos órganos del cuerpo, tales como las extremidades, los ojos, el corazón, etc.– proceso denominado *organogénesis*. En la tercera fase las pequeñas estructuras que se han generado de esta forma crecen hasta alcanzar su tamaño adulto. Estas fases no están claramente delimitadas en el tiempo sino que se solapan. La rana *Xenopus laevis* (Figura 21-1) nos servirá para seguir el desarrollo de un huevo fecundado hasta el inicio de la organogénesis. Al igual que en otros anfibios, todo el proceso a partir de la fecundación ocurre fuera de la madre, y el embrión en desarrollo es resistente y fácil de manipular para la experimentación.

La polaridad del embrión de anfibio depende de la polaridad del huevo[2]

El huevo de *Xenopus* es una célula grande, aproximadamente de un milímetro de diámetro, rodeada por una cápsula o cubierta extracelular gelatinosa. La mayor parte del volumen celular está ocupado por plaquetas vitelinas, que son agregados lipoproteicos rodeados por una membrana. El vitelo está concentrado en el extremo inferior del huevo, denominado **polo vegetativo**; el extremo superior se denomina **polo animal**. Las regiones animal y vegetativa contienen conjuntos distintos de moléculas de mRNA, diferentes cantidades de vitelo y de otros componentes celulares, y tienen destinos diferentes. En líneas generales, el extremo vegetativo del huevo está destinado a la formación de tejidos internos (particularmente el tubo digestivo), mientras que el extremo animal dará lugar a los tejidos externos (por ejemplo la piel). La fecundación inicia una compleja serie de desplazamientos que finalmente doblarán la región vegetativa hacia el interior, formarán el intestino, y a lo largo del proceso establecerán los tres ejes del cuerpo: el *anteroposterior*, desde la cabeza a la cola; el *dorsoventral*, de la espalda al vientre; y el *mediolateral*, desde el plano medio a derecha e izquierda.

La asimetría animal-vegetativa de un huevo no fecundado define solamente uno de los dos ejes finales del cuerpo –el anteroposterior– pero la fecundación desencadena una distorsión del contenido del huevo creando una asimetría adicional que determina una diferencia dorsoventral: el córtex citoplasmático del huevo, exterior, rico en actina, gira bruscamente respecto al centro del huevo, de tal modo que el polo animal del córtex se inclina ligeramente hacia la futura cara ventral (Figura 21-2). La dirección del giro viene determinada por el punto de entrada del espermatozoide –quizá por efecto del centrosoma que el espermato-

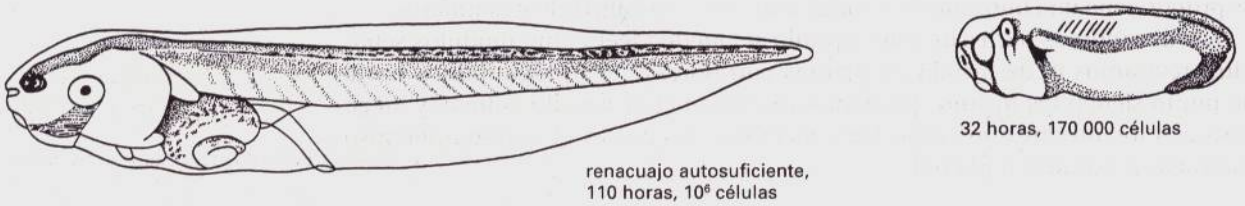


Figura 21-1 Sinopsis del desarrollo del huevo de *Xenopus laevis* desde el huevo recién fecundado hasta el renacuajo autosuficiente. La fotografía superior muestra la rana adulta. Las fases del desarrollo se han dibujado vistas de lado, salvo en el caso del embrión de 10 horas y del embrión de 19 horas, que se han dibujado desde abajo y desde arriba respectivamente. Salvo los adultos, todos las fases se muestran a la misma escala. (Fotografía por cortesía de Jonathan Slack; dibujos según P.D. Nieuwkoop y J. Faber, Normal table of *Xenopus laevis* [Daudin]. Amsterdam: North-Holland, 1956.)

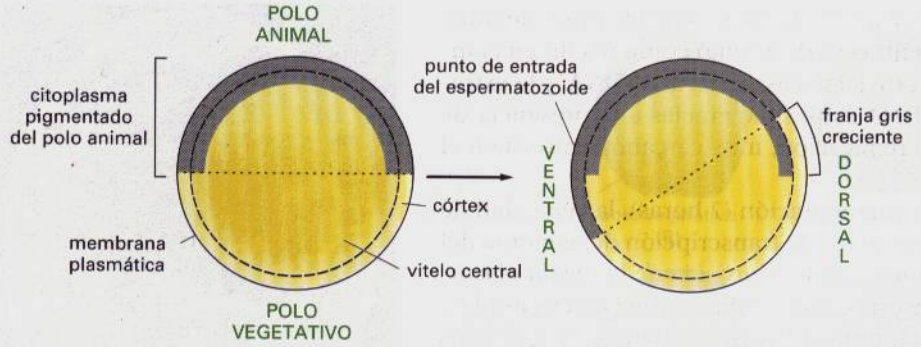


Figura 21-2 Primer desplazamiento morfogénico después de la fecundación de un huevo de rana. El córtex del huevo (una capa de escasas micras de profundidad) gira aproximadamente 30° en relación al centro del huevo, en una dirección determinada por el lugar de entrada del espermatozoide. En las especies que presentan pigmentación en el polo animal, la rotación genera una franja gris creciente (media luna gris) opuesta al punto de entrada del espermatozoide.

zoide introduce en el óvulo. En muchas especies de anfibios aparece una banda de pigmentación clara, llamada *media luna gris*, opuesta al punto de entrada del espermatozoide, que es debida a que los gránulos de pigmento se desplazan a causa del giro. En los alrededores de la media luna gris el córtex del hemisferio vegetativo se yuxtapone con la región central del citoplasma del hemisferio animal, creando una región especial, crucial para la organización del eje dorsoventral del cuerpo, tal como veremos más adelante.

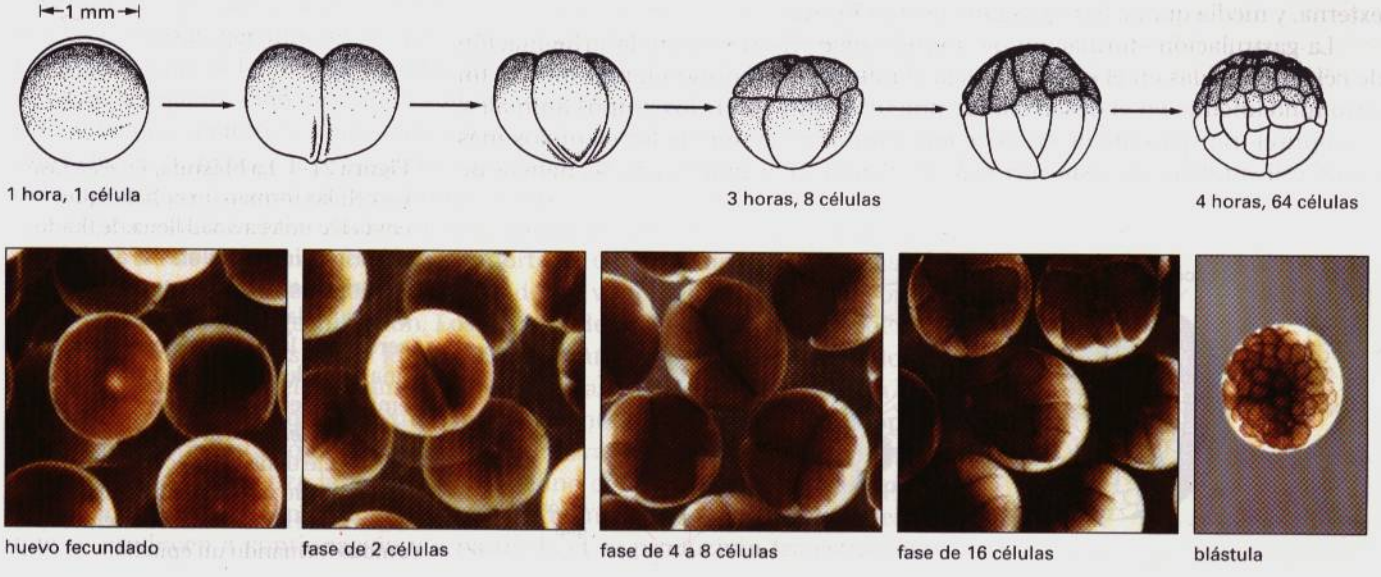
El punto de entrada del espermatozoide corresponde, más o menos, con el futuro vientre; el lado opuesto formará las estructuras de la espalda y el dorso, incluida la médula espinal. Los tratamientos que bloquean la rotación permiten que la segmentación del huevo se produzca con normalidad pero se forma un embrión con un intestino central y sin asimetría dorsoventral.

La segmentación produce muchas células a partir de una célula inicial[3]

La rotación cortical se completa aproximadamente una hora después de la fecundación y dispone la escena para la *segmentación*, en la cual una única y gran célula huevo se subdivide repetidamente por mitosis, dando lugar a muchas células más pequeñas, o **blastómeros**, sin que se produzca cambio en la masa total (Figura 21-3). Para sobrevivir, el embrión ha de alcanzar rápidamente un estado en el que pueda empezar a alimentarse, nadar y escaparse de los depredadores; estas primeras divisiones celulares son extraordinariamente rápidas, con un ciclo de aproximadamente 30 minutos. Parece que la elevada velocidad de replicación del DNA y de la mitosis imposibilita que se produzca transcripción génica (aunque se produce síntesis de proteínas), de forma que la segmentación del

Figura 21-3 Etapas de segmentación en *Xenopus*. Los dibujos muestran una serie de visiones laterales. Las fotografías están tomadas desde arriba. Las escisiones subdividen rápidamente el huevo en muchas células más pequeñas. La división celular es sincronizada durante las 12 primeras escisiones, aunque las divisiones son asimétricas, de forma que el número de células vegetativas inferiores, cargadas de vitelo, es menor y son más grandes.

Las asimetrías del huevo y los patrones de segmentación varían de unas especies animales a otras. En los mamíferos, cuyos óvulos pequeños y simétricos contienen poco vitelo, las tres primeras escisiones dividen la célula en ocho blastómeros idénticos. En el otro extremo, tenemos como ejemplo el huevo cargado de vitelo de las aves, cuya segmentación no se completa en el vitelo, permaneciendo todos los núcleos adheridos al polo animal; entonces el embrión se desarrolla a partir de un grupo de células situadas encima del vitelo. (Fotografías cortesía de Jonathan Slack.)



embrión depende casi totalmente de la reservas de RNA, de proteínas y de otros materiales acumulados en el huevo mientras se desarrolló como oocito en el interior de la madre. La única biosíntesis crucial necesaria es la de DNA, y la extraordinariamente rápida replicación de DNA es posible gracias a la presencia de un número elevadísimo de orígenes de replicación, muy cercanos entre sí en el DNA cromosómico.

Tras aproximadamente 12 ciclos de segmentación (7 horas), la velocidad de la división celular baja bruscamente y comienza la transcripción del genoma del embrión. Parece que este cambio, denominado la *transición de la media blástula*, se inicia debido a que se alcanza una proporción crítica entre DNA y citoplasma: la transición puede verse acelerada o retrasada si aumentamos o reducimos artificialmente la cantidad de DNA presente en el huevo.

La blástula es una cavidad rodeada por un epitelio[4]

Desde el inicio, las células del embrión no se unen entre sí sólo mecánicamente, sino que también están acopladas por medio de *uniones de tipo gap* a través de las que pueden pasar iones y pequeñas moléculas, transportando mensajes que pueden participar en la coordinación del comportamiento celular. Mientras tanto, en las regiones más externas del embrión existen *uniones estancas* entre blastómeros que generan una soldadura que aísla el interior del embrión del medio externo. Aproximadamente en la fase de 16 células se empieza a bombear Na^+ a través de las membranas celulares hacia los espacios intercelulares del interior del embrión, y el agua sigue al Na^+ como resultado del gradiente de presión osmótica que se produce. Los espacios intercelulares del interior del embrión se agrandan formando una sola cavidad, el **blastocele**, y ahora el embrión se denomina **blástula** (Figura 21-4). Las células que forman la superficie exterior de la blástula se organizan en una capa epitelial, que será decisiva en la coordinación de su comportamiento posterior.

La gastrulación transforma una esfera hueca de células en una estructura triestratificada con un intestino primitivo[5, 6]

Cuando las células de la blástula han quedado ordenadas formando la capa epitelial, pueden iniciarse los desplazamientos coordinados de la **gastrulación**. Este espectacular proceso transforma la simple esfera hueca de células en una estructura pluriestratificada, con un tubo digestivo central y una simetría bilateral: como consecuencia de una complicada invaginación, muchas de las células situadas en la periferia del huevo se desplazan al interior del mismo. El desarrollo posterior depende de las interacciones entre las tres capas de células, interna, externa, y media que se han generado de esta forma

La gastrulación –formación de un tubo digestivo mediante la invaginación de células situadas en el exterior, hacia el interior del embrión temprano– es un paso fundamental en el desarrollo de prácticamente todos los grupos animales. El embrión transparente de erizo de mar proporciona uno de los ejemplos más claros e ilustrativos de este proceso. La Figura 21-5 muestra la secuencia de

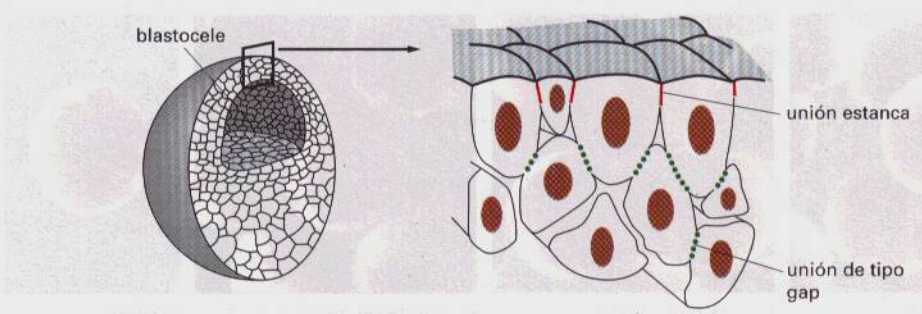


Figura 21-4 La blástula. En esta fase las células forman un epitelio que envuelve una cavidad llena de fluido, el blastocele. Las células se asocian eléctricamente mediante uniones de tipo gap y las uniones estancas cercanas a la superficie externa crean una soldadura que aísla el interior del embrión del medio externo. Obsérvese como en *Xenopus* la pared del blastocele tiene varias células de grosor y que sólo las células más externas se encuentran fuertemente unidas formando un epitelio.

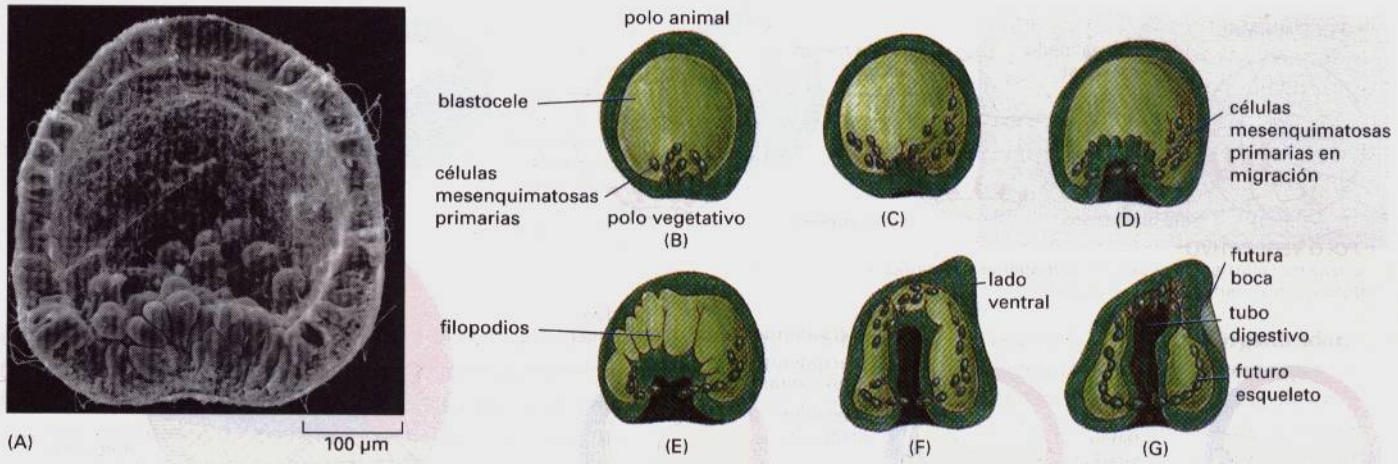


Figura 21-5 La gastrulación en el erizo de mar. El punto de partida de la gastrulación del erizo de mar es una simple blástula: una capa de cerca de 1000 células que envuelve una cavidad esférica. (A) Una electronmicrografía de barrido muestra el plegamiento interior inicial del epitelio en el polo vegetativo. (B) Un primer grupo de células del mesénquima se liberan del epitelio en el polo vegetativo de la blástula. (C) Estas células se arrastran por la cara interior de la pared de la blástula. (D) Mientras, en el polo vegetativo, el epitelio continúa invaginándose. (E y F) El epitelio continúa su invaginación y se extiende formando un tubo intestinal largo: las célula que se invaginan cambian activamente su empaquetamiento sin alterar demasiado su forma celular normal, convirtiendo así su formación inicial de cúpula aplanada en un tubo digestivo largo y estrecho. Este tipo de movimiento de tejidos, en el que una capa de células se alarga en una dirección al mismo tiempo que se acorta en la otra, es una de las causas principales del remodelaje durante el desarrollo animal y se denomina *extensión convergente*. Al mismo tiempo, algunas células de la capa epitelial que se invagina proyectan filopodios hacia el interior de la cavidad del blastocele; dichos filopodios entran en contacto con las paredes de la cavidad, se adhieren a ella, y se contraen, contribuyendo así a dirigir el desplazamiento invaginante. (G) El extremo del tubo digestivo entra en contacto con la pared de la blástula en la localización donde aparecerá la futura boca. Aquí se fusionará el epitelio formando un agujero. (A, de R.D. Burke, R.L. Myers, T.L. Sexton, y C. Jackson, *Dev.Biol.* 146:542-557, 1991; B-G según L. Wolper y T. Gustafson, *Endeavour* 26:85-90, 1967.)

acontecimientos, comenzando a partir de una sencilla blástula hueca. Esquemáticamente, las células situadas en el polo vegetativo se invaginan, formando un tubo que finalmente entrará en contacto con el epitelio cerca del polo opuesto del embrión, formando la boca. Mientras tanto, en determinados puntos salen células del epitelio invaginado y se desplazan por el interior de la cavidad del cuerpo formando el tejido conjuntivo embrionario, o *mesénquima*.

En la estructura triestratificada formada por la gastrulación, la lámina interna, el tubo digestivo primitivo, es el *endodermo*; la lámina externa, es decir el epitelio que ha permanecido externo, es el *ectodermo*; y entre ambos está el *mesodermo*, la capa más laxa de tejido formada por células mesenquimatosas. Éstas son las tres **hojas germinales** iniciales características de los animales superiores. La organización del embrión en estas tres capas se corresponde, a grandes rasgos, con la organización del adulto –intestino en el interior, epidermis en el exterior, y tejido conjuntivo y músculo entre ambos. Globalmente se puede decir que estas tres capas de tejidos adultos derivan respectivamente del endodermo, del ectodermo y del mesodermo, aunque existen excepciones.

El proceso de la gastrulación es más complejo en el huevo de *Xenopus* que en el de erizo de mar. Sin embargo, es importante conocer sus principios básicos ya que los ejes fundamentales del cuerpo de un vertebrado se generan por los desplazamientos de la gastrulación. Los detalles de este proceso se describen en la Figura 21-6. El tejido situado junto a la media luna gris, a un lado del polo vegetativo, juega un papel fundamental. Aquí la gastrulación comienza con una pequeña invaginación que se extiende gradualmente formando el **blastoporo** –una línea de penetración que finalmente se curva rodeando el polo vegetativo. El lugar donde comienza la invaginación define el *labio dorsal* del blastoporo; este tejido juega un papel importante en las complejas series de movimientos que se producen a continuación y a partir de él se producirán las estructuras

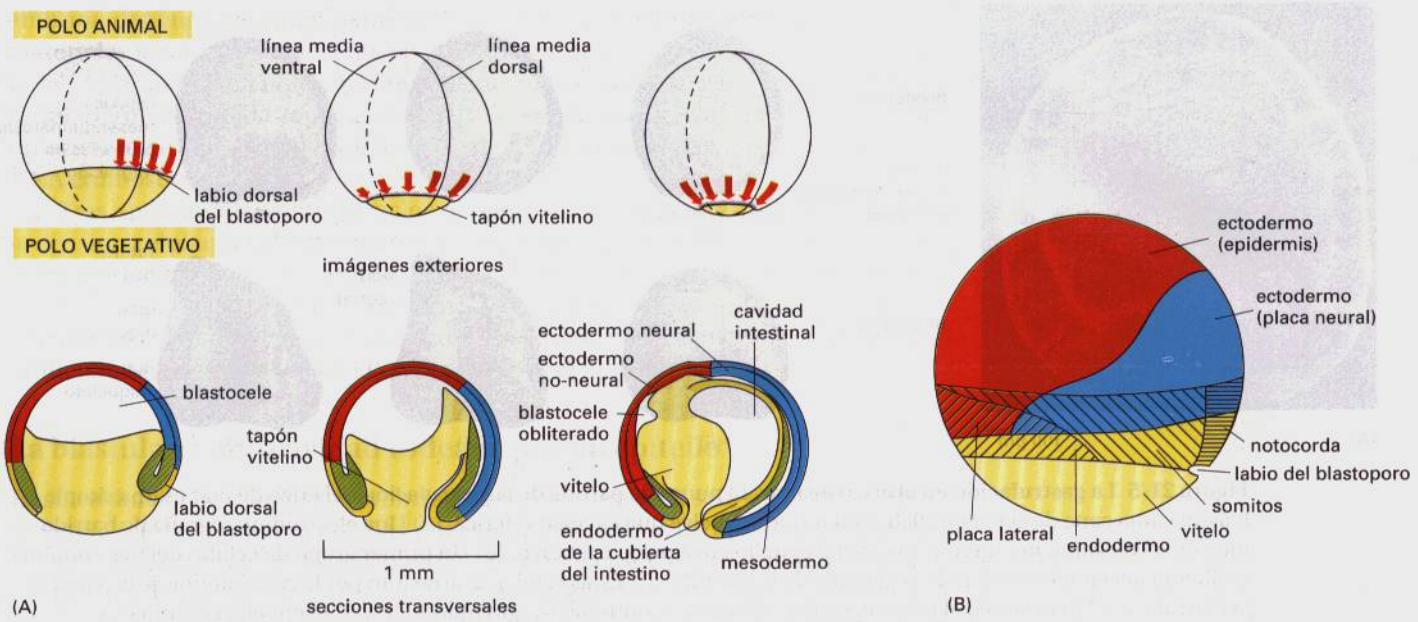


Figura 21-6 La gastrulación en *Xenopus*. (A) Las imágenes exteriores (*arriba*) muestran el embrión como un objeto semitransparente, la visión es lateral; las secciones transversales (*abajo*) están extraídas del plano medio (el plano en el que se cruzan las líneas dorsales y ventrales). Las direcciones del movimiento celular se indican mediante *flechas rojas*. La gastrulación se inicia cuando aparece una corta invaginación, el primer signo del futuro blastoporo, en el exterior de la blástula. La invaginación se extiende gradualmente, curvándose alrededor de la blástula hasta que cierra el círculo envolviendo un grupo de células con abundante vitelo (que finalmente quedarán encerradas en el intestino y serán digeridas). Mientras esto ocurre, varias capas de células se repliegan alrededor del labio del blastoporo y se desplazan hacia el interior del embrión. Al mismo tiempo el epitelio externo de la región del polo animal se extiende ocupando el lugar de la capas celulares que se han replegado. Finalmente, el epitelio del hemisferio animal se extiende de esta forma cubriendo la superficie externa del embrión en su totalidad, y a medida que se completa la gastrulación, el círculo del blastoporo se contrae quedando reducido prácticamente a un punto. (B) Mapa del destino de las diferentes zonas del embrión temprano de *Xenopus* (visto lateralmente) al iniciar la gastrulación, que muestra los orígenes de las células que formarán las tres capas germinales como resultado de los movimientos en la gastrulación. Las distintas partes del mesodermo (placa lateral, somitas y notocorda) derivan de células situadas más profundamente en la franja rayada, de cuyo epitelio se segregarán posteriormente; las otras células, incluidas las más superficiales de la franja rayada, darán lugar al ectodermo (*azul* y *rojo*, en la parte *superior*) o al endodermo (*amarillo*, parte *inferior*). En resumen, las primeras células que se pliegan hacia el interior de huevo, es decir que *involucionan*, efectúan movimientos en el interior del embrión formando las estructuras endodérmicas y mesodérmicas más anteriores, mientras que las últimas células en involucionar forman las estructuras más posteriores. (Según R.E. Keller, *J. Exp. Zool.* 216:81-101, 1981.)

dorsales del eje principal del cuerpo. Como ocurre en el erizo de mar, el resultado final del proceso completo es una estructura triestratificada: un capa de ectodermo externa, un tubo interno de endodermo formando el rudimento del intestino, y entre ellos un capa de mesodermo. De nuevo, la boca se desarrolla como un orificio formado en un punto anterior en el que el endodermo y el ectodermo entran en contacto directo sin intervención del mesodermo.

La transformación que se ha producido durante la gastrulación se puede resumir dibujando sobre la superficie del embrión, al inicio de la gastrulación, un *mapa de destino* que indique las regiones destinadas a formar específicamente cada una de las partes del cuerpo del adulto; en la Figura 21-6B se muestra uno de estos mapas.

Los movimientos de gastrulación se organizan alrededor del labio dorsal del blastoporo[6, 7]

El labio dorsal del blastoporo desempeña una función central no sólo en el sentido geométrico, sino también como fuente de control. Si se secciona el labio dorsal de un blastoporo de un embrión normal al comienzo de la gastrulación y dicho labio se injerta en otro embrión en posición diferente, el embrión receptor

Figura 21-7 Papel del Organizador. Diagrama de un experimento que muestra cómo el labio dorsal de un blastoporo (Organizador de Spemann) inicia y controla los movimientos de la gastrulación y cómo, en consecuencia, si se trasplanta organiza la formación de un segundo conjunto de estructuras corporales. La fotografía muestra un renacuajo de axolote bicéfalo y con dos colas resultado de dicho injerto; en *Xenopus* se obtienen resultados muy similares a éste. (Fotografía cortesía de Jonathan Slack.)

inicia la gastrulación tanto en su propio labio dorsal como en el lugar del injerto (Figura 21-7). Los movimientos de gastrulación del segundo punto conllevan la formación de un segundo conjunto completo de estructuras corporales, de forma que se obtiene un embrión doble (gemelos siameses).

Realizando injertos de este tipo entre especies que tengan células de pigmentación diferente, de manera pueda distinguirse el tejido receptor del tejido implantado, se ha podido demostrar que el labio del blastoporo injertado atrae epitelio receptor hacia su propio sistema de endodermo invaginado y de mesodermo. Evidentemente el labio dorsal del blastoporo proporciona alguna señal (o señales) que coordinan los movimientos de la gastrulación y, directa o indirectamente, el patrón de especialización de los tejidos de su alrededor. Debido a este papel crucial en la organización de la construcción del eje principal del cuerpo, el labio dorsal del blastoporo es conocido como el *Organizador* (u *Organizador de Spemann*, su codescubridor). Es el más antiguo y famoso ejemplo de un *centro embrionario de señales* –una función que trataremos más adelante cuando consideremos cómo se controla la diversificación celular.

Cambios activos del empaquetamiento celular suministran una fuerza conductora para la gastrulación[1, 6, 8]

La gastrulación comienza con cambios en la forma de las células situadas en el blastoporo. En los anfibios estas células reciben el nombre de *células en botella*: tienen cuerpos anchos y cuellos estrechos que les sirven para anclarse a la superficie del epitelio (Figura 21-8), y pueden contribuir a curvar el epitelio y plegarlo hacia el interior, produciendo la muesca inicial observada desde el exterior. Cuando se ha formado este primer pliegue, las células pueden continuar desplazándose al interior de la capa formando el tubo digestivo y el mesodermo. Como en el erizo de mar, parece que el desplazamiento sea guiado por una combinación de mecanismos, aunque el principal de ellos es el re-empaquetamiento de células, especialmente el de las células situadas en la parte dorsal de la *zona marginal* junto al labio blastoporo (véase Figura 21-8). En este punto se produce la **extensión convergente**. Pequeños fragmentos de tejido de la zona marginal

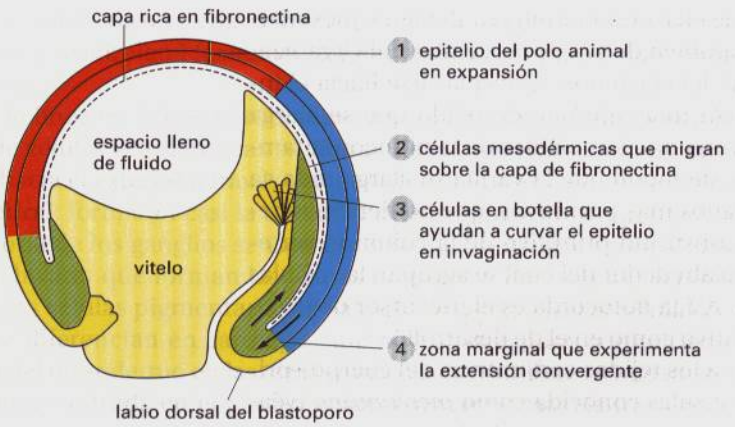
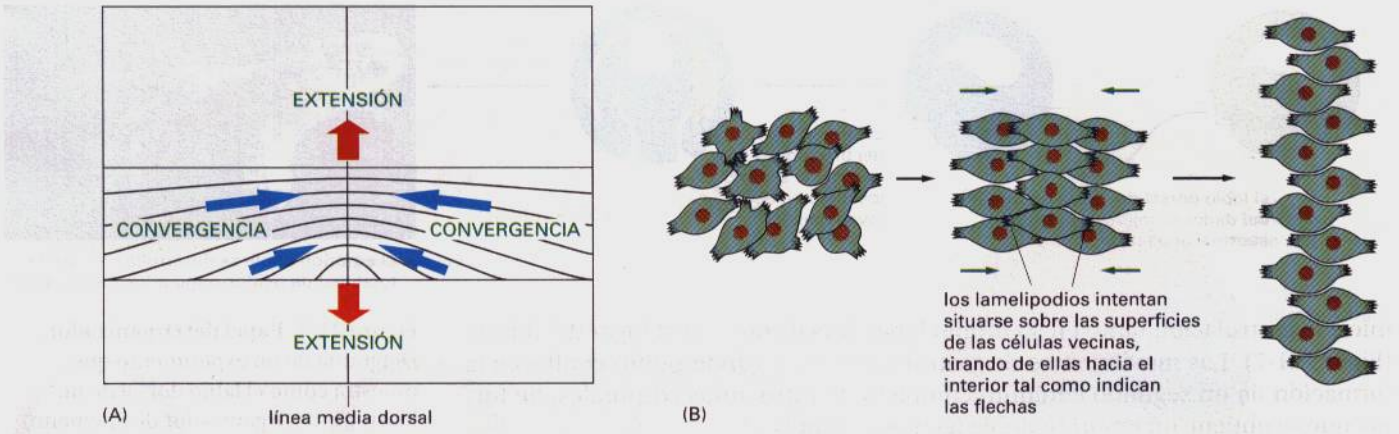


Figura 21-8 Los movimientos celulares de la gastrulación. Embrión de *Xenopus* en gastrulación seccionado en el mismo plano que en la Figura 21-6; se indican los cuatro tipos principales de movimientos implicados en la gastrulación. El epitelio del polo animal se expande mediante la reorganización celular, haciéndose más fino a medida que se ensancha. La migración de las células mesodérmicas por encima de la matriz de fibronectina revistiendo el techo del blastocele puede contribuir al estiramiento de los tejidos invaginados. Sin embargo, la fuerza principal en la conducción de la gastrulación en *Xenopus* es la extensión convergente de la zona marginal. (Según R.E. Keller, *J. Exp. Zool.* 216:81-101,1981.)



dorsal aislados en cultivo se estrechan y se alargan espontáneamente gracias a una reorganización celular, tal como harían en el embrión durante el proceso de convergencia hacia la línea media dorsal, doblándose hacia dentro alrededor del labio blastopórico, y alargándose hasta formar el eje principal del cuerpo. En la Figura 21-9 se presenta una visión característica de los mecanismos que acompañan la extensión convergente.

Figura 21-9 La extensión convergente y su base celular. (A) Patrón de la extensión convergente en la zona marginal de la gástrula, tal como se aprecia desde la cara dorsal. Las *flechas azules* indican la convergencia hacia la línea media dorsal, las *flechas rojas* indican la extensión del eje anteroposterior. Este esquema es demasiado simple para ilustrar el movimiento de involución que se produce paralelamente a éste, por el cual las células se pliegan hacia el interior del embrión. (B) Esquema del comportamiento celular que sirve de base a la extensión convergente. Las células se agrupan y forman lamelipodios, mediante los cuales intentan situarse encima de las células vecinas. La alineación de los movimientos lamelipodiales a lo largo del eje común causa la extensión convergente. Probablemente, es un proceso cooperativo, debido a que las células ya alineadas ejercen fuerzas sobre sus vecinas para que se alineen como ellas. (B, según J. Shih y R. Keller, *Development* 116:901-914,1992.)

Las tres capas germinales formadas por la gastrulación tienen destinos distintos[9, 10, 11, 12]

El **endodermo** forma un tubo, el primordio del tracto digestivo, desde la boca hasta el ano. No sólo da lugar a la faringe, al esófago, al estómago y a los intestinos, sino también a muchas glándulas asociadas. Por ejemplo, las glándulas salivales, el hígado, el páncreas, la tráquea y los pulmones, se desarrollan a partir de las paredes del tracto digestivo inicial y crecen hasta convertirse en sistemas de tubos ramificados que se abren al tubo digestivo o la faringe. El endodermo forma los componentes epiteliales de estas estructuras –el revestimiento del intestino y las células secretoras del páncreas, por ejemplo– mientras que los elementos musculares y fibrosos que actúan de soporte derivan del **mesodermo**.

La diferenciación del mesodermo está guiada por el Organizador en el labio dorsal del blastoporo, que parece ser una fuente de moléculas señal que regulan las alternativas entre los posibles destinos mesodérmicos. A su vez, las señales procedentes de los distintos grupos de células especializadas controlan el patrón básico de especializaciones del endodermo y del ectodermo e inician la formación del sistema nervioso, como veremos más adelante. Tras la gastrulación, la capa mesodérmica del embrión queda fragmentada en zonas diferentes situadas a derecha e izquierda del cuerpo. Una especialización muy precoz del mesodermo, conocida como **notocorda**, define el eje central del cuerpo y efectúa la separación. Se trata de una delgada varilla de células, de aproximadamente 80 μm de diámetro, con ectodermo por encima de ella, endodermo por debajo y mesodermo a cada lado (véase Figura 21-12). También deriva de las células del Organizador. Al pasar alrededor del labio dorsal del blastoporo y desplazarse hacia el interior del embrión, estas células forman una columna de tejido que se alarga espectacularmente por extensión convergente. Las células de la notocorda también se hinchan debido a las vacuolas, de modo que la varilla se alarga todavía más estirando el embrión. En los cordados más primitivos, que no tienen vértebras, la notocorda se conserva como substituto primitivo de la columna vertebral. En los vertebrados actúa de centro alrededor del cual se agrupan las células mesodérmicas formando las vértebras. Así la notocorda es el precursor de la columna vertebral, tanto en sentido evolutivo como en el de desarrollo.

En general, el mesodermo da lugar a los tejidos conjuntivos del cuerpo –primero a una red tridimensional laxa de células conocida como *mesénquina* (véa-

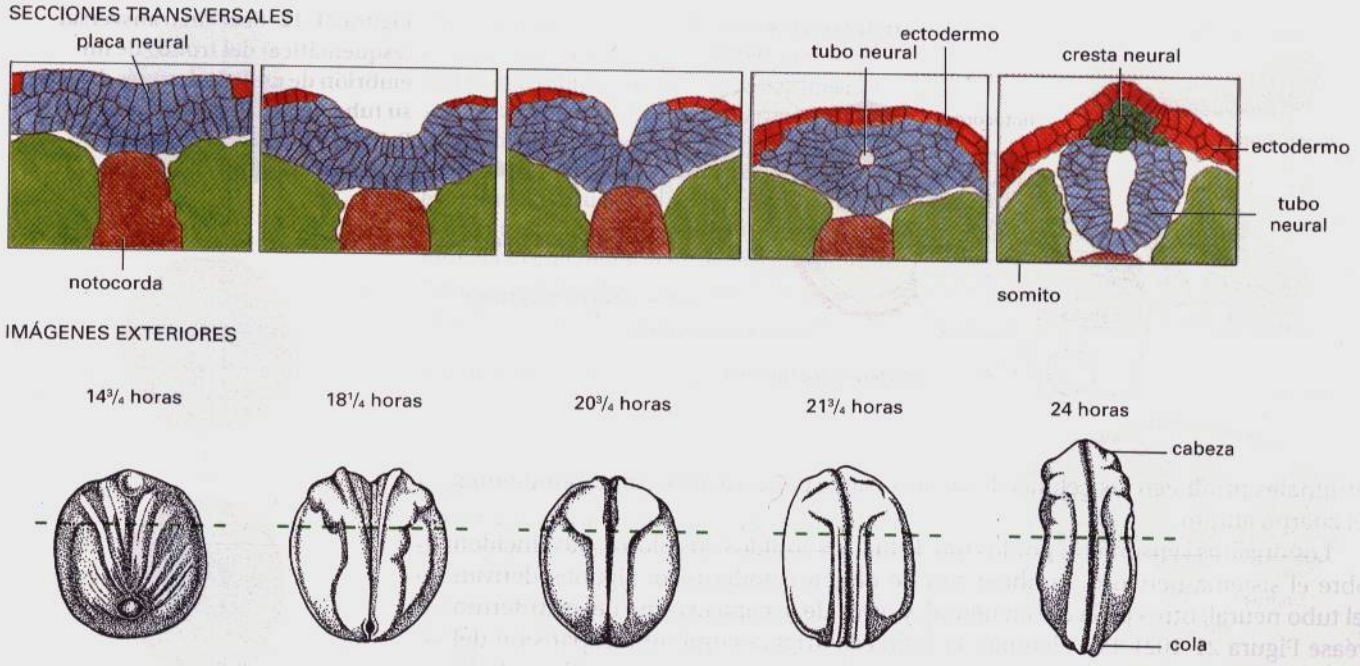


Figura 21-10 Formación del tubo neural en *Xenopus*. Las imágenes exteriores son de la cara dorsal. Las secciones transversales están cortadas por donde indica la línea discontinua. (Según T.E. Schroeder, *J. Embryol. Exp. Morphol.* 23:427-462,1970. © Company of Biologists Ltd.)

se Figura 19-30) y finalmente al tejido cartilaginoso, al tejido óseo y al tejido fibroso, incluida la dermis (capa interna de la piel). Los túbulos del sistema urogenital también se forman a partir de él, así como el sistema vascular, incluidos el corazón, los vasos sanguíneos y las células de la sangre. Estos tejidos mesodérmicos especializados derivan de células situadas a diferentes distancias del labio dorsal del blastoporo, de forma que la notocorda tiene el origen más dorsal y las células sanguíneas el más ventral.

Al finalizar la gastrulación, la capa del **ectodermo** cubre el embrión, dando finalmente lugar a la epidermis (capa externa de la piel). Además, la totalidad del sistema nervioso también deriva del ectodermo. Mediante un proceso conocido como **neurulación**, una ancha región central del ectodermo se engrosa, se enrolla formando un tubo y se separa del resto de la capa celular (Figura 21-10). El tubo así formado a partir del ectodermo recibe el nombre de **tubo neural**, y formará el encéfalo y la médula espinal. Los mecanismos de la neurulación dependen, como los de la gastrulación, de cambios en el empaquetamiento celular y en la forma celular; en la Figura 21-11 se muestra cómo puede organizarse el citoesqueleto provocando cambios en la forma celular que pueden hacer que el epitelio se enrolle en forma de tubo.

La neurulación se produce por una interacción entre la notocorda subyacente y el mesodermo adyacente a la misma. Si de un embrión de anfibio en gastrulación se extrae un fragmento de mesodermo dorsal del área situada justo por debajo del futuro tubo neural y se implanta directamente bajo el ectodermo –es decir en la región ventral– de otro embrión en gastrulación, el ectodermo de esta región se engrosará y se enrollará formando un fragmento de un tubo neural colocado fuera de sitio.

A lo largo de la línea en la que el tubo neural se separa de la futura epidermis, numerosas de células ectodérmicas se liberan de la capa epitelial y emigran individualmente hacia el exterior a través del mesodermo. Estas células pertenecen a la **cresta neural**; formarán casi la totalidad del sistema nervioso periférico (incluidos la mayoría de los ganglios sensoriales y todos los ganglios simpáticos y las células de Schwann que forman las vainas de mielina de los nervios periféricos) así como las células pigmentarias de la piel. En la cabeza, las células de la cresta neural se diferencian en cartílago, hueso, y otros tejidos conjuntivos, los cuales derivan del mesodermo en las otras zonas del cuerpo. Éste es uno de los varios ejemplos que contradicen el patrón general según el cual las tres capas

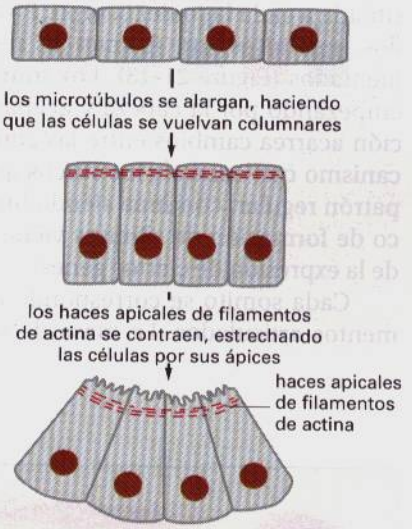


Figura 21-11 Curvatura de un epitelio debida a cambios en la forma celular mediados por microtúbulos y filamentos de actina. A partir de observaciones de la neurulación de salamandras y tritones, en los que el epitelio tiene sólo una capa de células de grosor. A medida que los extremos apicales de la célula se estrechan, su superficies membranosas superiores se arrugan.

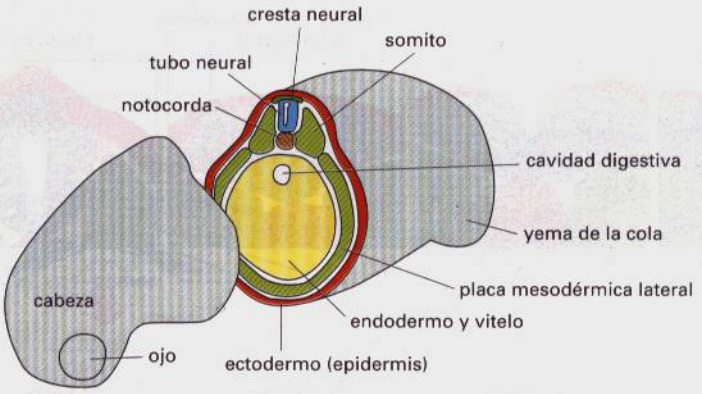


Figura 21-12 Sección transversal (esquemática) del tronco de un embrión de anfibio después de cerrar su tubo neural. (Según T. Mohun, R. Tilly, R. Mohun y J.M. Slack, *Cell* 22:9-15,1980. © Cell Press.)

germinales producen las células de las tres capas concéntricas correspondientes del cuerpo adulto.

Los órganos sensoriales, por los que la luz, los sonidos, los olores, etc., inciden sobre el sistema nervioso, también son de origen ectodérmico: algunos derivan del tubo neural, otros de la cresta neural, y otros de la capa externa del ectodermo (véase Figura 21-102). Por ejemplo, la retina se origina como una expansión del encéfalo y por lo tanto deriva de células del tubo neural, mientras que las células olfativas de la nariz se diferencian directamente a partir del epitelio ectodérmico que reviste la cavidad nasal.

El mesodermo situado a cada lado del eje del cuerpo se fragmenta en somitos, de los que derivan las células musculares[13]

A cada lado del recién formado tubo neural se encuentra una extensa capa de mesodermo (Figura 21-12). A partir de la región dorsal de este mesodermo –más gruesa y medial– se forman los tejidos musculares y esqueléticos del eje central del cuerpo. Inicialmente consiste en un una lámina gruesa y continua de tejido, situada a cada lado del cuerpo. Pronto esta lámina se rompe en bloques separados, o **somitos,** que forman las series repetitivas de vértebras y músculos segmentados (Figura 21-13). Los somitos se forman uno tras otro, sucesivamente, empezando por la cabeza y acabando por la cola (Figura 21-13). La segmentación acarrea cambios entre las conexiones de las células mesodérmicas. El mecanismo que controla los surcos que separan un somito de su vecino, según un patrón regular, continúa siendo un misterio (aunque se sabe que el proceso físico de formación de somitos viene prefigurado por un patrón de segmentación de la expresión de ciertos genes).

Cada somito se corresponde con una unidad en la secuencia final de elementos articulados. La masa de somitos forma los músculos esqueléticos del

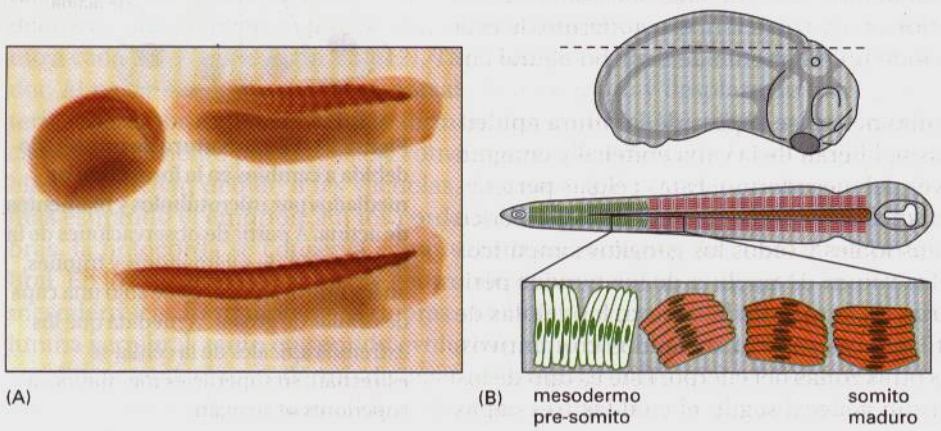


Figura 21-13 Formación de somitos en *Xenopus*. (A) Fotografías de embriones en tres fases consecutivas, tomadas lateralmente y marcadas con anticuerpos específicos anti-células musculares mostrando la formación de somitos. (B) Diagramas explicativos. En el esquema superior de muestra una visión lateral del embrión; la línea intermitente señala el plano en el que se ha efectuado la sección horizontal que se muestra justo debajo. El diagrama inferior es un esquema aumentado de las células mesodérmicas en pleno proceso de reagrupación formando los somitos. En *Xenopus*, inicialmente las futuras células de los somitos están orientadas en ángulo recto respecto a los ejes del cuerpo y entonces rotan en grupos durante la formación de los somitos. La parte principal de cada somito formará tejido muscular y se llama *miotomo*; la parte interna situada frente a la notocorda es el origen de las vértebras y costillas y se denomina *esclerotomo*; la más exterior, es decir la parte dorsal (en los vertebrados superiores, aunque no en *Xenopus*), contribuirá a la formación de la dermis (el tejido conjuntivo de la piel) y se denomina *dermatomo*.

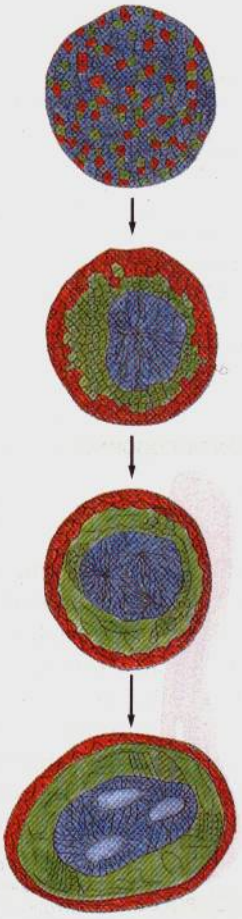


Figura 21-14 *(izquierda)* **Clasificación.** Las células procedentes de diferentes partes del embrión temprano de anfibio se clasificarán según sus orígenes. En este experimento clásico primero se desagregan la células mesodérmicas, las células de la placa neural y las células epidérmicas, y luego se dejan reagrupar en una mezcla aleatoria. Se clasifican dando lugar a una formación con reminiscencias de un embrión típico, con un "tubo neural" interno, una epidermis externa, y un mesodermo entre ambos. (Modificado de P.L. Townes y J. Holtfreter, *J. Exp. Zool.* 128:53-120,1955.)

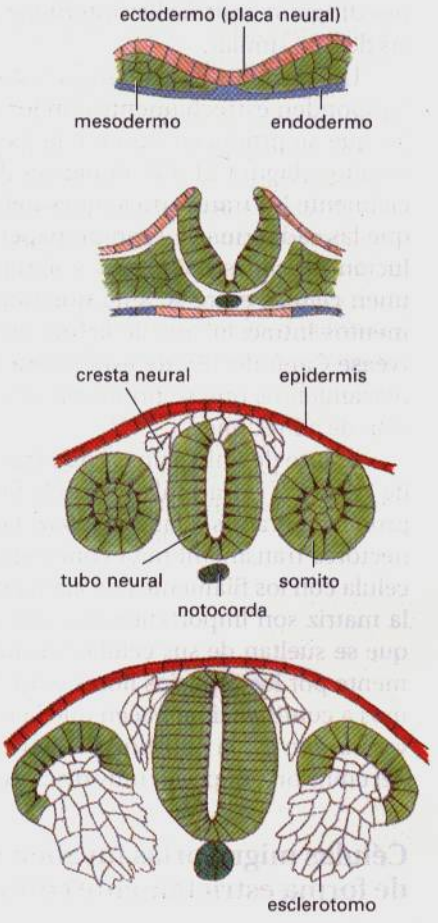


Figura 21-15 *(derecha)* **Cadherinas en el embrión temprano.** Ilustración de la variación de los patrones de expresión de tres cadherinas en estadios sucesivos de los embriones tempranos de pollo o ratón, observados mediante secciones transversales efectuadas en el tubo neural y los somitos en desarrollo. Las células que expresan el mismo tipo de cadherinas permanecen unidas entre sí y tienden a segregarse de las otras células. Así pues, el patrón de cadherinas contribuye a la regulación del patrón de desplazamientos morfogénicos implicados en la formación del tubo neural, de la notocorda, de los somitos, de la cresta neural y de los esclerotomos. (Según M. Takeichi, *Trends Genet.* 8:213-217, 1987.)

segmento, mientras que un subconjunto de sus células forma los tejidos correspondientes a las vértebras y otros tejidos conjuntivos como la dermis. Los somitos también son el origen de casi todas las células del músculo esquelético en el resto del cuerpo: estas células derivan de precursores que abandonan los somitos antes de diferenciarse de forma manifiesta.

Los patrones cambiantes de moléculas de adhesión celular regulan los movimientos morfogénicos[14]

Los movimientos de los tejidos en el embrión van acompañados de cambios en los caracteres químicos de las células. Por ejemplo, una célula puede alterar su forma o su movimiento mediante la activación de la producción de una proteína citoesquelética. Cambiando el conjunto de moléculas de adhesión que presenta en su superficie puede romper adherencias anteriores y establecer otras nuevas. Las células de una región determinada pueden desarrollar propiedades en su superficie que causarán su adhesión entre ellas y su segregación de un grupo de células vecinas cuya superficie es químicamente distinta.

Experimentos clásicos en embriones tempranos de anfibios demuestran que los efectos la adhesión selectiva célula-célula pueden ser tan fuertes que producen una reconstrucción aproximada de la estructura normal incluso después de que las células hayan sido disociadas artificialmente y mezcladas al azar (Figura 21-14). Como se expone en el Capítulo 19, estudios realizados en embriones de pollo y de ratón sugieren que este comportamiento depende, al menos en parte, de una familia de glucoproteínas homólogas de adhesión célula-célula dependientes de Ca^{2+} –las *cadherinas*. Estas y otras moléculas de adhesión célula-célula independientes de Ca^{2+} tal como las moléculas N-CAM, se expresan de forma distinta en los diferentes tejidos del embrión temprano; anticuer-

pos dirigidos contra ellas interfieren con la adhesión selectiva normal entre células de tipo similar.

Los cambios de los patrones de expresión de la diferentes cadherinas se corresponden estrechamente con los cambios de los patrones de asociación celular que se producen durante la gastrulación, la neurulación y la formación de somitos (Figura 21-15); el patrón de cadherinas puede regular y conducir parcialmente las transformaciones del embrión temprano. Particularmente, parece que las cadherinas juegan un papel central en el control de la formación y disolución de capas epiteliales y agrupaciones de células. Las cadherinas no sólo unen células entre sí, sino que también proporcionan un anclaje para los filamentos intracelulares de actina en las localizaciones de adhesión célula-célula (véase Capítulo 19): de esta forma ayudan a regular el patrón de fuerzas y desplazamientos que se producen en el tejido en desarrollo de acuerdo con el patrón de adhesiones.

Aparte de unirse unas con otras, las células pueden adherirse a componentes de la matriz extracelular como la fibronectina y la laminina. Estas adhesiones se producen gracias a las *integrinas* las cuales, como las cadherinas, actúan de conectores transmembrana conectando los lugares de adhesión del exterior de la célula con los filamentos de actina del interior. Las interacciones entre la célula y la matriz son importantes para los desplazamientos de ciertas clases de células que se sueltan de sus células vecinas y migran en el embrión, avanzando lentamente por los espacios libres entre las células. Invasiones como éstas, que veremos a continuación, hacen que la mayoría de los tejidos del cuerpo adulto de un vertebrado estén constituidos por combinaciones de células derivadas de zonas del embrión temprano muy distantes entre sí.

Células migratorias invaden los tejidos del embrión de forma estrictamente controlada[11, 15, 16]

Hasta este momento hemos establecido dos clases de células migratorias –las de la cresta neural y las que abandonan los somitos formando los músculos esqueléticos. Otro grupo importante de células migratorias son las precursoras de las células de la sangre, de las células germinales y de los diferentes grupos de neuronas pertenecientes al sistema nervioso central.

Estas migraciones celulares pueden establecerse marcando las células al comienzo de su trayecto, con colorantes no tóxicos, o incluso mejor con un marcador heredable genéticamente. La mayor parte de nuestro conocimiento proviene de estudios mediante injerto de células de embriones de codorniz en embriones de pollo. Aunque la codorniz es parecida al pollo en muchos aspectos, sus células se pueden distinguir, en cortes histológicos, gracias a una gran masa de heterocromatina, intensamente teñida, que se encuentra asociada al nucléolo. Mediante este marcador nucleolar podemos identificar las células injertadas que han emigrado abandonando la localización donde fueron implantadas. Por ejemplo, si se substituye un tejido somítico de codorniz antes de que aparezcan las yemas de sus extremidades, por un tejido somítico de un embrión de pollo muy temprano, todas las células musculares de las extremidades que se desarrollen serán originarias de codorniz (Figura 21-16). Evidentemente las futuras células musculares migran desde los somitos hacia la región de la futura ala y permanecen allí, mezcladas de forma discreta con las células de los tejidos conectivos de las yemas de las extremidades, hasta el momento oportuno para su diferenciación.

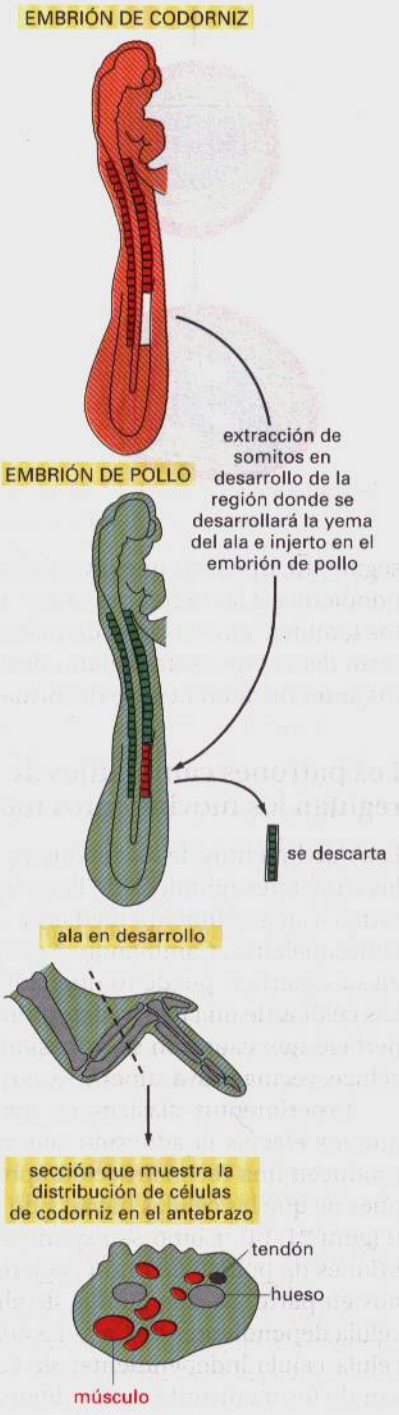


Figura 21-16 Origen migratorio de las fibras musculares de las extremidades. Si se substituyen las células de los somitos de la extremidad de un embrión de pollo por células de somitos de codorniz a los dos días de incubación y luego se secciona el ala del pollo una semana más tarde, se puede ver cómo la fibras musculares del ala del pollo derivan de las células de somitos de codorniz injertadas.

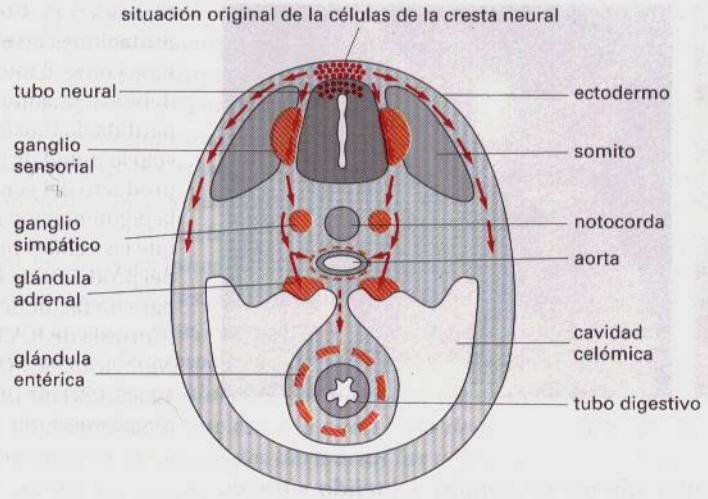
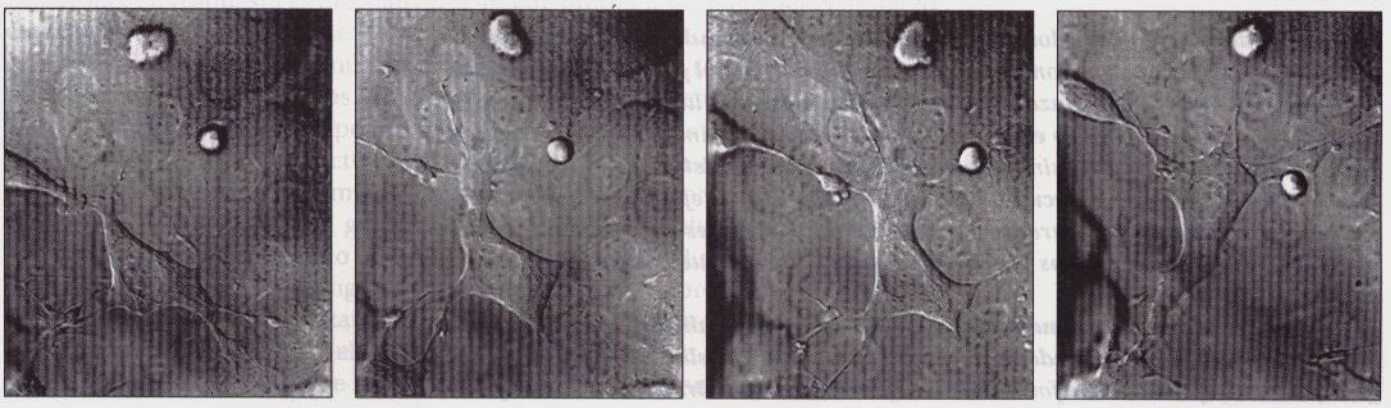


Figura 21-17 Principales vías de migración celular de la cresta neural. Ilustración que muestra un esquema de una sección transversal de un embrión de pollo en la parte media de su cuerpo. Las células que inician su camino justo debajo del ectodermo formarán células pigmentarias de la piel; las células que tomen el camino profundo vía somitas formarán los ganglios sensoriales, los ganglios simpáticos y partes de las glándulas adrenales. Las glándulas digestivas, de la pared del intestino, se forman con células procedentes de la cresta neural que migrarán a lo largo del cuerpo, y darán origen tanto a la región del cuello como a la región sacra. (Véase también Figura 19-22.)

De una forma parecida se puede seguir la dispersión de células procedentes de la cresta neural. Estas células migran a través del embrión por vías específicas (Figura 21-17) y se establecen en localizaciones determinadas de forma exacta. Mientras una célula que migra se desplaza a través del embrión, va repetidamente extendiendo proyecciones que le permiten conocer su entorno inmediato (Figura 21-18) mediante sutiles indicios a los que es especialmente sensible gracias a su específico surtido de proteínas receptoras de superficie. En el interior de la célula, estas proteína receptoras están conectadas con el citoesqueleto, responsable del desplazamiento celular. Algunos componentes de la matriz extracelular, como la fibronectina, proporcionan lugares de adhesión que facilitan el avance de la célula; otros, como el proteoglucano condroitín sulfato, inhiben el desplazamiento y repelen la inmigración. De la misma forma, las células no migratorias situadas a lo largo de los caminos de migración pueden tener superficies receptoras o repelentes, o incluso pueden extender filopodios que entren en contacto con la célula migratoria, afectando su comportamiento. El tira y afloja incesante entre las tentativas opuestas de adhesión, conduce a las células a desplazarse en la dirección más favorable hasta que la célula encuentra una localización en la que puede establecer una adhesión duradera. Otros factores también pueden jugar un papel importante, como son la quimiotaxis y las interacciones entre las células migratorias.

Otro medio para controlar la distribución de células migratorias es la regulación de su supervivencia y proliferación. Parece que tanto las células germinales como las precursoras de células sanguíneas y las células pigmentarias derivadas de la cresta neural, están gobernadas en este aspecto por el mismo mecanismo básico de control. Tal mecanismo implica a un receptor transmembrana perteneciente a la membrana de la células migratorias, denominado proteína *Kit*, y a

Figura 21-18 Migración de células de la cresta neural. Esta serie de fotografías de un embrión vivo de pez cebra, observadas mediante contraste de fases interferencial, muestran una célula de la cresta neural emitiendo prolongaciones de tanteo en varias direcciones antes de tomar la dirección ventral correcta (parte baja de la cuarta fotografía). Las fotografías se tomaron a intervalos de cinco minutos, aproximadamente. (Cortesía de Suresh Jesuthasan.)



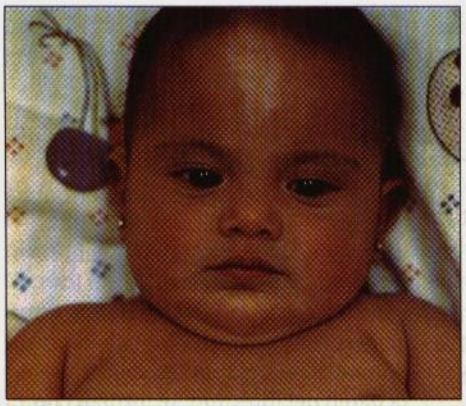


Figura 21-19 Consecuencias de mutaciones en el gen *kit*. Tanto la niña como el ratón son heterocigotos debido a una mutación que conlleva la pérdida de funciones que los deja con sólo la mitad de la cantidad normal de producto del gen *kit*. En ambos casos la pigmentación es deficiente debido a que las células pigmentarias dependen del producto de *kit* como receptor para un factor de supervivencia. (Cortesía de R.A.Fleischman, de *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:10885-10889,1991. © 1991 Macmillan Magazines Ltd.)

un ligando, denominado factor *Steel*, fabricado por las células del tejido a través del cual las células migran y/o en el que llegan a establecerse. Individuos con mutaciones en los genes de cualquiera de estas proteínas tienen deficiencias en su pigmentación, en el suministro de células sanguíneas y en la producción de células germinales (Figura 21-19). Parece que el factor Steel en una forma ligada a la membrana es necesario para activar correctamente la proteína Kit y capacitar todos estos tipos de células para sobrevivir y proliferar.

El plano estructural del cuerpo de los vertebrados se forma primero en miniatura y después se mantiene a medida que el embrión crece[9]

Normalmente, en el momento que se forman los somitos el embrión mide unos cuantos milímetros y consta de alrededor de 10^5 células. Aunque hasta ahora nos hemos referido principalmente a *Xenopus*, su escala y forma generales son muy parecidas a la de un pez, una salamandra, un pollo, o un ser humano (véase Figura 1-36). Posteriormente estas especies de embrión crecerán y alcanzarán tamaños y formas muy diferentes, pero de momento se puede observar que comparten el mapa estructural básico del cuerpo de los vertebrados. El sistema nervioso central está representado por el tubo neural, con un engrosamiento en un extremo para el encéfalo; un tubo de endodermo representa el tubo digestivo y sus derivados; los somitos representan los segmentos del tronco; el mesodermo más periférico no segmentado representa los otros tejidos conjuntivos, incluido el sistema vascular; y el ectodermo, la epidermis de la piel. Durante el crecimiento posterior todos estos componentes aumentarán de tamaño, multiplicándose por un factor de cien veces o más en longitud, y de un millón o más respecto a su volumen y número de células. No obstante se conservará la misma organización básica del cuerpo.

Resumen

Los huevos de la mayoría de los organismos son células grandes, que contienen reservas de nutrientes y otros componentes especificados por el genoma materno. En los anfibios, el primer desplazamiento de importancia tras la fecundación es una rotación del córtex del huevo en relación a su núcleo. La asimetría producida por esta rotación, junto con la asimetría original debida a la distribución de contenidos del huevo antes de la fecundación, define los futuros ejes anteroposterior y dorsoventral del cuerpo. Durante las posteriores divisiones de segmentación el huevo se subdivide en células mucho más pequeñas, sin que ocurra crecimiento alguno.

Pronto se desarrollará una cavidad en el interior del embrión, mientras se organizan las células de su alrededor formando una capa epitelial. Entonces se invagina parte del epitelio, transformando el embrión en una estructura triestratifica-

da, formada por un tubo interno epitelial de endodermo, una capa epitelial externa de ectodermo, y una capa intermedia de células mesodérmicas que se han separado de la capa epitelial original. Durante este proceso de gastrulación las células epiteliales cambian activamente su empaquetamiento celular, lo cual parece que proporciona una fuerza mayor que conduce los desplazamientos.

El endodermo revestirá al intestino y sus derivados, el ectodermo formará la epidermis y el sistema nervioso, y el mesodermo los músculos, los tejidos conjuntivos, el sistema cardiovascular y el tracto urogenital. El desarrollo de todas estas estructuras depende de las interacciones entre las tres capas germinales y implica desplazamientos celulares posteriores. Por ejemplo, el mesodermo dorsal induce al ectodermo suprayacente a engrosarse, enrollarse y separarse, formando el tubo y la cresta neural. Justo en medio del mesodermo dorsal una varilla de células especializadas, denominada notocorda, se alargará formando el eje central del embrión. Las anchas láminas de mesodermo que están a cada lado de la notocorda se segmentan formando los somitos, de los cuales derivarán las vértebras y los músculos esqueléticos. En varias lugares, algunas células migratorias, como las células de la cresta neural, se liberan de sus vecinos originales y migran a través del embrión para colonizar nuevas regiones. Moléculas de adhesión célula-célula, como las cadherinas y las integrinas, ayudan a guiar las migraciones y a controlar la cohesión celular selectiva en el epitelio.

Diversificación celular en el embrión animal temprano[17, 18]

Un huevo fecundado puede convertirse en una margarita o en un roble, en un erizo de mar o en un ser humano. El resultado final está determinado por el genoma: la secuencia lineal de los nucleótidos A, G, C y T del DNA del organismo tiene que dirigir la producción de una variedad de tipos de celulares químicamente distintos dispuestos según un patrón espacial muy exacto. La biología del desarrollo intenta explicar cómo ocurre esto. Cualquier discusión del problema, en este y en siguientes apartados, se basa en un hecho fundamental: todas las células del cuerpo heredan el mismo genoma del huevo. No importa lo diferentes que puedan parecer las células –en músculos, huesos, o nervios, en raíces, tallos u hojas– todas contienen el mismo conjunto de instrucciones genéticas.

Una de las primeras y más contundentes demostraciones de este principio proviene de experimentos de trasplante de núcleos utilizando huevos de anfibio (Figura 21-20). Un huevo normal de anfibio es tan grande que utilizando una pipeta fina de cristal se puede inyectar en el interior del huevo un núcleo extraído de otra célula. Antes se ha destruido el núcleo del huevo receptor mediante irradiación ultravioleta. El desarrollo del huevo se activa con pinchazos producidos por la pipeta fina usada para inyectar el núcleo. De este modo se puede comprobar si el núcleo de una célula somática diferenciada contiene un genoma completo equivalente al de un huevo fecundado típico y si es igual de válido para el desarrollo. La respuesta es afirmativa: se puede producir un renacuajo completo a partir de un huevo al que se le ha substituido el núcleo por el de un queratinocito de la piel o por el de un núcleo de un glóbulo rojo de la sangre. Debemos admitir que estos experimentos también presentan limitaciones. Sólo han tenido éxito con núcleos de un grupo limitado de tipos de células diferenciadas y sólo en algunas especies. Pero actualmente existe un conjunto contundente de evidencias que apuntan a esta misma conclusión. Con sólo unas cuantas excepciones (véase Figura 23-37), el genoma permanece intacto durante el desarrollo. Los genes se pueden activar o permanecer inactivos, las células del cuerpo se diferencian no porque contengan genes diferentes sino porque *expresan* genes distintos. En el Capítulo 9 examinamos los mecanismos intracelulares que regulan la expresión génica. En el presente capítulo hemos de considerar cómo se originan las diferencias entre las células y cómo se coordinan espacial y tempo-

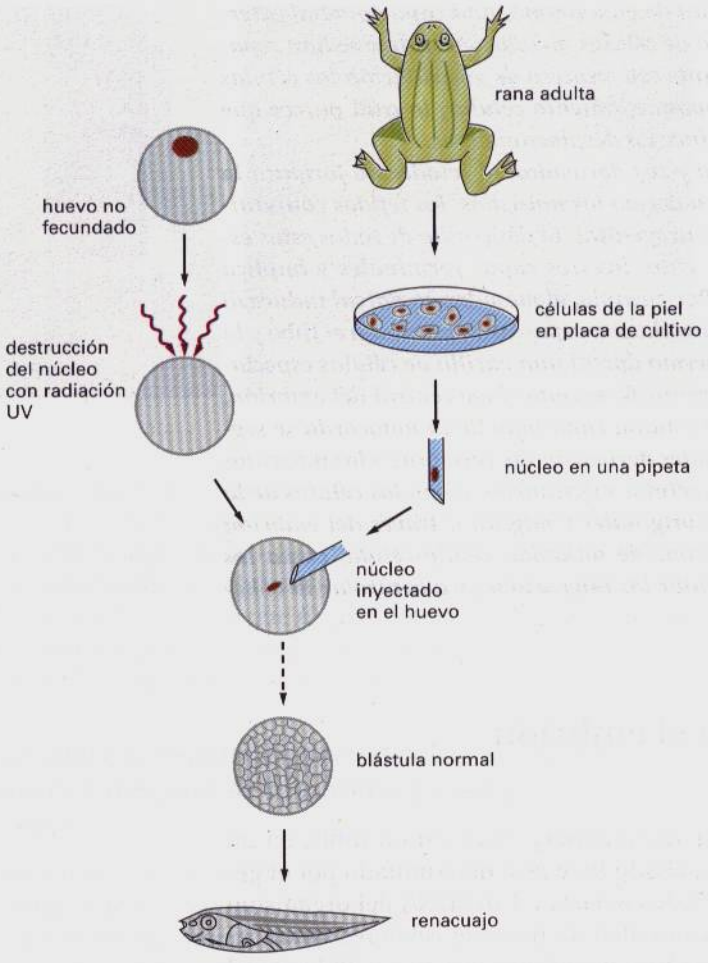


Figura 21-20 Trasplante nuclear. Esquema de un experimento que demuestra que el núcleo de una célula diferenciada de la piel de una rana adulta contiene todo el material genético necesario para controlar la formación de un renacuajo completo. La flecha discontinua de la parte inferior de la figura indica que para conceder al genoma trasplantado el tiempo suficiente para que se adapte a un entorno embrionario se requiere un paso más de transferencia en el que se extrae uno de los núcleos del embrión temprano cuando comienza su desarrollo y se repone en un segundo huevo anucleado. (Modificado de J.B. Gurdon, Gene expression During Cell Differentiation. Oxford, UK: Oxford University Press, 1973.)

ralmente dentro de un organismo pluricelular. En este apartado veremos cómo se coordinan los primeros pasos de la diversificación celular en los embriones tempranos, tomando como ejemplo ranas y ratones.

Las diferencias iniciales entre los blastómeros de *Xenopus* surgen a partir de la segregación espacial de determinantes en el huevo[2, 17, 19]

En la mayoría de especies de plantas y animales el huevo es en sí mismo químicamente asimétrico, concentrando algunos componentes en regiones determinadas del citoplasma o de la membrana. Como resultado de ello, desde el inicio ya existen diferencias entre las células que se forman en la segmentación porque reciben porciones distintas de material debido a su localización asimétrica. La importancia de tales *determinantes localizados* del huevo varía de unas especies a otras. Teóricamente siempre se ha distinguido entre dos tipos de desarrollo opuestos: en el desarrollo en *mosaico*, determinantes localizados del huevo diseñan por completo el futuro patrón del cuerpo, de forma que las interacciones célula-célula posteriores no tienen ninguna consecuencia; en el desarrollo *regulador*, los determinantes localizados del huevo no cuentan para nada, de forma que el patrón corporal se genera totalmente gracias a las interacciones célula-célula. En realidad, la posición de la mayoría de las plantas y animales está entre ambos extremos. Por lo que se sabe hasta el momento, no existe ninguno desarrollo que sea completamente en mosaico –las interacciones reguladoras siempre juegan un papel importante; como veremos más adelante, los huevos de mamífero parecen ser completamente reguladores. *Xenopus* representa un caso intermedio característico.

Figura 21-21 Inducción mesodérmica en *Xenopus*. Las células del polo animal de la blástula, que normalmente sólo forman el ectodermo, formarán tejidos mesodérmicos si se cultivan conjuntamente con células del polo vegetativo. En un desarrollo normal, probablemente una interacción inductiva de este tipo sucede durante una fase más temprana; cuando se cultiva de forma aislada, la región ecuatorial de la blástula es capaz de formar tejidos mesodérmicos.

Las asimetrías del huevo de *Xenopus* se manifiestan de varias formas –en la localización excéntrica del núcleo, en la distribución del vitelo y los gránulos de pigmento, en el citoesqueleto y, quizás la más significativa, en la distribución de unos mRNA determinados. Las asimetrías del huevo dotan a los blastómeros tempranos con caracteres diferentes según sean animales o vegetativos, dorsales o ventrales. Tanto la alteración artificial de la disposición de los blastómeros tempranos como la aplicación de tratamientos como la centrifugación o la radiación ultravioleta que desplazan los contenidos del huevo antes de su segmentación e impiden que ocurra la rotación cortical que en condiciones normales sigue a la fecundación provocan drásticas perturbaciones en el mapa embrionario del cuerpo.

Interacciones inductivas generan nuevos tipos de células en un patrón cada vez más detallado[20]

Las diferencias iniciales entre los blastómeros tempranos sólo determinan las bases del patrón del embrión. Para generar todos los tipos celulares, los blastómeros han de interactuar unos con otros. Si colocamos el embrión temprano de *Xenopus* en un medio desprovisto de Ca^{2+} y Mg^{2+}, los blastómeros perderán su cohesión, y podrán separarse y desarrollarse por separado; unos van a desarrollar las características propias del ectodermo, mientras que otros desarrollarán las características propias del endodermo; pero ninguno de ellos activará la expresión de los genes característicos del mesodermo, como por ejemplo el gen de actina específico del músculo. Pero si las células del polo animal de la blástula se colocan cerca del las células vegetativas, algunas de las células del polo animal cambian su vía de desarrollo ectodérmica por la vía mesodérmica (Figura 21-21).

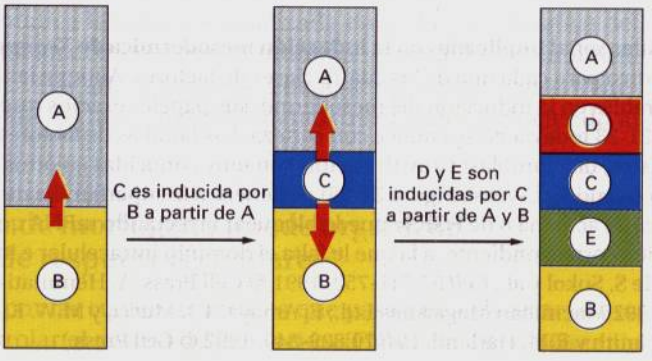


Figura 21-22 Modelaje mediante inducciones secuenciales. Series de interacciones inductivas pueden generar muchos tipos de células partiendo de unas pocas.

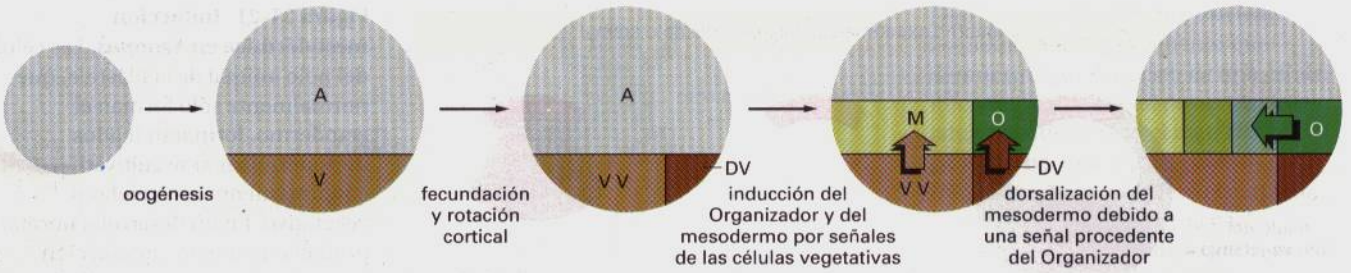


Figura 21-23 Modelo de tres señales para la inducción mesodérmica en el embrión temprano de *Xenopus*. Parece que se necesitan al menos tres señales, actuando de la forma indicada, para explicar los resultados de los experimentos sobre injertos. De hecho cada una de las "señales" podría ser producto de una compleja combinación de moléculas señal. (Según J. Slack, From Egg to Embryo, 2nd ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1991.)

El cambio de vía de las células debido a la influencia de un grupo adyacente de células se denomina **inducción**. En el transcurso de un desarrollo normal, las inducciones interactivas pueden ocurrir entre células que eran adyacentes desde el inicio del proceso –por ejemplo en la inducción mesodérmica– o entre células cuya proximidad se debe a movimientos morfogénicos como la gastrulación. Mediante una serie de inducciones consecutivas se pueden generar muchos tipos de células distintos derivados de interacciones entre unos cuantos tipos celulares (Figura 21-22).

Tal como hemos destacado, las asimetrías del huevo de *Xenopus* determinan no sólo el eje animal como el vegetativo del cuerpo, y en consecuencia la división del embrión en ectodermo, mesodermo y endodermo, sino también los ejes dorsoventral y anteroposterior. Parece de nuevo que en la organización del eje dorsoventral actúa un mecanismo inductivo. Experimentos de injerto indican que todos los blastómeros vegetativos pueden inducir mesodermo pero que no todos lo hacen de la misma forma: los blastómeros vegetativos *dorsales* son únicos en tanto que inducen a las células situadas encima de ellos a asimilar los caracteres especiales del Organizador de Spemann. Como vimos anteriormente, a su vez el Organizador produce una señal que induce a su alrededor la formación de un conjunto de especializaciones del mesodermo. Posteriormente, el pa-

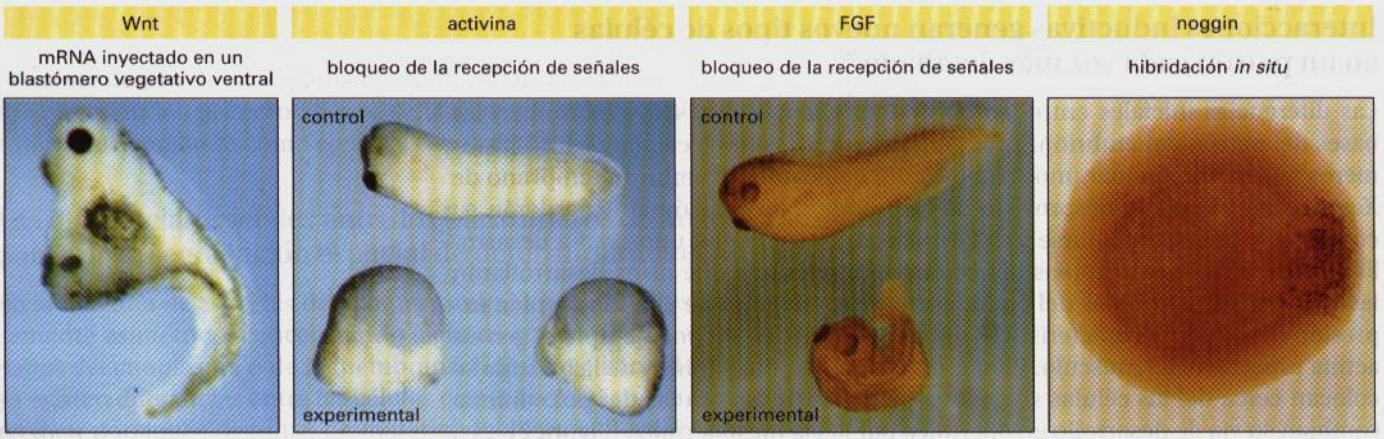


Figura 21-24 Algunas moléculas señal implicadas en la inducción mesodérmica de *Xenopus*. Se presenta el resultado de un experimento representativo para cada una de las cuatro clases de factores. Aunque las cuatro clases de factores pueden tener efectos considerables en la inducción del mesodermo, sus papeles exactos respecto al modelo de tres señales ilustrado en la Figura 21-23 todavía no se conoce con certeza. Las familias de factores Wnt, activina y FGF (factor de crecimiento de los fibroblastos, de Fibroblast Growth Factor) son muy conocidas en otros contextos como moléculas señal célula-célula; la activina (como Vg1 -véase Figura 21-25) pertenece a la superfamilia de factores de crecimiento TGF-β. La recepción de señales de activina o de FGF se puede bloquear inyectando mRNA que codifica una forma defectuosa del receptor proteico correspondiente, a la que le falta el dominio intracelular e interfiere con la función del receptor normal. (Fotografía de S. Sokol y al., *Cell* 67:741-752, 1991.© Cell Press; A. Hemmati-Brivanlou y D.A. Melton, *Nature* 359:609-614, 1992. © 1992 Macmillan Magazines Ltd.; E. Amaya, T.J. Musci, y M.W. Kirschner, *Cell* 66:257-270,1991.© Cell Press; y W.C. Smith y R.M. Harland, *Cell* 70:829-840, 1992.© Cell Press.)

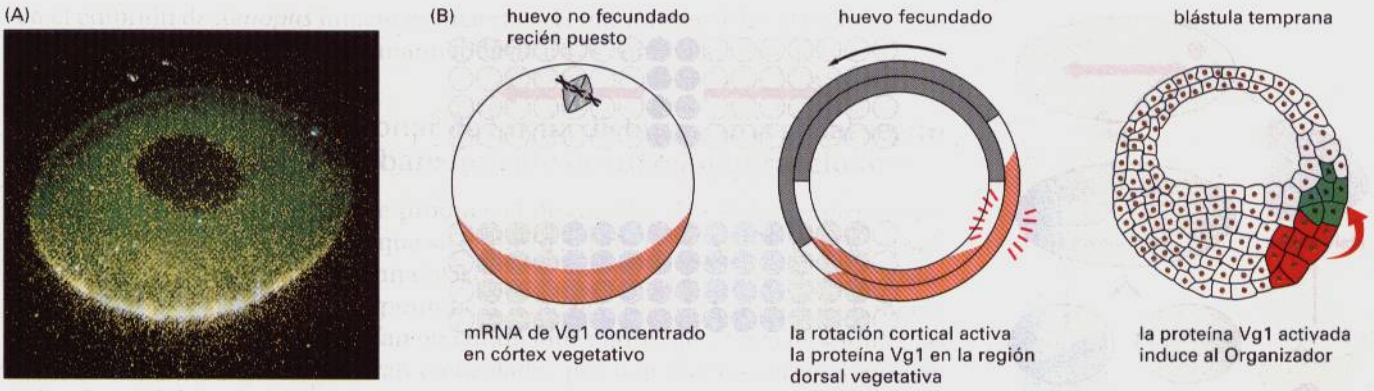


Figura 21-25 Localización de Vg1 y su supuesto papel inductor en el embrión de *Xenopus*. (A) Hibridación *in situ*, mostrando su localización en la región vegetativa cortical del oocito (el futuro huevo). (B) Diagramas que ilustran una hipótesis de cómo actúa Vg1. El mRNA del Vg1 se sintetiza en el oocito y queda localizado, mediante mecanismos desconocidos, en las regiones corticales vegetativas de la célula. Igual que otros miembros de la superfamilia TGF-β, la forma activa de la proteína Vg1 es un fragmento segmentado del precursor de longitud completa. El control del paso de activación de la segmentación es desconocida. Si se inyecta mRNA que codifica Vg1 de tamaño normal en un embrión temprano, se produce muy poco del fragmento activo y no se observa efecto alguno en el modelaje del embrión. Pero si se modifica el mRNA para que codifique un precursor que ya está segmentado para producir el fragmento activo de Vg1, las consecuencias son dramáticas: se puede inducir un eje corporal completo, de un modo que sugiere que el fragmento de Vg1 está imitando la señal que normalmente procede de los blastómeros dorsales vegetativos y que induce el desarrollo del Organizador. Según otra propuesta, Vg1 actúa como esta señal durante el desarrollo normal, y la producción de fragmento activo de Vg1 se localiza en los blastómeros dorsales vegetativos mediante un proceso que consta de dos fases. Primero, el mRNA es liberado en el extremo vegetativo del huevo; entonces la rotación cortical que sigue a la rotación crea las condiciones especiales en la parte dorsal del córtex vegetativo, de forma que el precursor de proteínas se segmenta produciendo el fragmento activo. Entonces éste se libera de los blastómeros dorsales vegetativos induciendo la formación de un Organizador. (A, cortesía de Douglas Melton.)

trón creado en el mesodermo inducirá patrones de especialización local en el ectodermo y en el endodermo con los que entra en contacto.

Así pues parece que existen al menos tres señales inductivas que actúan en los primeros estadios del desarrollo de *Xenopus*, cuyos orígenes son: los blastómeros vegetativos ventrales, los blastómeros vegetativos dorsales y el Organizador (Figura 21-23). ¿Qué son estas señales desde el punto de vista químico? Parece que están implicados miembros de al menos cuatro familias de proteínas señal secretadas. Aunque sus papeles exactos en el desarrollo típico no están nada claros, se cree que ya están todas presentes en el embrión temprano de *Xenopus*, y todas ellas producen efectos inductores dramáticos si se suministran artificialmente. Al menos en dos de las cuatro clases, el bloqueo artificial de la función produce embriones que carecen de partes importantes del cuerpo (Figura 21-24).

Tales observaciones no explican, sin embargo, por qué la localización de las señales inductivas que circulan entre los blastómeros del embrión de *Xenopus* viene determinada por el patrón de asimetrías del huevo no segmentado. En el caso de la *proteína Vg1*, que es miembro de la superfamilia TGF-β de factores señal secretados, se puede entrever por qué ocurre. Se ha localizado una reserva de mRNA materno que codifica la proteína localizada en la parte vegetativa del huevo antes de su fecundación. Se cree que la proteína se produce en su forma precursora en las regiones vegetativas, y que se puede activar en la región vegetativa dorsal, liberándose de los blastómeros vegetativos dorsales induciendo al Organizador (Figura 21-25).

Un sencillo gradiente de morfógeno puede organizar un complejo patrón de respuestas celulares[21]

Existen muchas maneras por las cuales las señales que pasan de una parte a otra del embrión pueden controlar el patrón de formación (Figura 21-26). El Organi-

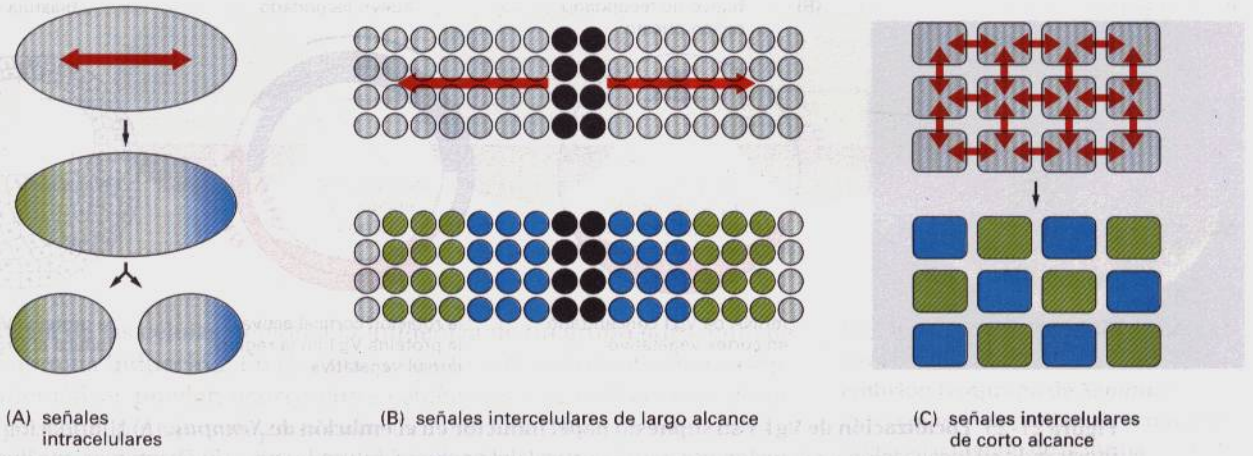


Figura 21-26 Tres tipos de señales para tres estilos de formación de patrones. (A) Las señales intracelulares pueden organizar los determinantes citoplasmáticos dentro del huevo, que heredarán los distintos blastómeros cuando el huevo se divida. (B) Señales difusibles de largo alcance procedentes de un centro señal pueden dirigir el patrón global de especialización celular en el tejido envolvente. (C) Interacciones de corto alcance, célula-célula, pueden crear un mosaico de células minúsculas que se encuentran en diferentes estados; a menudo juegan un papel crucial en la toma final de decisiones sobre la diferenciación en tejidos complejos como la retina y otros epitelios sensoriales.

zador constituye un ejemplo de una estrategia de un interés particular: un pequeño trozo de tejido de una región determinada adquiere un carácter especial y se convierte en la fuente de una señal que se introduce en los tejidos vecinos y controla su comportamiento. Por ejemplo, la señal podría tomar la forma de una molécula difusible secretada por centro emisor de señales. Supongamos que tal substancia se degrada lentamente a medida que difunde a través del tejido circundante. La concentración será constante y alta cerca de la fuente y disminuirá gradualmente al alejarse de ella, estableciéndose un gradiente de concentración (Figura 21-27). Las células que se encuentren a distancias distintas de la fuente estarán expuestas a distintas concentraciones y por tanto se volverán diferentes. Una sustancia como ésta, cuya concentración es "leída" por las células para descubrir su posición relativa respecto a una cierta señal o baliza, se denomina **morfógeno**. Se cree que los gradientes de morfógeno constituyen una vía común de suministro de información posicional a las células o de control de su patrón de diferenciación, a pesar de que en muy pocos casos se ha identificado el morfógeno químicamente.

¿Cómo responden las células a un gradiente de morfógeno? La concentración del morfógeno difusible debe presentar un gradiente muy suave, y sin embargo muchas de las especializaciones importantes del desarrollo son discretas: por ejemplo, no existen series graduales de tipos celulares adultas intermedias entre cartílago y músculo, o entre hueso y nervio. Teóricamente, en una población inicialmente uniforme pueden aparecer diferencias marcadas a través de un *umbral* de respuesta a una señal cuya variación de concentración es muy suave. Si existe una retroalimentación positiva en cada célula que responde que amplifica el efecto de un pequeño incremento de la señal, células expuestas a intensidades sólo ligeramente distintas de la señal pueden verse abocadas a vías de desarrollo completamente distintas, en función de si la concentración a la que están expuestas es superior o inferior a un umbral determinado. Si existen varios umbrales de respuesta a una señal, un solo morfógeno puede controlar el patrón de varias opciones celulares diferentes. Por ejemplo, se ha demostrado que cuando las células procedentes del polo animal de un embrión temprano de *Xenopus* son expuestas a la molécula señal activina (véase Figura 21-24), se desarrollan como epidermis si la concentración es baja, en músculo si es un poco más elevada y en notocorda si es un poco más alta. Sin embargo, la función normal de la activina

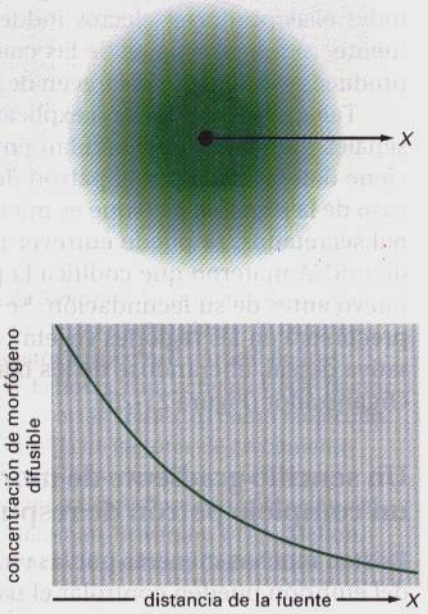


Figura 21-27 Gradiente de morfógeno. Si una substancia es producida por una fuente puntual y a medida que difunde a partir de esta fuente se va degradando, se produce un gradiente de concentración cuyo máximo se encontrará en la fuente. La substancia puede actuar como morfógeno, cuya concentración local controlará el comportamiento de las células según su distancia respecto a la fuente.

en el embrión de *Xenopus* intacto es incierta, y la naturaleza de las señales producidas por el Organizador de Spemann todavía no es conocida.

Las células pueden reaccionar de forma distinta a una señal según el momento en que la reciban: función de un reloj intracelular [22]

Generalmente, a medida que se produce el desarrollo, las células embrionarias cambian su carácter a pesar de que su entorno permanezca inalterado. Si extraemos célula del polo animal de una blástula de *Xenopus* y las mantenemos aisladas *in vitro*, se diferenciarán espontáneamente en epidermis aproximadamente al mismo tiempo en que lo harían en condiciones normales. En este sentido, las células actúan como si estuvieran controladas por una especie de reloj intracelular. Las células cambian espontáneamente su estado interno, por lo que pueden responder de forma diferente a una señal inductora en función del momento en que la reciban. Si por ejemplo extraemos un fragmento del epitelio del polo animal de una gástrula temprana y lo insertamos en el rudimento del ojo de un embrión más desarrollado, este fragmento será inducido (de forma inadecuada) a convertirse en un trozo de tejido parecido al tubo neural; en cambio, si le permitimos que madure unas horas *in vitro* antes de injertarlo en el mismo entorno, se convertirá (de forma adecuada) en un cristalino; si se cultiva *in vitro* un período todavía más largo, pierde la capacidad para responder a la influencia inductora del ojo rudimentario en ambos sentidos.

De estos hechos se puede concluir una cuestión general importante: la diversidad celular y los patrones espaciales pueden aparecer a partir de una simple señal inductora *invariable* que actúe en una sucesión de célula idénticas, en distintos momentos (Figura 21-28). Ya hemos visto por ejemplo que las partes del eje central del cuerpo se forman secuencialmente durante la gastrulación, involucionando primero las zonas anteriores alrededor del labio del blastoporo y las zonas posteriores después. De acuerdo con una teoría, las diferencias en la edad a la cual las células sobrepasan el labio dorsal y reciben la influencia del Organizador de Spemann son la causa de las diferencias de carácter celular entre las zonas anterior y posterior del mesodermo y el endodermo y análogamente en todo el cuerpo.

Así pues la estrategia general de formación de patrones puede resumirse así: (1) los patrones son resultado de simples asimetrías, (2) los detalles se generan secuencialmente mediante interacciones célula-célula, y el patrón de diversificación celular resultante depende tanto de (3) las señales posicionales entre las células, como de (4) programas intracelulares que cambian con el tiempo la respuesta celular a estas señales.

Las diferentes especies combinan de forma distinta estos cuatro elementos básicos. Ahora consideraremos el caso especial de un embrión temprano de mamífero, que tiene algunas propiedades reguladoras notables.

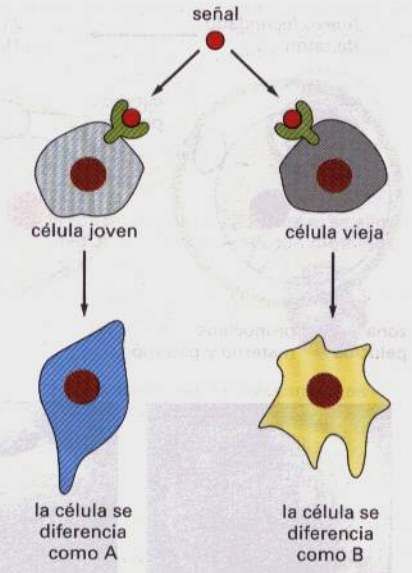


Figura 21-28 La influencia temporal. Una señal invariable actúa sobre células similares pero de edades diferentes, lo cual puede evocar respuestas diferentes. Los patrones espaciales pueden producirse de esta forma, permitiendo que una señal invariable actúe en momentos distintos sobre diferentes miembros de una formación de células inicialmente similares.

En los mamíferos, el protegido entorno uterino permite un tipo extraordinario de desarrollo temprano [9, 23]

El embrión de mamífero actúa de forma distinta del de otros animales en muchos aspectos. Al desarrollarse en el entorno protegido del útero, no tiene la misma necesidad que los embriones de la mayoría de las demás especies de completar rápidamente los estadios iniciales del desarrollo. Además, el desarrollo de una placenta proporciona pronto alimento procedente de la madre, por lo que el huevo no necesita tener grandes reservas de alimentos básicos como el vitelo. El huevo de ratón tiene un diámetro aproximado de tan sólo 80 μm, por lo que su volumen es 2000 veces menor que el de un huevo de un anfibio común. Sus divisiones de segmentación no se producen más rápidamente que las divisiones de muchas células somáticas ordinarias, y la transcripción genética ya se inicia en el estadio de 2 células. Además, mientras que las etapas más avanzadas del desarrollo de los mamíferos son fundamentalmente similares a los de otros ver-

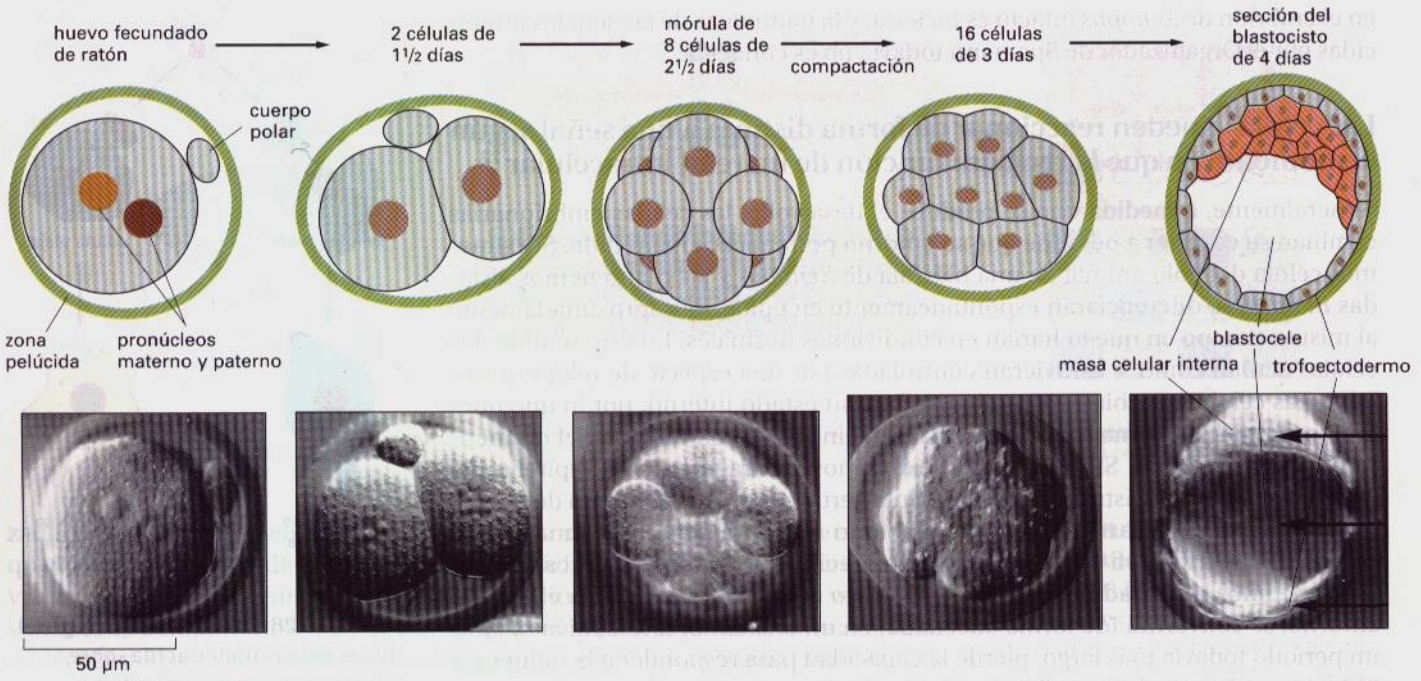
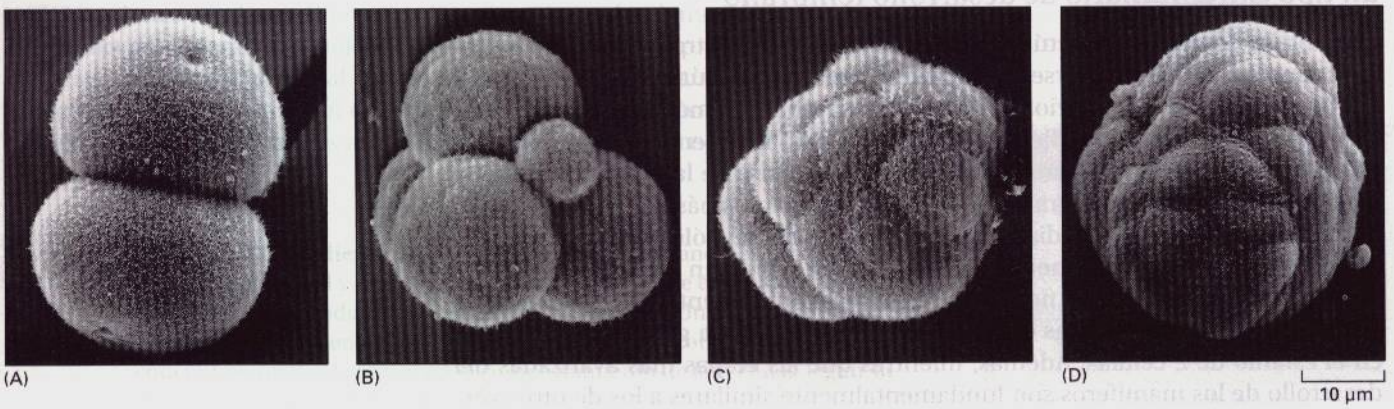


Figura 21-29 Las primeras etapas del desarrollo del ratón. (Fotografías por cortesía de Patricia Calarco, de G. Martin, *Science* 209:768-776, 1980. Copyright 1980 the AAAS.)

tebrados como *Xenopus*, los mamíferos empiezan por dar un gran rodeo en su desarrollo, formando un conjunto de complicadas estructuras –principalmente el saco amniótico y la placenta– que envuelven y protegen al embrión y que proporcionan las condiciones idóneas para intercambiar metabolitos con la madre. Estas estructuras, como el resto del cuerpo, derivan del huevo fecundado pero se denominan *extraembrionarias* debido a que se eliminan en el parto y no forman parte del animal adulto.

En la Figura 21-29 se resumen los estadios tempranos del desarrollo del ratón. Inicialmente el huevo está rodeado por una cubierta celular transparente, la *zona pelúcida*. Tras la fecundación, el huevo se segmenta dentro de la cubierta formando un grupo celular con forma de mora denominado *mórula*. En algún momento entre los estadios de 8 células y de 16 células, la superficie de la mórula se alisa y adquiere una apariencia casi esférica a medida que las células modifican sus uniones y el grupo se vuelve más compacto (Figura 21-30), y las células situadas en el exterior de la esfera se unen entre sí mediante uniones herméticas, aislando el interior de la mórula del medio externo. Poco después, los espacios intercelulares internos se ensanchan dando lugar a una cavidad central que se llenará de fluido –el blastocele. En este estadio la mórula ya se ha convertido en un *blastocisto*. Las células del blastocisto forman una lámina esférica que envuelve el blastocele, en la que se destaca un polo debido a una mayor acumulación de células. Como se observa en la Figura 21-29, la capa celular externa es el

Figura 21-30 Electronmicrografía de barrido de un embrión temprano de ratón. Se ha extraído la zona pelúcida. (A) Fase de dos células. (B) Fase de cuatro células (además de los cuatro blastómeros se observa un cuerpo polar). (C) Mórula de ocho a dieciséis células –se produce la compactación. (Cortesía de Patricia Calarco y C.J. Epstein, *Dev. Biol.* 32:208-213, 1973.)



trofoectodermo; el grupo de células situadas en el interior del trofoectodermo, en el polo más grueso, se denomina *masa celular interna.*

De la masa celular interna deriva todo el embrión. El trofoectodermo es el precursor de la placenta y es el primer componente que aparece del futuro sistema de estructuras extraembrionarias. Cuando la zona pelúcida se ha formado, las células del trofoectodermo entran en contacto con la pared del útero, de forma que el embrión queda implantado. Mientras tanto, la masa celular interna crece y empieza a diferenciarse. Parte de ella da lugar a estructuras extraembrionarias, como el saco vitelino, y el resto participa en la formación del embrión mediante procesos de gastrulación, neurulación, etc., que son muy parecidos a los de otros vertebrados, a pesar de que notables distorsiones geométricas dificulten nuestra percepción de ellas.

Todas las células del embrión animal temprano tienen el mismo potencial de desarrollo[24]

Hasta que llegan al estadio de 8 células, las células del embrión temprano de mamífero conservan su capacidad de desarrollarse en cualquier parte del embrión adulto. Si el embrión temprano se partiera en dos, se producirían un par de gemelos idénticos –una única célula produciría dos individuos totalmente normales. De forma parecida, si una de las dos células de un embrión de ratón bicelular se destruyen mediante pinchazos con una aguja, y se coloca el "medio embrión" resultante en un útero de una madre adoptiva para que se desarrolle, en muchos casos nacerá un ratón completamente normal.

Inversamente, dos embriones de ratón de ocho células cada uno se pueden combinar formando una mórula gigante, la cual se desarrollaría formando un ratón de tamaño normal (Figura 21-31). Tales criaturas, producto de agregados de células genéticamente diferentes, se denominan **quimeras**. Las quimeras también pueden generarse inyectando células de un embrión temprano de un genotipo en el interior de un blastocisto de otro genotipo. Las células inyectadas se incorporan a la masa celular interna del blastocisto receptor desarrollándose un animal quimérico. Es incluso posible conseguir una quimera inyectando de esta forma una sola célula; de esta forma se puede estudiar la capacidad de desarrollo de una célula aislada. Una de las conclusiones más importantes derivadas de estos estudios es que inicialmente las células de un embrión temprano de mamífero (hasta que alcanzan el estadio de 8 células) son idénticas y no tienen restringida ninguna de sus capacidades: todas ellas son *totipotentes*. Aparentemente los determinantes localizados no juegan ningún papel en el huevo de mamífero, y el patrón de diversificación celular del embrión se genera posteriormente, y de forma completa, mediante las interacciones de unas células con otras y con su entorno.

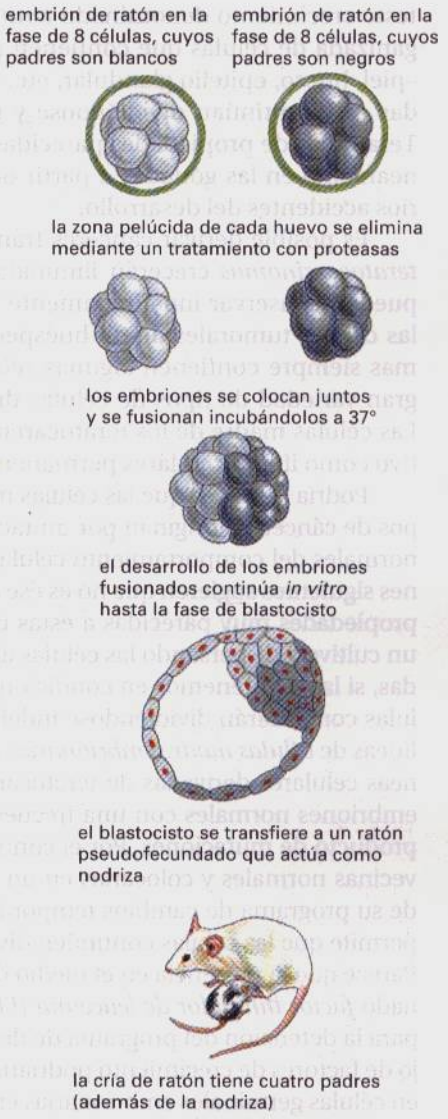


Figura 21-31 Procedimiento para generar un ratón quimérico. Se combinan dos tipos de mórulas de genotipo diferente.

Las células madre embrionarias de los mamíferos muestran cómo señales procedentes del entorno pueden controlar el ritmo y la vía de desarrollo[25]

El desarrollo temprano de los mamíferos está altamente *regulado*. El futuro de cada célula se determina a través de interacciones con sus vecinas. Los experimentos con ratones que acabamos de describir lo ilustran perfectamente. Las células de un medio-embrión o de un embrión quimérico doble tienen que ajustar su comportamiento para poder generar un animal completamente normal en cuanto a su patrón y a su tamaño. Sin embargo, cuando las circunstancias de desarrollo son mucho más anormales, las células embrionarias pueden quedar totalmente fuera de control. De este fenómeno hemos de aprender varias lecciones importantes.

Si se inyecta un embrión temprano normal de ratón en el riñón o en el testículo de un adulto, el embrión queda rápidamente desorganizado y desaparecen los controles normales de la proliferación celular. El resultado de ello es un gro-

testo crecimiento denominado *teratoma*, cuya composición es una masa desorganizada de células que contienen muchas variedades de tejidos diferenciados –piel, hueso, epitelio glandular, etc.– mezclados con células madre indiferenciadas que continúan dividiéndose y generan todavía más tejidos diferenciados. Teratomas de propiedades parecidas a éstas también pueden aparecer espontáneamente en las gónadas a partir de células germinales como resultado de varios accidentes del desarrollo.

Es posible derivar cánceres transplantables a partir de los teratomas. Tales *teratocarcinomas* crecerán ilimitadamente hasta que maten a su huésped. Se pueden conservar indefinidamente implantando de forma seriada muestras de las células tumorales de un huésped a otro y se observa que los teratocarcinomas siempre contienen algunas *células madres* indiferenciadas, junto con una gran variedad de tipos de células diferenciadas producto de las células madre. Las células madre de los teratocarcinomas también pueden mantenerse en cultivo como líneas celulares permanentes.

Podría pensarse que las células madre de los teratocarcinomas, como otros tipos de cáncer, se originan por mutaciones de genes responsables de los controles normales del comportamiento celular (Capítulo 24). Sin embargo, las observaciones siguientes sugieren que no es ése el caso. Se pueden obtener células madre con propiedades muy parecidas a éstas colocando la masa celular interna normal en un cultivo y dispersando las células al inicio de su proliferación. Una vez dispersadas, si las mantenemos en condiciones idóneas en el cultivo, algunas de estas células continuarán dividiéndose indefinidamente sin alterar su características. Las líneas de *células madre embrionarias (ES,* de Embrionic Stem) son similares a las líneas celulares derivadas de teratocarcinoma, pero se pueden generar a partir de embriones normales con una frecuencia tan alta que es poco probable que sean producto de mutaciones. Por el contrario, parece que al separar las células de sus vecinas normales y colocarlas en un medio de cultivo adecuado, el curso normal de su programa de cambios temporales de caracteres celulares se detiene, lo cual permite que las células continúen dividiéndose indefinidamente sin diferenciarse. Parece que la presencia en el medio de un factor de crecimiento proteico denominado *factor inhibidor de leucemia (LIF,* de Leukemia Inhibitory Factor), es crucial para la detención del programa de desarrollo. Con un coctel un poco más complejo de factores de crecimiento podríamos inducir el mismo tipo de comportamiento en células germinales embrionarias en cultivo.

El estadio en el que se detienen las ES, los teratocarcinomas, o las células madre derivadas de células germinales parece ser equivalente al de las células de la masa celular interna normal. Ello puede ponerse de manifiesto tomando las células de una placa de cultivo e inyectándolas dentro de la cavidad del blastocele de un blastocito normal (Figura 21-32). Las células inyectadas quedan incorporadas a la masa celular interna del blastocisto y pueden contribuir en la formación de un ratón quimérico aparentemente normal. Los descendientes de las células madre inyectadas están presentes en prácticamente todos los tejidos del ratón, donde se diferenciarán ordenadamente y de forma apropiada para su localización y pueden incluso formar células germinales viables. Esta capacidad de las células ES constituye la base de una técnica muy utilizada gracias a la cual se generan ratones con una mutación diseñada por ingeniería genética en cualquier gen escogido cuyo DNA se haya clonado. Para producir tales ratones "de genes fuera de combate" (gene-knockout), se construyen células ES mutantes seleccionando para una inserción de DNA que substituya el gen escogido por una versión modificada artificialmente; la célula ES mutante se utiliza entonces para producir un ratón quimérico que contenga la mutación en sus células germinales (véase pág. 353).

El comportamiento sorprendentemente adaptable de las células ES demuestra que las señales del entorno no sólo determinan qué opciones seguir entre diferentes vías de diferenciación, sino que en algunos casos también ponen en marcha o detienen el reloj del desarrollo celular –es decir los procesos que conducen el progreso de la célula desde que es un embrión hasta su estado adulto.

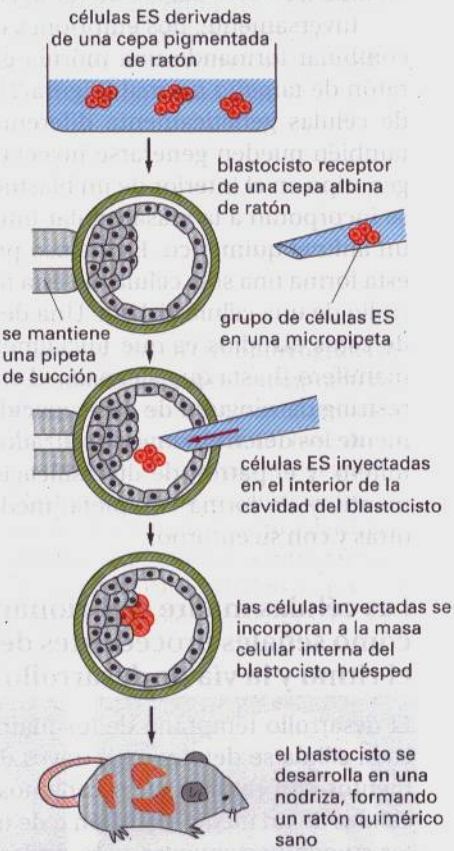


Figura 21-32 Producción de un ratón quimérico con células ES o células madre de teratocarcinoma. El experimento demuestra que las células madre pueden combinarse con las células de un blastocisto normal formando un ratón quimérico sano.

Resumen

En el transcurso del desarrollo embrionario a partir de un huevo fecundado se generan muchos tipos de células. Los genomas de la células diferenciadas son idénticos; lo que las distingue es el patrón de expresión de sus genes. Generalmente, algunas de las diferencias entre las células del embrión temprano tienen su origen en una distribución desigual de los determinantes localizados citoplasmáticos del huevo antes de su segmentación, pero la mayoría de ellas surgen más tarde a partir de diferencias localizadas en el entorno de las células del embrión. Por ejemplo, en el embrión temprano de* Xenopus*, las células animales y vegetativas heredan determinantes citoplasmáticos distintos del huevo, y luego algunas de las células animales reciben una influencia de las células vegetativas que las induce a desarrollarse como mesodermo en vez de ectodermo. Esta inducción mesodérmica parece estar mediada por familias de factores proteicos de crecimiento que también contribuyen a regular el crecimiento y la diferenciación del organismo adulto.

Los huevos de mamífero son excepcionales dado que son esencialmente simétricos. Así, inicialmente todas las células de un embrión temprano de mamífero son iguales y solamente se diferencian a través de la interacción de unas con otras. Mediante interacciones célula-célula, las células de dos embriones tempranos de ratón ajustan su futuro y colaboran formando un único ratón quimérico. Células de un embrión temprano de ratón, alejadas de las influencias típicas de sus vecinas, pueden proliferar de forma inadecuada dando lugar a teratocarcinomas, de los cuales se pueden obtener células madre embrionarias. Sin embargo, estas células recuperan un comportamiento normal cuando se implantan en un embrión temprano normal, y sus descendientes se diferencian según su entorno y pueden contribuir a la formación de un animal quimérico normal.

Memoria celular, determinación celular y el concepto de valores posicionales

Las células no sólo han de ser diferentes, sino que han de *permanecer* diferenciadas tras la desaparición de las influencias originales responsables de la diversificación celular. A pesar del continuo recambio y resíntesis de prácticamente todos los componentes celulares, en el adulto muchos tipos de células tienen características distintivas que se mantienen estables y heredables, incluso cuando el entorno cambia. Así, cuando una célula pigmentaria se divide, sus hijas continúan siendo células pigmentarias; cuando un queratinocito de la piel se divide, sus hijas continúan siendo queratinocitos; y, aunque un fibroblasto puede convertirse en otro tipo de célula perteneciente a un tejido conjuntivo, como una célula cartilaginosa, nunca se convertiría en una neurona o en una célula del hígado; y así sucesivamente. Las diferencias entre tipos celulares se deben, en último término, a las distintas influencias a que han sido sometidas las células en el embrión, pero dichas diferencias se mantienen debido a que las células recuerdan de alguna manera los efectos de pasadas influencias y los transmiten a sus descendientes. Como veremos en este apartado, la memoria celular –y los tipos de información celular, especialmente la posicional, que las células conservan como consecuencia– son elementos centrales de los mecanismos de modelaje que hacen posible un organismo pluricelular complejo.

A menudo las células quedan determinadas para su futuro papel especializado mucho antes de que se diferencien manifiestamente[15, 26]

La existencia de una memoria celular se hace patente en la persistencia y estabilidad de los estados diferenciados de las células del cuerpo adulto (véase Capítulo 22). Pero habitualmente, el carácter final de una célula ha sido decidido a través de una secuencia compleja de influencias que afectaron a sus progenitoras

durante el desarrollo y este carácter puede haber sido establecido y fijado mucho antes de que se manifieste la diferenciación. Por ejemplo, a través de varias series de decisiones tomadas antes, durante y justo después de la gastrulación, algunas células de los somitos de un vertebrado se especializan, en un estadio muy temprano, como precursoras de las células del músculo esquelético; entonces migran desde los somitos a otras regiones, entre ellas a las regiones donde se formarán las extremidades (véase Figura 21-16). Estos precursores de células musculares carecen de las grandes cantidades de proteínas contráctiles especializadas que se encuentran en las células musculares maduras; de hecho, superficialmente se parecen mucho a las otras células del rudimento de las extremidades. Pero después de varios días empiezan a fabricar grandes cantidades de las proteínas típicas del músculo, mientras que las otras células de las extremidades, con las que están mezcladas, se diferencian en varios tipos de células de tejido conjuntivo. Por lo tanto, la decisión de desarrollarse en célula muscular o en célula del tejido conjuntivo se había tomado mucho antes de que tal diferenciación se manifestase abiertamente, y se registra en cada célula como un cambio molecular que no tiene ninguna consecuencia apreciable en la apariencia externa de la célula.

Se dice que una célula que ha tomado una decisión sobre su desarrollo está *determinada*. Dado que dicho concepto es parte fundamental del lenguaje de la biología del desarrollo, nos será útil contar con una definición formal: una célula está **determinada** si ha sufrido un cambio autoperpetuante de carácter interno que la diferencia, a ella y a su progenie, de las otras células del embrión, y que las obliga a tomar una vía de desarrollo especializada. Normalmente, el término **diferenciación** se reserva para designar la especialización celular *manifiesta*, es decir, referida a la especialización de un carácter celular muy evidente. Generalmente una célula ya está determinada antes de su diferenciación, aunque en algunos casos ambos procesos ocurren simultáneamente. De hecho, la diferenciación puede ocurrir sin determinación, siempre que la especialización del carácter celular sea reversible.

El momento de la determinación celular puede ponerse de manifiesto por medio de experimentos de trasplante[27]

Para comprobar si una célula o un grupo de células está determinado, se ha de demostrar que estas células tienen un carácter distintivo que se mantiene incluso aunque las circunstancias se alteren experimentalmente. La técnica más común consiste en trasplantar las células a un entorno experimental (Figura 21-33).

Un ejemplo sencillo de este tipo de experimento nos lo proporcionan los estudios con embriones de anfibios. Como apuntábamos anteriormente, es posible trazar el mapa futuro de la blástula o de una gástrula temprana, indicando qué partes de la misma se desarrollarán, según su proceso normal, y en qué se con-

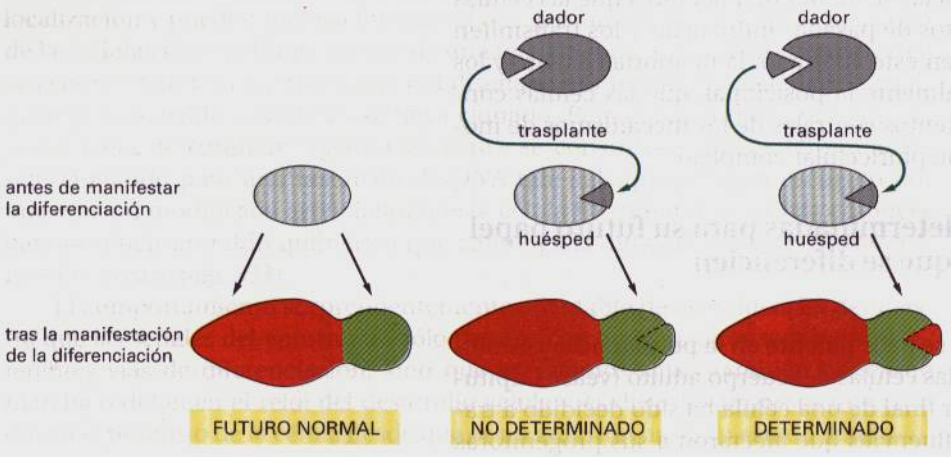


Figura 21-33 Prueba estándar de determinación.

vertirán. Por ejemplo, las células de una región están destinadas a convertirse en epidermis si su desarrollo sigue el curso normal, mientras que el destino de las de otras regiones será convertirse en cerebro. Para establecer cuándo estos dos grupos de células quedan *determinados* para seguir sus vías de diferenciación particulares, se secciona un bloque de células de la futura región epidérmica y se las sitúa en la futura región encefálica, y viceversa. Si la células se trasplantan en el estadio de gástrula temprana, no muestran memoria alguna de sus orígenes y se diferencian de la forma más apropiada para sus nuevas localizaciones. No obstante, si el mismo experimento se realiza un poco más tarde, en la gástrula tardía, las futuras células del cerebro trasplantadas a una localización epidérmica se diferenciarán como tejido neuronal desplazado y las futuras células epidérmicas trasplantadas a una localización cerebral se diferenciarán como epidermis desplazada. Esto demuestra que ambos grupos de células han quedado determinados en algún momento entre el estadio de gástrula temprana y tardía.

La determinación y la diferenciación celulares reflejan la expresión de genes reguladores[28]

Del fenómeno de determinación celular surgen tres cuestiones moleculares: ¿Qué molécula o moléculas definen el estado de determinación de una célula; qué mecanismo de memoria mantiene este estado; y cómo se acoplan determinación y diferenciación? En general, el carácter de una célula está dirigido por la combinación de las proteínas reguladoras de genes que contiene. Estas proteínas controlan su patrón de expresión génica. En el caso ampliamente estudiado del músculo, visto en el Capítulo 9, las proteínas de la *familia MyoD* estrechamente relacionadas con las *proteínas miogénicas* (MyoD, Myf5, MRF4 y miogenina) desempeñan un papel crucial en dicha regulación. En circunstancias apropiadas estas proteínas pueden activar la expresión de genes específicos del músculo, como la actina y la miosina musculares; la introducción de un miembro de la familia MyoD dentro de los fibroblastos y de otros tipos celulares distintos puede convertirlos en células precursoras del músculo. En un desarrollo normal, los genes que codifican las proteínas de la familia MyoD inician su expresión muy pronto en las células precursoras del músculo a medida que éstas dejan los somitos, lo cual sugiere que la presencia de estas proteínas define el estadio de determinación celular. Si por ejemplo se elimina el gen miogenina mediante recombinación génica dirigida, las células musculares no consiguen desarrollarse.

El conjunto de genes sujetos a activación por la actuación de los miembros de la familia MyoD incluye al menos algunos de los genes de esta misma familia. Por esta razón, normalmente la expresión de un miembro de la familia conlleva también la expresión de otros miembros. Además, algunas de estas proteínas reguladoras actúan directamente en su propio gen manteniendo la expresión del gen una vez ha sido activada. La *retroalimentación positiva* resultante de una activación mutua y de una auto-activación proporciona un mecanismo posible de memoria celular, tal como se vio en el Capítulo 9.

Aun así todavía existe un problema: las células precursoras de músculo no empiezan a fabricar grandes cantidades de proteínas específicas del músculo hasta días, semanas o quizá años después de haber abandonado los somitos. ¿Cómo pueden continuar sin diferenciarse durante tanto tiempo una vez que han quedado determinadas? El mecanismo podría depender de otras proteínas que interactúan con miembros de la familia MyoD regulando su acción. Como se vio en el Capítulo 9, MyoD y sus parientes pertenecen a la superfamilia hélice-bucle-hélice, cuyos miembros dimerizan unos con otros, se unen al DNA y activan la expresión génica. La eficiencia de la activación génica depende de la correcta elección del compañero para efectuar la dimerización. Aparentemente, la regulación de la disponibilidad de compañeros apropiados para la dimerización de una proteína de la familia MyoD bastará para que la célula pueda cambiar de un estado determinado, en el cual la proteína sólo es capaz mantener la producción de

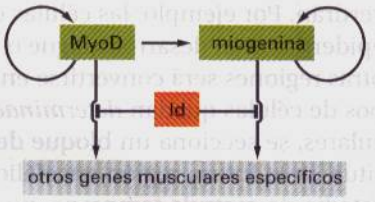


Figura 21-34 Circuito del control génico para la determinación de una fibra muscular. En este diagrama simplificado sólo se muestran dos miembros representativos de la familia de genes MyoD –el propio *myoD* y el gen *miogenina*. La activación mutua y la auto-activación de estos genes por parte de sus propios productos crea una retroalimentación positiva que conlleva la expresión autoperpetuante de los genes. Id es una proteína hélice-bucle-hélice codificada por el gen *inhibidor de la unión a DNA*; gracias a su dimerización con otras proteínas hélice-bucle-hélice, y particularmente debido a su competición con miembros de la familia MyoD para obtener compañeros de dimerización adecuados, se cree que dificulta la expresión tardía de genes musculares específicos. Sin embargo el sistema de control completo es mucho más complicado de lo que sugiere este diagrama.

miembros de la familia MyoD, a un estado ya diferenciado, en el cual la proteína activa toda la variedad de genes musculares específicos (Figura 21-34).

El estado de determinación puede estar controlado por el citoplasma o puede ser intrínseco a los cromosomas[29]

La memoria celular, tal como se manifiesta en el fenómeno de la determinación, es uno de los principales problemas que desafían a la biología molecular. En el Capítulo 9 vimos algunos de los mecanismos moleculares a través de los cuales algunos patrones de expresión génica pueden convertirse en autoperpetuantes. En el contexto de la determinación celular pueden distinguirse tres grandes categorías de memoria celular, que podrían denominarse respectivamente: *memoria citoplasmática, autocrina* y *nuclear*. El mecanismo que acabamos de apuntar sobre las proteínas miogénicas es un ejemplo de memoria citoplasmática. En este caso los componentes codificados por el conjunto de genes activos están presentes en el citoplasma, y actúan directa o indirectamente sobre el genoma manteniendo la expresión selectiva de este conjunto determinado de genes. Una consecuencia de este mecanismo es que si un núcleo tomado de un tipo de célula diferenciada se inyecta en el citoplasma de otro tipo celular, debería de modificar su patrón de expresión génica para encajar con el carácter del citoplasma huésped. Los experimentos de trasplante nuclear efectuados en huevos de anfibio que estudiamos anteriormente proporcionan un ejemplo de esta clase de comportamiento.

El mecanismo de memoria autocrina es una variante del mecanismo citoplasmático. También depende de la síntesis de productos que estimulan su propia producción, pero con la característica especial de que estos productos se segregan al medio extracelular y actúan sobre el exterior de la célula para que la célula permanezca en el estado óptimo para su producción. Este mecanismo tiene un efecto secundario importante: debido a que las células vecinas comparten el mismo entorno extracelular, tenderán a actuar colectivamente, adoptando el mismo estado porque están expuestas a las substancias que ellas mismas producen, y por lo tanto una célula individual trasplantada a un medio nuevo tenderá a cambiar su carácter para ajustarse al de las células que la rodean por todos lados. Así pues, un grupo celular puede actuar como determinado aunque una célula de este grupo aislada no lo esté. Parece que estos "efectos comunitarios" de la determinación celular son bastante corrientes y se han estudiado con profundidad en el embrión temprano de *Xenopus*.

A diferencia de las memorias citoplasmática y autocrina, la memoria nuclear depende de cambios autoperpetuantes que son intrínsecos de los cromosomas –cambios que definen la selección de genes que se expresan, sin alterar la secuencia de DNA. La inactivación del cromosoma X (véase pág. 476) y la actividad heredable (véase pág. 481) son ejemplos claros de ello. La base de la memoria nuclear son las modificaciones heredadas en la cromatina o en el DNA; la memoria citoplasmática, por el contrario, permite que dos genes idénticos coexistan con diferentes estados en una única célula, uno expresado y el otro inhibido, aunque ambos estén expuestos al mismo entorno intracelular.

En los temas concernientes a la memoria celular nuestra ignorancia es profunda, todavía, y en la mayoría de los casos aún no podemos discernir si la memoria es citoplasmática o nuclear.

Las células de los tejidos en desarrollo recuerdan sus valores posicionales[30]

En el embrión animal las señales posicionales y las interacciones actúan a distancias cortas, aproximadamente a un milímetro o incluso menos, y estas influencias dejan su huella en el carácter celular a través de la memoria celular. A medida que el cuerpo se va desarrollando, otras influencias más avanzadas actúan sobre cada una de sus regiones, creando nuevas diferencias dentro de cada clase de células y trazando niveles de detalle cada vez más finos sobre el mapa corporal básico original.

Así pues cuando las células quedan sometidas a un modo de diferenciación particular, normalmente quedan *especificadas regionalmente*: adquieren marcas bioquímicas distintas de dirección, o **valores posicionales**, que reflejan su localización en el cuerpo. El valor posicional de una célula guiará su comportamiento en fases consecutivas del patrón de formación –la manera en que responderá a señales posicionales posteriores, las vías de interacción con sus vecinas, y toda la variedad de modos de diferenciación abiertos a ella misma y a su progenie. Se dice que las influencias que controlan la elección del valor posicional proporcionan a la célula la *información posicional*.

La existencia y la naturaleza de valores posicionales almacenados en la memoria se demuestra mediante experimentos sobre injertos llevados a cabo entre un muslo y un ala de pollo, ambos en desarrollo. Tanto el muslo como el ala adultos tienen músculo, hueso, piel, etc., y prácticamente la misma proporción de tejidos diferenciados. La diferencia entre ambas extremidades no radica en la clase de tejidos, sino en su distribución espacial. ¿Cómo se produce esta diferencia? A simple vista podría parecer más simple explicar la diferencia en términos de la presencia de una distribución espacial de señales distinta para las extremidades anterior y posterior, ambas en desarrollo, que ordenara directamente a las células qué estado diferenciado deben adoptar. Un simple experimento utilizando injertos demuestra que esta visión es profundamente errónea.

En el embrión de pollo, el ala y el muslo se originan casi simultáneamente en forma de pequeñas yemas con forma de lengua que se proyectan desde el costado (Figura 21-35). Al principio las células de los dos pares de yemas de las

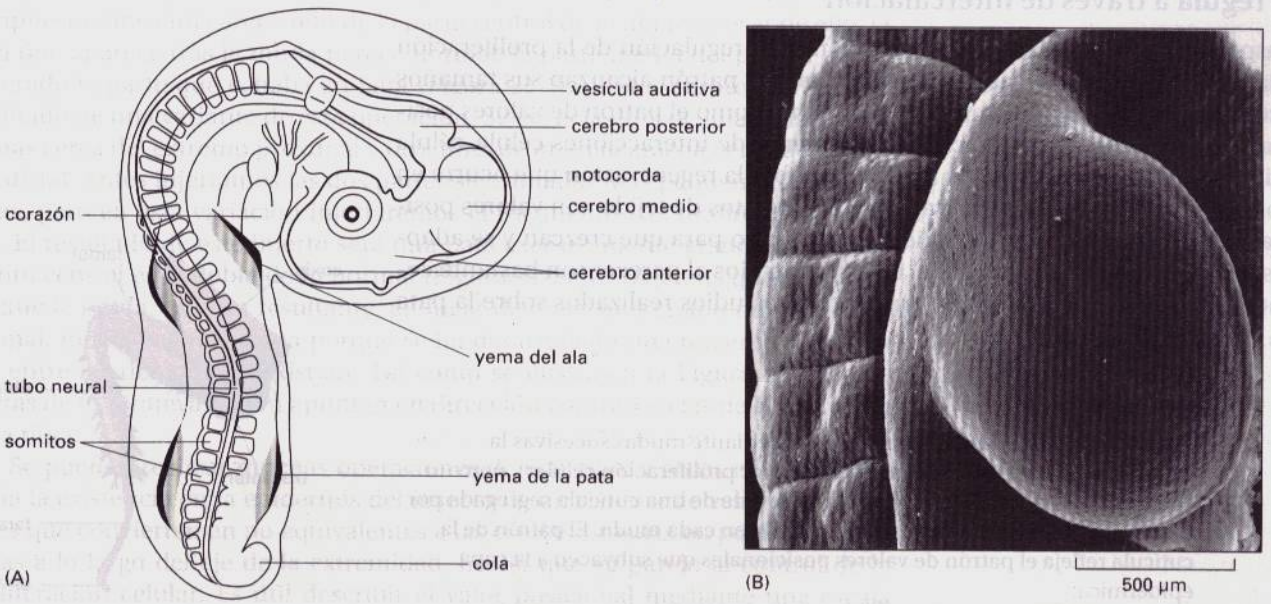
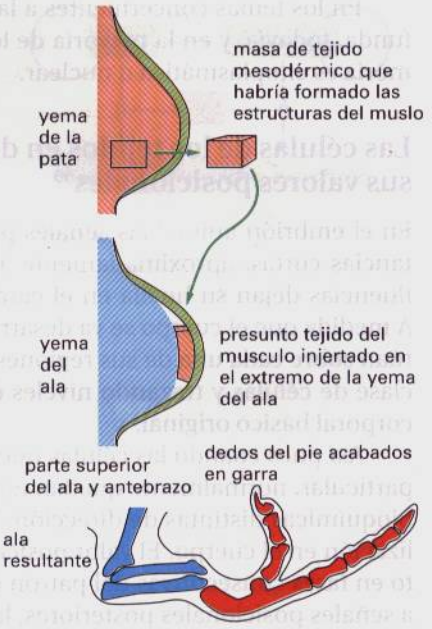


Figura 21-35 Desarrollo de un embrión de pollo. (A) Un embrión de pollo después de tres días de incubación, ilustrando las localizaciones iniciales de las yemas tempranas de las extremidades. (B) Electronmicrografía de barrido que muestra una vista dorsal de la yema del ala y los somitos adyacentes, un día después; la yema ha crecido convirtiéndose en una proyección con forma de lengua de aproximadamente 1mm de largo, 1 mm de ancho, y 0,5 mm de grosor. (A, según W.H. Freeman y B. Bracergirdle; An Atlas of Embriology. London: Heinemann, 1967; B, cortesía de Paul Martin.)

Figura 21-36 Futuro tejido del muslo injertado en el extremo de la yema de un ala forma dedos del pie. (Según J.W. Saunders et al., *Dev. Biol.* 1:281-301,1959.)



extremidades aparecen similar y uniformemente indiferenciadas (véase Figura 19-30). Entonces se puede seccionar una pequeña cantidad de tejido no diferenciado de la base de la yema del muslo, procedente de la región que normalmente daría lugar a parte de la cadera, e injertarse en la punta del extremo de la yema del ala. El injerto no formará la parte del ala correspondiente ni tampoco una pieza desplazada de tejido de la cadera, sino un dedo del pie (Figura 21-36). Este experimento demuestra que las células de las yemas del muslo temprano ya están determinadas como muslo, aunque su determinación sólo implica que formarán parte de la extremidad posterior sin concretar la parte del muslo que formarán: todavía pueden reaccionar ante influencias de la yema del ala, formando así estructuras adecuadas para el extremo de la extremidad más que para la base. Al parecer, el sistema de señales que controla las diferencias entre las partes de las extremidades es el mismo para el muslo y para el ala. La diferencia entre las dos extremidades deriva de una diferenciación presente en los estados internos de sus células en el inicio del desarrollo de las extremidades. Aunque las células parecen iguales y están destinadas a dar lugar a la misma variedad de tipos celulares diferenciados, son *no equivalentes*, y presentan valores posicionales distintos. Así pues la especialización del comportamiento de las células de las extremidades se desarrolla de forma combinada: primero, y según la información que reciban, formarán parte del ala o del muslo; luego señales presentes en el interior de la yema de la extremidad especifican componentes más detallados de valor posicional, indicando la colocación exacta en la extremidad.

Una de las revelaciones más notables de la genética molecular moderna ha sido que casi todos los animales parecen utilizar los mismos mecanismos moleculares altamente conservados para retener los valores posicionales situados a lo largo del todo el eje corporal (de la cabeza a la cola), y algunos de estos mismos productos genéticos también pueden actuar especificando valores posicionales en la extremidades de los vertebrados. Tendremos que aplazar nuestras teorías sobre estos importantes controladores del patrón corporal hasta que hayamos estudiado la mosca del vinagre, *Drosophila*, cuyos mecanismos fueron los primeros en ser descubiertos y caracterizados.

El patrón de valores posicionales controla la proliferación celular y se regula a través de intercalación[31]

Un aspecto crucial del patrón de formación es la regulación de la proliferación celular, a través de la cual las diferentes partes del patrón alcanzan sus tamaños adecuados. Muy a menudo, tanto el crecimiento como el patrón de valores posicionales dependen de un estrecho acoplamiento de interacciones célula-célula continuas. Partiendo de estudios realizados sobre la regeneración que ocurre en varios organismos cuando se yuxtaponen fragmentos de tejido con valores posicionales distintos y se concede el tiempo necesario para que crezcan y se adapten, se ha deducido una ley sencilla, cuyos principios al parecer son bastante corrientes. Quizás su ejemplo más claro sean los estudios realizados sobre la pata de la cucaracha (Figura 21-37).

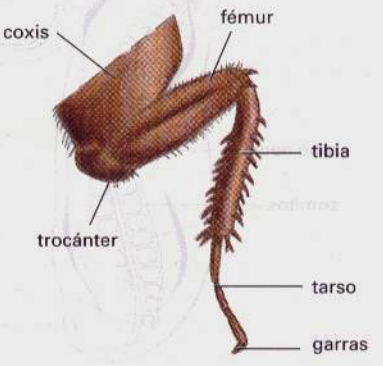


Figura 21-37 La pata de la cucaracha. Mediante mudas sucesivas la cucaracha se hace cada vez más grande (por proliferación celular), pero no cambia su estructura básica. La pata se reviste de una cutícula segregada por una capa epidérmica y que es reemplazada en cada muda. El patrón de la cutícula refleja el patrón de valores posicionales que subyacen a la capa epidérmica.

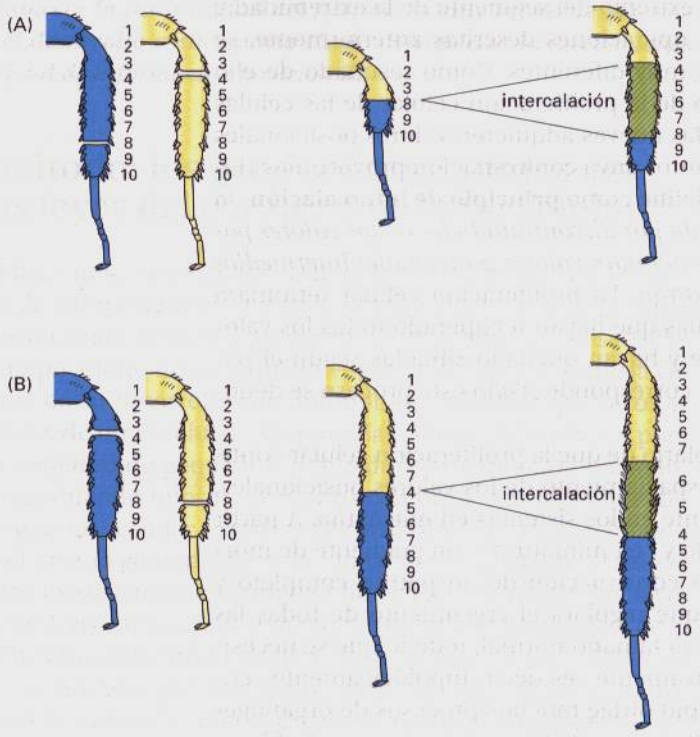


Figura 21-38 Regeneración intercalada. Si se injertan regiones de la tibia de la cucaracha que no se corresponden, se intercalará (mediante proliferación celular) un tejido nuevo (*verde*), para rellenar los vacíos en el patrón de valores posicionales (numerados de 1 a 10). En el caso de (A) la intercalación restablece la parte ausente. En (B) la intercalación genera una tercera parte central de la tibia entre las dos partes centrales ya presentes. Las quetas indican la polaridad del tejido intercalado. En ambos casos la continuidad se restablece en el patrón final de los valores posicionales.

Las cucarachas pertenecen a la clases de insectos que no presentan una metamorfosis radical de la larva al adulto, sino una progresión gradual a través de una serie de formas juveniles separadas por mudas, en las cuales se elimina la capa de cutícula vieja y se genera una nueva capa mayor. La cucaracha juvenil tiene extremidades bien diferenciadas, pero sus células diferenciadas –a diferencia de las extremidades humanas– todavía son capaces de responder a las influencias que controlan el desarrollo del patrón de la extremidad y pueden regenerar dicha extremidad si ésta se ve perturbada. Así pues, los mecanismos del sistema de patrón de formación se pueden poner a prueba mediante operaciones realizadas bastante después del período de desarrollo embrionario.

Si a una cucaracha le amputamos dos patas por uno de sus segmentos medios –es decir por la tibia– pero por distintos niveles, el fragmento distal de una pata puede ser injertado en el muñón proximal del otro, de modo que la pata compuesta sane aun careciendo de la parte central de la tibia. A pesar de ello, la pata que aparece tras la muda parece normal: la parte media del patrón ha regenerado la parte que echaba en falta (Figura 21-38A). Más sorprendente es el resultado de una variante de esta operación. Se corta la tibia de una de las cucarachas cerca del extremo proximal y otra tibia de otra cucaracha cerca del extremo distal. Antes injertamos las dos partes seccionadas más pequeñas de ambas patas, pero en esta variación injertaremos el fragmento y el muñón más grandes. El resultado de este injerto será una pata excesivamente grande cuyo fragmento central es el doble de lo normal (Figura 21-38B). Dejamos que el animal efectúe la muda. La pata resultante, en lugar de tener un tamaño más o menos normal, todavía es más larga porque se ha desarrollado una tercera parte central entre las dos que ya existían. Tal como se ilustra en la Figura 21-38B, las quetas de esta nueva región apuntan en dirección contraria a las de las del resto de la tibia.

Se pueden realizar muchas operaciones de este tipo, y todas ellas apuntan hacia la existencia en la epidermis del insecto de un sistema de valores posicionales que convierten en no equivalentes a las células situadas en posiciones distintas a lo largo del eje de la extremidad, hecho que va parejo al control de la proliferación celular. Es útil describir el valor posicional mediante una escala

numérica cuyo máximo se halla en un extremo del segmento de la extremidad y el mínimo en el otro extremo. En las operaciones descritas anteriormente, se unen células con valores posicionales muy diferentes. Como resultado de ello obtendremos células nuevas producto de la proliferación celular de las células vecinas al punto de injerto. Estas células nuevas adquieren valores posicionales interpolados entre los de los dos conjuntos cuya confrontación provocamos (Figura 21-38). Este comportamiento se define como **principio de intercalación**: *la proliferación celular local está provocada por discontinuidades en los valores posicionales, y las células recién formadas adoptan valores posicionales intermedios para restablecer la continuidad del patrón.* La proliferación celular terminará sólo cuando se hayan intercalado células que hayan recuperado todos los valores posicionales perdidos inicialmente y hayan quedado situadas según el patrón de separación intercelular que les corresponde. Todo este proceso se denomina **regeneración por intercalación**.

La ley de intercalación, con el corolario de que la proliferación celular continúa hasta que se consigue un cierto espaciamiento de los valores posicionales, es un principio organizador muy potente en los sistemas en que actúa. A partir de un patrón más o menos especificado y "en miniatura" –un gradiente de morfógeno, por ejemplo– puede causar la construcción de un patrón completo y muy preciso de valores posicionales que regulará el crecimiento de todas las partes del patrón hasta que adquieran su tamaño normal: todo lo que se necesita es que el patrón inicial sea cualitativamente –es decir, topológicamente– correcto. Parece ser que el mismo principio dirige muchos procesos de organogénesis y regeneración celular en insectos y también en crustáceos y anfibios. Incluso en criaturas como los mamíferos, cuyas estructuras perdidas no acostumbran a regenerarse en el adulto, el principio de la ley de intercalación puede contribuir a la regulación del crecimiento y del patrón de formación durante el desarrollo embrionario. Desgraciadamente no se conocen los mecanismos moleculares que originan esta forma crucial de control de crecimiento.

Resumen

Las células embrionarias no sólo han de diferenciarse sino que dicha diferenciación debe mantenerse tras la desaparición de las señales que iniciaron la diversificación celular. Para que ello ocurra es necesaria la memoria celular, ya que permite que las células queden determinadas particularmente para desempeñar un papel especializado mucho antes de que se diferencien abiertamente. Los mecanismos de la memoria celular pueden ser citoplasmáticos, implicando moléculas del citoplasma que actuarán retroactivamente en su núcleo para mantener su propia síntesis; autocrinos, implicando moléculas segregadas que actúan retroactivamente en la célula; o nucleares, implicando procesos de modificación de cromatina o DNA. En algunos casos el estado de determinación se ha relacionado con la expresión de genes reguladores específicos, como los genes miogénicos para las células musculares.

Los diferentes tipos de células de un embrión se producen según un patrón regular espacial. Normalmente, el origen de la formación de este patrón son las asimetrías en el huevo y continúa mediante interacciones célula-célula en el embrión. Las señales espaciales que coordinan el patrón de formación suministran información posicional a las células, y el almacenaje de una de estas informaciones por parte de las células se denomina valor posicional. Por ejemplo, las células de un rudimento temprano de la extremidad posterior o anterior de un embrión de vertebrado adquieren valores posicionales diferentes, convirtiendo a las células de las extremidades anterior y posterior no equivalentes en su carácter intrínseco, mucho antes de que el patrón de diferenciación celular se haya determinado.

En muchos animales el patrón de valores posicionales se acopla estrechamente al control de proliferación celular según un principio de intercalación muy simple. Según este principio, la discontinuidad de valores posicionales provoca una proliferación celular local, y las células recién formadas adoptan valores posicionales

intermedios para restablecer la continuidad del patrón. Es muy probable que este mecanismo actúe en el desarrollo embrionario típico corrigiendo inadecuaciones en la especificación inicial de información posicional.

El gusano nemátodo: los genes controladores del desarrollo y las leyes del comportamiento celular[32]

En el caso de las células, como en el de los ordenadores, la memoria hace que complejos programas de comportamiento celular sean posibles; muchas células a la vez, todas ellas avanzando gracias a su complejo programa de desarrollo, pueden generar un cuerpo adulto muy complejo. Algunos de los pasos que la célula da en el transcurso de su desarrollo son autónomos, mientras que otros se ven afectados por señales de otras células. Así pues, las células del embrión pueden compararse a un conjunto de pequeños ordenadores, o *autómatas*, actuando en paralelo e intercambiando información unos con otros. Las leyes que determinan el comportamiento celular están codificadas en los genes celulares. Cada célula contiene el mismo genoma y, por lo tanto, su comportamiento sigue las mismas reglas, pero existe una gran variedad de estados celulares; las leyes dirigen el desarrollo a lo largo de vías alternativas según una combinación de la información que la célula ha conseguido retener en su memoria y las señales del entorno que recibe. Los modelos por ordenador muestran que incluso un programa muy sencillo puede conducir a los individuos autómatas (células) de un sistema como éste a producir patrones sorprendentemente complejos; la simple observación del desarrollo normal del patrón no basta para deducir las leyes que rigen el programa. El reto, por lo tanto, consiste en descifrar experimentalmente las leyes subyacentes al desarrollo celular y esclarecer cómo los genes especifican estas leyes.

El gusano nemátodo *Caenorhabditis elegans* ofrece condiciones excepcionales para este estudio, y se ha convertido en uno de los principales modelos de la genética del desarrollo. Aquí, lo utilizamos para ilustrar varios principios generales, pero reservamos el estudio más detallado de la genética del desarrollo del patrón de formación para el próximo apartado, sobre *Drosophila*, de la cual se ha conseguido una visión más completa gracias a más años de investigación y muchos más medios.

Caenorhabditis elegans es anatómica y genéticamente sencillo[33]

Como animal adulto, *C. elegans* tiene una longitud aproximada de 1 mm y sólo consta de alrededor de 1000 células somáticas y de entre 1000 y 2000 células germinales (exactamente 959 núcleos de células somáticas más aproximadamente 2000 células germinales en un sexo; y exactamente 1031 núcleos de células somáticas más aproximadamente 1000 células germinales en el otro sexo) (Figura 21-39). Se ha reconstruido, célula a célula, la anatomía del nemátodo, mediante

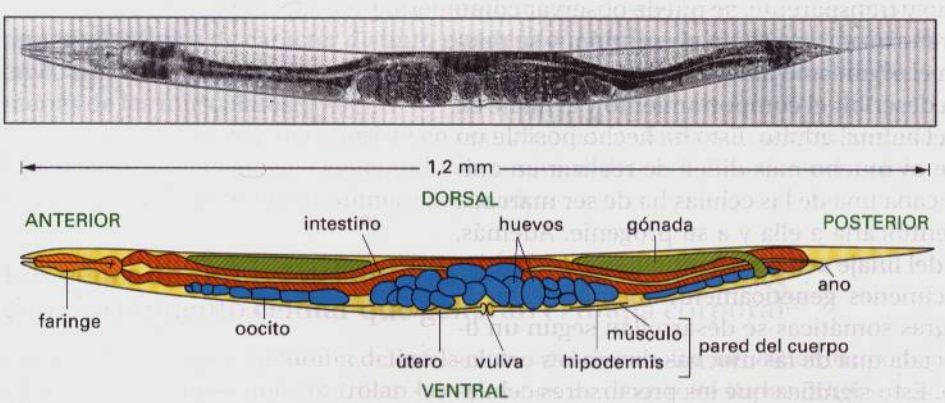


Figura 21-39 ***Caenorhabditis elegans.*** Visión lateral de un ejemplar hermafrodita adulto. Nótese que el tejido llamado hipodermis del nemátodo corresponde a la epidermis de otros animales. (De J.E. Sulston y H.R. Horvitz, *Dev. Biol.* 56:110-156, 1977.)

el estudio al microscopio electrónico de secciones seriadas. El mapa corporal de este nemátodo sencillo es básicamente el mismo que el de la mayoría de los animales superiores dado que consta de un cuerpo alargado con una simetría bilateral rudimentaria, compuesto por los mismos tejidos básicos (nervio, músculo, intestino y piel) organizados según el mismo patrón básico (boca y encéfalo en el extremo anterior, y ano en el posterior). La pared externa del cuerpo está compuesta de dos capas: la epidermis protectora, o "piel", y la capa muscular subyacente. Un sencillo tubo de células endodérmicas forma el intestino. Un segundo tubo, situado entre el intestino y la pared del cuerpo, constituye la gónada; la composición de su pared es a base de células somáticas, con las células germinales en el interior de la misma. *C. elegans* tiene dos sexos –uno hermafrodita y otro masculino. El hermafrodita podría describirse como una hembra que produce un número reducido de espermatozoides: puede reproducirse tanto por autofecundación, sirviéndose de sus propios espermatozoides, como por fecundación cruzada tras la transferencia de espermatozoides de un macho a través de la cópula. La autofecundación tiende a producir una progenie homozigótica, que facilita la utilización de *C. elegans* como un organismo excepcionalmente adecuado para los estudios genéticos.

La relativa sencillez de la anatomía de *C. elegans* queda reflejada de la misma manera en la sencillez de su genoma. Se calcula que el animal tiene en sus pares homólogos de cromosomas un total de 3000 genes "esenciales", (es decir, genes en los que las mutaciones son letales o de consecuencias fácilmente detectables en el fenotipo) y cuatro o cinco veces este mismo número de genes no esenciales. El genoma haploide consta de aproximadamente 10^8 pares de nucleótidos de DNA, lo que representa cerca de 20 veces más que *E. coli*, aproximadamente igual que *Drosophila*, y 30 veces menos que los seres humanos. Actualmente, mediante mutaciones se han identificado más de 900 genes esenciales. Entre ellos existen genes que influyen en características visibles como el tamaño y el comportamiento del gusano, genes que codifican proteínas conocidas como la miosina y genes que controlan el curso del desarrollo. Se han realizado mapas de casi todo el genoma mostrándolo cómo una gran serie de segmentos solapados de DNA, representados por una biblioteca de clones genómicos ordenados (véase pág. 339), y se han iniciado esfuerzos sistemáticos para determinar la secuencia completa de DNA del organismo.

El desarrollo del nemátodo es prácticamente invariable[34]

C. elegans comienza a vivir como una sola célula. El huevo fecundado da lugar, por medio de divisiones celulares repetidas, a 558 células que forman un pequeño gusano en el interior de la cáscara del huevo. Una vez fuera del huevo, se producen más divisiones que provocarán el crecimiento y la maduración sexual del gusano a medida que pasa por los cuatro estadios larvarios sucesivos separados por las correspondientes mudas. Tras la última muda se alcanza el estado adulto, y el gusano hermafrodita inicia la producción de sus propios huevos. Todo el proceso de desarrollo, de huevo a huevo, dura solamente tres días.

Puesto que el *C. elegans* es pequeño y transparente, se puede observar cómo sus células se dividen, migran, se diferencian y mueren en el embrión, y se puede seguir el linaje desde el huevo hasta el organismo adulto. Esta sencilla técnica de observación directa ha servido para describir el comportamiento y el linaje de todas las células desde el huevo hasta el animal adulto. Esto ha hecho posible un **análisis de linaje** pormenorizado, que es mucho más difícil de realizar en animales de mayor tamaño, en los cuales cada una de las células ha de ser marcada en estadios tempranos para poder identificarla a ella y a su progenie. Además, en animales mayores los pormenores del linaje celular presentan muchas variaciones aleatorias, incluso entre especímenes genéticamente idénticos. Por el contrario, en el nemátodo las estructuras somáticas se desarrollan según un linaje celular invariable y predecible, y cada una de las muchas divisiones celulares se produce en el momento preciso. Esto significa que los precursores celula-

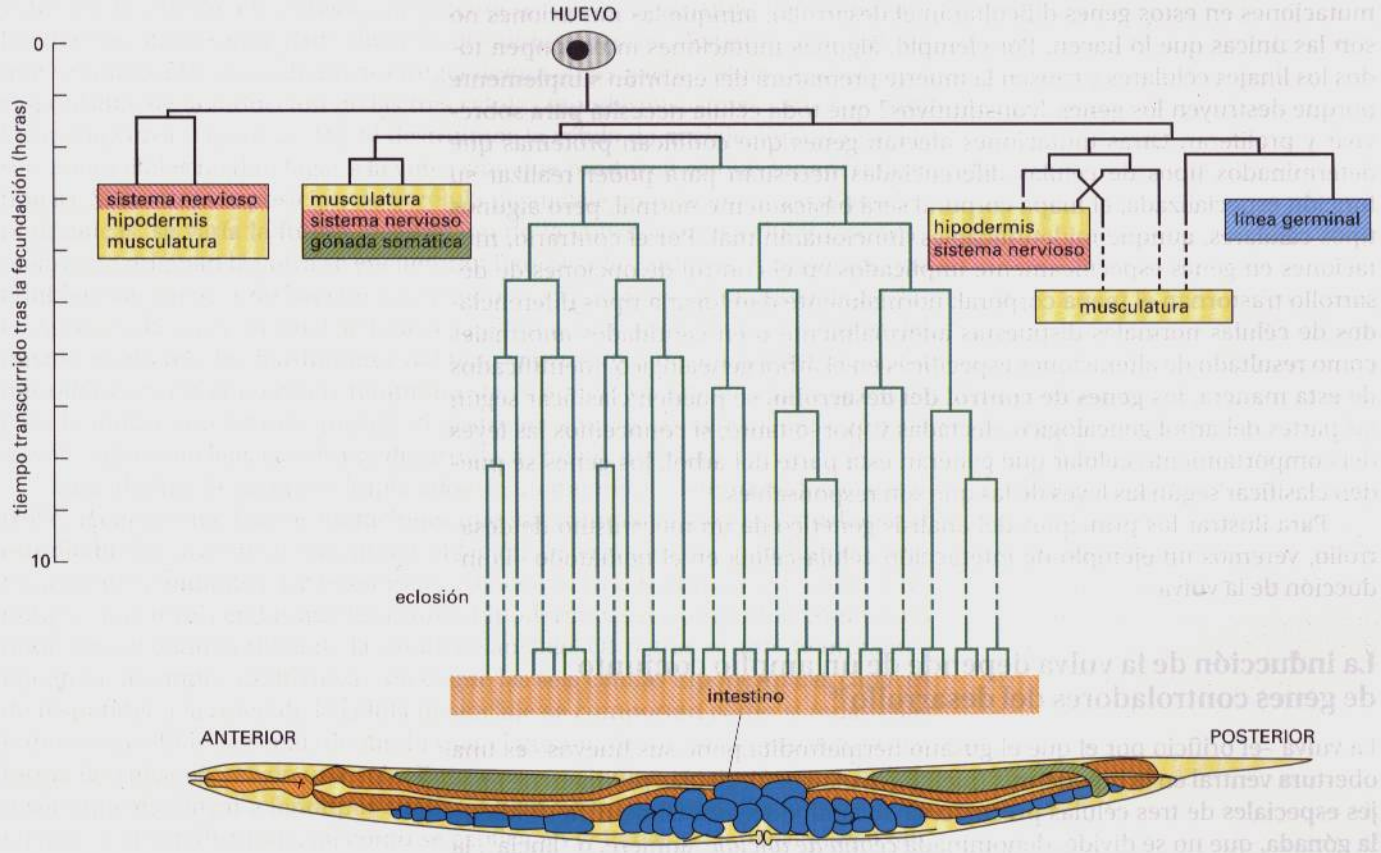


Figura 21-40 Árbol genealógico de las células que forman el intestino de *C. elegans*. El huevo (*arriba*) se ha dibujado a la misma escala que el adulto (*abajo*). Obsérvese que mientras que las células intestinales se forman a partir de un único clon (como hacen las células germinales), las células de la mayoría de los demás tejidos no lo hacen.

res siguen el mismo patrón de divisiones celulares en cada individuo, y salvo contadas excepciones, se puede predecir el futuro de cada célula hija a partir de su posición en el árbol genealógico (Figura 21-40).

La descripción completa del linaje celular del *C. elegans* nos proporciona una respuesta inmediata a una pregunta fundamental. El nemátodo, igual que muchos animales, se forma a partir de un número relativamente elevado de células que se pueden clasificar en un número mucho menor de tipos celulares diferenciados. Dada la importancia de los antecedentes celulares, cabe la tentación de suponer que todas las células de un mismo tipo celular son descendientes de una única "célula fundadora" que ha seguido una sola vía de desarrollo. Sin embargo, el análisis del linaje demuestra que generalmente esto no es cierto, ni para nemátodos ni para otros animales. Así, en *C. elegans* (salvo pocas excepciones como las células intestinales y las células de la línea germinal) cada clase de células diferenciadas –hipodérmicas, neuronas, musculares, de la gónada– derivan de varias células fundadoras que se originan en ramas separadas del árbol genealógico (véase Figura 21-40). De este modo, células de carácter parecido no tienen por qué ser parientes cercanos. Por el contrario (aunque raramente), células de carácter distinto pueden tener un parentesco muy próximo en cuanto a linaje; por ejemplo, algunas de las neuronas de *C. elegans* son hermanas de las musculares.

Entonces, el problema consiste en comprender las leyes que actúan en cada rama del árbol genealógico generando un conjunto determinado de tipos celulares, cada uno de ellos en un número adecuado.

Los genes de control del desarrollo definen las leyes del comportamiento celular que generan el mapa corporal[35]

Para explicar cómo el genoma define las leyes del desarrollo, necesitamos poder identificar los genes que controlan las opciones de desarrollo de las células. Las

mutaciones en estos genes dificultarán el desarrollo, aunque las mutaciones no son las únicas que lo hacen. Por ejemplo, algunas mutaciones interrumpen todos los linajes celulares y causan la muerte prematura del embrión simplemente porque destruyen los genes "constitutivos" que toda célula necesita para sobrevivir y proliferar. Otras mutaciones afectan genes que codifican proteínas que determinados tipos de células diferenciadas necesitan para poder realizar su función especializada; el mapa corporal será básicamente normal, pero algunos tipos celulares, aunque inidentificables, funcionarán mal. Por el contrario, mutaciones en genes específicamente implicados en el control de opciones de desarrollo trastornan el mapa corporal: normalmente dan lugar a tipos diferenciados de células normales dispuestas anormalmente o en cantidades anormales como resultado de alteraciones específicas en el árbol genealógico. Identificados de esta manera, los **genes de control del desarrollo**, se pueden clasificar según las partes del árbol genealógico afectadas y, por lo tanto, si conocemos las leyes del comportamiento celular que generan esta parte del árbol, los genes se pueden clasificar según las leyes de las que son responsables.

Para ilustrar los principios del análisis genético de un mecanismo de desarrollo, veremos un ejemplo de interacción célula-célula en el nemátodo –la inducción de la vulva.

La inducción de la vulva depende de un amplio conjunto de genes controladores del desarrollo[36]

La vulva –el orificio por el que el gusano hermafrodita pone sus huevos– es una obertura ventral en la hipodermis (piel) formada por 22 células producto de linajes especiales de tres células precursoras de la hipodermis. Una única célula de la gónada, que no se divide, denominada *célula de anclaje*, adhiere, o "ancla", la

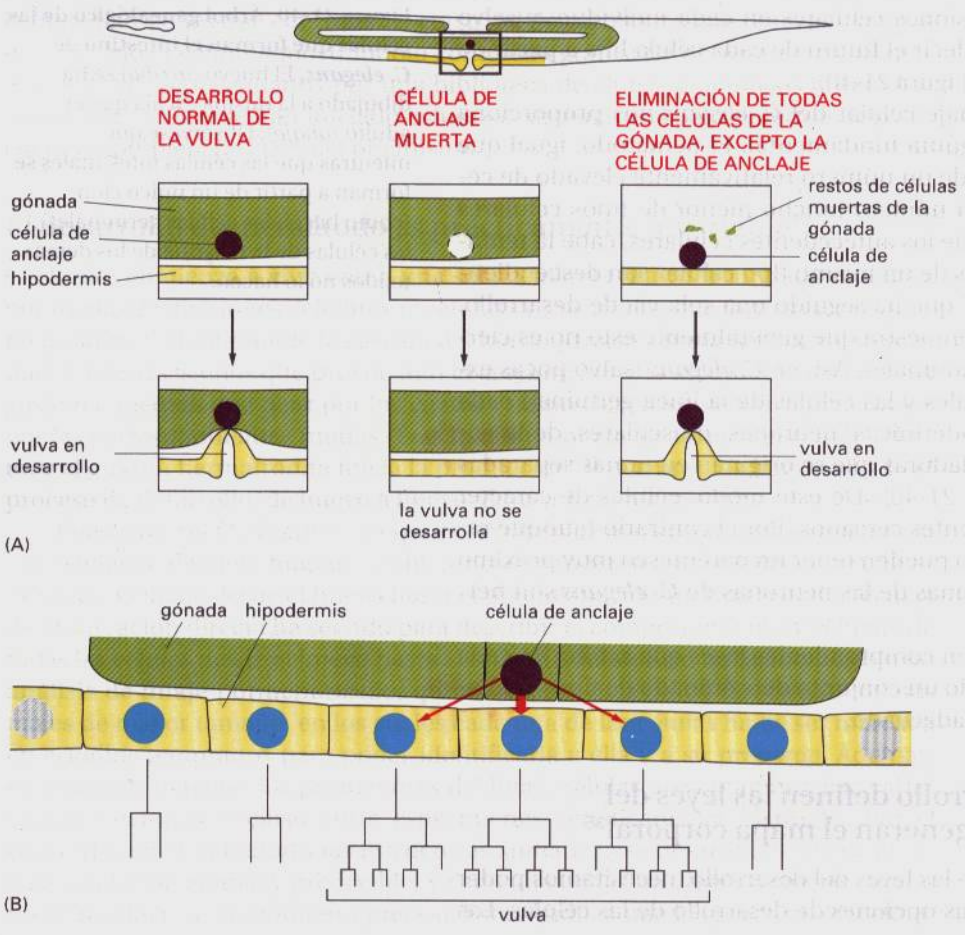


Figura 21-41 Inducción de la vulva. (A) Experimentos que demuestran que para que se desarrolle la vulva es necesaria una influencia inductiva procedente de la célula de anclaje. (B) Visión amplificada de las células de la hipodermis ventral adyacente a la gónada, en los alrededores de la célula de anclaje, con un esbozo de los diagramas del árbol genealógico típico de su progenie en la parte inferior. Las seis células (y ninguna otra) son capaces de responder a la influencia inductora de la vulva, pero normalmente sólo tres de estas células están expuestas a ella.

vulva en desarrollo a la gónada subyacente (el útero) originando un pasaje que los huevos atravesarán para alcanzar el mundo exterior. Experimentos en los que se utilizan técnicas de microcirugía demuestran que la célula de anclaje es responsable de la inducción de las tres células hipodérmicas más cercanas para formar la vulva (Figura 21-41). Si destruimos la célula de anclaje con un rayo láser, estas células no dan lugar a la vulva sino que producen células hipodérmicas típicas. Si se altera la posición de la célula de anclaje en relación a las células hipodérmicas, se varía la futura localización de la vulva: las tres células que normalmente originan la vulva se encuentran flanqueadas por otras tres células que también son capaces de hacerlo si se exponen a las señales de la célula de anclaje. Así pues, la célula de anclaje induce la diferenciación celular en *C. elegans* del mismo modo que los blastómeros del polo vegetativo inducen la diferenciación mesodérmica en el embrión temprano de *Xenopus*. La única célula necesaria para la inducción es la de anclaje: si destruimos todas las células de la gónada salvo la célula anclaje, la vulva se desarrollará con normalidad.

Para identificar los genes implicados en un momento determinado del desarrollo, tenemos que buscar mutaciones que interrumpan el proceso, mediante el estudio de la progenie de una gran población de animales que han sido expuestos a agentes mutantes. De este modo se encuentran mutantes que tienen un fenotipo "sin vulva", en los que las células hipodérmicas se comportan como si no hubieran recibido la señal de la célula de anclaje. Otro gran grupo de mutantes tienen un fenotipo "multivulva", en el que las seis células hipodérmicas capaces de responder a la señal de la célula de anclaje se comportan como si todas ellas hubieran recibido la señal, de modo que el gusano forma varias estructuras en forma de vulva en vez de una sola. Entonces se estudian las mutaciones individuales que dan lugar a fenotipos similares para ver si los genes afectados son los mismos o si son distintos, tal como se explica en el Panel 21-1, págs. 1148-1149. Una vez se ha identificado de esta forma, un conjunto relevante de genes, por regla general todavía podremos descubrir más componentes del sistema buscando mutaciones en otros genes que supriman los efectos nocivos de mutaciones en algún gen ya identificado. Dichas *mutaciones supresoras extragénicas* pueden ser raras y sólo son favorables a nivel genético en organismos como *C. elegans* en los que son fáciles de encontrar; si se encuentran, sin embargo, a menudo identifican genes cuyo productos proteicos interactúan directamente con los productos del gen identificado previamente (por ejemplo, se puede compensar la modificación de la forma de una molécula proteica mediante una modificación complementaria de la forma de su proteína compañera). Se han identificado más de 30 genes implicados en el control del desarrollo de la vulva.

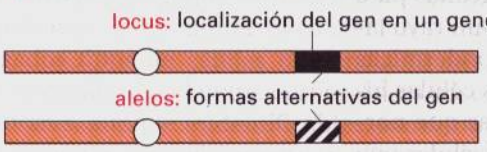
Pruebas genéticas microquirúrgicas revelan la lógica del control del desarrollo; el clonaje y la secuenciación de genes nos ayudan a descubrir su bioquímica[37]

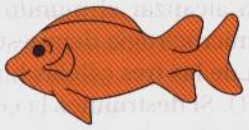
Nuestro estudio se centrará ahora en tan sólo cinco de los genes controladores de la vulva, llamados *lin-3, let-23, sem-5, let-60* y *lin-45*. El deterioro de la función de cualquiera de ellos a causa de mutaciones conlleva la misma consecuencia –un fenotipo sin vulva. Por el contrario, un cambio genético que provoque un exceso de cualquiera de estos productos génicos o una actividad excesiva o no regulada –en otras palabras, un incremento de funciones– puede producir lo contrario: un efecto multivulva. Por lo tanto, los cinco genes son imprescindibles para que se produzca la inducción de la vulva, lo cual sugiere que fácilmente todos ellos podrían ser eslabones de una misma cadena de causas y efectos; es decir, que los cinco genes podrían pertenecer a una única *secuencia génica*. Ya se vio en el Capítulo 15 cómo se definía mediante análisis genético el proceso de señalización que controla la especialización de un tipo celular particular del ojo de *Drosophila*. Para determinar el orden en que actúan los genes controladores de la vulva, se ha utilizado un tipo de análisis parecido, como se explica en la Figura 21-42. De hecho, parece que los cinco genes están situados en una única

GENES Y FENOTIPOS

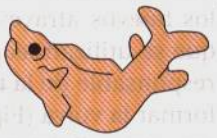
Gen: unidad funcional de herencia, normalmente corresponde al segmento de DNA que codifica una sola proteína.

Genoma: conjunto de genes de un organismo.





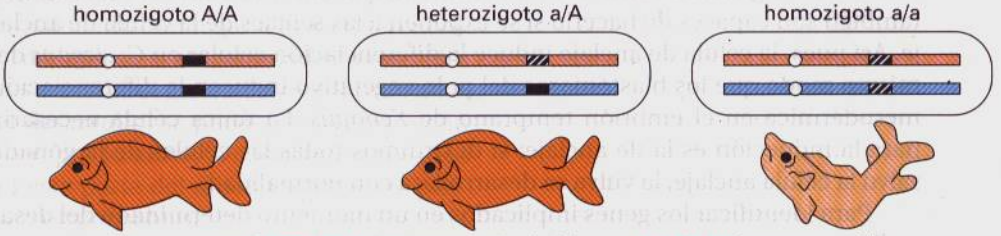
Tipo salvaje: el tipo más habitual



Mutante: se diferencia del tipo salvaje en un cambio genético (una mutación)

GENOTIPO: conjunto específico de alelos que forman el genoma de un individuo

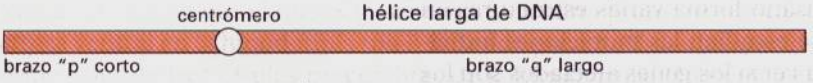
FENOTIPO: caracteres visibles de un individuo



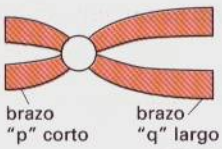
el alelo A es dominante (respecto a a); el alelo a es recesivo (respecto a A)

En el ejemplo ilustrado (parte superior), el fenotipo de un heterozigoto es el mismo que el de uno de los homozigotos; en los casos en que es diferente de los dos, se dice que los dos alelos son co-dominantes.

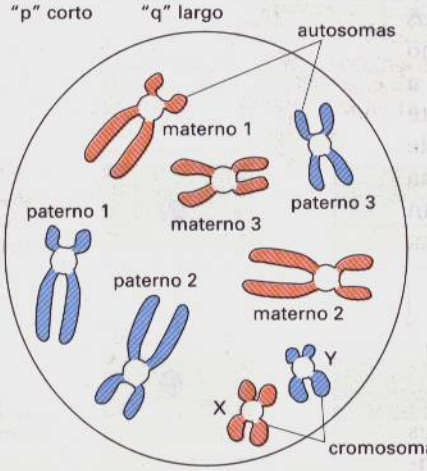
CROMOSOMAS



un cromosoma en el inicio del ciclo celular, en la fase G_1; la barra representa una doble hélice larga de DNA

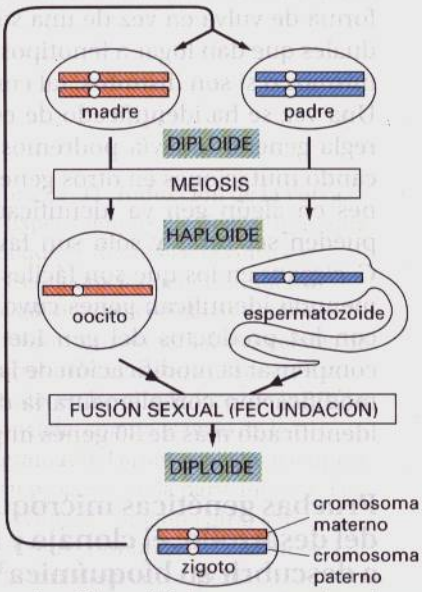


un cromosoma al final del ciclo celular, en metafase, formado por dos cromátidas hermanas idénticas (cada una de las cuales contiene una doble hélice de DNA) unidas al centrómero.



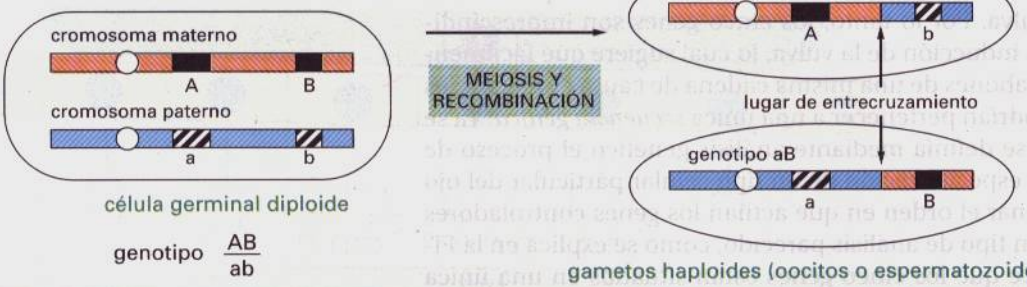
Un conjunto típico de cromosomas diploides, tal como se ve en una aposición en metafase preparada rompiendo la célula en metafase y tiñendo los cromosomas dispersos. En el ejemplo ilustrado esquemáticamente, aparecen tres pares de autosomas (cromosomas heredados simétricamente de ambos progenitores, excepto los asexuales) y dos cromosomas sexuales —uno X de la madre y otro Y del padre. La cantidad y los tipos de cromosomas sexuales varían de unos organismos a otros, al igual que la cantidad de pares de autosomas.

EL CICLO HAPLOIDE-DIPLOIDE DE REPRODUCCIÓN SEXUAL



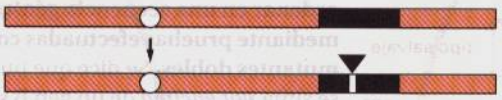
Para simplificar, el ciclo se representa solamente para un cromosoma/par de cromosomas.

MEIOSIS Y RECOMBINACIÓN GÉNICA



Cuanto mayor sea la distancia entre los dos loci, mayor será la posibilidad de recombinación por entrecruzamiento en un punto entre ambos loci. Si se recombinan una proporción x% de gametos, estarán separados por una distancia en el mapa genético de x unidades de mapa (o x centimorgans).

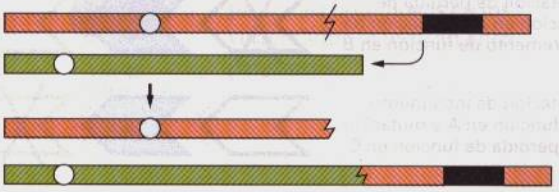
TIPOS DE MUTACIONES



mutación puntual: cambio de un único lugar del genoma correspondiente a un par de nucleótidos o una parte muy pequeña de un gen

inversión: invierte un segmento de un cromosoma

deleción: suprime un segmento de un cromosoma



translocación: secciona un segmento de un cromosoma y lo une a otro cromosoma

mutación letal: provoca la muerte prematura de un organismo en desarrollo.
mutación condicional: produce un efecto fenotípico sólo bajo ciertas condiciones, denominadas condiciones *restrictivas*; en otras condiciones —las condiciones *permisivas*— este efecto no se observa. Para una mutación *sensible a la temperatura*, la condición restrictiva más común es la temperatura alta mientras que la condición permisiva es la temperatura baja.
mutación de pérdida de función: reduce o elimina la actividad del gen. Son las mutaciones más típicas. Normalmente las mutaciones de pérdida de función son *recesivas* —generalmente los organismos pueden funcionar con normalidad mientras retengan al menos una copia normal del gen afectado.
mutación nula: elimina por completo la actividad del gen.

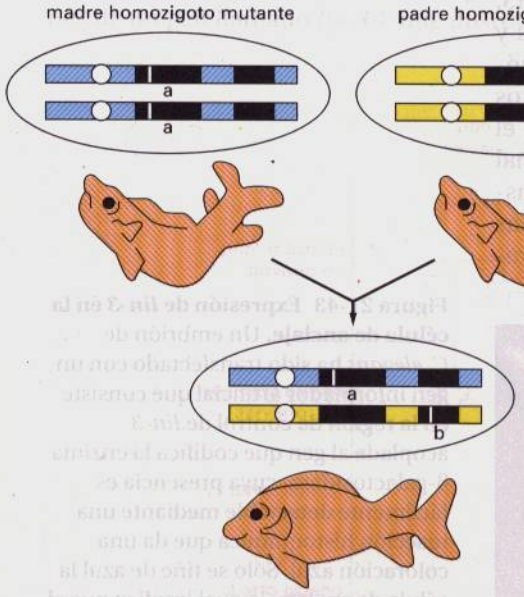
mutación de incremento de función: aumento de la actividad del gen o expresión del gen en condiciones inadecuadas; normalmente estas mutaciones reciben el nombre de *dominantes*.
mutación dominante negativa: mutación activa dominante que bloquea la actividad génica, provocando un fenotipo de pérdida de función incluso en presencia de una copia normal del gen. El fenómeno ocurre cuando el producto del gen mutante interfiere con el producto del gen normal.
mutación supresora: elimina el efecto fenotípico de otra mutación, y el individuo con ambas mutaciones parece normal. El gen afectado por la primera mutación presenta en su interior una mutación supresora *intragénica*; un segundo gen presenta una mutación supresora *extragénica*; a menudo el producto de este segundo gen interactúa directamente con el producto del primer gen.

¿DOS GENES O UNO SOLO?

Si dos mutaciones determinadas producen el mismo fenotipo, ¿cómo podemos discernir si son mutaciones del mismo gen? Si las mutaciones son recesivas (y la mayoría lo son), podremos encontrar la respuesta merced a una prueba de complementación.

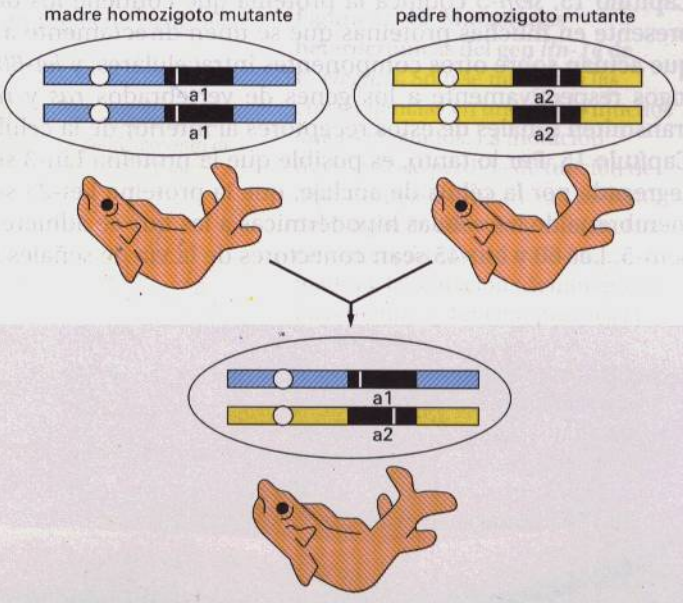
En el tipo más simple de prueba de complementación, un individuo homozigoto para una mutación se cruza con un individuo que es homozigoto para la otra mutación. El fenotipo de su descendiente responde la pregunta.

COMPLEMENTACIÓN: MUTACIONES EN DOS GENES DISTINTOS



el descendiente híbrido presenta un fenotipo normal: contiene una copia normal de cada gen

NO COMPLEMENTACIÓN: DOS MUTACIONES INDEPENDIENTES EN EL MISMO GEN



el descendiente híbrido presenta un fenotipo mutante: no presenta copias normales del gen mutado

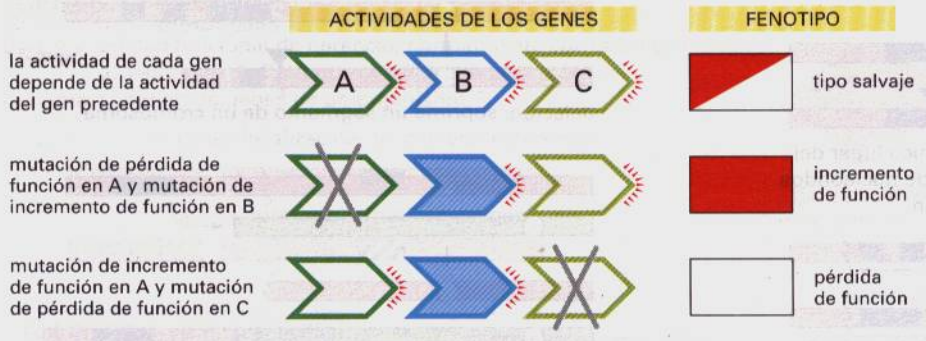


Figura 21-42 Los genes se pueden ordenar en una secuencia génica mediante pruebas efectuadas con mutantes dobles. Se dice que un gen A se sitúa *por encima* de un gen B si su producto normalmente regula la actividad de B (o el producto de B) y *por debajo* si la regulación es al revés. Si al gen superior le basta con regular la actividad del gen inferior para afectar el fenotipo del gen inferior, diremos que ambos genes están ligados en una misma *secuencia génica*. En este caso, mutaciones de cualquier gen tendrán consecuencias similares en los fenotipos. Para descubrir el orden de los genes en una secuencia, utilizamos mutantes dobles para determinar cuál de los dos genes determina de forma más directa al fenotipo. El estudio dependerá de que encontremos mutaciones específicas de A y de B que tengan consecuencias opuesta sobre el fenotipo cuando se presentan por separado. En el ejemplo ilustrado se combina una mutación (dominante) de incremento de función en el gen B, que lo activa independientemente de toda regulación procedente de los genes superiores, con una mutación (recesiva) de pérdida de función en A o C: la doble mutante (A,B) tiene un fenotipo de incremento de función, que implica que A se sitúa antes de B, mientras que la mutante (B,C) tiene un fenotipo de pérdida de función, que implica que C se sitúa detrás de B.

secuencia genética: *lin-3* ocupando la primera posición, seguido de *let-23*, y en este orden *sem-5*, *let-60* y finalmente *lin-45*. Así pues, por ejemplo una mutación de incremento de función de *lin-3* no tiene ningún efecto sobre el fenotipo de un animal que también contenga una mutación que conlleve la pérdida de función de *let-23*; la doble mutante carece de vulva debido a que el componente que abre la secuencia no puede hacer nada si el componente siguiente sobre el que debería actuar ha desaparecido.

El problema siguiente consiste en relacionar las actuaciones de los genes con células determinadas del embrión. Por ejemplo, ¿es necesario *lin-3* en las células de anclaje que producen la señal de inducción o en las células hipodérmicas que responden a ella? La genética molecular nos proporciona una fácil respuesta para el caso de *lin-3*: el gen se ha clonado y se ha demostrado su expresión en la célula de anclaje y en ninguna otra parte de la zona circundante (Figura 21-43). Parece que los otros cuatro genes, por el contrario, actúan de un modo distinto en las células hipodérmicas, y una mutación de incremento de función en uno de ellos puede causar un fenotipo multivulva incluso si se ha destruido la célula de anclaje.

Para completar el panorama vamos a relatar el camino definido genéticamente para moléculas proteicas y su bioquímica. Se han clonado y secuenciado los cinco genes *lin-3*, *let-23*, *sem-5*, *let-60* y *lin-45*, y en cada caso la secuencia indica una posible función: *lin-3* codifica una proteína similar a una molécula señal segregada muy conocida en los vertebrados –el factor de crecimiento epidérmico (EGF); *let-23* codifica un receptor de tirosina quinasa homóloga a los miembros de la familia de receptores de EGF de vertebrados; como vimos en el Capítulo 15, *sem-5* codifica la proteína que contiene los dominios SH2 y SH3, presente en muchas proteínas que se unen directamente a dichos receptores y que actúan sobre otros componentes intracelulares; y *let-60* y *lin-45* son homólogos respectivamente a los genes de vertebrados *ras* y *raf*, cuyos productos transmiten señales de estos receptores al interior de la célula, como se vio en el Capítulo 15. Por lo tanto, es posible que la proteína Lin-3 sea la molécula señal segregada por la célula de anclaje, que la proteína Let-23 sea el receptor transmembrana de las células hipodérmicas a las que se adhiere, y que las proteínas Sem-5, Let-60 y Lin-45 sean conectores de la vía de señales intracelulares, a tra-

Figura 21-43 Expresión de *lin-3* en la célula de anclaje. Un embrión de *C. elegans* ha sido transfectado con un gen informador artificial que consiste en la región de control de *lin-3* acoplada al gen que codifica la enzima β-galactosidasa, cuya presencia es fácilmente detectable mediante una reacción histoquímica que da una coloración azul. Sólo se tiñe de azul la célula de anclaje, lo cual implica que el gen *lin-3* sólo se activa en la célula de anclaje. (Cortesía de Russell Hill.)

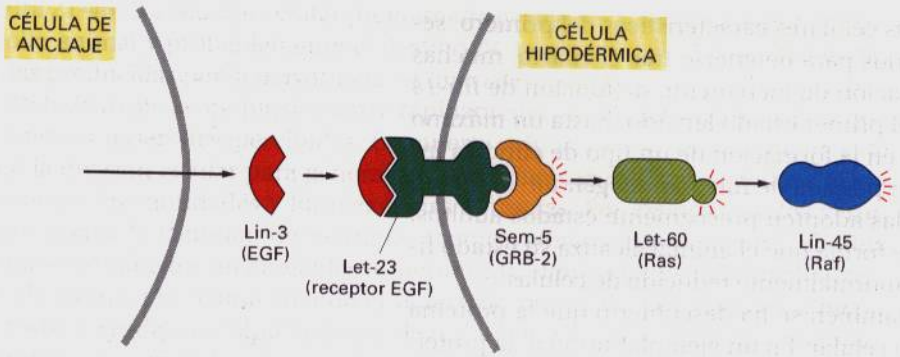


Figura 21-44 Camino que sigue la inducción de la vulva en *C. elegans*. Los diagramas muestran las funciones de los productos génicos que se han identificado. Los nombres de las proteínas homólogas en los vertebrados se indican entre paréntesis.

vés de la cual la unión del ligando con el receptor ejerce sus efectos finales sobre la expresión génica y la determinación celular (Figura 21-44). De hecho, el análisis genético de este sistema del gusano nemátodo en desarrollo proporciona una de las visones más claras que tenemos sobre la organización de la vía de señales que parece que se ha conservado en la mayoría del reino animal. Como vimos en el Capítulo 15, un camino muy similar a éste aparece del análisis de *sevenless* mutantes de *Drosophila* (véase pág. 817).

Mutaciones heterocrónicas identifican los genes que especifican cambios en las leyes del comportamiento celular a medida que transcurre el tiempo[38]

Tal como saben los programadores de ordenadores, pequeños cambios en el programa pueden tener consecuencias drásticas en el resultado que se obtiene al ejecutar dicho programa. De forma parecida, una mutación sobre un gen de control que altere una sola ley del comportamiento celular puede provocar un árbol genealógico totalmente anormal. Las *mutaciones heterocrónicas* en *C. elegans* constituyen un buen ejemplo de este fenómeno, ya que provocan un comportamiento en ciertos conjuntos de células que sería normal en otros estadios del desarrollo. Por ejemplo, una célula hija puede comportarse igual que una célula madre o abuela mientras que la célula descendiente de la hija puede comportarse de nuevo de la misma manera, etc., lo cual hace que una parte del patrón genealógico se repita indefinidamente.

La Figura 21-45 muestra los diagramas de linaje para una serie de mutaciones de un gen llamado *lin-14*, que ilustran este fenómeno: en lugar de progresar

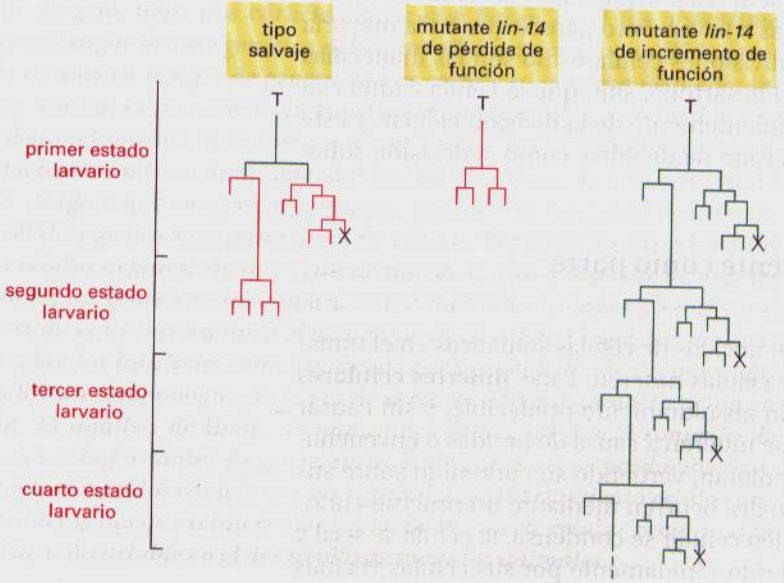


Figura 21-45 Mutaciones heterocrónicas del gen *lin-14* de *C. elegans*. Sólo se muestran las consecuencias en uno de los muchos linajes afectados. La mutación (recesiva) de pérdida de función de *lin-14* provoca la aparición prematura del patrón de división y diferenciación celular característico de la larva madura; la mutación (dominante) de incremento de función provoca el efecto contrario. La X indica una muerte celular programada. Las líneas *verdes* representan las células que contienen proteína Lin-14, las líneas *rojas* las que no. En un desarrollo típico el inicio de la nutrición larvaria marca el inicio de la desaparición de Lin-14. (Según V. Ambros y H.R. Horvitz, *Science* 226:409-416, 1984. © the AAAS; y P. Arasu, B. Wightman y G. Ruvkun, *Growth Dev. Aging.* 5:1825-1833, 1991.)

mediante series normales de divisiones celulares características del primero, segundo, tercero y cuarto estados larvarios para detenerse tras el cuarto, muchas de las células que presentan una mutación de incremento de función de *lin-14* repiten los patrones característicos del primer estado larvario, hasta un máximo de cinco ciclos –o mudas– y persisten en la formación de un tipo de cutícula inmadura. Las mutaciones que implican pérdida de función del gen *lin-14* tienen un efecto inverso: hacen que las células adopten precozmente estados adultos, saltándose los estados intermedios, de forma que el animal alcanza su estado final prematuramente con un número anormalmente reducido de células.

El gen *lin-14* ha sido clonado, y también se ha descubierto que la proteína que codifica se concentra en el núcleo celular. En un ejemplar normal, la proteína está presente en la mayoría de las células somáticas del embrión tardío y en el primer estadio larval temprano, pero en el segundo estadio larval su concentración disminuye hasta casi cero. Las mutantes *lin-14* que entran precozmente en el estado adulto presentan un nivel de proteína Lin-14 reducido, mientras que las mutantes que continúan repitiendo los primeros ciclos del primer estadio larvario presentan una expresión de la proteína Lin-14 durante un período extraordinariamente largo (debido a una mutación en la porción reguladora del gen). Así el efecto de la proteína Lin-14 consiste en mantener las células en un estado inmaduro, y su maduración normal depende de su desaparición. Podemos suponer que este producto génico es solamente uno de los muchos cuyas concentraciones en las células provocan cambios en las reglas del comportamiento celular a lo largo del desarrollo.

El "tempo" del desarrollo no está controlado mediante el ciclo de división celular[39]

El ejemplo que acabamos de ver nos conduce a un problema fundamental del desarrollo. El genoma tiene que definir un conjunto de reglas que dirijan tanto la división como la especialización de la célula, y ambos procesos han de estar coordinados. ¿Cómo se coordina la división celular durante el desarrollo, y cómo se coordina a su vez con la especialización celular?

Una sugerencia es que existan cambios de su estado interno que esperen el paso de la célula a través del ciclo de división: por decirlo de algún modo, la célula pasaría a la fase siguiente como lo hizo a través de la mitosis. Esta idea parece tentadora, especialmente cuando se describe el desarrollo en términos de diagramas de linaje, pero las pruebas van en contra de esta hipótesis. A menudo las células de embriones en desarrollo continúan diferenciándose de forma casi normal incluso cuando se impide artificialmente la división celular. Obviamente, tiene que haber anomalías, aunque sólo sea porque una sola célula no dividida no pueda diferenciarse de dos formas a la vez. Pero parece que en la mayoría de los casos que hemos estudiado las divisiones celulares no son las manecillas del reloj que establecen el "tempo" del desarrollo, sino que la célula cambia su estado químico con el tiempo independientemente de la división celular, y este estado cambiante controla tanto la decisión de dividirse como la decisión sobre cómo y cuándo especializarse.

Las células mueren ordenadamente como parte del programa de desarrollo[40]

Un *C. elegans* hermafrodita genera 1030 núcleos de células somáticas en el transcurso de su desarrollo, pero 131 de las células mueren. Estas **muertes celulares programadas** ocurren según un patrón absolutamente predecible, y sin causar problemas. Mientras que las células que mueren a causa de heridas o envenenamientos normalmente se hinchan y explotan, vertiendo su contenido sobre sus vecinas, estas muertes de células normales ocurren mediante un proceso conocido como **apoptosis**, en el que el núcleo celular se condensa, la célula se seca y el cuerpo marchito es engullido y digerido rápidamente por sus células vecinas

(Figura 21-46). La muerte celular programada es una característica típica del desarrollo animal y probablemente el destino de un porcentaje substancial de las células producidas por la mayoría de los animales.

Debido a que la apoptosis ocurre rápidamente y sin dejar rastro, es fácil que las muertes pasen desapercibidas. La muerte celular puede ser tan importante como la división celular para generar un individuo con los tipos celulares necesarios y en las cantidades y localizaciones correctas. Por ejemplo, en los vertebrados regula la cantidad de neuronas (como veremos más adelante), elimina los tipos de linfocitos no deseables (Capítulo 23), elimina las células que han terminado su función (como cuando el renacuajo pierde su cola durante la metamorfosis) y ayuda a esculpir la forma de los órganos en desarrollo (por ejemplo, creando vacíos entre los dígitos eliminando las células situadas entre los rudimentos de los dígitos de la yema de la extremidad).

Se cree que la muerte de las células normales son suicidios en los que la célula activa un programa de defunción y se autoinmola. La mayor evidencia de que las células animales tienen un programa intrínseco de muerte procede de estudios genéticos sobre *C. elegans*, en el que dos genes, denominados *ced-3* y *ced-4* (*ced*, de cell death abnormal, muerte celular anormal), que han verificado la necesidad de que ocurran 131 muertes de células normales. Si uno de estos genes es inactivado mediante una mutación, las células cuyo destino inicial era la muerte sobrevivirán, diferenciándose en tipos celulares fácilmente reconocibles como las neuronas. Por el contrario, la sobreexpresión o la expresión desplazada de *ced-3* y *ced-4* (como resultado de mutaciones de pérdida de función que inactivan otro gen, *ced-9*, que normalmente reprime el programa de muertes) hace que mueran muchas células que en condiciones normales sobrevivirían.

Se conocen las secuencias de aminoácido de estas tres proteínas Ced. La proteína Ced-4 es nueva y podría actuar antes que Ced-3, que es una proteasa. La secuencia de aminoácidos de Ced-9 es idéntica en un 23% a la de una proteína de mamífero Bcl-2 (el producto del proto-oncogén *bcl-2*) que, como Ced-9, reprime la muerte celular programada en muchos tipos de células de mamífero. Al transferir el gen humano *bcl-2* a *C. elegans*, actúa como inhibidor de la muerte celular normal en el gusano e incluso es capaz de rescatar mutantes *ced-9* que de otra manera morirían en etapas tempranas del desarrollo. Estos importantes descubrimientos indican que tanto el mecanismo de la muerte celular programada como su regulación se han conservado a lo largo de la evolución, desde los gusanos hasta los humanos, lo cual confirma que la capacidad de suicidarse de este modo es una propiedad fundamental de las células animales.

Figura 21-46 Muerte celular por apoptosis en *C. elegans*. La muerte depende de la expresión de los genes *ced-3* y *ced-4* en la célula que va a morir, mientras que la expresión de otros genes en las células vecinas controlan la absorción y la eliminación de sus restos.

Resumen

Caenorhabditis elegans ***tiene dos características que hacen de él un organismo atractivo para investigar la base genética del desarrollo: primera, su análisis genético es sencillo porque su tiempo de generación es corto y su genoma pequeño; segunda, el curso normal de su desarrollo es extraordinariamente reproducible y se ha estudiado detalladamente, de manera que una célula de una posición determinada del cuerpo tiene el mismo linaje en todos los individuos, y este linaje se conoce a la perfección. Al igual que en otros organismos, el desarrollo depende de interacciones célula-célula y de procesos autónomos de células. Por ejemplo, experimentos de destrucción celular demuestran que el desarrollo de la vulva depende de una señal de inducción, y los genes necesarios para esta inducción se pueden identificar a través de mutaciones que interrumpen el desarrollo de la vulva. El análisis molecular genético revelan las funciones individuales de estos genes y muestran que algunos de ellos codifican componentes de la vía de señalización que también actúa en los vertebrados. El análisis de linaje de mutantes conduce al descubrimiento de muchos otras clases importantes de genes, incluyendo genes cuyos productos establecen de forma temporal los cambios de las reglas del comportamiento celular durante el desarrollo y genes que serán responsables de la muerte celular programada –una característica invariable en el desarrollo de todos los animales.***

Drosophila y la genética molecular del patrón de formación. I. Génesis del mapa corporal[41]

La afirmación básica de la genética clásica es que la estructura de un organismo está controlada por sus genes. Los mecanismos del control genético de la estructura del cuerpo continuaron siendo un misterio durante casi un siglo, y mucho tiempo después de que se descubriera el papel del DNA en los procesos de la herencia. Desde hace pocos años se está llenando este vacío de nuestro conocimiento. En el apartado anterior utilizamos el gusano nemátodo para describir algunos de los principios más importantes según los cuales los genes de control del desarrollo organizan los procesos del desarrollo. Pero la mosca *Drosophila melanogaster* (Figura 21-47) es el organismo que más ha contribuido a la transformación de nuestro conocimiento sobre el control que los genes ejercen sobre la formación del mapa corporal. Tras décadas de estudios genéticos, culminados con investigaciones sistemáticas a gran escala, se ha conseguido un amplio catálogo de genes de control del desarrollo de la mosca cuya función específica es definir el patrón espacial de los tipos celulares y de las partes del cuerpo. Ahora es posible no sólo identificar los genes básicos, sino también observar cómo trabajan: mediante una hibridación *in situ* utilizando sondas de DNA o de RNA se puede observar directamente cómo se definen los estados internos de las células del embrión mediante la expresión de conjuntos de genes reguladores. Gracias al análisis de mutantes, animales transgénicos y animales que constituyen una masa confusa de células mutantes y no mutantes, se puede avanzar más y descubrir cómo actúa cada gen como una parte de un sistema que define la organización del cuerpo. Además, la mosca ha abierto una puerta fundamental para conocer nuestro propio desarrollo, ya que los genes que controlan el patrón del cuerpo de *Drosophila* tienen equivalentes muy cercanos en los animales superiores, incluidos nosotros mismos

Nuestro tratado sobre la genética del desarrollo de *Drosophila* está dividido en dos apartados. El primero trata los procesos del embrión temprano y describe la creación del mapa básico del cuerpo, con un rudimento de la cabeza en un extremo, y un rudimento posterior en el otro extremo y entre ambos una serie ordenada de segmentos –las unidades modulares básicas a partir de las cuales están construidos todos los insectos. El segundo apartado trata de procesos más avanzados y habla del aparato genético que dota a las células de valores posicionales que diferencian las células de un segmento de las del siguiente; estos procesos aseguran que, por ejemplo, la cabeza desarrollará antenas y el tórax desarrollará patas –y no al contrario, como veremos que ocurre en algunas mutantes.

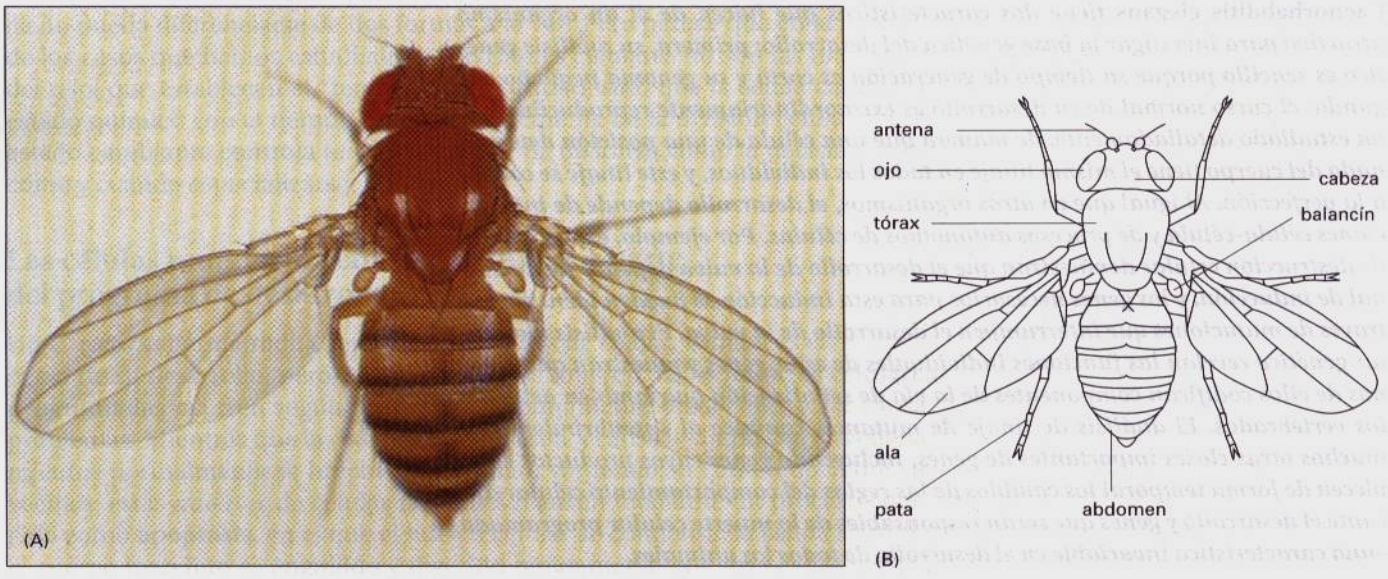


Figura 21-47 ***Drosophila melanogaster.*** Vista dorsal de una mosca adulta normal. (A) Fotografía. (B) Dibujo. (Fotografía cortesía de E.B. Lewis.)

El cuerpo del insecto se construye mediante la modulación de un patrón fundamental de unidades de repetición[41, 42]

El programa del desarrollo de *Drosophila*, desde el huevo hasta el adulto, está resumido en la Figura 21-48. El período de *desarrollo embrionario* comienza en la fecundación y dura aproximadamente un día, al final del cual el embrión abandona la cáscara del huevo y se convierte en *larva*. Entonces la larva pasa por tres estadios, o *crisálidas*, separados por mudas en las cuales se deshace de su cutícula vieja y se reviste de una nueva. Al final de la tercera crisálida se convierte en *pupa*. Dentro de la pupa se produce una remodelación radical del cuerpo, y finalmente, unos nueve días después de la fecundación, emerge una mosca adulta, o *imago*.

La mosca está formada por una cabeza, tres segmentos torácicos (numerados de T1 a T3), y ocho o nueve segmentos abdominales (numerados de A1 a A9). Aunque cada segmento es diferente de los demás, todos se construyen de acuerdo con un mapa parecido. Por ejemplo, del segmento T1 salen un par de patas, de T2 un par de patas y un par de alas, y de T3 un par de patas y un par de balancines –pequeñas protuberancias de gran importancia para el vuelo que han evolucionado a partir del segundo par de alas que poseían los insectos más primitivos. La segmentación casi repetitiva se desarrolla durante las primeras horas tras la fecundación, aunque es más obvia en la larva, en la que los segmentos se parecen más a los del adulto. En el embrión se puede observar que los rudimentos de la cabeza, o al menos las partes de la futura boca en el adulto, también están segmentados (Figura 21-49). No obstante en los dos extremos del animal encontramos estructuras terminales muy especializadas que no están derivadas de segmentos.

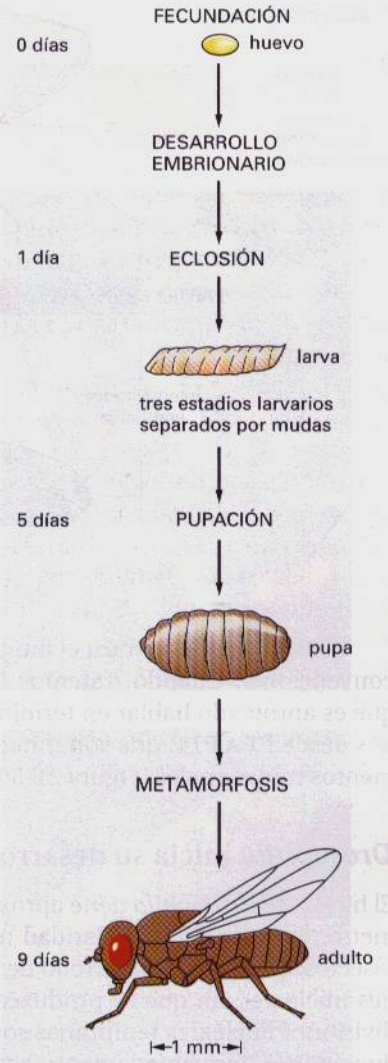


Figura 21-48 Sinopsis del desarrollo de *Drosophila* desde el huevo hasta la mosca adulta.

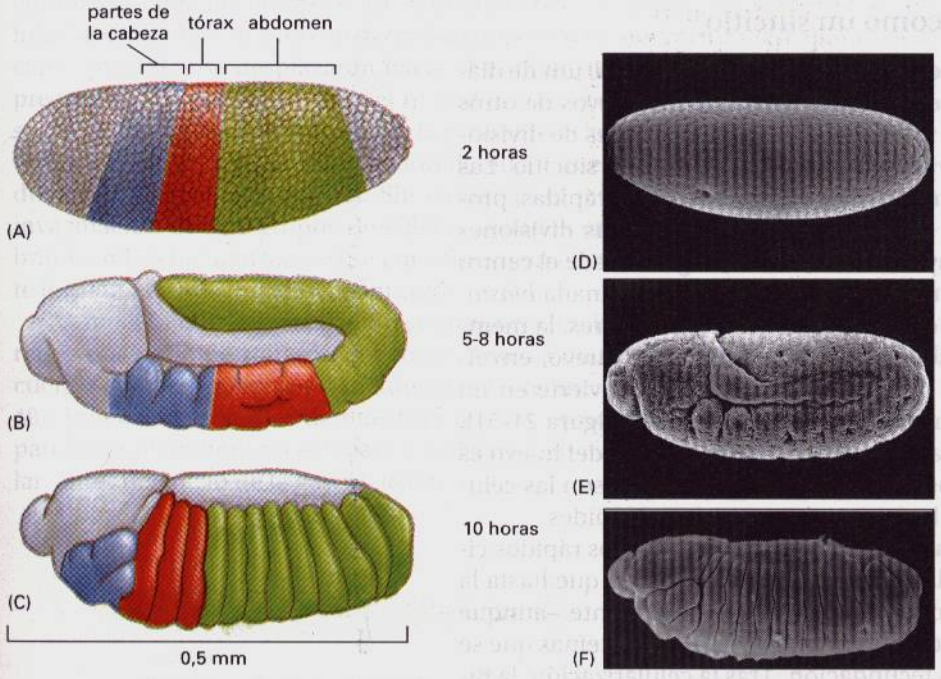


Figura 21-49 Los orígenes de los segmentos corporales de *Drosophila* durante el desarrollo embrionario. Los embriones se presentan en vista lateral en los dibujos (A-C) y corresponden a las electronmicrografías de barrido (D-F). (A y D) A las 2 horas, el embrión se encuentra en el estadio de *blastodermo sincitial* (véase Figura 21-51) y no se aprecia segmentación alguna, aunque se puede trazar el mapa de destino mostrando las futuras regiones segmentadas (*coloreadas* en A). (B y E) A las 5-8 horas, el embrión se encuentra en el estadio de *banda germinal extendida*: la gastrulación ya ha tenido lugar, la segmentación ha comenzado a ser visible, y el eje segmentado del cuerpo ha aumentado de longitud, curvándose sobre sí mismo por el extremo de la cola de forma que encaja dentro de la cáscara del huevo. (C y F) A las 10 horas, el eje del cuerpo se ha contraído y se ha erguido de nuevo, y todos los segmentos están definidos claramente. Las estructuras de la cabeza, externamente visibles en este estadio, se pliegan posteriormente en el interior de la larva, para emerger de nuevo cuando la larva experimente la pupación transformándose en adulta. (D y E, cortesía de Rudi Turner y Anthony Mahowald; F, cortesía de Jane Petschek.)

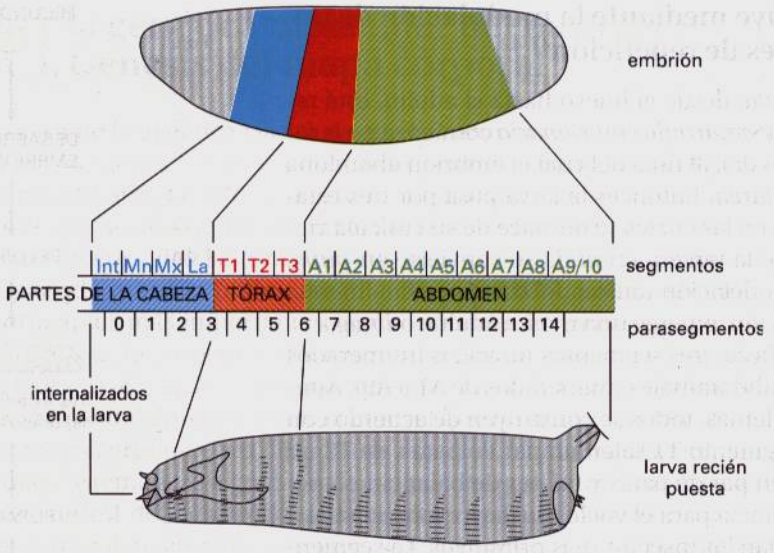


Figura 21-50 Segmentos de *Drosophila* y sus correspondencias con las regiones del blastodermo. Téngase en cuenta que los extremos del blastodermo se corresponden con estructuras no segmentadas que forman grandes zonas internas de la larva como, por ejemplo, los rudimentos segmentales de las zonas bucales del adulto. En *Drosophila*, la segmentación puede describirse en términos de segmentos o parasegmentos: la relación se muestra en la parte inferior de la figura. Los parasegmentos normalmente corresponden a patrones más sencillos de expresión génica. El número exacto de segmentos abdominales es discutible: ocho están bien definidos, y es probable que exista un noveno.

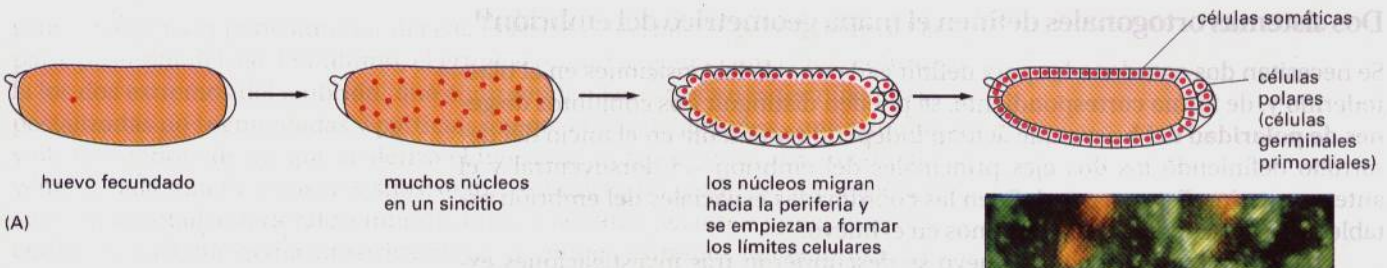
El lugar donde se traza el límite entre un segmento y el siguiente es en parte convencional. Cuando tratemos los patrones de la expresión génica veremos que es apropiado hablar en términos de un total de 14 parasegmentos (numerados desde P1 a P14) que son mitades de segmento fuera de registro con los segmentos tradicionales (Figura 21-50).

Drosophila inicia su desarrollo como un sincitio[41, 43]

El huevo de *Drosophila* tiene aproximadamente 400 µm de largo y 160 µm de diámetro, y presenta una polaridad muy definida. Al igual que los huevos de otros insectos, empieza su desarrollo de una forma poco usual: varias series de divisiones nucleares sin que se produzca división celular, dan lugar a un sincitio. Las divisiones nucleares tempranas son sincrónicas y extremadamente rápidas, produciéndose aproximadamente cada 8 minutos. Las nueve primeras divisiones generan un conjunto de núcleos, la mayoría de los cuales migran desde el centro del huevo hacia la superficie, donde forman una monocapa denominada *blastodermo sincitial*. Después de cuatro rondas más de divisiones nucleares, la membrana plasmática crece hacia el interior, desde la superficie del huevo, envolviendo cada núcleo, y por lo tanto el blastodermo sincitial se convierte en un *blastodermo celular* compuesto por unas 6000 células separadas (Figura 21-51). Un pequeño subgrupo de núcleos situados en el extremo posterior del huevo es segregado a células unos cuantos ciclos antes; estas *células polares* son las células germinales primordiales que darán lugar a oocitos o espermatozoides.

Como en el huevo de un anfibio en segmentación, parece que los rápidos ciclos de replicación de DNA dificultan la transcripción, de tal modo que hasta la fase de blastodermo celular el desarrollo depende mayoritariamente –aunque no exclusivamente– de las reservas maternas del mRNA y de las proteínas que se han acumulado en el huevo antes de la fecundación. Tras la celularización, la división celular continúa, siguiendo una vía más convencional, asincrónicamente y a una velocidad más baja, y la velocidad de transcripción aumenta espectacularmente.

El blastodermo celular equivale a la blástula hueca de un anfibio o de un erizo de mar, incluso aunque su interior esté lleno de vitelo en lugar de ser una cavidad llena de fluido. La gastrulación se produce cuando finaliza la celularización, y aunque la geometría de este proceso es muy diferente de la del insecto, el resultado general es sumamente parecido. Las células endodérmicas se desplazan hacia el interior mediante movimientos celulares coordinados, formando el intestino que se extiende a lo largo del eje del embrión. El mesodermo que envuelve el ru-



(B)

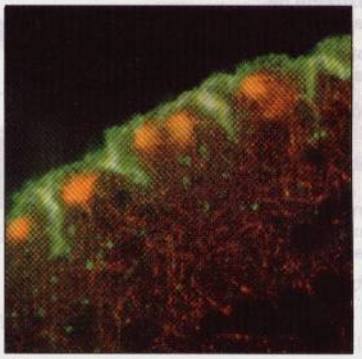

(C)

Figura 21-51 Desarrollo del huevo de *Drosophila* desde la fecundación hasta el estadio de blastodermo. (A) Diagramas esquemáticos. (B) Vista de superficie y (C) fotografías al microscopio óptico de secciones del núcleo blastodérmico durante la mitosis en la transición desde el estadio sincitial al blastodérmico. La actina está teñida de *verde*, la tubulina de *naranja*. (A, según H.A.Schneiderman, en Insect Development [P.A. Lawrence, ed.], pp. 3-34. Oxford, UK: Blackwell, 1976; B y C, cortesía de W. Therkauf.)

dimento del intestino ocupa el espacio entre éste y la capa exterior envolvente de ectodermo.

Si marcamos las células y las seguimos durante sus complejos movimientos de gastrulación, podremos dibujar un mapa futuro de la monocapa de células situada en la superficie del blastodermo (Figura 21-52). El futuro mapa es especialmente sencillo en una sección transversal a través de la mitad del embrión, con el futuro mesodermo situado ventralmente y el ectodermo a cada lado por encima de él. Como en un vertebrado, los cordones de las células nerviosas que corren a lo largo del cuerpo derivan de parte del ectodermo: un subgrupo de células se separarán en este *ectodermo neurogénico* de sus vecinas, escaparán de la capa epitelial, y se desplazarán hacia el interior del embrión convirtiéndose en precursores de neuronas. Para el mesodermo, el ectodermo y el cordón nervioso, se mantiene aproximadamente la posición de las células a lo largo del eje anteroposterior durante la gastrulación debido a que sus desplazamientos se producen en el plano transversal. Sin embargo, el intestino se forma mediante la invaginación de dos grupos de células situados en extremos opuestos del embrión; ambas invaginaciones se encuentran en la mitad del embrión y finalmente forman un tubo intestinal continuo.

A medida que la gastrulación se completa, en la superficie del embrión aparecen una serie de muescas y protuberancias que definirán la subdivisión del cuerpo en parasegmentos a lo largo de su eje anteroposterior (véase Figura 21-49). Pruebas más sutiles demuestran que las características principales de este patrón de segmentos ya estaban establecidas en el estado de blastodermo celular, antes del inicio de la gastrulación.

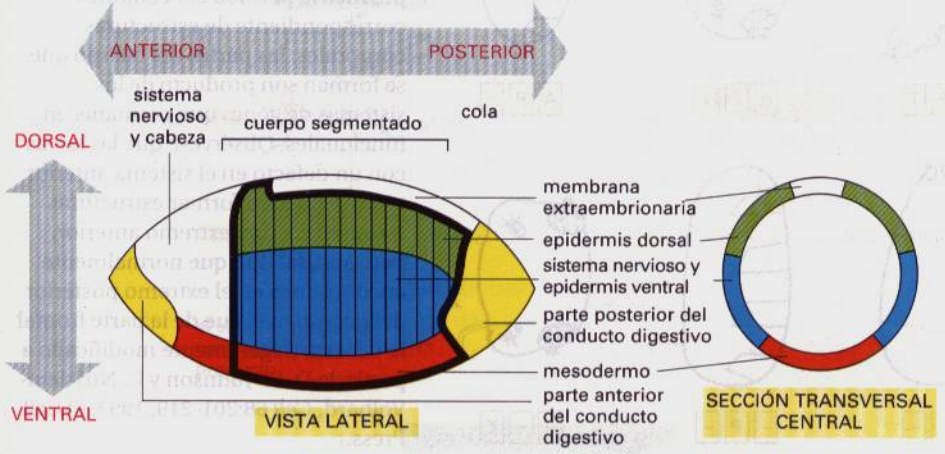


Figura 21-52 Mapa de destino de un embrión de *Drosophila* en la fase de blastodermo celular. Vista lateral y en sección transversal del embrión, ilustrando la relación entre la subdivisión dorsoventral en los principales tejidos futuros y el patrón anteroposterior de los futuros segmentos. Una línea gruesa limita la región que formará estructuras segmentales. Durante la gastrulación las células situadas a lo largo de la línea media ventral se invaginan formando el mesodermo, mientras que las células destinadas a formar el intestino se invaginan cerca de los dos extremos del embrión. Así pues, aunque los dos extremos del embrión se encuentran situados en puntos opuestos y lejanos, comparten funciones y destino. (Según V. Hartenstein, G.M. Technau y J.A. Campos-Ortega, *Wilhem Roux' Arch. Dev. Biol.* 194:213-216, 1985.)

Dos sistemas ortogonales definen el mapa geométrico del embrión[44]

Se necesitan dos coordenadas para definir cada una de las posiciones en el blastodermo y, de forma correspondiente, se pueden distinguir dos conjuntos de **genes de polaridad del huevo** que actúan independientemente en el inicio del desarrollo definiendo los dos ejes principales del embrión –el dorsoventral y el anteroposterior. Estos genes definen las coordinadas espaciales del embrión estableciendo gradientes de morfógenos en el huevo.

Los genes de polaridad del huevo se descubrieron tras investigaciones exhaustivas en busca de mutantes que transtornasen la polaridad del huevo. De esta forma se descubrieron 12 *genes polares dorsoventrales del huevo*. Salvo uno de ellos, todos los demás tienen el mismo fenotipo mutante de pérdida de función en el que el embrión se *dorsaliza* –es decir, todas sus células toman un carácter dorsal, de modo que las estructuras ventrales no se forman. El gen restante tiene el fenotipo de pérdida de función contrario: el embrión se ventraliza. Veremos que tales genes son componentes de un sistema único que establece el gradiente morfogénico en el embrión temprano.

Por el contrario, el conjunto de genes anteroposteriores puede subdividirse según sus fenotipos mutantes en tres subsistemas , responsables de la definición de partes diferentes del eje anteroposterior (Figura 21-53). El *grupo anterior* (4

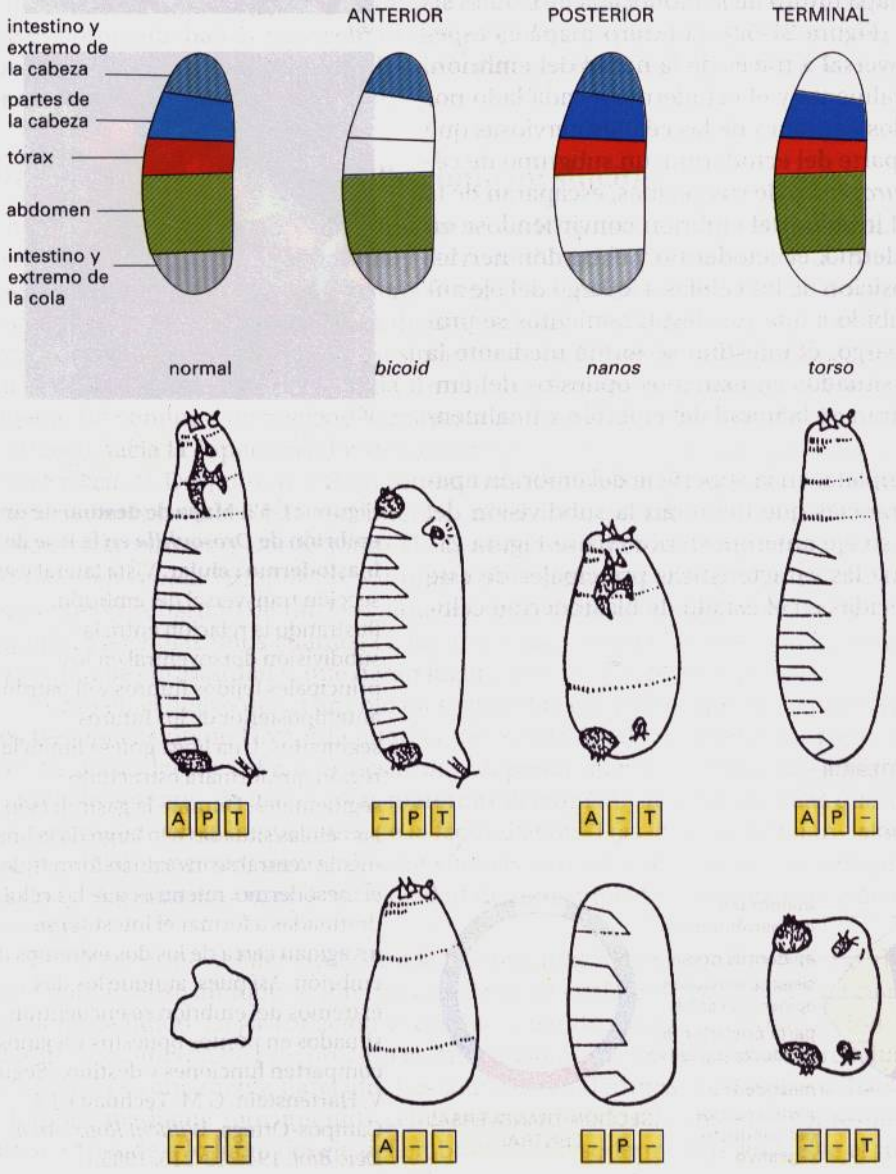


Figura 21-53 Dominios de los sistemas de genes de polaridad del huevo: anteriores, posteriores y terminales. Los diagramas muestran los destinos de diferentes regiones del huevo/embrión temprano, y las regiones que no pueden desarrollarse si los sistemas anterior, posterior o terminal son deficientes, se indican en *blanco*. Los diagramas centrales muestran esquemáticamente la apariencia de la larva normal y de las larvas mutantes que carecen de un gen del sistema anterior (el *bicoid*, por ejemplo), del sistema posterior (el *nanos*, por ejemplo), o del sistema terminal (el *torso*, por ejemplo). Los diagramas inferiores muestran la apariencia de las larvas en que no funciona ninguno de los tres sistemas de genes o sólo uno de ellos. Las letras que aparecen debajo de cada larva especifican qué sistemas permanecen intactos (A P T para una larva normal, –P T para una larva que tiene deficiencias en su sistema anterior pero que conserva los sistemas posterior y terminal intactos, etc.). La inactivación de un gen determinado provoca la pérdida del conjunto correspondiente de estructuras corporales; las partes del cuerpo que se forman son producto de los sistemas de genes que permanecen funcionales. Obsérvese que las larvas con un defecto en el sistema anterior todavía pueden formar estructuras terminales en su extremo anterior, pero son del tipo que normalmente encontramos en el extremo posterior del cuerpo más que de la parte frontal la cabeza. (Ligeramente modificado a partir de D. St. Johnson y C. Nüsslein-Volhard, *Cell* 68:201-219, 1992. © Cell Press.)

genes) controla la parte anterior del eje. El *grupo posterior* (11 genes) controla la parte posterior del eje. Por último, el *grupo terminal* (6 genes conocidos) controla los dos extremos del embrión, que comprenden las estructuras terminales especializadas no segmentadas y particularmente el par de regiones –una anterior y otra posterior– de las que se deriva el intestino. Al igual que el sistema dorsoventral, cada uno de estos tres subsistemas establece un gradiente morfogénico –uno en la mitad anterior del embrión, otro en la mitad posterior (aunque es discutible) y otro que actúa simétricamente en ambos extremos del embrión. Las mutaciones de pérdida de función que inactivan uno de estos subsistemas causan la pérdida de la estructura anterior, posterior o terminal correspondiente.

Las cuatro señales espaciales primarias –anterior, posterior, terminal y ventral– organizan el modelaje del embrión gracias al control que ejercen sobre la expresión de otro grupo de genes, que interpretan, pulen y almacenan la información que suministran las señales primarias.

Influencias procedentes de las células que envuelven el huevo marcan el inicio del modelaje del embrión[44, 45]

Los genes de polaridad del huevo son transcritos desde el genoma materno durante la oogénesis, y sus productos actúan poco después de la fecundación, y en algunos casos incluso antes de ella. Así pues, el fenotipo del embrión se determina a través de los alelos presentes en la madre (y en sus oocitos) más que por la combinación de genes maternos y paternos que posee el propio embrión. Los genes que actúan de este modo se denominan **genes de efecto materno**. Fueron descubiertos al buscar los fenotipos mutantes adecuados de embriones producidos a partir de huevos puestos por madres que parecían normales pero que contenían mutaciones genéticas que convertían a sus huevos en anormales (Figura 21-54). Normalmente, la mutación de efecto materno es recesiva, y las madres que producen huevos defectivos son homozigotas para el gen mutante.

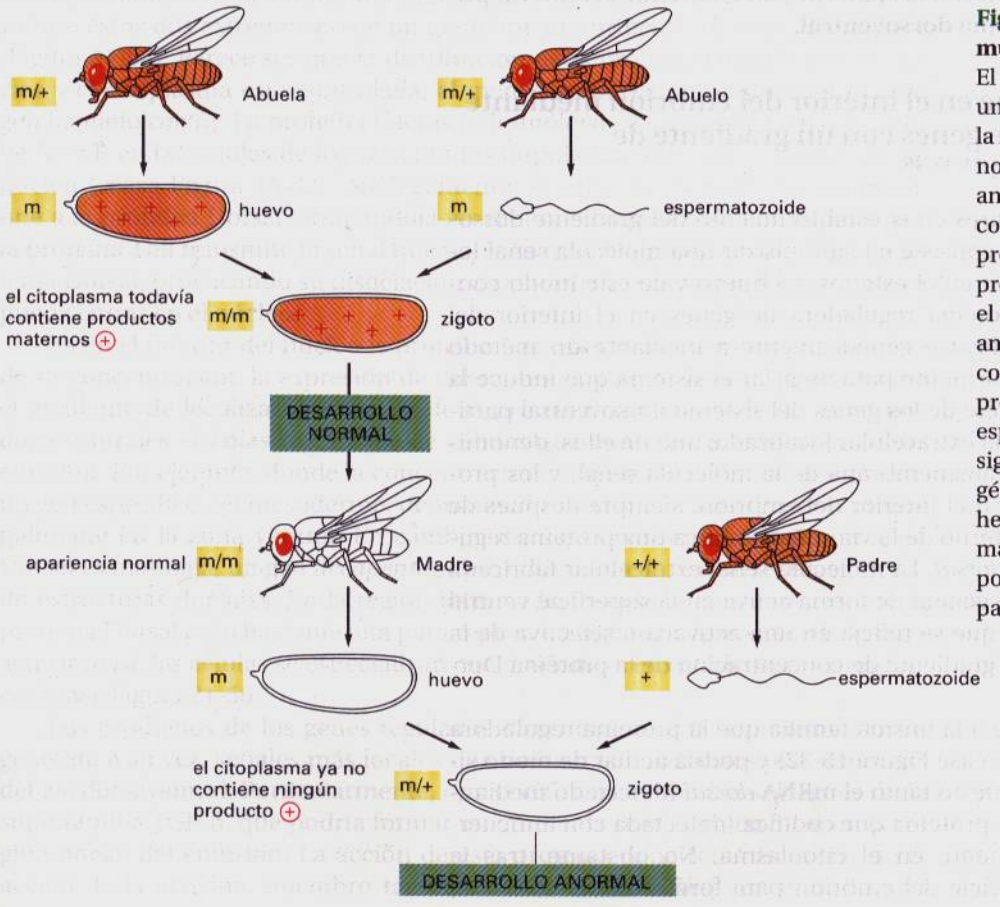


Figura 21-54 Herencia de una mutación recesiva de efecto materno. El patrón de herencia se inicia con unos abuelos heterozigotos (m/+) para la mutación (m) que es recesiva al gen normal (+). A la izquierda de cada animal se muestra su genotipo. El color *rojo* denota la presencia de un producto génico normal (+). El producto génico actúa sólo al iniciarse el desarrollo, y la apariencia de una animal maduro refleja el conjunto de componentes especificados maternos presentes en el huevo. Nótese que el espermatozoide no contribuye significativamente con estos productos génicos en el huevo. El patrón de herencia de una mutación de efecto materno dominante es distinto pero podría generar unos efectos muy parecidos.

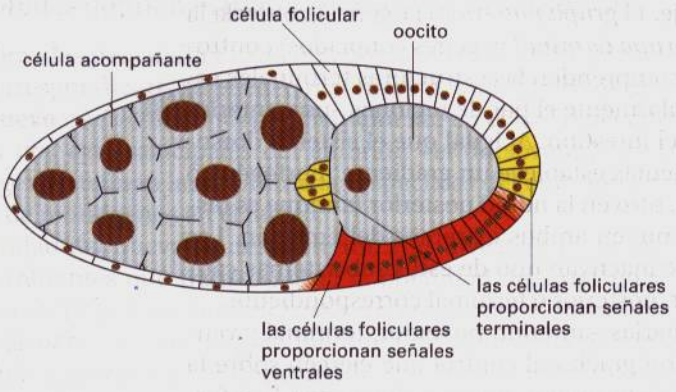


Figura 21-55 Oocito de *Drosophila* en su folículo. El oocito deriva de una célula germinal que se divide cuatro veces dando lugar a una familia de 16 células que permanecen en comunicación unas con otras a través de puentes citoplasmáticos. Un miembro de la familia se convierte en oocito, mientras que los otros se convierten en células nodriza, que generan muchos de los componentes necesarios para el oocito, y se los transfieren a través de los puentes citoplasmáticos. Las células foliculares que envuelven parcialmente el huevo tienen un origen diferente; son la fuente de las señales ventrales y terminales que polarizan al huevo.

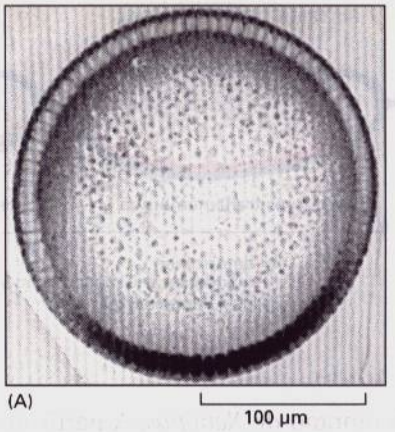
Cuando se ha identificado un gen, ya se puede investigar su campo de acción a través de la creación y el análisis de *mosaicos genéticos* –moscas que contienen porciones clonadas y marcadas de células en las que el gen que interesa está ausente o mutado. (Más adelante explicaremos cómo se efectúa este sorprendente truco de microcirugía genética.) Utilizando este método se puede demostrar que la mayoría de los genes de polaridad del huevo son imprescindibles para el linaje del oocito, mientras que en las células foliculares que envuelven al oocito en el ovario son suficientes unos cuantos. Los genes requeridos en las células foliculares proporcionan influencias que actúan en el exterior del huevo localizando las fuentes de los gradientes morfogénicos terminales y ventrales que se desarrollarán en el interior de las células (Figura 21-55). Además, los productos localizados suministrados al oocito en crecimiento, por medio de las células nodriza gigantes a las que está conectado por un extremo, definen la polaridad anteroposterior del huevo.

Para observar cómo se establecen los patrones en el interior del huevo, primero nos centraremos en el **sistema dorsoventral**.

El eje dorsoventral se define en el interior del embrión mediante una proteína reguladora de genes con un gradiente de concentración intranuclear[44, 45, 46]

La función de las células foliculares en el establecimiento del gradiente dorsoventral del huevo de *Drosophila* consiste en suministrar una molécula señal localizada que se une a un receptor en el exterior del huevo y de este modo controla la distribución de una proteína reguladora de genes en el interior del huevo. Este sistema puede analizarse genéticamente a mediante un método muy parecido al utilizado anteriormente para analizar el sistema que induce la vulva en el gusano nemátodo. Siete de los genes del sistema dorsoventral participan en la producción de la señal extracelular localizada; uno de ellos, denominado *Toll*, codifica el receptor transmembrana de la molécula señal, y los productos de los otros tres actúan en el interior del embrión, siempre después de *Toll*. El último gen del efecto materno de la vía señal codifica una proteína reguladora de genes y se denomina *dorsal*. La molécula señal extracelular fabricada por las células foliculares sólo se genera de forma activa en la superficie ventral del huevo y forma un gradiente que se refleja en una activación selectiva de la proteína Toll y finalmente en un gradiente de concentración de la proteína Dorsal en el núcleo del embrión.

La proteína dorsal pertenece a la misma familia que la proteína reguladora de genes de vertebrados NF-κB (véase Figura 15-32) y podría actuar de modo similar a ella. En el huevo recién puesto tanto el mRNA *dorsal* (detectado mediante la hibridación *in situ*) como la proteína que codifica (detectada con anticuerpos), se distribuyen uniformemente en el citoplasma. No obstante, tras la migración del núcleo a la superficie del embrión para formar el blastodermo,



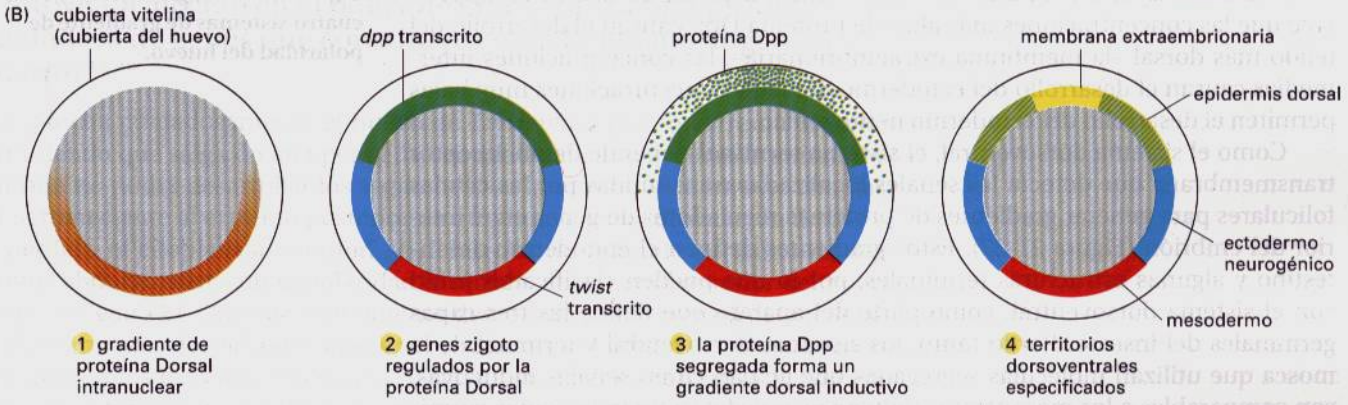


Figura 21-56 El gradiente de la proteína Dorsal y su interpretación. (A) Gradiente de concentración de la proteína Dorsal en el núcleo del blastodermo, puesto de manifiesto mediante un anticuerpo. (B) Interpretación del gradiente Dorsal por genes que demarcan los distintos territorios dorsoventrales; para simplificar sólo se muestran dos genes representativos. Los procesos posteriores efectuarán subdivisiones más complejas de estos territorios. Particularmente, el gen *decapentaplégico (dpp)* codifica un factor segregado que actúa como morfógeno local controlando el modelaje detallado del ectodermo. (A, según S. Roth, D. Stein y C. Nüsslein-Volhard, *Cell* 59:1189-1202, 1989. © Cell Press.)

tiene lugar una notable redistribución de la proteína Dorsal: dorsalmente la proteína permanece en el citoplasma pero ventralmente se concentra en el núcleo, y entre estos dos extremos existe un gradiente uniforme de localización nuclear (Figura 21-56). Parece ser que la distribución de la proteína Dorsal entre el núcleo y el citoplasma está controlada, al menos en parte, por el producto de un gen llamado *cactus*. La proteína Cactus es homóloga a la proteína I-κB que inhibe NF-κB en las células de los vertebrados impidiendo que migre al interior del núcleo (véase Figura 15-32). Análogamente, se cree que la proteína Cactus se une a la proteína Dorsal, atrapándola en el citoplasma; también se supone que la proteína Toll transmite la señal que pone en marcha la fosforilación de la proteína Dorsal, provocando su disociación de la proteína Cactus de forma que ésta pueda entrar en el núcleo.

Ya en el interior del núcleo la proteína Dorsal activa o desactiva, en función de su concentración, la expresión de diferentes grupos de genes. De esta forma el gradiente de localización nuclear de la proteína crea una serie de territorios dorsoventrales –franjas distintivas de células que aparecen a todo lo largo del embrión. Por ejemplo, donde la concentración de la proteína Dorsal es más alta, un gen específico del mesodermo, denominado *twist*, activa su expresión principalmente en la zona ventral. En cambio, donde la concentración de proteína Dorsal es más baja, un gen *decapentaplégico (dpp)*, puede activarse, especificando estructuras dorsales. En la región intermedia, donde la concentración de la proteína Dorsal es lo bastante alta para reprimir a *dpp* pero demasiado baja para activar *twist*, las células se especializan convirtiéndose en ectodermo neurogénico (véase Figura 21-56).

Los productos de los genes regulados directamente por la proteína Dorsal generan, a su vez, señales más locales que definen subdivisiones más delicadas del eje dorsoventral. Particularmente, *dpp* codifica una proteína segregada de la superfamilia TGF-β, que podría formar un gradiente morfogénico local en la región dorsal del embrión. La acción de esta proteína tiene reminiscencias de la acción de la activina, miembro también de la familia TGF-β, en el desarrollo

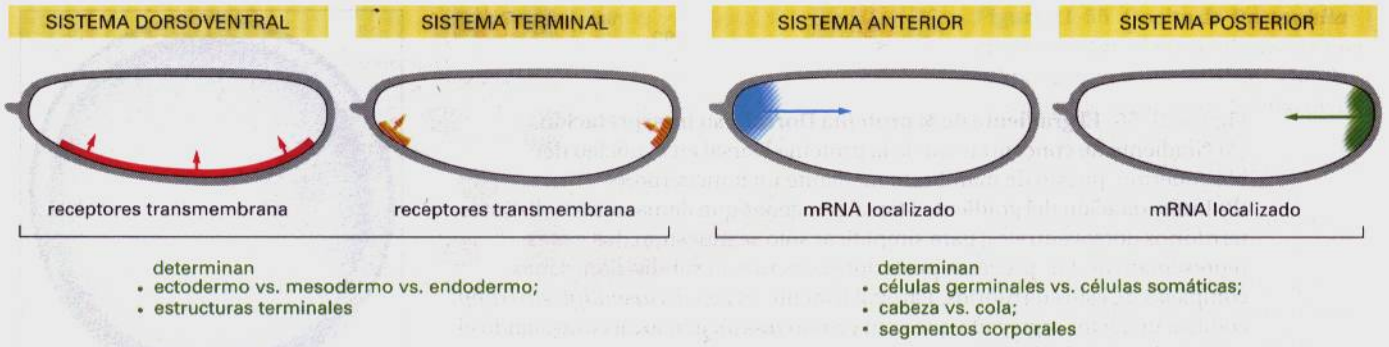


Figura 21-57 Organización de los cuatro sistemas de gradiente de polaridad del huevo.

temprano de *Xenopus*. A partir de experimentos inyectando mRNA de *dpp*, se cree que las concentraciones más altas de proteína Dpp causan el desarrollo del tejido más dorsal –la membrana extraembrionaria–, las concentraciones intermedias causan el desarrollo del ectodermo dorsal, y concentraciones muy bajas permiten el desarrollo del ectodermo neurogénico.

Como el sistema dorsoventral, el **sistema terminal** depende de un receptor transmembrana que detecta las señales localizadas transmitidas por las células foliculares para generar gradientes de proteínas reguladoras de genes en el interior del embrión (Figura 21-57). Estos gradientes definen el endodermo del intestino y algunas estructuras terminales, por lo que pueden clasificarse, junto con el sistema dorsoventral, como parte del aparato que define las tres capas germinales del insecto. Por lo tanto, los sistemas dorsoventral y terminal de la mosca que utilizan moléculas segregadas que actúan como señales inductivas, son comparables a los mecanismos inductivos que determinan las capas germinales en el embrión temprano de *Xenopus*.

Por el contrario, los sistemas anterior y posterior de los genes de polaridad del huevo establecen gradientes que dependen de acumulaciones localizadas de mRNA específicos en el interior del huevo (véase Figura 21-57). Estos gradientes controlan las diferencias entre la cabeza y la cola, y definen las series de segmentos corporales a lo largo del eje cabeza-cola, como veremos de forma detallada en el sistema anterior. Primero nos detendremos brevemente en discutir la función específica del **sistema posterior**: la especialización de las células germinales.

El sistema posterior define las células germinales y también los segmentos corporales posteriores[47]

En prácticamente todos los animales estudiados, las *células germinales primordiales* –los precursores de la próxima generación de gametos– se distinguen de las *células somáticas* –que formarán el resto de los tejidos del cuerpo– en un estadio muy temprano del desarrollo (véase Figura 21-51). En muchas especies el huevo contiene componentes citoplasmáticos localizados –visibles como *gránulos polares* en *C. elegans* y *Drosophila*, o *plasma germinal* en *Xenopus*– segregados al interior de las células primordiales germinales durante la segmentación del huevo y que probablemente incluyen o se asocian con determinantes del carácter de las células germinales. Generalmente estos componentes se concentran en el extremo posterior o vegetativo del huevo, y las células que los heredan migran de este punto para colonizar las gónadas.

Los genes de efecto materno de *Drosophila* necesarios para la formación de las células germinales pueden ser identificados mediante el descubrimiento de los mutantes que producen hijos que carecen de células germinales. Esta descendencia anómala también carece de segmentos corporales posteriores, lo que indica que estos genes pertenecen al sistema posterior de genes de polaridad del huevo. Los productos de muchos de estos genes se localizan en el polo posterior –entre ellos, probablemente, los determinantes del carácter de célula germinal. El gradiente morfogénico que organiza los segmentos corporales posteriores depende

de los mecanismos que crean y localizan los determinantes celulares germinales. Un gen fundamental de este sistema es *oskar*. Generalmente, la proteína y el mRNA de *oskar* se localizan en el polo posterior del huevo. En su ausencia no se desarrolla ninguna célula germinal, y si artificialmente se desplaza el mRNA de *oskar* hacia el extremo anterior del huevo, las células germinales se formarán en aquella localización. Además, se puede demostrar que el mRNA localizado de *oskar* controla la localización de otros componentes –productos de otros genes del grupo posterior implicados en el desarrollo de los segmentos corporales posteriores y de las células germinales. Mediante su localización en el polo posterior del huevo, estos productos pueden quedar incorporados de forma específica a las células que allí se formen, determinando su futuro como células germinales.

El mRNA localizado en el polo anterior codifica una proteína reguladora de genes que constituye el gradiente morfogénico anterior[44, 48]

Si se pincha cuidadosamente el huevo de *Drosophila* por su extremo anterior, permitiendo que salga de una pequeña cantidad del citoplasma más anterior, el embrión no podrá desarrollar los segmentos de la cabeza. Si se inyecta citoplasma perteneciente al extremo posterior de otro huevo en la localización donde se ha perdido el citoplasma anterior, se desarrolla un segundo conjunto de segmentos abdominales, con la polaridad invertida, en la mitad anterior del huevo receptor (Figura 21-58). Este experimento demuestra que el control del modelaje de los segmentos del eje anteroposterior se efectúa por medio de substancias localizadas en los extremos del huevo. Estas substancias se han identificado gracias a investigaciones genéticas, comenzando con la búsqueda de mutaciones que imiten las consecuencias de la pérdida de citoplasma anterior o posterior. De forma más destacada, las madres que son homozigotos para una mutación en el gen de la polaridad del huevo *bicoid*, producen embriones que carecen de las estructuras de la cabeza y el tórax, y cuyas estructuras abdominales se extienden sobre una fracción anormalmente larga del cuerpo. Sin embargo, tales embriones mutantes pueden salvarse de un desarrollo anómalo si en su extremo anterior se inyecta citoplasma procedente del extremo anterior de un huevo normal. Así pues el gen *bicoid* normal es imprescindible para fabricar cierto producto en el extremo anterior del huevo que puede actuar como fuente emisora de influencias de largo alcance que controlan el patrón del desarrollo de las zonas anteriores.

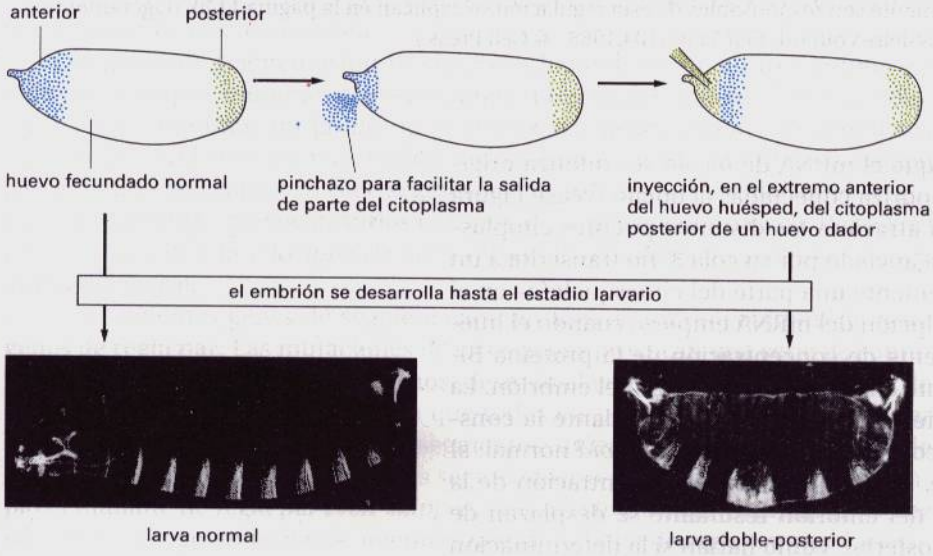


Figura 21-58 Determinantes localizados en los extremos del huevo de *Drosophila* controlan su polaridad anteroposterior. Se extrae una pequeña cantidad de citoplasma anterior del huevo y se reemplaza inyectando citoplasma posterior. La larva doble-posterior resultante (*fotografía de la derecha*) se compara con un control normal (*fotografía de la izquierda*); la substitución del citoplasma en un extremo del huevo tiene consecuencias a largo plazo, ya que convierte a todos los segmentos más anteriores en un duplicado especular de los tres últimos segmentos abdominales. Las larvas se muestran con iluminación de campo oscuro. (De H.G. Frohnhöfer, R. Lehmann y C. Nüsslein-Volhard, *J. Embryol. Exp. Morphol.* 97 [Suppl]:169-179, 1986. con autorización de Company of Biologists Ltd.)

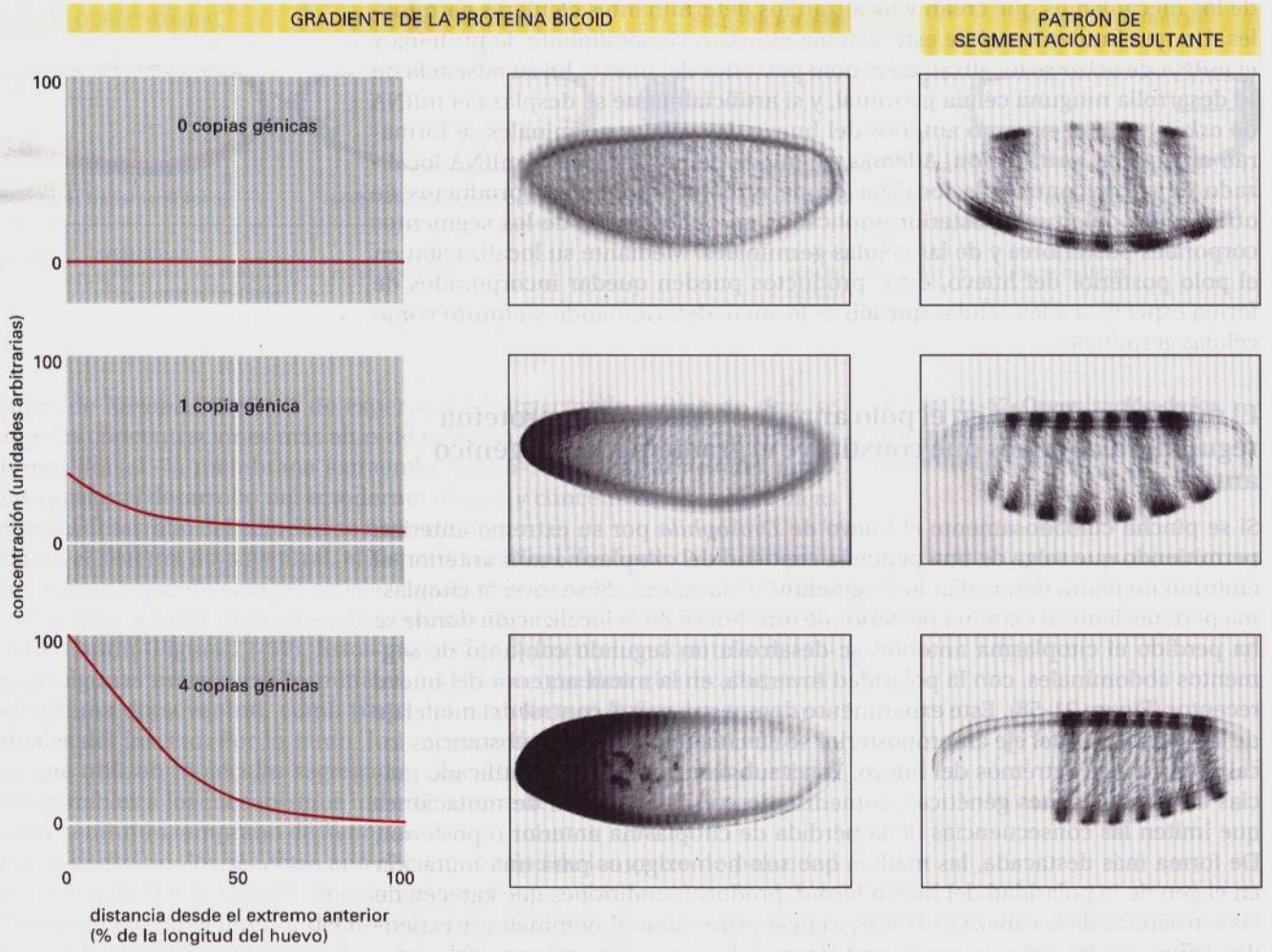


Figura 21-59 El gradiente de la proteína Bicoid en el huevo de *Drosophila* y sus consecuencias en el patrón de segmentos. El gradiente se manifiesta por tinción con un anticuerpo contra la proteína Bicoid; el patrón segmentado se manifiesta con un anticuerpo contra el producto de un gen de regla par, *even-skipped* (que veremos más adelante). Se comparan embriones que contienen cero, una y cuatro copias respectivamente del gen *bicoid* normal. Con la dosis cero de *bicoid*, no se forman segmentos con carácter anterior; al aumentar la dosis génica se forman segmentos cada vez más alejados del extremo anterior del huevo, como sería de esperar si su posición se determinara por medio de la concentración local de la proteína Bicoid. En las gráficas se presentan las medidas de esta concentración, indicadas por la intensidad de tinción. A pesar de las diferencias de posición y de espaciamiento de los rudimentos segmentales en los embriones con una o cuatro dosis del gen, ambos embriones se convertirán en larvas adultas de proporciones normales. Los mecanismos que probablemente son responsables de esta regulación se explican en la página 1140. (Ligeramente adaptado de W. Driever y C. Nüsslein-Volhard, *Cell* 54:83-104,1988 . © Cell Press.)

La hibridación *in situ* demuestra que el mRNA de *bicoid* se sintetiza originalmente en el ovario por las células nodriza conectadas al oocito (véase Figura 21-55). A medida que el mRNA *bicoid* atraviesa los distintos puentes citoplasmáticos en el interior del oocito, queda anclado por su cola 3' no transcrita a un componente del citoplasma –probablemente una parte del citoesqueleto– en el extremo anterior del oocito. La transcripción del mRNA empieza cuando el huevo es puesto, dando lugar a un gradiente de concentración de la proteína Bicoid, con el punto más alto del gradiente en el extremo anterior del embrión. La concentración del gradiente puede alterarse genéticamente mediante la construcción de mutantes que contengan copias múltiples del gen *bicoid* normal: al aumentar la dosis génica en la madre, también lo hace la concentración de la proteína en el huevo. Los segmentos del embrión resultante se desplazan de forma correspondiente hacia el polo posterior, como harían si la determinación

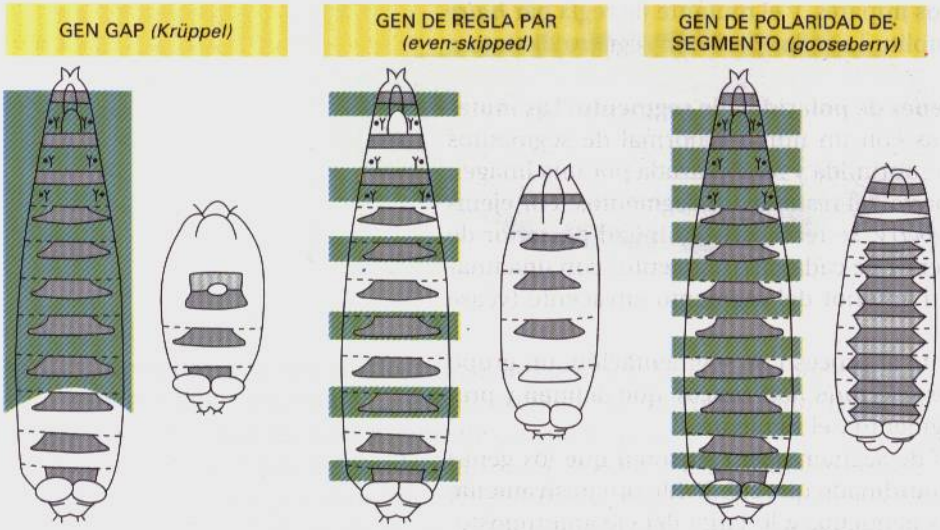


Figura 21-60 Ejemplos de los fenotipos de mutaciones que afectan a tres tipos de genes de segmentación. En cada caso las áreas sombreadas en *verde* sobre la larva normal (*izquierda*) están suprimidas en el mutante o están substituidas por duplicados especulares de regiones no afectadas. Convencionalmente, las mutaciones dominantes se escriben con letras en mayúscula y las mutaciones recesivas en minúscula. Varias de la mutaciones de modelaje de *Drosophila* se clasifican como dominantes debido a que tienen un efecto apreciable en el fenotipo del heterozigoto, a pesar de que su característica más importante, las consecuencias letales, son recesivas, es decir, sólo son apreciables en el homozigoto. (Modificado de C. Nüsslein-Volhard y E. Wieschaus, *Nature* 287:795-801, 1980. © 1980 Macmillan Magazines Ltd.)

de sus localizaciones fuera debida a las informaciones posicionales derivadas de la concentración local de proteína Bicoid (Figura 21-59). Por lo tanto, esta proteína encaja perfectamente con la definición de un morfógeno. Como la proteína Dorsal, la proteína Bicoid se une al DNA y su función es regular la expresión de otros genes.

Tres clases de genes de segmentación subdividen el embrión[49]

Los productos de los genes de polaridad del huevo proporcionan, pues, gradientes globales de señales. Las influencias que actúan sobre el sistema anterior derivan del mRNA *bicoid* localizado en el extremo anterior del huevo antes de la fecundación, y toman la forma de un gradiente anteroposterior de la proteína reguladora de genes Bicoid. El gradiente dirige la creación de una serie de segmentos corporales discretos. Este proceso depende de la acumulación de **genes de segmentación**, de los cuales han sido caracterizados cerca de 25. Cualquier mutación en uno de estos genes altera el número de segmentos o la organización interna básica del huevo sin que la polaridad global del huevo quede afectada. Los genes de segmentación actúan en estadios más avanzados que los genes de polaridad del huevo, cuando el embrión transcribe su propio genoma en vez de depender del mRNA materno almacenado. Debido a que son los transcritos de los genes embrionarios, y no los transcritos de los genes maternos, los que determinan el fenotipo, estos genes se clasifican como **genes de efecto zigoto** en vez de genes de efecto materno.

Los genes de segmentación se clasifican habitualmente en tres grupos según sus fenotipos mutantes y los estadios en los cuales actúan (Figura 21-60). Primero encontramos un grupo de al menos seis **genes gap**, cuyos productos marcan las subdivisiones más básicas del embrión. Las mutaciones en un gen gap eliminan un grupo o más de segmentos adyacentes, y las mutaciones de genes gap diferentes provocan varios defectos de solapamiento parcial. Por ejemplo, en el gen mutante *Krüppel*, la larva carece de seis segmentos, desde T1 a A5, ambos inclusive.

Los siguientes genes de segmentación en actuar son un conjunto de ocho **genes de regla par**. Las mutaciones de estos genes provocan una serie de supresiones que afectan segmentos alternos, dejando al embrión con sólo la mitad de sus segmentos habituales. Mientras que todos los genes mutantes de regla par presentan esta periodicidad de dos segmentos, difieren en la posición exacta de las supresiones relativas a los límites segmentales o parasegmentales. Por ejemplo el mutante de regla par *even-skipped*, que se estudia en el Capítulo 9, carece de todos sus segmentos pares, mientras que el mutante de regla par *fushi tarazu*

(ftz) carece de todos sus parasegmentos impares, y el mutante de regla par *hairy* carece de una serie de regiones de amplitud similar pero con registro distinto a las unidades parasegmentales.

Por último, existen al menos 10 **genes de polaridad de segmento**. Las mutaciones en estos genes producen larvas con un número normal de segmentos pero una parte de cada segmento está suprimida y reemplazada por una imagen especular duplicada de todos o sólo parte del resto de los segmentos. Por ejemplo, en el caso de los mutantes *gooseberry*, se reemplaza la mitad posterior de cada segmento (es decir, la mitad anterior de cada parasegmento) con una imagen especular aproximada de la mitad anterior del segmento adyacente (véase Figura 21-60).

Luego estudiaremos, paralelamente al proceso de segmentación, un grupo de genes más evolucionados, los *genes selectores homeóticos*, que definen y preservan las diferencias entre un parasegmento y el siguiente.

Los fenotipos de varios mutantes de segmentación sugieren que los genes de segmentación forman un sistema coordinado que subdivide progresivamente el embrión en dominios cada vez más pequeños a lo largo del eje anteroposterior, que se diferencian según diferentes patrones de expresión génica. Así, otra vez la genética molecular proporciona las herramientas necesarias para investigar el funcionamiento de este sistema.

La expresión localizada de los genes de segmentación está regulada por una jerarquía de señales de posición[50, 51]

Se han clonado la mayoría de los genes de segmentación, y la secuenciación de los cDNA revela que cerca de las tres cuartas partes de ellos, incluyendo todos los genes gap, codifican proteínas reguladoras de genes. Por lo tanto, sus acciones sobre otro u otros genes pueden estudiarse comparando la expresión génica en embriones normales y en embriones mutantes. En efecto, se puede fotografiar la activación y desactivación de genes en patrones cambiantes utilizando las

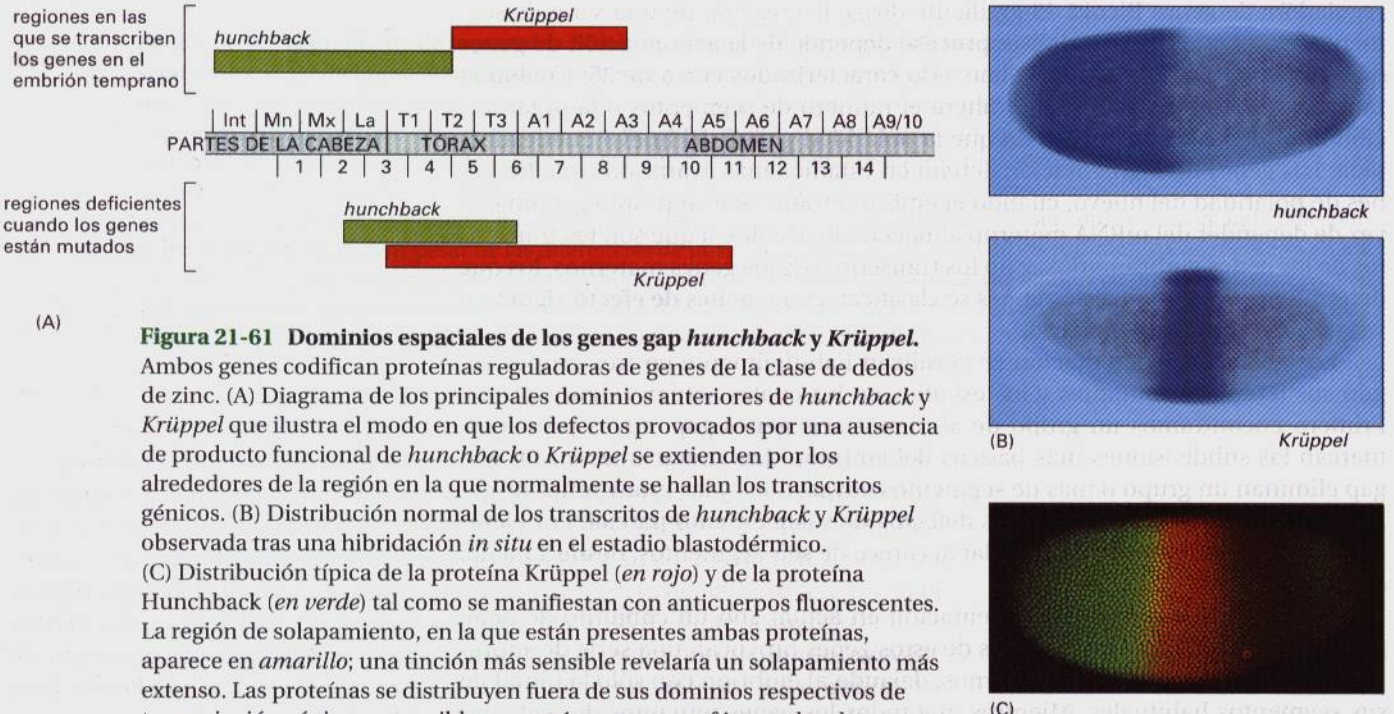


Figura 21-61 Dominios espaciales de los genes gap *hunchback* y *Krüppel*. Ambos genes codifican proteínas reguladoras de genes de la clase de dedos de zinc. (A) Diagrama de los principales dominios anteriores de *hunchback* y *Krüppel* que ilustra el modo en que los defectos provocados por una ausencia de producto funcional de *hunchback* o *Krüppel* se extienden por los alrededores de la región en la que normalmente se hallan los transcritos génicos. (B) Distribución normal de los transcritos de *hunchback* y *Krüppel* observada tras una hibridación *in situ* en el estadio blastodérmico. (C) Distribución típica de la proteína Krüppel (*en rojo*) y de la proteína Hunchback (*en verde*) tal como se manifiestan con anticuerpos fluorescentes. La región de solapamiento, en la que están presentes ambas proteínas, aparece en *amarillo*; una tinción más sensible revelaría un solapamiento más extenso. Las proteínas se distribuyen fuera de sus dominios respectivos de transcripción génica y es posible que actúen como morfógenos locales participando en la regulación de la expresión de otros genes (genes gap y genes de regla par incluidos). (A, adaptado de M. Hülskamp y D. Tautz, *Bioessays* 13:261-268,1991; B, cortesía de Diethard Tautz; C, cortesía de Jim Williams, Steve Paddock, Sean Carroll, y Howard Hugues Medical Institute.)

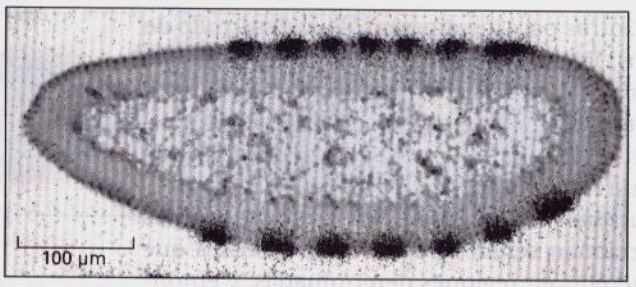


Figura 21-62 Patrón de expresión de *ftz* en el blastodermo de *Drosophila*. La hibridación *in situ* muestra que el gen se transcribe siguiendo un patrón de siete bandas que se corresponden al patrón de defectos en los mutantes *ftz*. Las bandas de expresión de *ftz* aparecen como manchas negras debido a los granos autorradiográficos de plata presentes en esta sección longitudinal. (Cortesía de Philip Ingham.)

sondas adecuadas para detectar los transcritos génicos. Analizando por este método mutantes que carecen de un gen de segmentación determinado, se puede empezar a deducir la lógica del sistema de control génico.

Ya hemos visto como la hibridación *in situ* de embriones normales ha ayudado a demostrar que los transcritos de gen *bicoid* son la fuente de una señal posicional: los transcritos se localizan en un extremo del huevo, a pesar de que los efectos de una mutación en el gen se extienden sobre gran parte del embrión. De forma similar puede demostrarse que los genes gap generan a su vez (directa o indirectamente) señales posicionales que ayudan a controlar el patrón del desarrollo en zonas vecinas que se extienden más allá de sus propios dominios de expresión. Por ejemplo, los mutantes defectuosos en los genes gap *Krüppel* o *hunchback* presentan anomalías en la región en que se detectan los transcritos génicos de un embrión normal y también en varios segmentos más alejados (Figura 21-61). Se cree que, al igual que la proteína Bicoid, las proteínas reguladoras de genes codificadas por genes gap como *Krüppel* y *hunchback*, se distribuyen como morfógenos difusibles a partir de los lugares en que estos genes se transcriben.

El nivel siguiente de modelaje espacial, más delicado, lo marcan los genes de regla par. Algunos de estos genes también pueden codificar proteínas que se distribuyen por difusión ejerciendo efectos sobre células vecinas al lugar en que

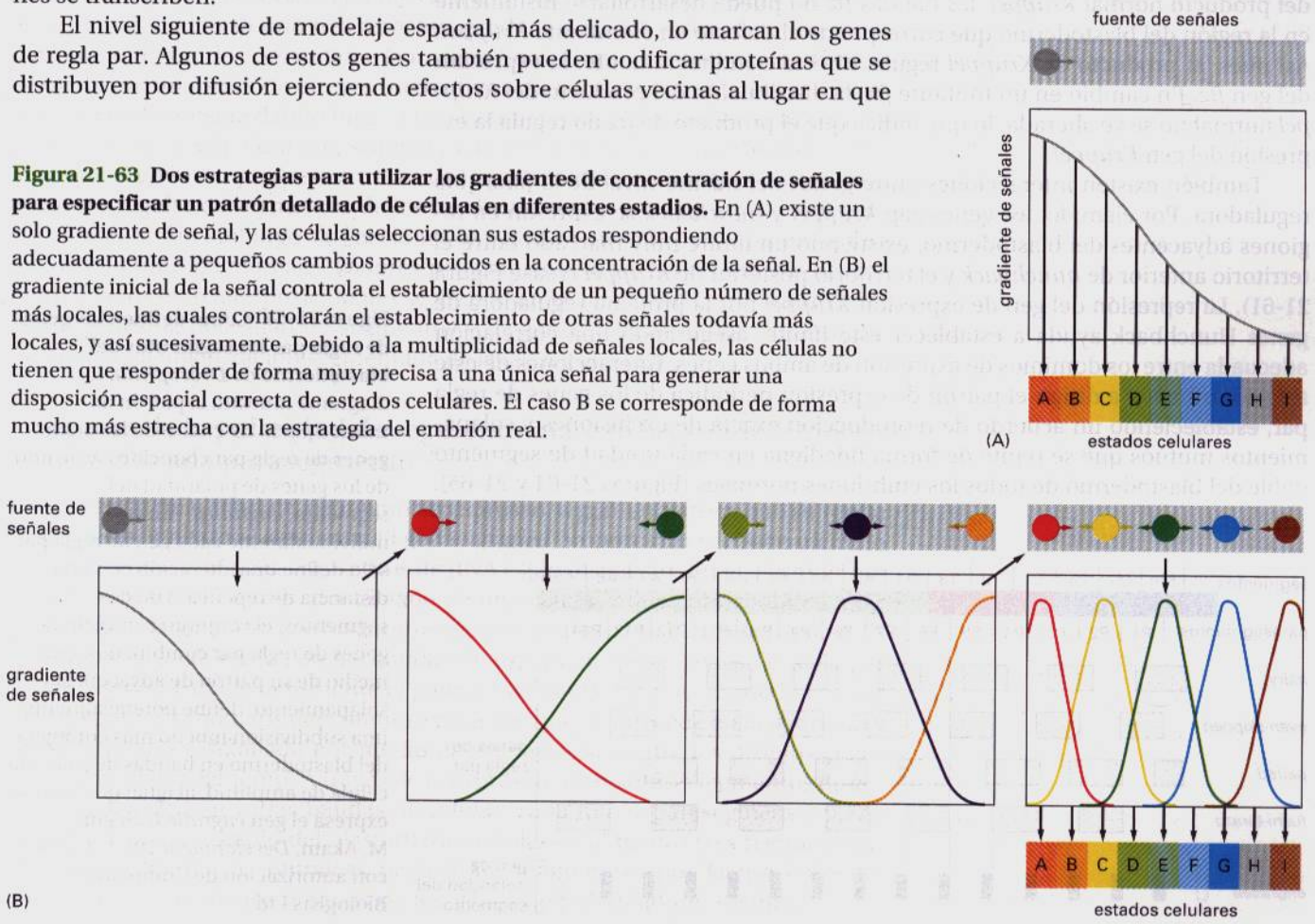


Figura 21-63 Dos estrategias para utilizar los gradientes de concentración de señales para especificar un patrón detallado de células en diferentes estadios. En (A) existe un solo gradiente de señal, y las células seleccionan sus estados respondiendo adecuadamente a pequeños cambios producidos en la concentración de la señal. En (B) el gradiente inicial de la señal controla el establecimiento de un pequeño número de señales más locales, las cuales controlarán el establecimiento de otras señales todavía más locales, y así sucesivamente. Debido a la multiplicidad de señales locales, las células no tienen que responder de forma muy precisa a una única señal para generar una disposición espacial correcta de estados celulares. El caso B se corresponde de forma mucho más estrecha con la estrategia del embrión real.

se transcriben estos genes; en cambio, otros parecen afectar sólo el desarrollo de las regiones en las que son transcritos. Por ejemplo, los transcritos del gen *ftz* normal ocurren en siete "bandas cebra" en forma de circunferencia, en el estadio de blastodermo (Figura 21-62), de aproximadamente cuatro células de ancho cada una, pareciéndose en amplitud y localización a la de los rudimentos de los parasegmentos pares perdidos en un mutante *ftz*.

En conjunto, todas estas informaciones implican que los productos de los genes de polaridad del huevo proporcionan señales posicionales globales que activan la expresión de genes gap concretos en regiones determinadas, y entonces los productos de los genes gap proporcionan un segundo nivel de señales posicionales que actúan localmente regulando detalles más sutiles del modelaje afectando la expresión de otros genes, incluidos los genes de regla par. De este modo los gradientes globales producidos por los genes de polaridad del huevo organizan la creación de un patrón detallado a través de un proceso de subdivisiones secuenciales por medio de una jerarquía de controles posicionales. Ésta es una estrategia de confianza: debido a que las señales posicionales globales no tienen que definir detalles sutiles, los núcleos individuales que responden a dichas señales no tienen por qué reaccionar con una precisión absoluta a pequeñas diferencias de concentración de señal (Figura 21-63).

El producto de un gen de segmentación controla la expresión de otro gen generando un patrón detallado[41, 50, 51, 52]

La jerarquía de relaciones de control existentes entre los niveles consecutivos de genes de segmentación puede ponerse de manifiesto mediante la observación del patrón de expresión de un gen determinado cuando otro gen queda desactivado debido a una mutación. Por ejemplo, en un embrión mutante que carezca del producto normal *Krüppel*, las bandas *ftz* no puede desarrollarse justamente en la región del blastodermo que corresponde al defecto en el mutante *Krüppel*. Así pues, el producto de *Krüppel* regula, directa o indirectamente, la expresión del gen *ftz*. En cambio en un mutante *ftz*, la distribución del producto del *Krüppel* normal no se ve alterada, lo que indica que el producto de *ftz* no regula la expresión del gen *Krüppel*.

También existen interacciones entre genes del mismo nivel de la jerarquía reguladora. Por ejemplo, los genes gap *Krüppel* y *hunchback* se expresan en regiones adyacentes del blastodermo, existiendo un límite muy marcado entre el territorio anterior de *hunchback* y el territorio posterior de *Krüppel* (véase Figura 21-61). La represión del gen de expresión *Krüppel* por la proteína reguladora de genes Hunchback ayuda a establecer este límite, asegurando una correlación adecuada entre los dominios de expresión de ambos genes. Interacciones de este tipo contribuyen a dirigir el patrón de expresión periódica de los genes de regla par, estableciendo un acuerdo de reproducción exacta de exclusiones y solapamientos mutuos que se repite de forma fidedigna en cada unidad de segmento doble del blastodermo de todos los embriones normales (Figuras 21-64 y 21-65).

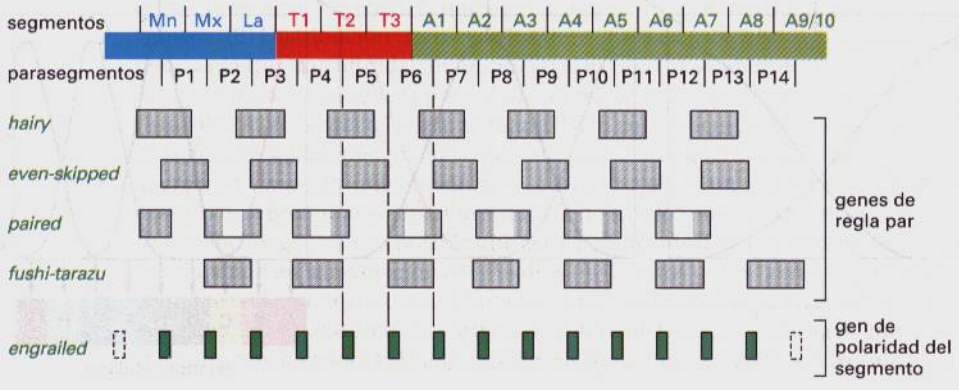
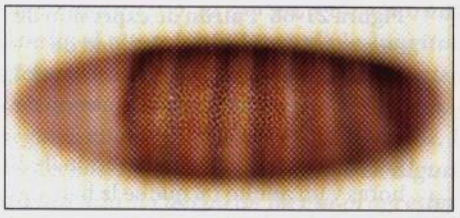
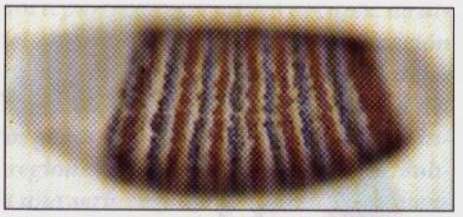


Figura 21-64 Cómo definen los genes de regla par los segmentos del blastodermo de *Drosophila*. El diagrama muestra el patrón de transcripción de cuatro de los ocho genes de regla par conocidos, y de uno de los genes de polaridad del segmento, *engrailed*. Aunque individualmente cada gen de regla par sólo define una alteración con una distancia de repetición de dos segmentos, el conjunto completo de genes de regla par combinados, por medio de su patrón de adyacencia y solapamiento, define potencialmente una subdivisión mucho más compleja del blastodermo en bandas de sólo una célula de amplitud, al igual que las que expresa el gen *engrailed*. (Según M. Akam, *Development* 101:1-22, 1987, con autorización de Company of Biologists Ltd.)



3 horas después de la fecundación



3½ horas después de la fecundación

Figura 21-65 Formación de las bandas *ftz* y *eve* en el blastodermo de *Drosophila*. Tanto el gen *ftz* como el gen *eve* son de regla par. Sus patrones de expresión (coloreados en *marrón* para *ftz* y *gris* para *eve*) primero se encuentran difusos pero se definen rápidamente en bandas. (Según P.A. Lawrence, The Making of a Fly. Oxford, UK: Blackwell, 1992.)

De este modo se distinguen, hasta el más mínimo detalle, bandas de células diferentes alrededor del blastodermo por medio de diferentes combinaciones de expresiones de genes de regla par –la anchura de una sola célula, que corresponde aproximadamente a una cuarta parte de la anchura de un futuro segmento o un parasegmento.

La totalidad de este detallado proceso de modelaje depende de las largas extensiones de secuencias de DNA que controlan la expresión de cada uno de los genes de segmentación. Estas regiones reguladoras unen muchas copias de proteínas reguladoras de genes producidas por un subgrupo de otros genes de segmentación, y el gen se activa o desactiva según la combinación de proteínas que se consigue. En el Capítulo 9 (véase pág. 456) nos centramos en un gen de segmentación determinado y vimos cómo la decisión de la transcripción o no transcripción de un gen se efectúa en base a todas estas señales de entrada.

Los genes de polaridad del huevo gap y de regla par generan un patrón transitorio que es recordado por otros genes[41, 50, 52]

Durante las primeras horas siguientes a la fecundación, los genes gap y los genes de regla par se activan uno tras otro. Sus productos mRNA aparecen primero en patrones que sólo se aproximan a la imagen final; luego, al cabo de poco tiempo –y mediante una serie de ajustes interactivos– la confusa distribución inicial se resuelve por sí misma dando lugar a un sistema regular bien definido de bandas (véase Figura 21-65). Pero este sistema es de por sí inestable y transitorio. A medida que el embrión progresa a través de la gastrulación y las etapas posteriores, el patrón regular de segmentos de los productos de los genes gap y de regla par se desintegra. Sin embargo, sus acciones han dejado un sello permanente en forma de conjunto de marcajes (valores posicionales) sobre las células del blastodermo. Estos marcajes posicionales se graban en la activación continuada de algunos genes de polaridad de segmentos y de genes selectores homeóticos que mantienen la organización segmentada de la larva y el adulto.

Los genes de la polaridad de segmento marcan las subdivisiones básicas de cada parasegmento[53]

Los genes de polaridad de segmento se expresan según un patrón que se repite de un parasegmento al siguiente. El gen *engrailed* proporciona un buen ejemplo de ello (Figura 21-66). Sus transcritos de RNA están dispuestos en el blastodermo en una serie de 14 bandas, del tamaño de una célula, y que corresponden a las porciones más anteriores de los futuros parasegmentos. Las bandas aparecen en una relación establecida con las bandas de expresión de los genes de regla par (véase Figura 21-64). Nuevamente el patrón está controlado de un modo combinatorio por los productos del conjunto de genes que le antecede en la jerarquía y se ve mejorado y detallado por medio de interacciones entre los propios genes de polaridad de segmento. A través de la expresión de distintos segmentos de genes de polaridad en varias bandas de células, cada futuro parasegmento queda subdividido en el estadio del blastodermo celular en al menos tres regiones distintas. Las diferencias químicas persistirán, mantenidas por la transcripción continuada de al menos algunos de los genes de polaridad del segmento, des-

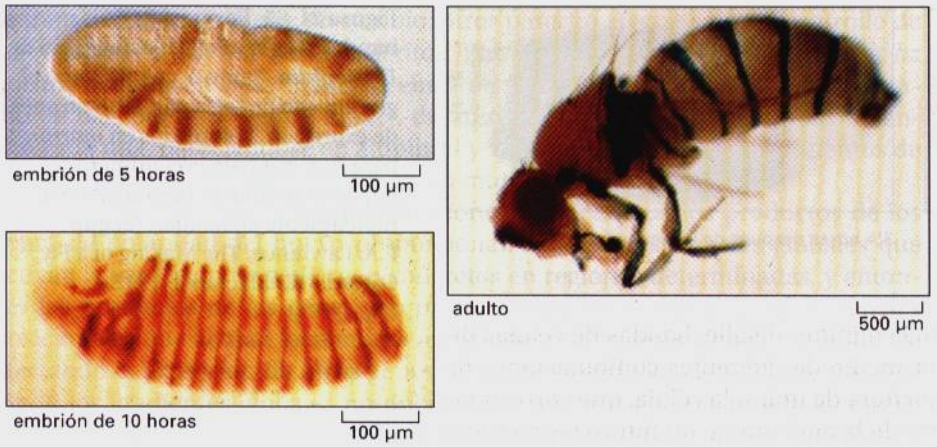


Figura 21-66 Patrón de expresión de *engrailed*, un gen de polaridad de segmento. Las fotografías ilustran el patrón de *engrailed* en un embrión de 5 horas (en el estadio de banda germinal extendida), un embrión de 10 horas y un adulto (al que se le han extraído las alas para este experimento). El patrón se hace visible gracias a un anticuerpo (*marrón*) contra la proteína Engrailed (para embriones de 5 a 10 horas) o (para el adulto) mediante la construcción de un linaje de *Drosophila* que contiene secuencias de control del gen *engrailed* acopladas a la secuencia que codifica la enzima β-galactosidasa, cuya presencia es fácilmente detectable por medio de métodos histoquímicos a través del producto *azul* de la reacción que cataliza. Nótese que una vez establecido, el patrón de *engrailed* se preserva durante todo el transcurso de la vida del animal. (Cortesía de Tom Kornberg y Cory Hama.)

pués de la desaparición de la mayor parte de los productos de los genes de regla par (véase Figura 21-66). Algunos de los genes de polaridad del segmento que se expresan de este modo –incluyendo, especialmente uno llamado *wingless*– codifican proteínas secretadas que también actúan durante el desarrollo posterior como señales espaciales dentro del parasegmento regulando los detalles de su crecimiento y modelaje interno.

Además de regular los genes de polaridad del segmento, los productos de los genes de regla par colaboran con los productos de los genes gap (y quizás con los genes de polaridad del huevo) provocando la activación localizada y precisa de un conjunto de marcajes espaciales más desarrollado –es decir, los genes selectores homeóticos, que distinguirán un parasegmento de otro de forma permanente. En el próximo apartado examinaremos en detalle estos genes selectores y consideraremos su función en la memoria celular.

Resumen

Igual que otros insectos* Drosophila *se construye a partir de una serie de unidades modulares repetidas denominadas segmentos, con estructuras no segmentales especializadas en cada extremo del cuerpo. Cada subdivisión importante de cada segmento se distingue por medio de la expresión de una selección de genes de control particular que define su "dirección postal". El origen del patrón está en la simetría del huevo: la información posicional la proporcionan cuatro gradientes establecidos por los productos de cuatro grupos de genes de efecto materno llamados genes de polaridad del huevo. Los cuatro grupos de genes controlan cuatro diferenciaciones básicas del mapa corporal de los animales: dorsal* versus *ventral, endodermo* versus *mesodermo y ectodermo, células germinales* versus *células somáticas, y cabeza* versus *cola. Los genes de polaridad del huevo actúan estableciendo distribuciones escalonadas de proteínas reguladores de genes en el huevo y el embrión temprano, pero los gradientes los establecen de modo distinto los diferentes ejes del huevo.

***La polaridad dorsoventral se define mediante una señal localizada procedente de las células foliculares que rodean el huevo. La molécula señal se une a los receptores transmembrana presentes en la superficie ventral del huevo, lo que conducirá finalmente a una concentración intranuclear escalonada de la proteína Dorsal reguladora de genes, a lo largo del eje dorsoventral del embrión temprano. La proteína Dorsal regula la expresión de otros genes, incluido* dpp, *cuyo producto actúa a su vez como gradiente morfogénico definiendo subdivisiones más sutiles del eje dorsoventral, como hacen las señales inductoras tempranas que actúan en* Xenopus.

En el caso del grupo anterior de genes de polaridad del huevo, el gradiente surge a partir de un depósito de mRNA producto del gen* bicoid, *localizado en el extremo anterior del huevo. Debido a que el huevo del insecto se desarrolla inicialmente

como un sincitio, la proteína Bicoid transcrita a partir de este mRNA es capaz de difundir el citosol a lo largo de la longitud del embrión, dirigiendo la organización global de su mitad anterior. La concentración del gradiente Bicoid pone en marcha la expresión ordenada de los genes gap, genes de regla par, genes de polaridad del segmento y genes selectores homeóticos. Estos genes, a través de un jerarquía de interacciones, quedan expresados en algunas regiones del embrión y en otras no, subdividiendo el cuerpo de forma progresiva en una serie regular de unidades segmentales y subsegmentales.

Drosophila y la genética molecular del patrón de formación. II. Genes selectores homeóticos y modelaje de las partes del cuerpo[41, 50]

Las primeras observaciones sobre el sistema de genes del patrón de formación se efectuaron hace más de 70 años, con el descubrimiento del primer grupo de mutaciones en *Drosophila* que provocaban perturbaciones extrañas en la organización de la mosca adulta. Por ejemplo, en la mutación *Antennapedia* de la cabeza surgen patas en vez de antenas (Figura 21-67), mientras que en la mutación *bithorax*, aparecen porciones de un par extra de alas donde normalmente deberían surgir unos apéndices mucho más pequeños denominados balancines. Estas mutaciones, llamadas *homeóticas*, transforman unas partes del cuerpo en estructuras adecuadas para otras posiciones. Un grupo completo de **genes selectores homeóticos** determina el carácter anteroposterior de los segmentos de la mosca. En este apartado seguimos el desarrollo de *Drosophila* a través de las últimas etapas en la formación de la mosca adulta. Al final de este apartado veremos que estos mismos genes tienen un papel crucial en el modelaje del cuerpo de otros animales, incluso los seres humanos.

Los genes selectores homeóticos del complejo bithorax y del complejo Antennapedia definen las diferencias entre parasegmentos[54, 55]

Los genes selectores homeóticos que aquí nos interesan se encuentran todos ellos concentrados en una de las dos estrechas agrupaciones de genes, conocidas como **complejo bithorax** y **complejo Antennapedia**. Cada complejo contiene varios genes con funciones análogas: los del complejo bithorax controlan las diferencias entre los segmentos torácicos y abdominales del cuerpo, mientras que los del complejo Antennapedia controlan las diferencias entre los segmentos torácicos y los de la cabeza. En otros insectos los grupos de genes correspondientes se encuentran en un único complejo, denominado *complejo HOM*; por lo tanto se piensa que los complejos Antennapedia y bithorax son las dos mitades de un único complejo HOM que se dividió en el curso de la evolución de la mosca. Cada gen homeótico selector tiene un dominio de actuación propio, definido por la región del cuerpo que queda afectada si se produce una mutación en este gen. Generalmente, el dominio tiene unos límites bien marcados desplazados de los límites de los segmentos convencionales aproximadamente medio segmento, lo que indica que el dominio es un parasegmento o un bloque de parasegmentos (véase Figura 21-50).

Muchas de las mutaciones de los genes selectores homeóticos tienen un fenotipo letal recesivo y sólo permiten que el embrión sobreviva poco tiempo a su nacimiento. En consecuencia son las observaciones efectuadas en embriones y larvas muy tempranas las que nos proporcionan la visión más clara y en algunos aspectos más completa de la función de los genes selectores homeóticos.

Las larvas que son deficientes en todos los genes del complejo bithorax tienen una estructura especialmente simple: la cabeza y el tórax son normales hasta el parasegmento P4, pero los 10 parasegmentos restantes se convierten en el

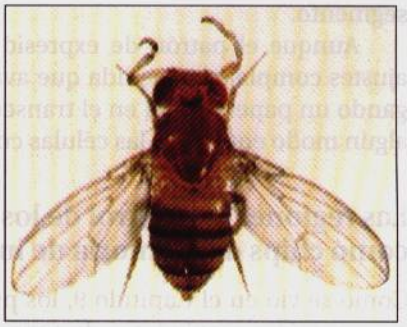


Figura 21-67 Mutación homeótica. La mosca que aquí se presenta es una mutante *Antennapedia*. Sus antenas se convierten en estructuras de pata debido a una mutación del gen *Antennapedia* que provoca su expresión en la cabeza. Compárese con la mosca normal que aparece en la Figura 21-47. (Cortesía de Matthew Scott.)

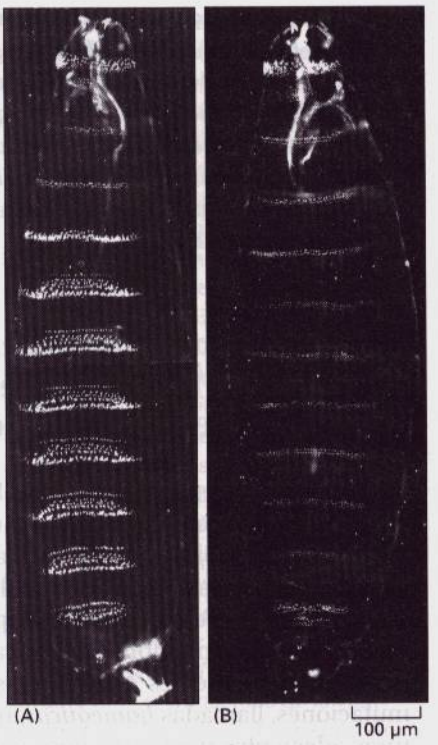


Figura 21-68 Consecuencias de la supresión de la mayoría de los genes del complejo bithorax. (A) Una larva normal de *Drosophila* observada con iluminación de campo oscuro; (B) la larva mutante en la que se ha suprimido la mayoría del complejo bithorax. En el mutante todos los parasegmentos posteriores a P5 tienen el aspecto de P5. (Cortesía de Gary Struhl; A, de *Nature* 293:36-41. © 1981 Macmillan Journals Ltd.)

carácter P4. Las supresiones parciales del complejo bithorax provocan transformaciones que son menos generales (Figura 21-68). Estas observaciones, y descubrimientos análogos en el complejo Antennapedia, ilustran la función fundamental de los genes selectores homeóticos respecto a la definición de las diferencias entre los parasegmentos: cuando se pierden estos genes, los parasegmentos no se diferencian unos de otros.

Los genes selectores homeóticos codifican un sistema de marcadores moleculares de dirección[50, 56]

Como los genes de segmentación, los genes selectores homeóticos se activan primero en el blastodermo. Desde que se clonó el DNA completo de los complejos Antennapedia y bithorax, disponemos de sondas de DNA que permiten establecer el mapa del patrón espacial de transcripción de cada uno de los genes selectores homeóticos, mediante hibridación *in situ*. Las conclusiones obtenidas de estos estudios son sorprendentes: según una primera aproximación, habitualmente cada gen homeótico selector se expresa en las regiones que se desarrollan con anomalías, por ejemplo debido a una mala colocación, si el gen está ausente o mutado.

De esta forma se puede considerar a los productos de los genes selectores como marcadores moleculares de dirección de las células de cada parasegmento. Si se cambian los marcadores de dirección, el parasegmento se comporta como si estuviera colocado en otro lugar. Debido a que los genes de segmentación contribuyen al control de la activación de los genes selectores homeóticos, el patrón de expresión del gen homeótico selector se sitúa en el mismo registro que los límites de los parasegmentos definidos por medio de los productos de genes de regla par y de polaridad del segmento. De esta forma la combinación del producto de un gen homeótico selector (o una suma de tales productos) con un conjunto de productos de genes de segmentación definirá con precisión una sola dirección, que únicamente tomarán las células de una subdivisión de un segmento.

Aunque el patrón de expresión de los genes selectores homeóticos sufre ajustes complejos a medida que avanza el desarrollo, estos genes continúan jugando un papel crucial en el transcurso del desarrollo posterior de la mosca. De algún modo equipan a las células con una memoria de su valor posicional.

Las regiones de control de los genes selectores homeóticos actúan como chips de memoria de información posicional[54, 57, 58, 59]

Como se vio en el Capítulo 9, los productos de los genes selectores homeóticos son proteínas reguladoras de genes, todos son homólogos entre sí y todos contienen una *secuencia homeobox* muy conservada que codifica un *homeodominio* de unión a DNA (de una longitud de 60 aminoácidos) en las proteínas correspondientes. Aunque muchos otros genes también contienen un homeobox, el tipo de secuencia homeobox encontrada en los genes selectores homeóticos es característica.

En los complejos de genes Antennapedia y bithorax existen ocho genes selectores homeóticos (a los que, por convenio, nos referiremos colectivamente como complejo HOM). Sus secuencias codificantes están repartidas en medio de una cantidad mucho mayor de DNA regulador –cerca de un total de 650 000

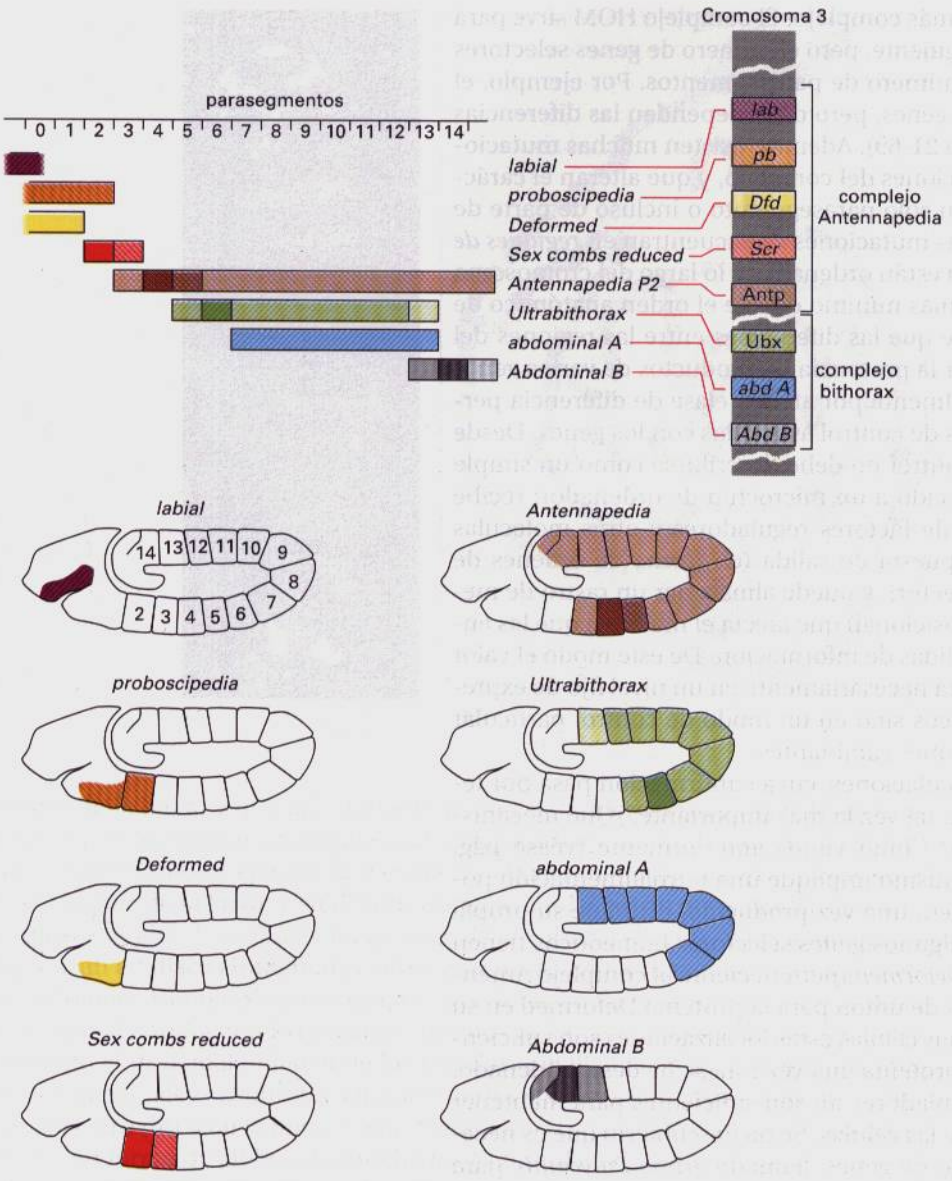


Figura 21-69 Comparación de los patrones de expresión y las localizaciones cromosómicas de los genes del complejo HOM. La secuencia de los genes en cada una de las dos subdivisiones del complejo cromosómico se corresponde con la secuencia espacial en que se expresan los genes. Obsérvese que la mayoría de los genes se expresan a un elevado nivel a través de uno de los parasegmentos (*color oscuro*) y a nivel menor en alguno de los parasegmentos adyacentes (*color intermedio*, cuando la presencia de los transcritos es necesaria en un fenotipo normal, *color claro* donde dicha presencia no lo es). En las regiones donde se solapan los dominios de expresión, normalmente el gen que determina el fenotipo local es el gen localmente activo más "posterior". Los diagramas en la parte baja de la figura representan los patrones de expresión génica de embriones en la fase de banda germinal extendida, aproximadamente 5 horas después de la fecundación.

pares de nucleótidos. Este DNA incluye localizaciones para la fusión de los productos de genes de polaridad del huevo y de genes de segmentación –como *bicoid, hunchback* y *even-skipped*. El DNA regulador del complejo HOM actúa como un intérprete de las muchas unidades de información posicional que le proporcionan todos estos factores, y, como respuesta ante ellos, decidirá si se transcribe un grupo determinado de genes selectores homeóticos o no. Sin embargo, todavía existen grandes incógnitas acerca del cómo se organiza el sistema de control HOM y cómo actúa.

Una característica notable es que la secuencia en la que los genes se ordenan a lo largo del cromosoma tanto en el complejo Antennapedia como en el bithorax, se corresponde casi exactamente con el orden en que los genes se expresan a lo largo del eje corporal (Figura 21-69). Es como si los genes fueran activados en serie por un proceso que se extiende cada vez más lejos a lo largo del cromosoma en proporción directa a un indicador intracelular de distancia, presente a lo largo del eje corporal. No está claro si estas órdenes son tan solo un accidente evolutivo o si realmente reflejan la implicación de algún mecanismo que se propaga a lo largo del cromosoma, aunque luego veremos que ésta es una característica del complejo HOM altamente conservado en el curso de la evolución.

Existe un rompecabezas todavía más complejo. El complejo HOM sirve para diferenciar cada parasegmento del siguiente, pero el número de genes selectores homeóticos es más pequeño que el número de parasegmentos. Por ejemplo, el complejo bithorax contiene sólo tres genes, pero de él dependen las diferencias entre 10 parasegmentos (véase Figura 21-69). Además, existen muchas mutaciones, que afectan a diferentes localizaciones del complejo, y que alteran el carácter anteroposterior de únicamente un solo parasegmento o incluso de parte de un parasegmento. La mayoría de estas mutaciones se encuentran en *regiones de control* no codificantes y que también están ordenadas a lo largo del cromosoma en una secuencia que imita hasta el más mínimo detalle el orden anatómico de las regiones que afectan. Esto sugiere que las diferencias entre las regiones del cuerpo no se definen únicamente por la presencia de productos de varios genes selectores homeóticos, sino más sutilmente por alguna clase de diferencia persistente en los estados de las regiones de control asociadas con los genes. Desde este punto de vista, una región de control no debe describirse como un simple interruptor sino como algo más parecido a un microchip de ordenador: recibe entradas de información (en forma de factores reguladores y otras moléculas que se unen a él), produce una respuesta de salida (en forma de órdenes de transcribir o no el gen homeótico selector), y puede almacenar un rastro de memoria (una unidad de información posicional) que afecta el modo en que las entradas de información calculan las salidas de información. De este modo el valor posicional de una célula no se reflejará necesariamente en un nivel fijo de expresión de los genes selectores homeóticos sino en un modo de control particular de este gen en respuesta a las condiciones cambiantes.

De momento todo esto son especulaciones, cuya confirmación pasa por tener respuesta a una tercera pregunta, tal vez la más importante: ¿Qué mecanismo mantiene el rastro de memoria? Como vimos anteriormente (véase pág. 1137) una posibilidad es que el mecanismo implique una retroalimentación positiva, en la que el producto de un gen, una vez producido, estimule su propia transcripción. Parece que al menos algunos genes selectores homeóticos tienen esta propiedad. Por ejemplo, el gen *Deformed* (perteneciente al complejo Antennapedia) tiene muchas localizaciones de unión para la proteína Deformed en su región de control superior, y en algunas células estas localizaciones son suficientes para mantener la actividad de la proteína una vez ésta se ha desencadenado. No obstante, estos efectos autoestimuladores no son suficientes para mantener el rastro de memoria en la mayoría de las células. Se ha descubierto que es necesario un conjunto adicional completo de genes, llamado *grupo Polycomb*, para mantener inactivos a los genes selectores homeóticos no expresados: si se inactiva cualquiera de los genes del grupo Polycomb mediante mutaciones, los genes selectores homeóticos se activan primero siguiendo un patrón normal, pero luego se activa de forma indiscriminada por todo el embrión (Figura 21-70A). La proteína Polycomb está unida a la cromatina de los genes que ella controla (Figura 21-70B). Además, parece ser que genes relacionados están implicados en otras regiones en el control de la estructura de cromatina, lo cual sugiere que alguna modificación persistente de la cromatina del complejo de genes HOM podría ser la transmisora de la memoria de valor posicional.

La mosca adulta se desarrolla a partir de un conjunto de discos imaginales que contienen información posicional[60]

En *Drosophila*, el patrón básico de expresión de los genes selectores homeóticos ya se establece en el embrión y no sólo determina la estructura de la larva, sino que todavía es capaz de determinar las estructuras de la mosca adulta. Para apreciar la función completa de estos genes como portadores de memoria posicional, es necesario tener una idea aproximada de la curiosa vía a través de la que se desarrolla la mosca adulta, o *imago*.

La mosca adulta se forma mayoritariamente a partir de grupos de células, denominadas células imaginales, que permanecen en un rincón de cada seg-

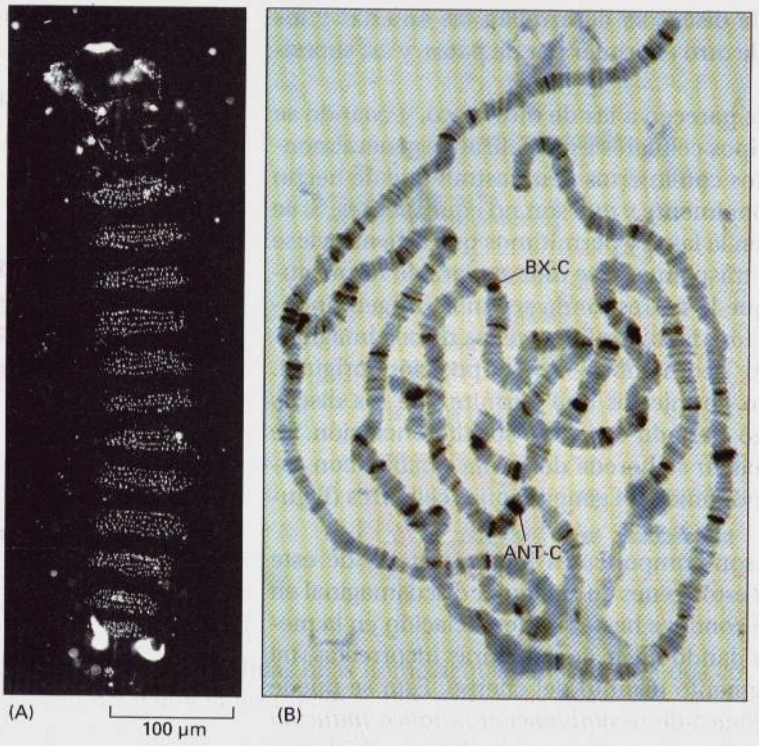


Figura 21-70 Actuación de genes del grupo Polycomb. (A) Fotografía de un embrión mutante que carece de un gen *extra sex combs (esc)* y que desciende de una madre que también carecía de este gen. El gen pertenece al grupo Polycomb. Prácticamente todos los segmentos se han transformado pareciéndose al más posterior de los segmentos abdominales (compárese con Figura 21-68). En el mutante, el patrón de expresión de los genes selectores homeóticos, que inicialmente era casi normal, es inestable de una forma tal que pronto todos los genes situados a lo largo del eje corporal intercambiarán posiciones. (B) Visualización del patrón que normalmente rige la unión de la proteína Polycomb a los cromosomas gigantes de *Drosophila* por medio de un anticuerpo contra Polycomb. La proteína se une al complejo Antennapedia (ANT-C) y al complejo bithorax (BX-C) así como a 60 localizaciones más.(A, según G. Struhl, *Nature* 293:36-41, 1981. © 1981 Macmillan Journals Ltd; B, cortesía de B. Zink y R. Paro, de R. Paro, *Trends Genet.* 6:416-421, 1990.)

mento de la larva, y que aparentemente no están diferenciadas. El origen de la mayoría de las células imaginales del cuerpo adulto se encuentra en la epidermis embrionaria –el epitelio que envuelve al cuerpo. Permanecen conectadas a la epidermis de la larva, y su destino será formar las estructuras epidérmicas de la mosca adulta. Las células imaginales de la cabeza, el tórax, y los genitales se organizan en **discos imaginales**; otros grupos de células imaginales constituirán el abdomen. También existen grupos de células imaginales en las visceras de la larva que darán lugar a los órganos internos de la mosca. Los discos imaginales han sido el principal objetivo de los estudios detallados en este ámbito. Hay 19 discos imaginales, dispuestos en nueve pares situados en sendos lados de la larva, más otro disco en la línea media (Figura 21-71). Los discos son bolsas de epitelio, con forma de globos deshinchados y apretujados, que se evaginan (se despliegan desde el interior hacia el exterior), se extienden y se diferencian durante

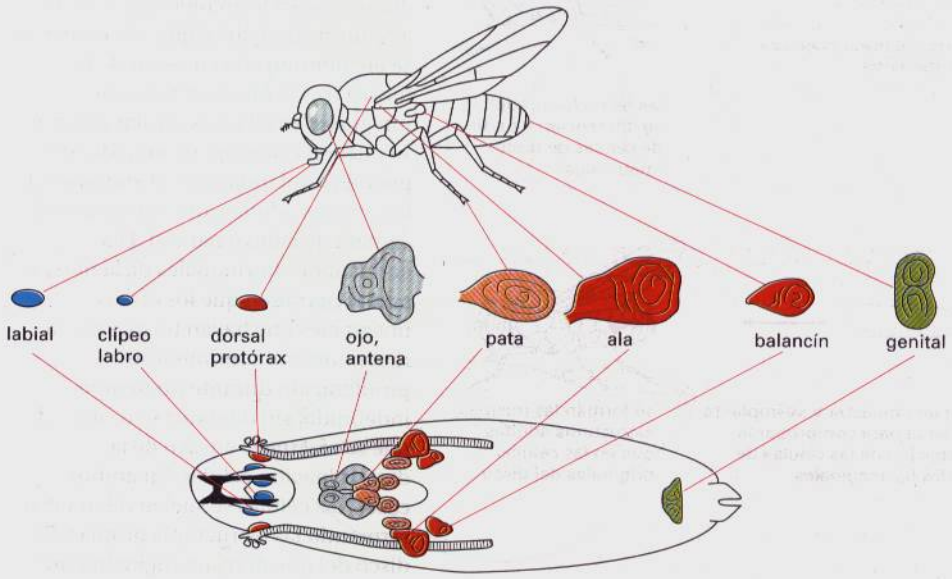


Figura 21-71 Los discos imaginales de la larva de *Drosophila* y las estructuras adultas a que dan lugar. (Según J.W. Fristrom et al., en Problems in Biology: RNA in Development [E.W. Hanley,ed.], p. 382. Salt Lake City: University of Utah Press, 1969.)

la metamorfosis. A partir de un par de discos se desarrollan las antenas y los ojos, de otro las alas y parte del tórax, de otro el primer par de patas, y así sucesivamente.

Las células de un disco imaginal se parecen a las de otro disco, y cuando se diferencian, dan lugar a conjuntos de tipos celulares especializados generalmente bastante similares. Pero experimentos con injertos demuestran que de hecho las células ya están determinadas regionalmente y que son no equivalentes. Si se substituye un disco imaginal por otro en la larva y permitimos que ésta atraviese la metamorfosis, veremos que el disco trasplantado se diferenciará de forma autónoma, y dará lugar a la estructura que le corresponde según su origen, independientemente de su nueva localización. Esto implica que los discos imaginales están controlados por algún tipo de memoria de su posición original. Mediante un ingenioso procedimiento de injertos que permite que los discos imaginales proliferen durante un largo período antes de su diferenciación, se puede demostrar que esta memoria celular se hereda de forma estable (con escasos errores) a través de un número indefinido de generaciones celulares (Figura 21-72).

Los genes selectores homeóticos son componentes fundamentales de este mecanismo de memoria. Si se eliminan estos genes de cualquier disco imaginal en cualquier estadio del largo período que conduce hasta la diferenciación en la metamorfosis, las células se diferenciarán dando lugar a estructuras incorrectas, tal como harían si pertenecieran a un segmento distinto del cuerpo. Esto se puede demostrar gracias a la poderosísima técnica de *recombinación mitótica inducida por rayos X* –de hecho, una especie de cirugía genética para células individuales que posibilita la generación de clones mutantes de un genotipo determinado en cualquier momento del desarrollo, tal como veremos a continuación.

Los genes selectores homeóticos son esenciales para la memoria de la información posicional de las células de los discos imaginales[61]

Una breve exposición a la radiación con rayos X puede provocar, como efecto secundario al daño causado en el DNA, un entrecruzamiento entre cromosomas homólogos de una célula en división –normalmente, dicho entrecruzamiento sólo se produciría en la meiosis. Como ilustra la Figura 21-73, si la célula es heterozigota por un gen de la región del entrecruzamiento cromosómico, es posible que el re-

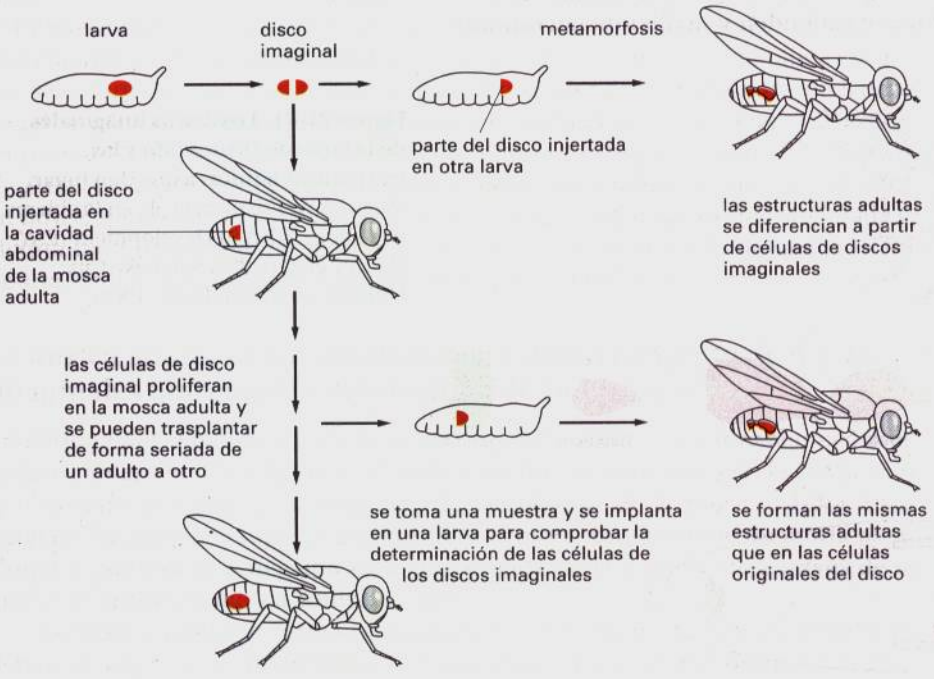


Figura 21-72 Experimentos que permiten comprobar el estado de determinación de las células de los discos imaginales. El método de ensayo consiste en implantar células en la larva que está a punto de sufrir metamorfosis; las células se diferenciarán formando estructuras adultas reconocibles que, sin embargo, se encuentran en el interior de la mosca tras la metamorfosis sin integrarse en ella. Las células del disco se pueden examinar de inmediato o pueden implantarse en el abdomen de las moscas adultas, que servirán como cámara de cultivo natural. Las condiciones hormonales de la mosca adulta permiten que los discos imaginales que hayan traspasado la metamorfosis continúen su proliferación durante un tiempo indefinido, sin diferenciarse, antes de que se efectúe el ensayo de la determinación celular. En ambos casos, las células se suelen diferenciar formando las estructuras propias del disco del que derivan originalmente.

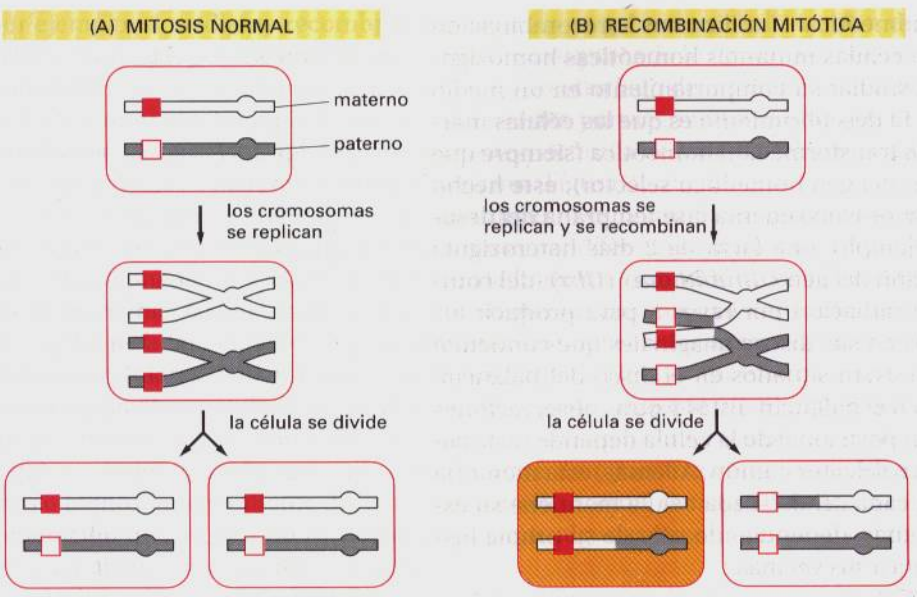


Figura 21-73 Comparación de la recombinación mitótica (B) con la mitosis normal (A). Los diagramas siguen el destino de un solo par de cromosomas homólogos, uno procedente del padre (*sombreado*) y otro procedente de la madre (*no sombreado*). Estos cromosomas contienen un locus para un gen de pigmentación (u otro gen de marcaje) con un alelo *A* de tipo salvaje (un pequeño *cuadrado blanco* en el cromosoma paterno) y un alelo *a* con mutación recesiva (un pequeño *cuadrado rojo* en el cromosoma materno) de modo que una célula homozigota *A/A* o heterozigota *A/a* tiene un aspecto normal (ilustrado en *blanco*) y una célula homozigota *a/a* presenta un aspecto alterado (ilustrado en *naranja*). La recombinación por intercambio de DNA entre cromosomas maternos y paternos puede dar lugar a un par de células hijas, una homozigota *A/A* y consecuentemente de aspecto normal y la otra *a/a* y por lo tanto visiblemente diferente. La recombinación mitótica es un accidente raro que ocurre sin la intervención del aparato especializado que facilita la recombinación durante la meiosis. Una breve exposición a rayos X provoca una mayor frecuencia de recombinaciones.

sultado del proceso sea un par de células hijas homozigotas: una recibirá dos copias del alelo materno del gen y la otra recibirá dos copias del alelo paterno. La coincidencia del entrecruzamiento se puede detectar si el animal escogido también es heterozigoto para una mutación en un gen de marcaje –por ejemplo, un gen de pigmentación– que se encuentre cerca del gen que nos interesa, de forma que ambos sufran juntos el entrecruzamientos. De esta manera, se pueden generar "a medida" clones de células mutantes homozigotas marcadas (Figura 21-74).

Las consecuencias más importantes de las mutaciones en los genes selectores homeóticos acostumbran a ser recesivas: sólo en el organismo homozigoto

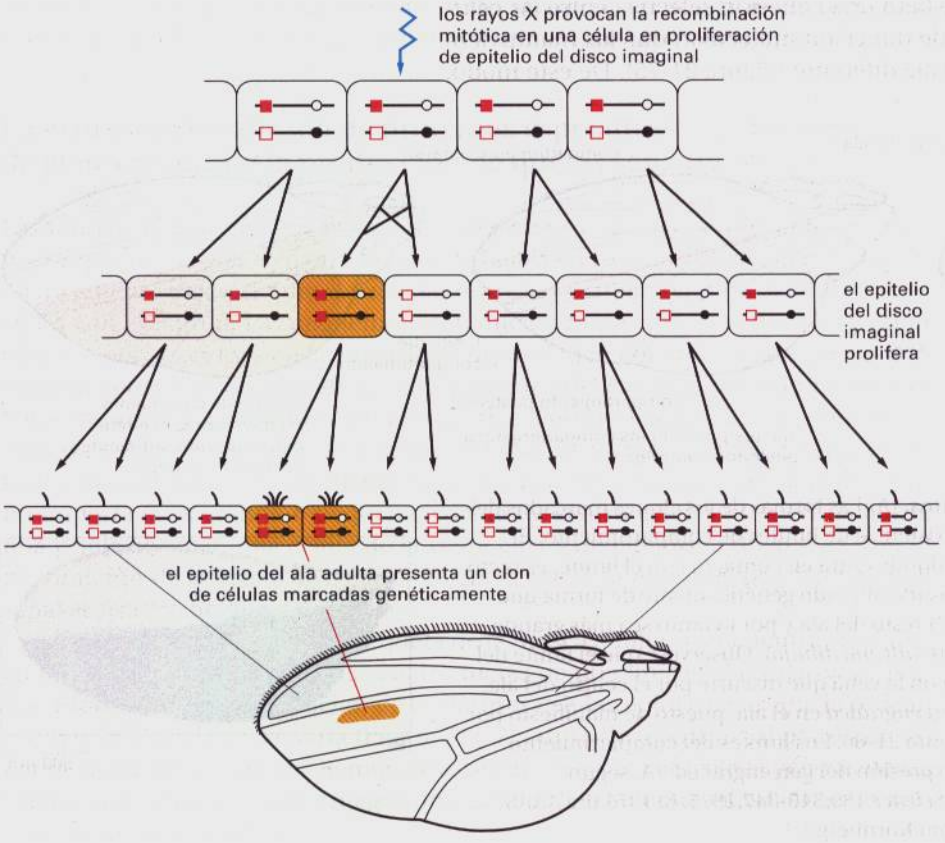
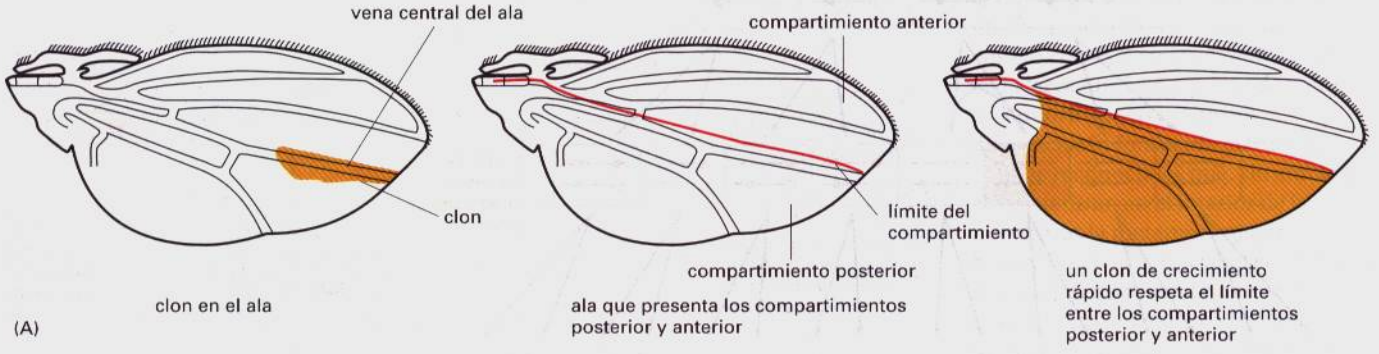


Figura 21-74 La utilización de la recombinación mitótica para generar un clon de células mutantes marcadas genéticamente en el ala de *Drosophila*. Cuanto más temprano sea el estadio en que ocurra la recombinación, mayor será el clon resultante.

mutante es visible la transformación homeótica. Si utilizamos la recombinación mitótica podremos generar un clon de células mutantes homeóticas homozigotas marcadas en un disco imaginal y estudiar su comportamiento en un medio heterozigoto, con un fenotipo normal. El descubrimiento es que las células marcadas, y sólo las marcadas, presentan la transformación homeótica (siempre que estén situadas en el dominio de acción del gen homeótico selector); este hecho se produce tanto si la recombinación se provocó en una fase temprana del desarrollo como en una fase tardía. Por ejemplo, una larva de 2 días heterozigota para una mutación que elimina la función del gen *Ultrabithorax (Ubx)* (del complejo bithorax), puede ser tratada con radiación por rayos X para producir los clones aislados de células homozigotos en sus discos imaginales que contienen gen *Ubx* no funcional. Estos clones, si están situados en el disco del balancín, darán lugar a parches de tejido del ala en el balancín. Estas y otras observaciones indican que la memoria de información posicional de la célula depende de la actividad continuada de un gen homeótico selector común. Además, esta memoria se expresa de forma independiente en cada célula –cada célula mantiene su estado de forma independiente de las demás, dependiendo sólo de su propia historia y de su genoma, sin tener en cuenta a sus vecinas.

Los genes selectores homeóticos y los genes de polaridad del segmento definen los compartimientos del cuerpo[53, 62]

Las diferencias recordadas definidas por los genes selectores homeóticos son discretas: existe una gran diferencia en la expresión génica en células situadas en parasegmentos adyacentes. Lo mismo ocurre con algunos de los genes de polaridad, como *engrailed* (véase Figura 21-66), cuyas diferencias en la expresión se corresponden con la gran diferencia existente entre células situadas en la parte posterior del parasegmento y las situadas en la parte anterior. Así pues, por medio de la expresión diferente de estos dos tipos de genes, el cuerpo se subdivide en una serie de regiones discretas que constan de células en diferentes estados de determinación. En la frontera entre una región y la siguiente parece que las células no pueden mezclarse, como si existiera una cohesión selectiva entre las células que contienen el mismo marcaje de dirección molecular, que las mantuviera segregadas de las células con un marcaje diferente (Figura 21-75). De este modo,



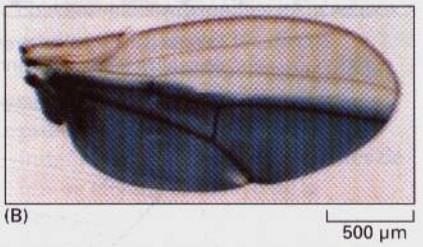


Figura 21-75 Compartimientos. (A) Las formas de los clones marcados del ala de *Drosophila* revelan la existencia de límites de compartimiento. El borde de cada clon marcado, donde entra en contacto con el límite, es recto. Incluso si un clon marcado ha sido alterado genéticamente de forma que crezca más rápidamente que el resto del ala y por lo tanto sea más grande, este clon respetará dicho límite (*último dibujo*). Obsérvese que el límite del compartimiento no coincide con la vena que discurre por el centro del ala. (B) Patrón de expresión del gen *engrailed* en el ala, puesto de manifiesto por la misma técnica que en la Figura 21-66. Los límites del compartimiento coinciden con los límites de expresión del gen engrailed. (A, según F.H.C. Crick y P.A. Lawrence, *Science* 189:340-347,1975. © 1975 the AAAS; B, cortesía de Cory Hama y Tom Kornberg.)

por ejemplo, si mediante recombinación mitótica se genera en el ala un clon de células marcadas genéticamente, aunque normales por todo lo demás, se observa que el clon está estrictamente restringido a uno u otro lado de un límite marcado de forma muy precisa en la frontera entre los dos parasegmentos en los que se construyen las alas. Una subdivisión del cuerpo definida de esta manera en el ala o en otro órgano se denomina **compartimiento** (Figura 21-75).

Por definición, el límite de un compartimiento es la frontera existente entre dos poblaciones de células que, debido a presentar diferentes estados de diferenciación, no pueden mezclarse. Como el estado de determinación normalmente no es reversible, cada compartimiento tiene que ser una unidad autosuficiente. No puede reclutar células de los compartimientos adyacentes ni transferirles excedentes celulares. Sin embargo, puede regular su organización interna y su tamaño según el principio de intercalación, visto anteriormente, mediante reajustes que no violan esta limitación. Así pues, en relación a la regulación del patrón y del crecimiento, cada compartimiento parece comportarse como un módulo más o menos independiente durante el desarrollo normal (aunque durante la regeneración que sigue a un trastorno importante algunas veces alteran su carácter y sus alianzas de compartimiento).

Algunas de las señales morfogénicas que actúan en el disco imaginal controlando estos procesos, han sido identificadas. Parece ser que incluyen productos de los genes *dpp* y *wingless*, que, como sabemos, son activos en el modelaje del embrión temprano (véase Figura 21-56). Pero todavía no sabemos en términos de genética molecular cómo se organizan estos sistemas de señales o cómo colaboran con los genes selectores homeóticos proporcionando a cada compartimiento su patrón interno característico y haciendo que detenga su crecimiento una vez haya alcanzado el tamaño adecuado.

De este modo, si seguimos las vías genéticas de formación de patrones hasta estadios cada vez más avanzados y detallados, llegaremos a un punto donde la cadena de causa-efecto se desvanece. No obstante, en el último estadio del proceso, mientras las células se preparan para la diferenciación final, se puede retomar la pista, y podemos establecer los mecanismos genéticos que controlan algunos de los detalles más minúsculos del modelaje de la superficie del cuerpo de la mosca, tal como muestra la distribución de sus *quetas sensitivas*.

La expresión localizada de proteínas específicas reguladoras de genes antecede la producción de quetas sensitivas[63]

Las moscas tienen muchas quetas repartidas por todo su cuerpo –unas grandes y otras pequeñas. Las mayores actúan de baliza en la superficie de la mosca: son relativamente escasas, muy espaciadas entre sí y ocupan unas posiciones predecibles con exactitud. Las pequeñas están mucho más cerca unas de otras y están dispuestas en regiones de la superficie corporal bien definidas. Estas quetas son órganos sensitivos en miniatura –componentes del sistema nervioso periférico. Unas responden a estímulos químicos, otras a estímulos mecánicos, pero todas ellas han sido construidas de forma parecida. Su estructura puede verse en su forma más simple y estereotipada, la *queta mecanosensorial*. Cada una de ellas, no importa si es grande o pequeña, consta de cuatro células: una célula lanza, una célula alveolar, una célula de la vaina glial y una neurona (Figura 21-76). El movimiento de la célula alveolar de la queta excita la neurona, que enviará una señal al sistema nervioso central.

El origen de las células de la queta de la mosca adulta se encuentra en el disco imaginal epitelial, siendo las cuatro nietas de una única *célula sensorial madre*. Estas células se diferencian de las futuras células epidérmicas que la rodean durante la última fase larvaria (Figura 21-77). Antes de referirnos al patrón de diferenciación de las quetas, hemos de explicar cómo se controla la génesis de las células sensoriales madre, y luego cómo se diferencian entre ellas las cuatro nietas de esta célula madre.

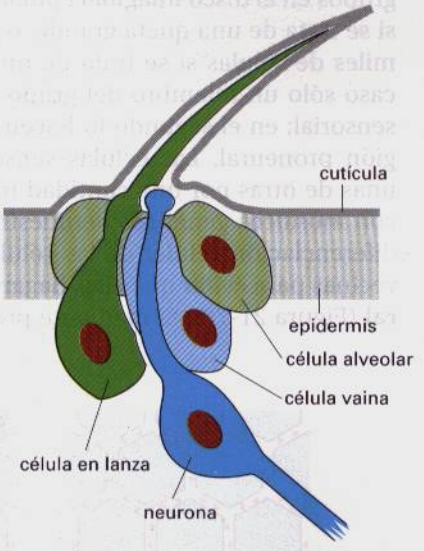


Figura 21-76 Estructura básica de una queta mecanosensorial. Diagrama que representa las cuatro células de la queta.

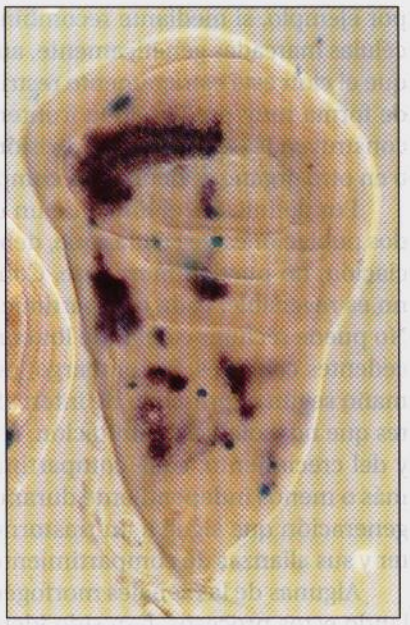


Figura 21-77 Células madre sensoriales del ala del disco imaginal. Las células madre sensoriales (aquí *azuladas*) se ponen de manifiesto con facilidad en esta muestra especial de *Drosophila*, que contiene un gen marcador artificial *lacZ* que, por casualidad, se ha insertado en el cromosoma colindante a una región de control, lo cual provoca su expresión selectiva en los genes sensoriales madre. Animales como éste nos proporcionan una vía de detección y de estudio de regiones de control específicas del genoma –la llamada técnica *enhancer-trap, activación-caza*. La tinción *púrpura* nos muestra el patrón de expresión del gen *scute*; ello antecede la producción de las células sensoriales madre y desaparece progresivamente a medida que las células se desarrollan. (Según P. Cubas, J.-F. de Celis, S. Campuzano y J. Modolell, *Genes Dev.* 5:996-1008, 1991.)

Hay dos genes, denominados *achaete* y *scute*, cruciales en el inicio de la formación de quetas en el disco imaginal epitelial. Estos genes tienen funciones similares que a menudo se solapan, y codifican proteínas reguladoras de genes de la clase hélice-bucle-hélice estrechamente emparentadas entre sí (estudiadas en el Capítulo 9). Ambos genes pertenecen a un grupo de genes homólogos muy relacionados, todos del *complejo achaete-scute*. La hibridación *in situ* demuestra que la expresión de *achaete* y *scute* se produce exactamente en las regiones en las que se formarán las quetas. Las mutaciones que eliminan la expresión de estos genes en algunas de sus localizaciones habituales bloquean el desarrollo de quetas precisamente en estas mismas zonas. Las mutaciones que provocan la expresión en localizaciones adicionales y extrañas causan la aparición de quetas en estas regiones no habituales. Pero la expresión de los genes *achaete* y *scute* es transitoria, y sólo una minoría de las células que inicialmente los expresan se convertirán en células sensoriales madre; las demás se convertirán en células epidérmicas típicas. El estado que se define mediante la expresión de *achaete* y *scute* se denomina *proneural*. Las células proneurales están preparadas para tomar la vía de diferenciación neurosensorial, pero esto depende de interacciones competitivas entre ellas, por lo que no todas lo consiguen.

La inhibición lateral regula el patrón detallado de tipos celulares diferenciados[63, 64]

Las células proneurales, que expresan *achaete, scute* o ambos, están situadas en grupos en el disco imaginal epitelial –un pequeño grupo de menos de 30 células si se trata de una queta grande, o un grupo amplio y uniforme de centenares o miles de células si se trata de una región con quetas pequeñas. En el primer caso sólo un miembro del grupo de células se convierte en una célula madre sensorial; en el segundo lo hacen muchas de las células distribuidas por la región proneural. Las células sensoriales madre casi siempre están separadas unas de otras por una cantidad mínima de células epidérmicas. Experimentos con mosaicos genéticos demuestran que todas las células que toman la vía de diferenciación celular de las células sensoriales madre envían una señal a sus vecinas para evitar que ellas hagan lo mismo; esto se denomina **inhibición lateral** (Figura 21-78). Si mediante procedimientos genéticos impedimos a una cé-

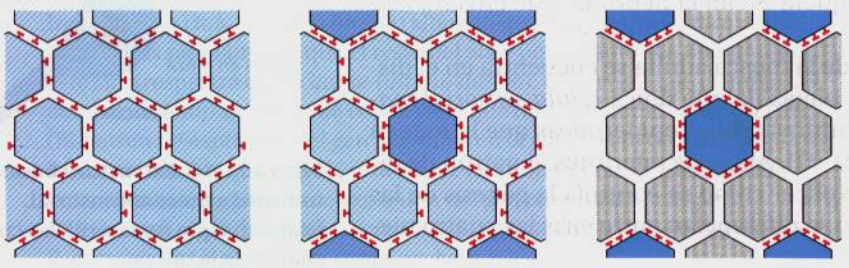


Figura 21-78 Inhibición lateral. Inicialmente todas las células de la muestra son equivalentes; todas tienden a desarrollarse como células sensoriales madre, y cada una envía una señal inhibidora a sus vecinas para que no sigan esta vía de diferenciación. Ello genera una situación altamente competitiva. En cuanto una célula toma ventaja en la competencia, esta ventaja se magnifica. Cuanto más cerca está la célula vencedora de diferenciarse como madre sensorial, mayor será la inhibición que padecen sus vecinas, y éstas, por el contrario, a medida que pierden su capacidad para convertirse en una célula sensorial también perderán su capacidad de inhibir a otras células. Así pues, la inhibición lateral conduce a las células adyacentes a destinos diferentes; es decir todo lo contrario del efecto comunitario tratado en la pág. 1138.

Figura 21-79 Consecuencias de la inactivación de la inhibición lateral. La fotografía muestra parte del tórax de una mosca que contiene una porción mutante (generada por una recombinación mitótica inducida por rayos X) en la que el gen neurogénico *Delta* ha sido parcialmente inactivado. La reducción de la inhibición lateral ha provocado que casi todas las células de la porción mutante (*en el centro de la fotografía*) se desarrollen como células sensoriales madre, lo que produce un gran exceso de quetas sensoriales en esta zona. Las zonas constituidas por células mutantes que contengan mutaciones más extremas, con pérdida completa de la inhibición lateral, aparentemente no forman quetas, debido a que toda la progenie de células sensoriales madre se desarrollará como neuronas en lugar de diversificarse formando tanto las neuronas como las partes externas de la estructura de la queta. (Cortesía de Patricia Simpson.)

lula que se convierta en una célula sensorial madre, una de las células proneurales circundantes, liberada de la inhibición lateral, se convertirá en célula madre en su lugar.

Fue en estudios de embriones mutantes donde se identificaron por primera vez los genes responsables de la inhibición lateral. Ya en el embrión, tanto el complejo achaete-scute como los genes de la inhibición lateral, controlan el desarrollo del sistema nervioso central y periférico, justo del mismo modo en que luego controlarán el desarrollo de los órganos sensoriales del sistema nervioso periférico en los discos imaginales. En ambos casos, las mutaciones que eliminan la inhibición lateral causan un efecto simple y sorprendente: se producen grandes cantidades de células neuronales a expensas de células epidérmicas (Figura 21-79). Generalmente se denomina a los genes según su fenotipo mutante; he aquí por qué los genes responsables de la inhibición lateral reciben la confusa denominación de **genes neurogénicos**. Forman un sistema genético de al menos siete miembros.

El gen neurogénico más conocido se llama *Notch*. Codifica una proteína transmembrana cuya posible función es la de actuar como receptora de la señal de inhibición lateral. Experimentos con mosaicos genéticos demuestran que las células que carecen de *Notch* no responden a la señal y prosiguen la vía de diferenciación neuronal. Parece ser que otra proteína transmembrana relacionada codificada por el gen neurogénico *Delta* es una proteína ligando que se une a *Notch* y lo activa; al parecer, la inhibición lateral se transmite por medio de contactos célula-célula. Por debajo de *Notch*, actúan intracelularmente los productos de otros genes neurogénicos que interpretan la señal y suprimen la diferenciación neural.

Puede demostrarse que este mismo mecanismo de inhibición lateral dependiente de *Notch* actúa por duplicado en la formación de las quetas –primero, obligando a las vecinas de las células sensoriales madre a seguir una vía de diferenciación distinta, convirtiéndose así en células epidérmicas, y segundo, haciendo que las cuatro nietas de la célula madre sigan vías de diferenciación distintas dando lugar a los cuatro componentes de la queta. En ambos casos la vía por defecto es la neural y la inhibición lateral proporciona una interacción competitiva que obliga a que las células adyacentes se diferencien de maneras distintas.

Este mismo conjunto de genes neurogénicos no sólo media en la inhibición lateral tantas veces como sea necesario durante el desarrollo del sistema nervioso, sino que también es imprescindible durante el modelaje detallado de muchos otros tejidos de la mosca. De hecho, la inhibición lateral es una estrategia crucial para el control de los patrones de diferenciación pluricelulares de todo el mundo animal, y seguramente también del mundo vegetal; los tipos de patrones de diferenciación que puede generar son múltiples, desde el estoma de una hoja a los fotorreceptores oculares. En los vertebrados se han encontrado genes homólogos de los genes neurogénicos, por lo que es probable que conserven los mismos mecanismos moleculares, y que éstos actúen al menos en algunos de

estos casos. En la parte final de este apartado consideramos hasta qué punto *Drosophila* es un modelo universal para la genética molecular del patrón de formación.

Los genes de control de desarrollo de *Drosophila* tienen homólogos en los vertebrados[65]

La teoría de la evolución nos dice que todos los animales son primos nuestros. Es bastante fácil apreciar parecidos familiares del ser humano con un ratón, o incluso con un pez, y establecer homologías entre partes de su cuerpo y del nuestro. Pero si nos comparamos con moscas o gusanos, de los cuales nos separamos hace aproximadamente 600 millones de años, las correspondencias no están tan claras. Es cierto que podemos reconocer algunos tipos celulares familiares –como neuronas, células musculares estriadas o espermatozoides. Con un grado de coincidencia menor se pueden apreciar similitudes en el plano corporal, con el intestino en el centro y la cabeza en un extremo. ¿Pero hasta dónde llegan estas similitudes? Aunque los fósiles no han proporcionado ninguna respuesta clara al respecto, la genética molecular ha comenzado a hacerlo.

Las comparaciones de secuencias génicas ponen de manifiesto que una proporción sorprendentemente amplia de los genes de un animal como la mosca tienen, de modo inconfundible, homólogos en vertebrados, y viceversa. Tales analogías han sido comprobadas para la mayoría de los genes de control de desarrollo que hemos mencionado en el transcurso de este capítulo. ¿Pero se usan estos genes de control con las mismas combinaciones y para propósitos homólogos, de forma que se conserva el mismo sistema genético de control del desarrollo? Al comparar un ser humano con una mosca, las diferencias que apreciaremos de entrada parecen fundamentales, tanto en el desarrollo como en la estructura final. Por ejemplo, los huevos de los vertebrados no atraviesan un estadio sincitial como hacen los insectos, y por lo tanto su modelaje pluricelular inicial no puede controlarse por medio de gradientes morfogénicos como Bicoid de *Drosophila*, establecido mediante la difusión intracelular de una proteína a través del citoplasma compartido por muchos núcleos. Y todavía más, cuando nos fijamos en estadios un poco más avanzados, encontramos un patrón considerable de correspondencias anatómicas. Sin la ayuda de la genética molecular nunca habríamos podido discernir esta cuestión. La genética molecular nos revela en animales muy diferentes la presencia de marcas posicionales señal parecidas que se expresadas en partes del cuerpo que de otra manera nunca podríamos haber considerado que tuvieran nada en común. El complejo génico HOM ha sido fundamental en la elaboración de esta nueva visión sobre nuestra relación con moscas y gusanos.

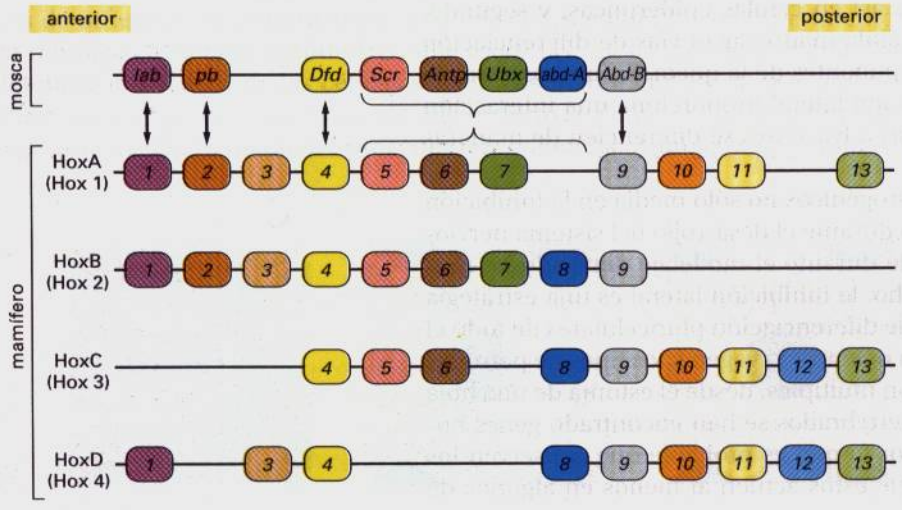


Figura 21-80 Comparación entre el complejo HOM de un insecto y los complejos Hox de un mamífero. La línea superior ilustra la distribución de los genes de los complejos Antennapedia y bithorax de *Drosophila*; a continuación se muestran los genes correspondientes a los cuatro complejos Hox de un mamífero (ratón o humano), también en su distribución cromosómica. Los genes que presentan un predominio anterior en los dominios de expresión están dispuestos en la parte izquierda, y los que presentan un predominio posterior en los dominios de expresión están dispuestos en la parte derecha. Los cinco complejos están alineados de modo que los genes con secuencias más parecidas estén en la misma columna. Se cree que los complejos han sufrido la siguiente evolución: primero, en algún ancestro común a gusanos, moscas y vertebrados, un único gen selector homeótico primordial sufrió una duplicación repetida formando una serie de tándems de estos genes –un complejo HOM. En el sublinaje de *Drosophila* este complejo único se dividió en dos complejos separados, Antennapedia y bithorax, mientras que en el linaje que conduce a los mamíferos se replicó repetidamente dando lugar a los cuatro complejos Hox. Así pues, el gen *labial (lab)* de *Drosophila* es identificable por medio de su subsecuencia como equivalente de *Hoxa-1*, *Hoxb-1* y *Hoxd-1*; el gen *proboscipedia (pb)* es el equivalente de *Hoxa-2* y *Hoxb-2*; y así sucesivamente. Aparentemente, el paralelismo no es perfecto debido a algunos genes individuales se han duplicado y otros se han perdido tras la divergencia de los cromosomas. (Basado en M.P. Scott, *Cell* 71:551-553, 1992. © Cell Press.)

Los mamíferos tienen cuatro complejos HOM homólogos[59, 66]

Debido a que el homeodominio de los genes selectores homeóticos ha sido muy conservado durante la evolución, ha sido relativamente fácil descubrir homólogos de los genes de *Drosophila* en otras clases de animales. Éstos se han encontrado en prácticamente todos los tipos de criaturas –en *Hydra*, en nemátodos y gusanos de tierra, en escarabajos, moluscos y erizos de mar, en peces, en ranas, en pájaros y en mamíferos. Cabe destacar que en los casos en que se ha investigado adecuadamente, resulta que estos genes se agrupan en complejos parecidos al complejo HOM de los insectos. En el ratón encontramos cuatro complejos de este tipo –denominados complejos HoxA, HoxB, HoxC y HoxD– cada uno de los cuales se halla en un cromosoma distinto. Los genes individuales de cada complejo pueden reconocerse por sus secuencias homeobox, como homólogos de miembros específicos del conjunto de genes de *Drosophila*. Al parecer cada uno de los cuatro complejos Hox en los mamíferos es, sin entrar en detalles, el equivalente de un complejo HOM completo de insecto (es decir, un complejo Antennapedia más un complejo bithorax) (Figura 21-80). La distribución de los genes en el interior de cada secuencia Hox es básicamente la misma que en el complejo HOM en los insectos, lo cual sugiere que el origen de los cuatro complejos vertebrados radica en las duplicaciones de un único complejo primordial y que su distribución básica se ha conservado. Cuando se examinan los patrones de expresión de genes Hox de los embriones de los vertebrados mediante hibridación *in situ*, resulta que los miembros de cada complejo se expresan en series de la cabeza a la cola al lo largo del eje corporal, como en el caso de *Drosophila* (Figura 21-81). El patrón es más fácil de observar en el tubo neural. Salvo escasas excepciones, este orden anatómico encaja con la distribución cromosómica de genes en cada complejo, y los genes correspondientes en los cuatro complejos Hox tienen los dominios de expresión anteroposteriores prácticamente idénticos.

Los dominios de expresión génica definen un sistema detallado de correspondencias entre las regiones del cuerpo de los insectos y las regiones del cuerpo de los vertebrados. Como muestra la Figura 21-82, los parasegmentos de la mosca se corresponden a series de segmentos de la parte anterior del embrión de vertebrados marcados de forma parecida. En el cerebro posterior esta serie de segmentos se denominan *rombómeros*. Los tejidos colaterales al cerebro posterior presentan la segmentación en series de *arcos branquiales*, prominentes en todos los embriones de vertebrados –los precursores del sistema de branquias de los peces y de las mandíbulas y las estructuras del cuello en los mamíferos; cada par de rombómeros del cerebro posterior corresponde a un arco branquial (véase Figura 21-82). En el cerebro posterior, igual que en *Drosophila*, los límites de los dominios de expresión de los genes Hox se alinean con los límites de los segmentos anatómicos. Y al igual que en los compartimientos de *Drosophila*, las células de un rombómero no se mezclan con las del rombómero siguiente.

Sin embargo, todavía no está claro hasta qué punto se parecen los detalles de los mecanismos que establecen la segmentación del cerebro posterior y del arco branquial de un vertebrado y los que generan los parasegmentos de un in-

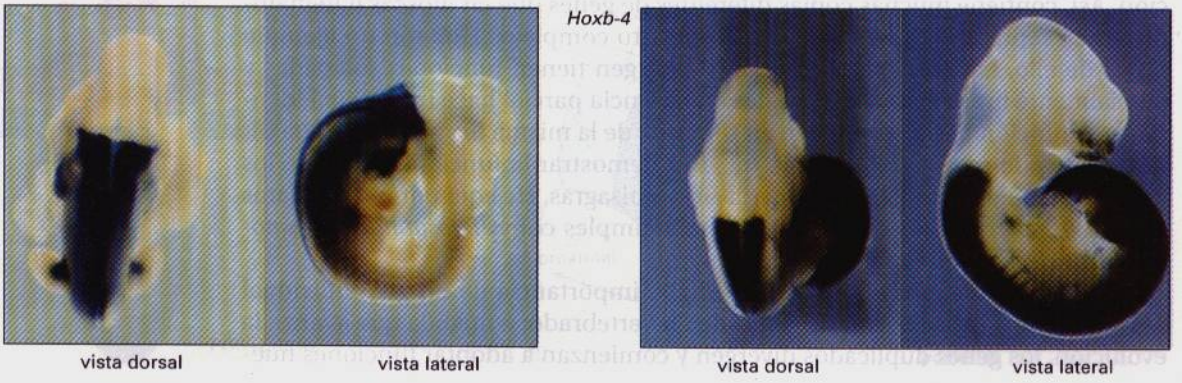


Figura 21-81 Dominios de expresión de los genes Hox en un ratón. Las fotografías muestran en embriones enteros los dominios de expresión de genes del complejo HoxB (mancha *azul*). Los dominios de expresión se visualizan gracias a la hibridación *in situ* o, como en estos ejemplos, generando un ratón transgénico que contiene la secuencia de control del gen Hox acoplada a la secuencia de la β-galactosidasa, cuya presencia se detecta por marcaje histoquímico. Cada gen se expresa en una larga extensión de tejido con un límite anterior bien definido. Cuanto más anterior sea la posición del gen en su complejo cromosómico, más anterior será el límite anatómico de su expresión. De este modo, salvo pequeñas excepciones, los dominios anatómicos de genes sucesivos forman un conjunto ordenado, distribuido según el orden de los genes en el complejo cromosómico. (Cortesía de Robb Krumlauf.)

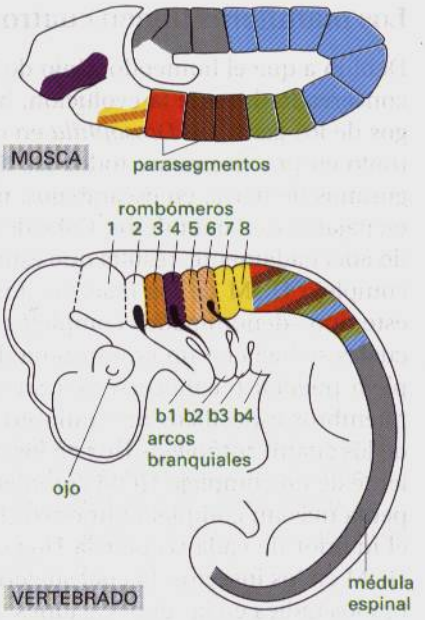


Figura 21-82 Correspondencias entre las regiones del cuerpo de un insecto y las de un vertebrado, como definen los genes de expresión HOM y Hox. Representación de un embrión de *Drosophila* en el estadio de banda germinal, con sus parasegmentos coloreados de acuerdo con los genes HOM que expresan. El código de colores es el mismo que en la Figura 21-80, y también es el mismo para el patrón de expresión del gen HoxB del tubo neural de un embrión de vertebrado. Para simplificar, no se ilustra la expresión de los otros tejidos del vertebrado. En las regiones en que los dominios de expresión de dos o más genes HOM/Hox se solapan, la coloración de los genes corresponde al más "posterior" de los genes expresados, tanto en la mosca como en el vertebrado. Los puntos que presenten la coincidencia de varios límites de expresión de genes distintos aparecerán rayados. Obsérvese que de igual forma que los dominios de expresión de la mosca están relacionados con los parasegmentos, los dominios de expresión de los vertebrados están relacionados con los rombómeros (segmentos del cerebro posterior). Cada par de rombómeros se asocia con un arco branquial (un rudimento branquial modificado), al que transmite inervación. El patrón de expresión de los genes Hox en los arcos branquiales (no está ilustrado) encaja con los rombómeros asociados.

secto. Aunque, por ejemplo, los vertebrados presentan homólogos de los genes *engrailed* y *wingless*, estos genes no se expresan de una forma segmental repetitiva en el cerebro anterior.

Los genes Hox definen los valores posicionales en los vertebrados tal como ocurre en los insectos[67]

A pesar de las incertidumbres que se plantean en los mecanismos de segmentación, pocas dudas pueden existir sobre la condición homóloga de nuestro eje de cabeza a la cola respecto al de un insecto y respecto a que esencialmente el mismo conjunto de genes marca los valores posicionales anteroposteriores de nuestras células. Al parecer, los genes Hox no tienen tan sólo patrones de expresión similares a los genes del complejo del insecto, sino que también presentan funciones reguladoras parecidas. Los vertebrados tienen cuatro clases de complejos de genes Hox que actúan más o menos en paralelo a lo largo del eje corporal, donde en el insecto actúa un solo complejo HOM. Por lo tanto, no basta con eliminar o provocar la expresión deficiente de un gen Hox para conseguir que una región experimente una transformación homeótica de consideración y adopte el carácter de otra. De todas formas, gracias a la ingeniería genética se ha conseguido que un ratón con alteraciones en un solo complejo de genes Hox presente anomalías localizadas que se podrían interpretar como transformaciones homeóticas incompletas.

Este hecho ilustra una de las dificultades principales que presenta el análisis de la genética de los sistemas de control del desarrollo de los vertebrados. El genoma vertebrado es muy grande, y debe su gran tamaño fundamentalmente a las duplicaciones génicas que se han ido produciendo en el curso de la evolución. Así, contiene muchas copias diferentes de genes que en moscas o nemátodos están representados en solitario: los cuatro complejos Hox son un ejemplo típico de ello. Las múltiples versiones de un gen tienen funciones solapadas y parcialmente intercambiables, y esta redundancia parcial hace muy difícil identificar la función básica de un gen en solitario, de la misma forma que resulta difícil, poniendo o quitando un solo tornillo, demostrar la función de uno de los muchos tornillos que tiene una puerta en sus bisagras. He aquí por qué los datos aportados por modelos de organismos más simples como *Drosophila* y *Caenorhabditis elegans* son tan importantes.

Sin embargo ello no quiere decir que la importancia de un gen individual sea superflua en el conjunto de genes de un vertebrado; a medida que avanza la evolución, los genes duplicados divergen y comienzan a adoptar funciones nue-

vas y cada vez más especializadas que los distinguen unos de otros. Los viejos componentes pueden adaptarse organizando el desarrollo de los nuevos tipos de estructuras que se añadirán a las ya existentes. Las extremidades de los vertebrados superiores nos proporcionan un ejemplo muy interesante de todo ello.

Subconjuntos de los genes Hox se expresan distribuidos a lo largo de los dos ejes ortogonales de las yemas de las extremidades de los vertebrados[68]

En este mismo capítulo ya hemos utilizado las yemas de las extremidades del embrión de pollo para demostrar que las células de regiones distintas se distinguen unas de otras mediante una propiedad que denominamos valor posicional. Esta característica de la memoria celular decide si las estructuras que se formarán serán de la pata o del ala, del omóplato o del antebrazo, del pulgar o del meñique. La genética molecular ha revelado lo que significa "valor posicional" en términos moleculares de la yema de la extremidad.

Ya sabemos que a lo largo del eje corporal, en moscas y vertebrados, los valores posicionales se definen mediante el estado de expresión de los genes Hox/HOM. La hibridación *in situ* demuestra que esto es cierto para las yemas de las extremidades de un embrión de ratón y también de pollo –aunque existe una pequeña diferencia. En lugar de encontrar que los cuatro complejos Hox se expresan de forma similar, mediante patrones solapantes, igual que en el cerebro posterior, se observa que un subconjunto de miembros del complejo HoxD se expresa en una serie de dominios distribuidos a lo largo de un eje de la extremidad (probablemente el anteroposterior) y que un subconjunto de miembros del complejo HoxA se expresan en serie a lo largo de un eje distinto (probablemente el proximodistal) (Figura 21-83). Para comprobar si estos genes realmente controlan el modelaje de la extremidad, se ha utilizado un retrovirus como vector de expresión en el embrión de pollo para introducir un gen Hox particular dentro de las células de la yema de la extremidad, forzando la expresión del gen en una

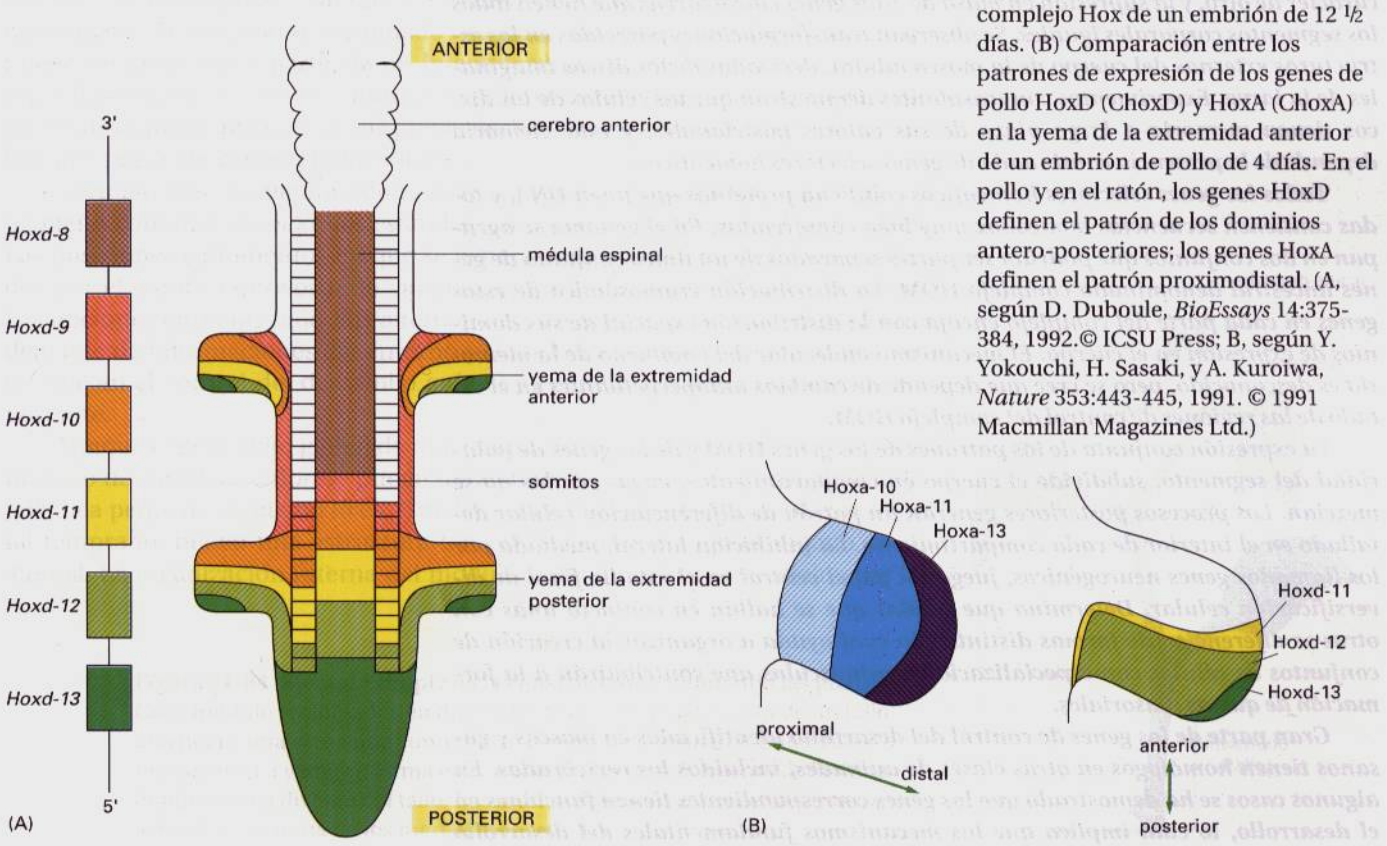


Figura 21-83 Patrones de expresión de los genes Hox de las yemas de las extremidades de los vertebrados. (A) Diagrama esquemático del patrón de expresión de los miembros expresados en la parte posterior del complejo Hox de un embrión de 12 ½ días. (B) Comparación entre los patrones de expresión de los genes de pollo HoxD (ChoxD) y HoxA (ChoxA) en la yema de la extremidad anterior de un embrión de pollo de 4 días. En el pollo y en el ratón, los genes HoxD definen el patrón de los dominios antero-posteriores; los genes HoxA definen el patrón proximodistal. (A, según D. Duboule, *BioEssays* 14:375-384, 1992.© ICSU Press; B, según Y. Yokouchi, H. Sasaki, y A. Kuroiwa, *Nature* 353:443-445, 1991. © 1991 Macmillan Magazines Ltd.)

localización inadecuada. Si se fuerza a las células pertenecientes a la región en la que se desarrollará el primer dedo del pie a que expresen el gen Hox característico del segundo dedo (*Hoxd-11*), su comportamiento se verá alterado, y en la localización del primer dedo se desarrolla un duplicado del segundo dedo. Evidentemente, cuando el vertebrado desarrolla las extremidades, combina los diferentes conjuntos de genes Hox de formas distintas para controlar el modelaje del embrión y también del principal eje corporal.

Ahora, el problema central de la embriología de los vertebrados es descubrir cómo se regulan los genes Hox. Varios estudios señalan que el ácido retinoico puede controlar la expresión de los genes Hox en las yemas de las extremidades y a lo largo del eje principal del cuerpo, pero la forma en que se ejerce tal control y el papel que juega en el desarrollo normal son, aún, preguntas sin respuesta.

En este momento los genes HOM/Hox constituyen el ejemplo más espectacular de conservación de mecanismos de control del desarrollo. Pero el camino iniciado con las homologías genéticas descubiertas mediante las secuencias genética durante los últimos años nos concede esperanzas para pensar que pronto podremos constatar muchas coincidencias más, y no menos importantes, en el desarrollo de vertebrados e invertebrados.

Los estudios genéticos tradicionales y moleculares de organismos pequeños como moscas y gusanos, más accesibles, nos dan las pautas para aclarar los misterios del desarrollo de todo el mundo animal. Pero, ¿y si vamos un poco más lejos y afirmamos que también nos abren las puertas del desarrollo vegetal?, o, ¿es que el desarrollo de las plantas actúa según un conjunto de principios y mecanismos completamente distintos? Con esta pregunta abordamos el siguiente apartado.

Resumen

Los genes selectores homeóticos definen las diferencias entre los segmentos del cuerpo desde la cabeza hasta la cola: proporcionan a las células una memoria de su valor posicional. Mutaciones en estos genes pueden convertir un segmento corporal al carácter de otro, y la supresión en masa de estos genes causa larvas que tienen todos los segmentos corporales iguales. Se observan transformaciones parecidas en las estructuras externas del cuerpo de la mosca adulta, derivadas de los discos imaginales de la larva. Experimentos con trasplantes demuestran que las células de los discos tienen memoria a largo plazo de sus valores posicionales, y esta memoria depende de la presencia continuada de genes selectores homeóticos.

Todos los genes selectores homeóticos codifican proteínas que unen DNA, y todas contienen secuencias homeobox muy bien conservadas. En el genoma se agrupan en dos conjuntos que podrían ser partes separadas de un único conjunto de genes ancestral denominado complejo HOM. La distribución cromosómica de estos genes en cada parte del complejo encaja con la distribución espacial de sus dominios de expresión en el cuerpo. El mecanismo molecular del fenómeno de la memoria es desconocido, pero se cree que depende de cambios autoperpetuantes en el estado de las regiones de control del complejo HOM.

La expresión conjunta de los patrones de los genes HOM y de los genes de polaridad del segmento, subdivide el cuerpo en compartimientos, cuyas células no se mezclan. Los procesos posteriores generan un patrón de diferenciación celular detallado en el interior de cada compartimiento. La inhibición lateral, mediada por los llamados genes neurogénicos, juega un papel central en el estadio final de diversificación celular. Determina que células que se hallan en contacto unas con otras se diferencien de formas distintas, lo cual ayuda a organizar la creación de conjuntos de células con especializaciones minúsculas que contribuirán a la formación de quetas sensoriales.

Gran parte de los genes de control del desarrollo identificados en moscas y gusanos tienen homólogos en otras clases de animales, incluidos los vertebrados. En algunos casos se ha demostrado que los genes correspondientes tienen funciones en el desarrollo, lo cual implica que los mecanismos fundamentales del desarrollo

animal se han conservado incluso cuando el aspecto externo del cuerpo ha evolucionado hasta ser completamente diferente. Al parecer, prácticamente todos los animales contienen complejos de genes HOM, de organización parecida a los de los insectos: los mamíferos presentan cuatro complejos, denominados complejos Hox, y se cree que sus productos definen los valores posicionales que controlan el patrón anteroposterior de zonas de la región del cerebro anterior y del tronco. Los complejos Hox también han adquirido nuevas funciones como especificadores de información posicional en partes del cuerpo de los vertebrados evolucionadas más recientemente, como son las extremidades.

El desarrollo vegetal[69]

Las plantas y los animales están separados aproximadamente por mil millones de años de historia evolutiva. Ambos han desarrollado su organización pluricelular de forma independiente pero a partir del mismo conjunto de herramientas –el conjunto de genes heredados de su antepasado eucariota unicelular común. La mayoría de diferencias entre sus estrategias de desarrollo provienen de dos particularidades básicas de las plantas. La primera es que las plantas consiguen su energía de la luz solar, no ingiriendo otros organismos. Esta característica define un plan corporal distinto. Y la segunda, que sus células están encerradas en paredes celulares semirrígidas que las mantienen en grupos compactos, evitando que se desplacen como hacen las células animales. Esta segunda característica determina un conjunto distinto de movimientos que definen la forma del cuerpo, y unos mecanismos de desarrollo distintos que puedan hacer frente a un entorno variable.

El desarrollo animal está muy protegido frente a los cambios del entorno, y el embrión genera la misma estructura corporal definida genéticamente sin que ésta se vea afectada por condicionantes externos. El desarrollo de la mayoría de las plantas, en cambio, está influido dramáticamente por el entorno: debido a que no pueden desplazarse a su entorno adecuado, las plantas se adaptan al medio que les corresponde alterando el curso de su desarrollo. Su estrategia es oportunista. Un órgano determinado –es decir una hoja, una flor o una raíz– puede ser generado a partir de un huevo fecundado mediante diferentes vías, según las informaciones del entorno. Una hoja de begonia plantada en el suelo puede desarrollar una raíz; la raíz puede dar un brote; el brote, si recibe la luz suficiente, puede desarrollar hojas y flores.

Normalmente, la planta adulta está compuesta por muchas copias de un pequeño conjunto de *módulos* estándar, tal como se ilustra en la Figura 21-84. Las posiciones y momentos en que se generan estos módulos están muy influidos por el entorno, provocando variaciones en la estructura de toda la planta. Las opciones entre los módulos alternativos y su organización en toda la planta depende de informaciones del entorno y de señales hormonales de largo alcance, que en el control del desarrollo animal juegan un papel mucho menos importante.

Aunque el desarrollo global de una planta –la forma de sus raíces y ramas, el número de sus hojas o flores– puede ser altamente variable, su organización detallada a pequeña escala no lo es. Una hoja, una flor o incluso un embrión vegetal temprano, tienen una estructura tan precisa como cualquier órgano de un animal. La organización interna del módulo vegetal presenta esencialmente los

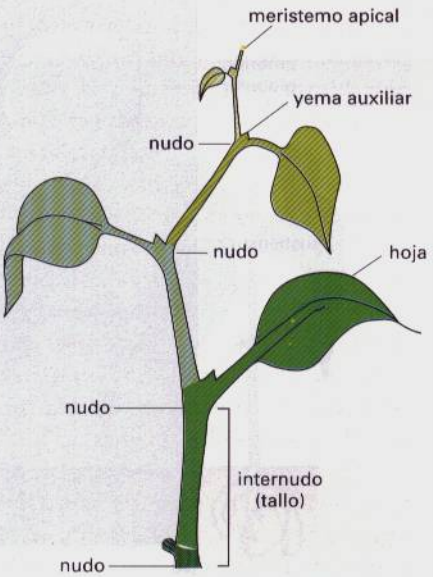


Figura 21-84 Ejemplo simple de la construcción modular de las plantas. Cada módulo (coloreados en diferentes tonos de *verde*) consta de un tallo, una hoja y una yema que contiene un centro de crecimiento potencial, o *meristemo*. La yema se forma en el *nudo*, punto de nacimiento de la rama, donde la hoja diverge del tallo. Los módulos derivan secuencialmente de la actividad continua de los meristemos apicales.

mismos problemas en el control genético de su patrón de formación que los del desarrollo animal, y se solucionan de formas análogas. En este apartado nos centraremos en los mecanismos celulares de desarrollo de la plantas con flores. Examinaremos tantos sus diferencias como sus similitudes con los animales.

El desarrollo embrionario empieza con el establecimiento del eje raíz-brote y se detiene en el interior de la semilla[70]

A pesar de la asombrosa variedad de las plantas con flores, su origen es relativamente reciente. Los ejemplares fósiles más tempranos son de hace 125 millones de años, frente a los 350 millones de años de fósiles de animales vertebrados. Este hecho contribuye a explicar por qué algunos aspectos de su forma y desarrollo son extraordinariamente constantes. La estrategia básica de su reproducción sexual está resumida esquemáticamente en el Panel 21-2, página 1189. El huevo fecundado, o *zigoto*, de una planta superior empieza dividiéndose asimétricamente, estableciendo la polaridad del futuro embrión. Un producto de esta división es una célula pequeña con un citoplasma denso, que se transformará en el embrión propiamente dicho. El otro producto es una célula grande y vacuolada, que se divide de nuevo y forma una estructura llamada el *suspensor*, que en algunos aspectos es comparable al cordón umbilical de los mamíferos. El suspensor mantiene unido el embrión al tejido nutritivo adyacente y proporciona una vía para el flujo de nutrientes.

Durante el siguiente estadio del desarrollo, la célula embrionaria diploide prolifera formando una bola de células que adquiere rápidamente una estructura polarizada. Comprende dos grupos clave de células proliferativas –uno en el extremo del suspensor del embrión que generará una *raíz* en un extremo y otro en el polo opuesto que generará un *brote* (Figura 21-85). El eje principal raíz-brote establecido de este modo es análogo al eje cabeza-cola de un animal. Al mismo tiempo empieza a ser posible distinguir las futuras *células epidérmicas*, que forman la capa más externa del embrión, las futuras *células de tejido básico*, que ocupan la mayoría del interior del embrión, y las futuras *células de tejido vascular*, que forman el núcleo central del embrión. Estos tres conjuntos de células pueden comparase a las tres capas germinales de un embrión animal. Un poco más tarde durante el desarrollo, el rudimento del brote empieza a producir las hojas embrionarias de la semilla, o *cotilédones* –uno en el caso de los monocotiledóneas y dos en el caso de las dicotiledóneas. Normalmente, el desarrollo

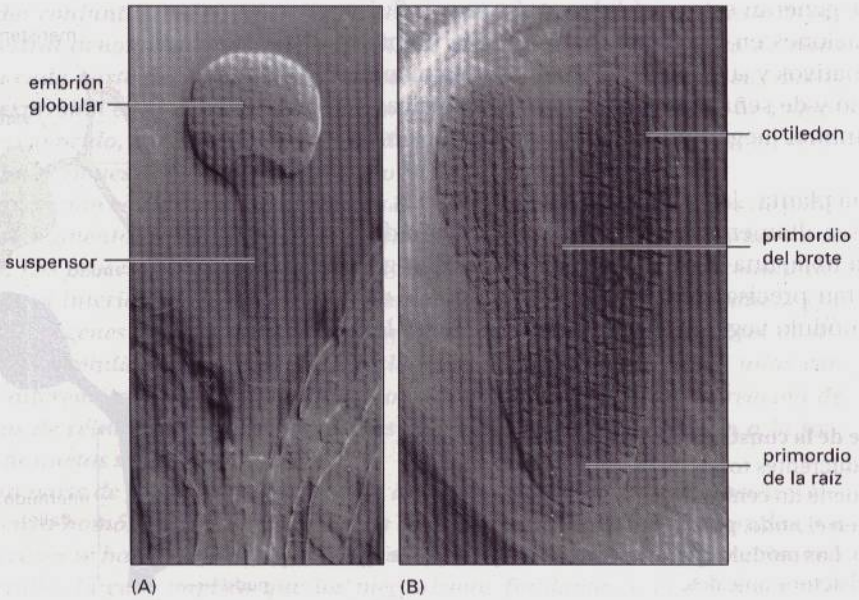
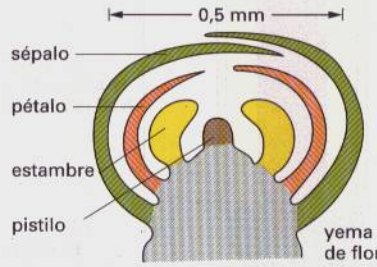
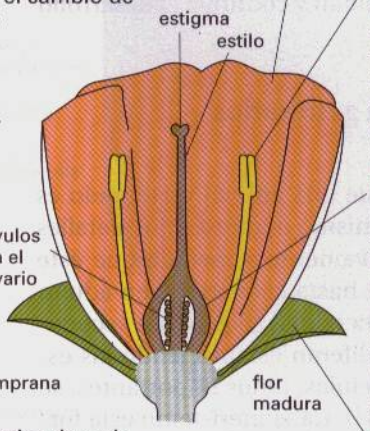


Figura 21-85 Dos estadios de la embriogénesis de la planta *Arabidopsis thaliana*. (Según G. Jürgens, U. Mayer, R.A. Torres-Ruiz, T. Berleth, y S. Miséra, *Development [Suppl.]* 1:27-38, 1991.)

LA FLOR

Las flores, que contienen las células reproductoras de las plantas superiores, surgen a partir de los meristemos apicales de brotes vegetales (véanse Figuras 21-84 y 21-88). Culminan su crecimiento a partir de este meristemo. Factores medioambientales, como el ritmo circadiano o la temperatura, activan el cambio de desarrollo vegetal floral. Así pues las células germinales aparecen en el transcurso del desarrollo de la planta, y lo hacen a partir de las células somáticas, y no a partir de una línea celular germinal como los animales.

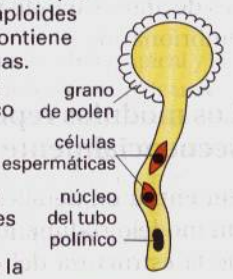




La estructura de la flor es variada y característica de cada especie; comprende cuatro formaciones de estructuras concéntricas que podrían considerarse hojas modificadas.

Pétalo: distintas estructuras en forma de hoja, generalmente coloreadas con tonos brillantes, que actúan de sistema polinizador, por ejemplo atrayendo insectos.

Estambre: órgano que contiene células que sufren meiosis y forman granos haploides de polen, cada uno de los cuales contiene dos células espermáticas masculinas. Cuando transferimos el polen a un estigma, germina, y el tubo polínico conduce los dos espermatozoides inmóviles al ovario.

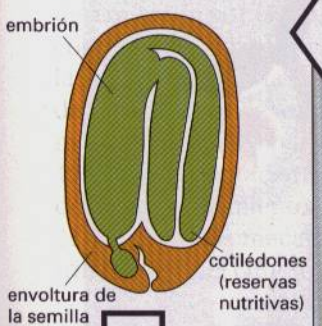


Pistilo: órgano que contiene uno o más ovarios, cada uno de los cuales contiene óvulos. Cada óvulo es huésped de células que atraviesan la meiosis, formando un saco embrionario que contiene la célula huevo femenina (oosfera). En la fecundación, una célula espermática se fusiona con la célula huevo construyendo el futuro embrión diploide, mientras que la otra se fusiona con dos núcleos del saco embrionario constituyendo el tejido triploide endospérmico.

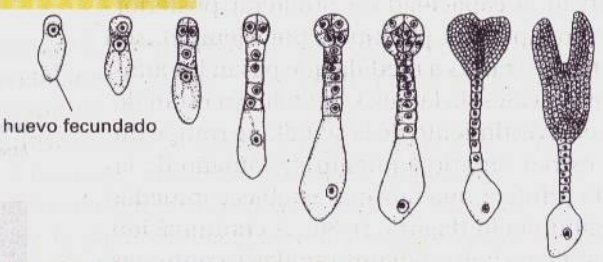
Sépalos: estructuras en forma de hoja que forman un revestimiento protector durante el desarrollo floral temprano.

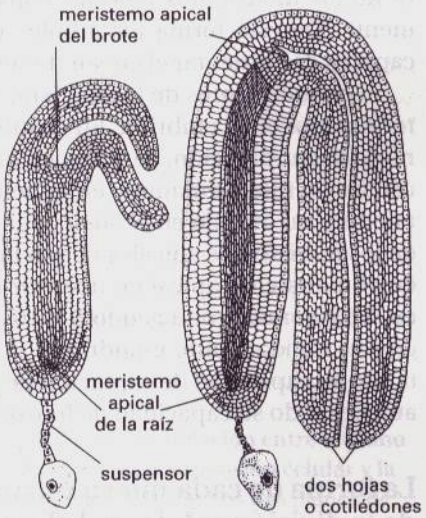
LA SEMILLA

Una semilla consta de un embrión quiescente, reservas nutritivas y la envoltura. Al final de su desarrollo el contenido de agua puede haber descendido desde un 90 a un 5%. Está protegida por un *fruto* cuyos tejidos son de origen materno.



EL EMBRIÓN





La oosfera fecundada del interior del saco embrionario crece formando un embrión, sirviéndose de los nutrientes transportados desde el endospermo por medio del suspensor. Una serie compleja de divisiones celulares, ilustrada aquí por una hierba pequeña llamada zurrón de pastor, origina un embrión con un meristemo apical de la raíz, un meristemo apical del brote, y una (monocotiledóneas) o dos (dicotiledóneas) hojas o cotilédones.

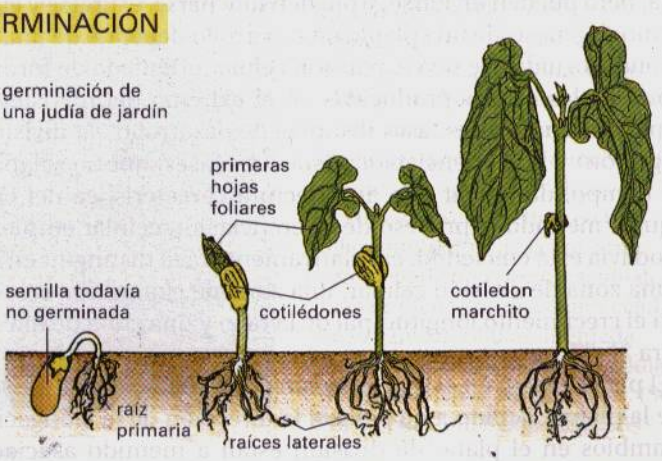
El desarrollo se detiene en este estadio, y el saco embrionario, que contiene el embrión, se convierte ahora en una semilla preparada para su dispersión y capaz de sobrevivir en circunstancias adversas.

GERMINACIÓN

Para que un embrión continúe su desarrollo es necesario que su semilla germine, un proceso que depende de factores internos (estado quiescente) y de factores medioambientales, como el agua, la temperatura y el oxígeno. Las reservas nutritivas para la fase temprana de la germinación pueden ser tanto el endospermo (maíz) como los cotilédones (guisantes y judías).

Habitualmente, primero emerge la raíz primaria de la semilla, para asegurar el suministro de agua necesario para la plántula desde el comienzo. El cotiledon(es) puede(n) aparecer por encima del suelo, como en la judía de jardín mostrada aquí, o continuar debajo del suelo, como en los guisantes. En ambos casos los cotilédones acabarán por extinguirse.

Ahora el meristemo apical puede mostrar su capacidad para el crecimiento continuo, produciendo el patrón típico de nudos, internudos y yemas (véase Figura 21-84).



Panel 21-2 Características generales del desarrollo temprano de las plantas con flores.

se detiene poco después de este estadio, y el embrión queda empaquetado en una *semilla*, especializada para la dispersión y para la supervivencia en condiciones adversas. El embrión en la semilla se estabiliza por deshidratación, y puede permanecer latente durante un período de tiempo muy largo –incluso centenares de años. Cuando se rehidratan, las semillas germinan y continúa el desarrollo embrionario.

Los módulos repetitivos de una planta son generados secuencialmente por los meristemos[71]

Sin entrar en detalles, el embrión de un insecto o de una animal vertebrado es un modelo rudimentario a pequeña escala del organismo maduro, y los detalles de la estructura del cuerpo se completan progresivamente a medida que éste aumenta de tamaño. El embrión de la planta crece hasta convertirse en adulto de manera bastante diferente: las partes de la planta adulta se generan secuencialmente por medio de grupos de células que proliferan estableciendo las estructuras periféricas de la planta. Estos grupos de células, todos importantes, se denominan **meristemos apicales** (véase Figura 21-84). Cada meristemo está formado por una población de células madre autorrenovables. A medida que estas células se van dividiendo, producen una progenie que emergerá desde la región meristemática, crecerá, y finalmente se diferenciará. Aunque los meristemos apicales del tallo y de la raíz generan todas las variedades básicas de células necesarias para formar las hojas, las raíces y los tallos, muchas células situadas fuera de los meristemos apicales conservan la capacidad de proliferar posteriormente. De esta forma los árboles y otras plantas perennes, por ejemplo, son capaces de aumentar el grosor de sus tallos y raíces a medida que pasan los años.

Los rudimentos de los meristemos apicales de la raíz y del tallo ya están determinados en el embrión. En cuanto el revestimiento de la semilla se rompe durante la germinación, se produce un extraordinario aumento de tamaño de las células no meristemáticas, emergiendo primero una raíz que establece inmediatamente un anclaje en el suelo, y luego un tallo (Figura 21-86). A continuación, en los meristemos apicales tienen lugar divisiones celulares rápidas y continuas: en el meristemo apical de una raíz de maíz, por ejemplo, las células se dividen cada 12 horas, produciendo 5×10^5 células cada día. Las raíces y los tallos, que crecen rápidamente, escudriñan el entorno circundante –las raíces incrementando su capacidad de captación de agua y sales minerales del suelo, y los brotes aumentando su capacidad de fotosíntesis (véase Panel 21-2, pág. 1189).

Figura 21-86 Una plántula de *Arabidopsis*. Los objetos marrones situados a la derecha de la joven plántula son las dos mitades de la envoltura de la semilla desechada. (Cortesía de Catherine Duckett.)

La forma de cada nueva estructura depende de la orientación de la división celular y de la expansión[72]

Las células vegetales, encerradas en el interior de sus paredes celulares, no pueden arrastrarse y tampoco pueden cambiar su posición a medida que crece la planta, pero pueden dividirse, y pueden hincharse, estirarse y curvarse. Por lo tanto, la morfogénesis de una planta en desarrollo depende de una serie ordenada de divisiones seguidas de una expansión celular orientada de forma muy precisa. La mayoría de las células producidas en el extremo del meristemo de la raíz, por ejemplo, pasan por tres fases distintas de desarrollo –la división, el crecimiento (elongación) y la diferenciación. Estas tres fases, que se solapan en el espacio y en el tiempo, dan lugar a la arquitectura característica del extremo de la raíz. Aunque a menudo el proceso de diferenciación celular empieza mientras la célula todavía está creciendo, es relativamente fácil distinguir en el extremo de una raíz una zona de división celular, una zona de elongación celular orientada (que afecta el crecimiento longitudinal de la raíz) y una zona de diferenciación celular (Figura 21-87).

El plano exacto en el que las células se dividen es crucial para la morfogénesis de la planta, debido a que afecta la dirección de la elongación de la planta, y los cambios en el plano de división están a menudo asociados con procesos

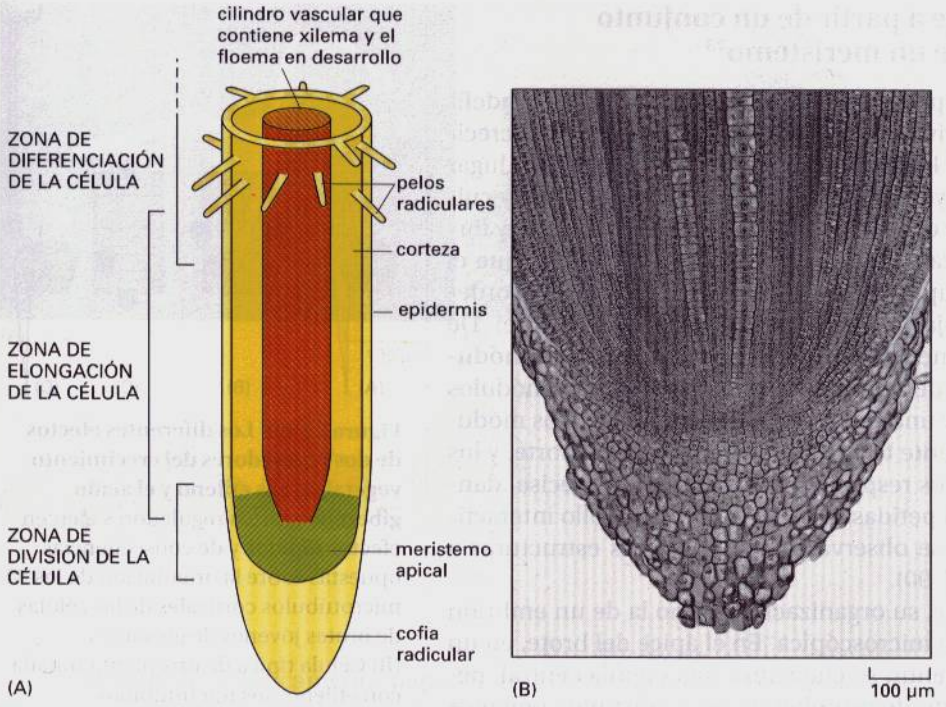


Figura 21-87 Extremo de una raíz en crecimiento. (A) Organización de los 2 mm finales del extremo de una raíz. Se indican las zonas aproximadas en las que es posible encontrar células que se dividen, se alargan y se diferencian. (B) Meristemo apical y la cofia radicular del extremo o de una raíz de maíz, presentando las series ordenadas de las células producidas. (B, según P.H. Raven, R.F. Evert y S.E. Eichhorn, Biology of Plants, 4th ed. New York: Worth, 1986.)

morfogénicos, como la producción de primordios foliares o de pétalos (Figura 21-88). Los mecanismos intracelulares especiales que controlan el plano de la división celular se tratan en el Capítulo 18.

En la fase de expansión controlada que generalmente sigue a la división celular, las células hijas pueden a menudo aumentar su volumen cincuenta veces o más. Esta expansión está conducida por una turgencia de base osmótica que presiona las paredes celulares de la planta hacia el exterior, y su dirección está determinada por la orientación de los fibrillas de celulosa de la pared celular que conducen la expansión a lo largo de un único eje (véase Figura 19-68). A su vez, la orientación de la celulosa está aparentemente controlada por la orientación de formaciones de microtúbulos situados justo por debajo de la membrana plasmática, los cuales parecen guiar la deposición de celulosa (visto en el Capítulo 19). Estas orientaciones pueden ser modificadas con rapidez mediante reguladores del crecimiento de la planta, como el *etileno* y el *ácido giberélico* (Figura 21-89), pero los mecanismos moleculares subyacentes a estas dramáticas redistribuciones del citoesqueleto son desconocidos.

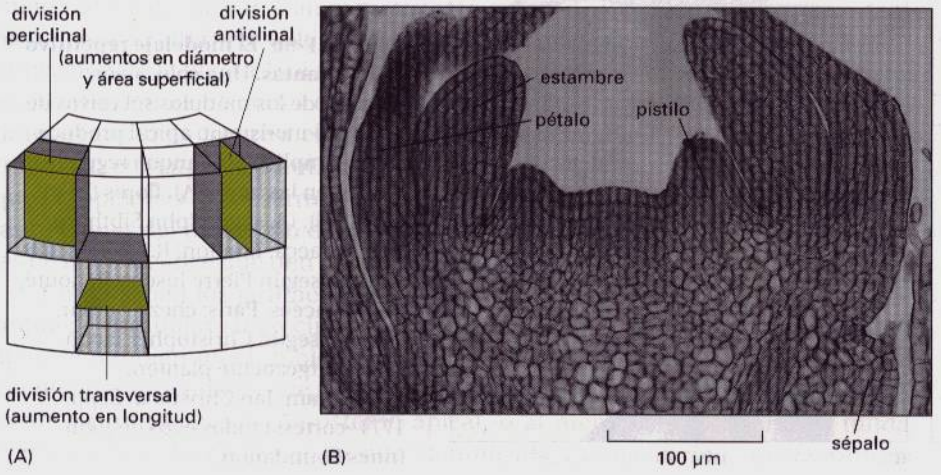


Figura 21-88 Relación entre el plano de división, la expansión celular y la morfogénesis. (A) Los tres planos de división celular que presenta un órgano vegetal típico. Las variaciones en la proporción de cada uno de ellos, combinadas con una expansión celular orientada, pueden ser las responsables de los patrones morfogénicos que actúan en las plantas. (B) Sección longitudinal de un yema floral joven de una vincapervinca (hierba doncella). Las pequeñas cúpulas de células destinadas a convertirse en las diferentes partes de la flor son producto de una combinación de los nuevos planos de divisiones celulares y de expansión celular orientada determinadas por refuerzos anulares de celulosa en la pared celular. (Según N.H. Boke, *Am. J. Bot.* 36:535-547, 1949.)

Cada módulo de la planta crece a partir de un conjunto microscópico de primordios de un meristemo[73]

Los meristemos apicales son autoperpetuantes: continúan sus funciones indefinidamente mientras la planta sobreviva, y son responsables del continuo crecimiento y desarrollo de la planta. Pero los meristemos apicales también dan lugar a un segundo tipo de crecimiento, cuyo desarrollo está altamente limitado y culmina con la formación de estructuras como una hoja o una flor, de tamaño y forma determinada y con una esperanza de vida corta. Así pues, a medida que el brote se va alargando, su meristemo apical deja detrás de él una secuencia ordenada de *nudos* donde han crecido hojas, e *internudos* (segmentos del brote). De esta forma la actividad continua del meristemo produce una cantidad de **módulos** similares, cuyo número no para de aumentar; cada uno de estos módulos está formado por un brote, una hoja y una yema (véase Figura 21-84). Los módulos se conectan unos con otros mediante tejido de soporte y de transporte, y los sucesivos módulos están situados unos respecto a otros, de forma precisa, dando lugar a una estructura de formas repetidas. Este modo de desarrollo interactivo es característico de las plantas y se observa en muchas otras estructuras a parte del sistema tallo-hoja (Figura 21-90).

Aunque el módulo final es grande, su organización, como la de un embrión animal, está mapada primero a escala microscópica. En el ápice del brote, en un espacio de un milímetro o incluso menor, se encuentra una cúpula central, pequeña y baja, rodeada por un conjunto de protuberancias de distintos tamaños (Figura 21-91). La cúpula central es el meristemo apical; cada una de las protuberancias que la rodean es un primordio foliar. Esta pequeña región, por lo tanto, contiene los rudimentos ya diferenciados de varios módulos completos. Mediante un programa muy preciso de proliferación celular y expansión celular, cada primordio foliar y sus células adyacentes crecen formando una hoja, un nudo y un entrenudo. Mientras, el meristemo apical da lugar a un nuevo primordio foliar, generando cada vez más módulos, en una sucesión potencialmente infinita. La organización en serie de los módulos de la planta está controlada, de este modo, por procesos del ápice del brote. Las señales locales dentro de una pequeña región determinan el patrón del primordio –la posición de un rudimento foliar en relación con el siguiente, el espacio existente entre ambos rudimentos y su localización en relación al meristemo apical.

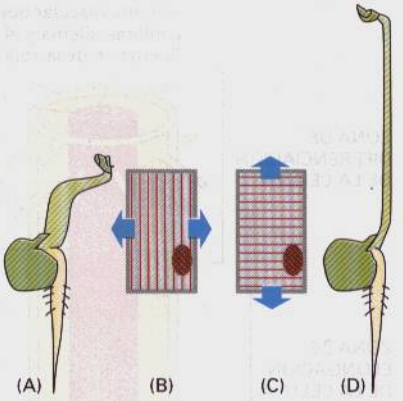


Figura 21-89 Los diferentes efectos de dos reguladores del crecimiento vegetal, el gas etileno y el ácido giberélico. Estos reguladores ejercen efectos rápidos y de consecuencias opuestas sobre la orientación de los microtúbulos corticales de las células de brotes jóvenes de guisantes. (B) Célula típica de una planta tratada con etileno, sus microtúbulos presentan una orientación longitudinal. (C) Célula típica de una planta tratada con ácido giberélico, sus microtúbulos presentan una orientación transversal. Se depositan microfibrillas de celulosa paralelas a los microtúbulos. Debido a su influencia sobre la orientación de la expansión celular, el ácido giberélico y el etileno favorecen el crecimiento en direcciones contrarias: las plántulas tratadas con etileno desarrollan brotes bajos y gruesos (A), mientras que las plántulas que reciben tratamiento con ácido giberélico desarrollan brotes altos y delgados (D).

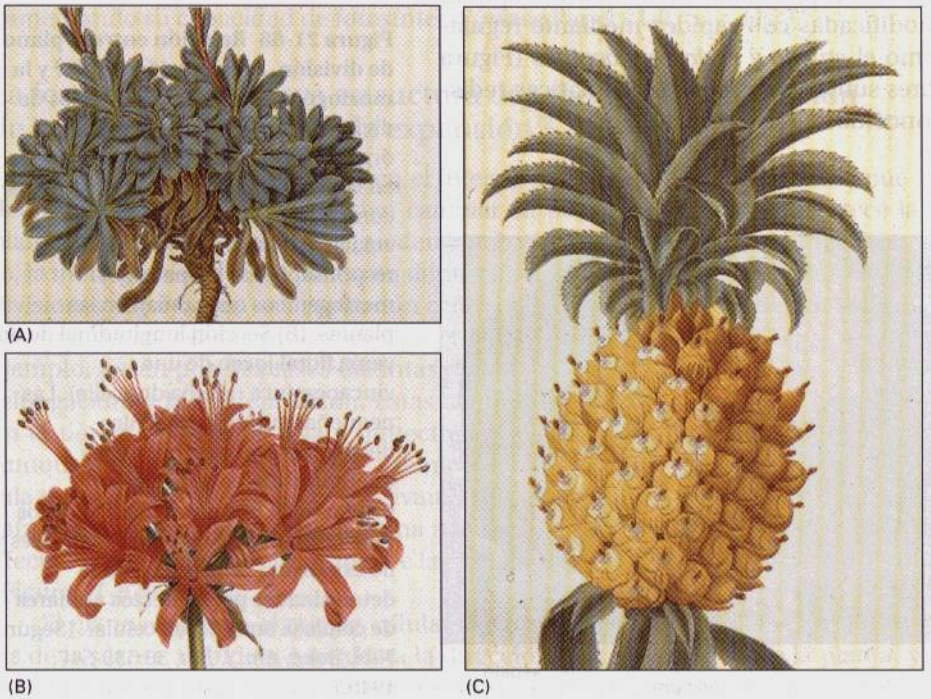


Figura 21-90 El modelaje repetitivo de las plantas. Una colocación correcta de los módulos sucesivos de un único meristemo apical produce estas complicadas aunque regulares formas en las hojas (A), flores (B) y frutos (C). (A, según John Sibthorp, Flora Graeca. London: R.Taylor, 1806-1840; B, según Pierre Joseph Redouté, Les Lliliacées. Paris: chez l'Auteur, 1807; C, según Christopher Jacob Trew, Uitgezochte planten. Amsterdam: Jan Christiaan Sepp, 1771–cortesía todos ellos de John Innes Foundation.)

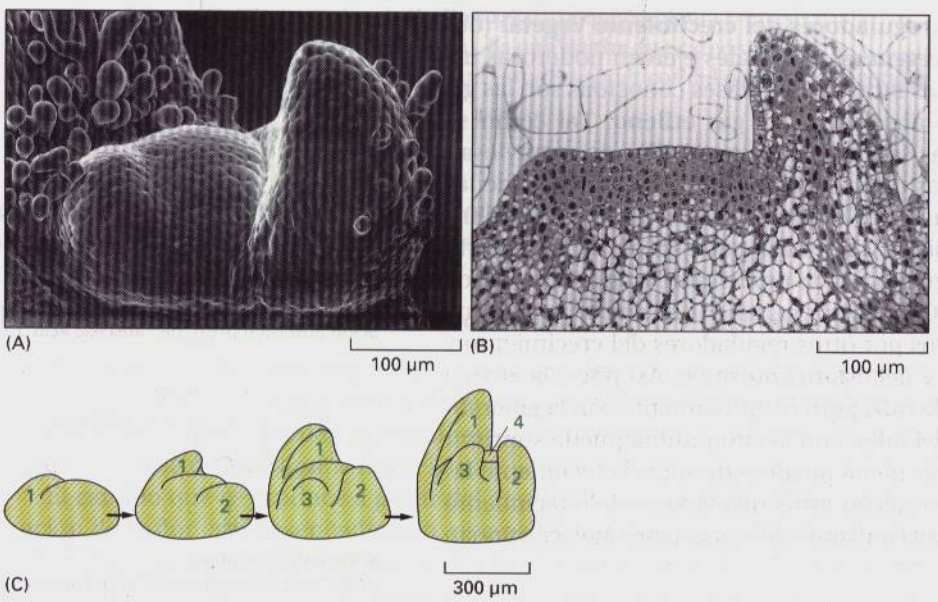


Figura 21-91 Ápice del brote de una planta joven de tabaco. (A) Electronmicrografía de barrido que muestra el ápice del brote con dos primordios foliares emergiendo secuencialmente, visibles aquí como dos protuberancias laterales a cada lado de la cúpula del meristemo apical. (B) Sección fina de un ápice similar mostrando que el primordio foliar más joven surge de un grupo reducido de células (aproximadamente 100) de las cuatro o cinco capas más exteriores. (C) Diagrama muy esquemático que muestra que la apariencia secuencial del primordio foliar tiene lugar sobre una distancia reducida y en una fase muy temprana del desarrollo del brote. Finalmente el crecimiento del ápice formará internudos que distribuirán ordenadamente las hojas a lo largo del tallo (véase Figura 21-84). (A y B, según R.S. Poethig e I.M. Sussex, *Planta* 165:158-169, 1985.)

No se conoce prácticamente nada sobre los mecanismos que median los procesos centrales del modelaje en el reino vegetal. Todas las estrategias que hemos tratado sobre el modelaje de la formación de los animales –como las basadas en morfógenos locales, los mecanismos del reloj celular y la inhibición lateral– también podrían darse en el reino vegetal. No obstante, estudios detallados del destino y el linaje de las células en el ápice del brote y en el ápice de la raíz están empezando a aportar parte de esta información básica esencial, y empiezan a ser identificados algunos de los genes fundamentales del control del desarrollo. La proteína reguladora de genes codificada por el gen *Knotted*, por ejemplo, se expresa en la parte central del meristemo; una sobreexpresión de esta proteína en una planta de tabaco provoca que las células foliares actúen como meristemo, generando nuevos órganos a partir de la propia hoja.

Señales hormonales de largo alcance coordinan los procesos del desarrollo en partes distantes de la planta[74]

Para que un tallo se ramifique, han de generarse nuevos meristemos, y es mediante el control de estos procesos que el entorno ejerce una parte importante de su influencia sobre la forma de la planta. En cada nudo, en su ángulo agudo, o *axila*, entre la rama foliar y el tallo, se forma una yema. Esta yema contiene un nido de células, derivado del meristemo apical, que ha conservado un carácter meristemático (y que expresa *Knotted*). Dichas células han conservado su capacidad para transformarse en el meristemo apical de una nueva rama, pero también tienen la alternativa de permanecer en estado latente. El modelaje de la ramificación de la planta está regulado por esta opción, en cuya elección participa el entorno. Partes distantes de la planta que reciben influencias de entornos distintos reaccionan frente a ellos individualmente mediante cambios en su desarrollo. Sin embargo, la planta debe de continuar actuando al unísono. Esto exige que las opciones del desarrollo y los procesos de una parte de la planta afecten a las opciones del desarrollo del resto del organismo. Es preciso que existan señales de largo alcance que den lugar a tal coordinación.

Como saben los jardineros, por ejemplo, cortando el extremo de una rama se puede estimular su crecimiento lateral: extrayendo el meristemo apical desaparece también una inhibición que afecta a los meristemos axilares en estado latente, permitiéndoles que formen nuevos ápices. En este caso la señal de largo alcance procedente del meristemo apical, o al menos un componente fundamental del sistema de señal, ha sido identificada. Es una *auxina*, un miembro de

uno de las cinco clases conocidas de **reguladores del crecimiento vegetal** (denominados algunas veces *hormonas vegetales*), los cuales ejercen poderosas influencias sobre el desarrollo vegetal. Las otras cuatro clases conocidas son las **giberelinas**, las **citoquininas**, el **ácido abscídico** y el gas **etileno**. Tal como se muestra en la Figura 21-92, todas ellas son pequeñas moléculas que atraviesan fácilmente las paredes celulares. Todas están sintetizadas por la mayoría de las células vegetales y pueden tanto actuar localmente como ser transportadas influyendo a distancia en otras células diana. La auxina, por ejemplo, se transporta de una célula a otra a la velocidad aproximada de un centímetro por hora desde el extremo de un brote hacia su base. Cada factor regulador de crecimiento tiene múltiples efectos, que están modulados por otros reguladores del crecimiento y por señales procedentes del entorno y del estatus nutritivo. Así pues, la auxina sola puede estimular la formación de la raíz, pero conjuntamente con la giberelina puede estimular la prolongación del tallo, con la citoquinina puede suprimir el crecimiento lateral del brote, y con el etileno puede estimular el crecimiento lateral de la raíz. Los receptores que reconocen estos reguladores del crecimiento empiezan a ser caracterizados, y los mecanismos de sus actuaciones continúan siendo un misterio.

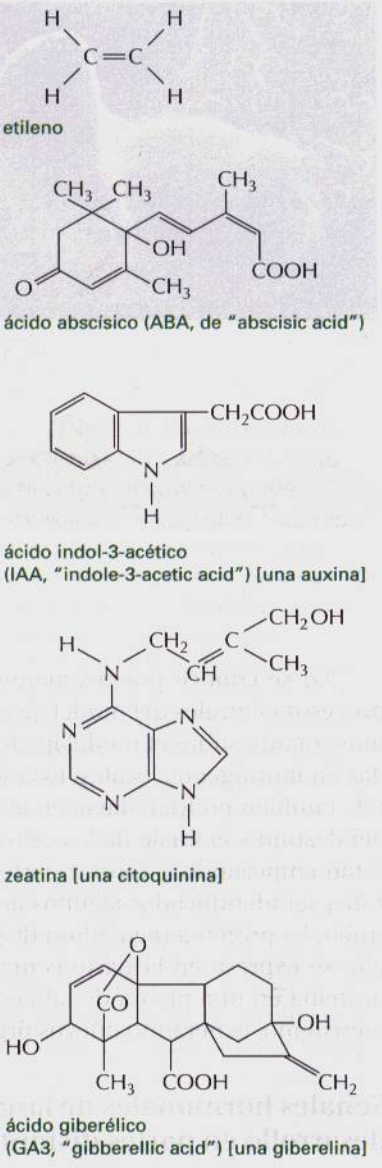


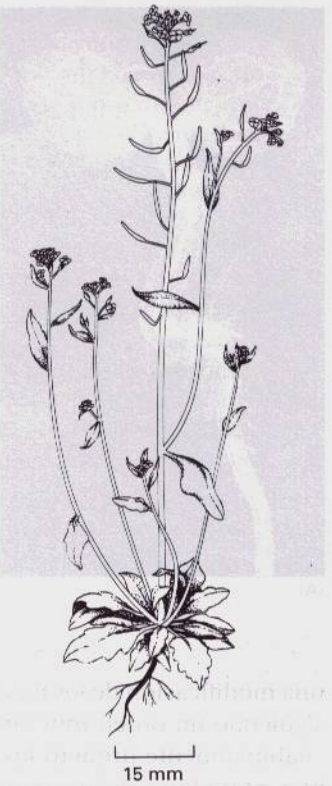
Figura 21-92 Reguladores del crecimiento vegetal. Fórmula de una molécula representativa de cada uno de los cinco grupos de moléculas reguladoras naturales del crecimiento vegetal.

Arabidopsis se utiliza como organismo modelo para la genética molecular de las plantas[75]

La investigación sistemática en busca de mutaciones que afecten el modelaje del embrión vegetal ha facilitado que se empiecen a identificar los genes que dirigen el desarrollo vegetal y que se empiece a dilucidar su funcionamiento. Este enfoque precisa de una planta que sea, como *Drosophila* o *Caenorhabditis elegans*, pequeña, de reproducción rápida, y apropiada para los estudios genéticos. El papel de "planta modelo" recayó en un pequeño vegetal, el berro común de pared ***Arabidopsis thaliana*** (Figura 21-93), ya que se pueden hacer crecer un gran número de individuos en el interior de un tubo de ensayo y producir millares de brotes por planta al cabo de 8 a 10 semanas. *Arabidopsis* también presenta la ventaja para el análisis molecular de tener el genoma vegetal más pequeño conocido (7×10^7 pares de nucleótidos), comparable al de la levadura (2×10^7 pares de nucleótidos), *C. elegans* (10^8 pares de nucleótidos) y *Drosophila* (10^8 pares de nucleótidos). Se han llevado a cabo cultivos celulares y se han establecido métodos de transformación génica, se ha aislado un gran número de mutantes de interés y ahora disponemos de una notable colección de clones de DNA genómico. *Arabidopsis* presenta, al igual que *C. elegans*, una ventaja importante sobre *Drosophila* para los estudios genéticos: como muchas otras plantas con flor, se puede reproducir como hermafrodita debido a que una sola flor produce tanto las células huevo como el polen que las puede fecundar. Por lo tanto, cuando una flor que es heterozigota debido a una mutación letal recesiva se autofecunda, una cuarta parte de sus semillas presentará el fenotipo embrionario homozigoto (Figura 21-94).

Mediante la utilización de mutágenos para generar decenas de millares de plantas mutantes, e inspeccionando de este modo su progenie, se ha identificado hasta el momento un total de 50 genes distintos que controlan la formación de los patrones embrionarios de *Arabidopsis*. Como en *Drosophila*, los genes del modelaje pueden agruparse según sus fenotipos mutantes homozigotos (Figura 21-95). Unos son necesarios para la formación de la raíz de la semilla, otros para el tallo de la semilla y otros para el ápice de la semilla con sus cotilédones. Otro tipo de genes es necesario para la formación de los tres tejidos básicos –la epidermis, el tejido fundamental y el tejido vascular– y todavía otra clase de genes es necesaria para los cambios programados de la forma celular que dan al embrión de la semilla su forma alargada. Ahora que poseemos este catálogo de genes fundamentales, pronto debería de ser posible dar otro paso y descubrir su funcionamiento. Pero a partir de la gran cantidad de fenotipos mutantes, ya parece probable que el modelaje del embrión se pueda explicar conceptualmente de la misma forma que

Figura 21-93 ***Arabidopsis thaliana.*** Esta pequeña planta pertenece a la familia de la mostaza (o crucífera). Es una hierba que carece de valor económico pero de gran valor para estudios genéticos del desarrollo vegetal. (Cortesía de Chris Sommerville).



para los animales. Tal como veremos ahora, lo mismo puede decirse de los procesos posteriores del desarrollo por los que se genera una flor.

Los genes selectores homeóticos definen las partes de una flor[76]

Los meristemos tienen que elegir entre otras opciones de desarrollo además de elegir entre permanecer en estado latente o iniciar el crecimiento; dichas opciones también se ven influidas frecuentemente por el entorno. La decisión más importante es la de formar una flor (Figura 21-96).

El cambio que se produce a partir del desarrollo meristemático hacia la formación de la flor está desencadenado, normalmente, por la luz. Mediante unos mecanismos poco conocidos basados en la absorción de la luz por medio de unas proteínas específicas denominadas *fitocromos*, las células del meristemo son capaces de modificar su patrón de expresión génica en respuesta a un cambio en la longitud del día, y de esta forma, de experimentar el cambio de estado que marca el inicio el desarrollo de la flor. A través de este cambio de su estado, el meristemo apical abandona sus opciones de continuar el crecimiento vegetativo y apuesta su futuro en la producción de gametos. Sus células se embarcan en un estricto programa de crecimiento y diferenciación finito: por medio de

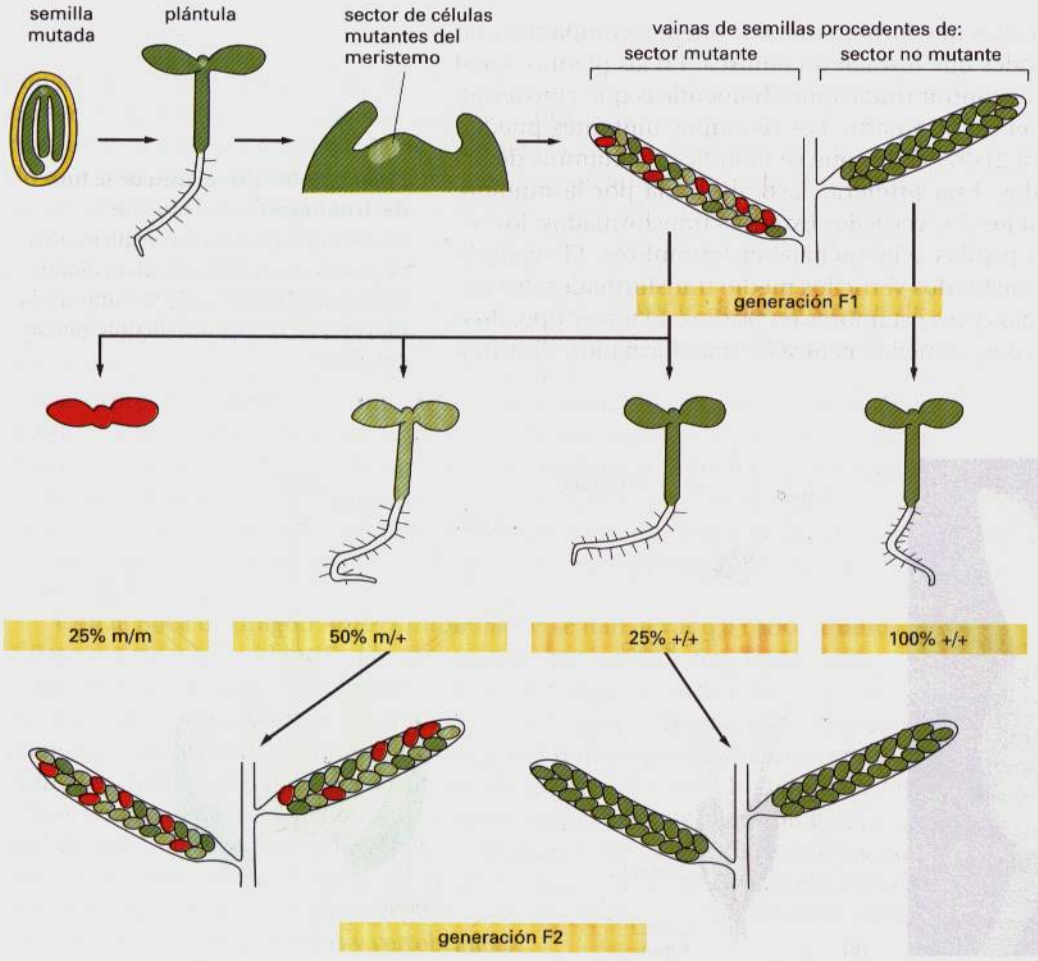


Figura 21-94 Producción de mutantes de *Arabidopsis*. Una semilla, que contiene un embrión pluricelular, se trata con un mutágeno químico y se deja que se convierta en una planta. En condiciones normales, esta planta será un mosaico de clones de células portadoras de varias mutaciones inducidas. Normalmente, cada flor producida por esta planta estará compuesta por células que pertenezcan al mismo clon, todas ellas portadoras de la misma mutación, *m*, en forma heterozigota (*m*/+). La autofecundación de flores individuales a través de su propio polen generará vainas de semillas, cada una de las cuales contendrá una familia de embriones la mitad de los cuales, por término medio, serán heterozigotos (*m*/+), una cuarta parte serán homozigotos mutantes (*m*/*m*), y una cuarta parte serán homozigotos de tipo salvaje (+/+).

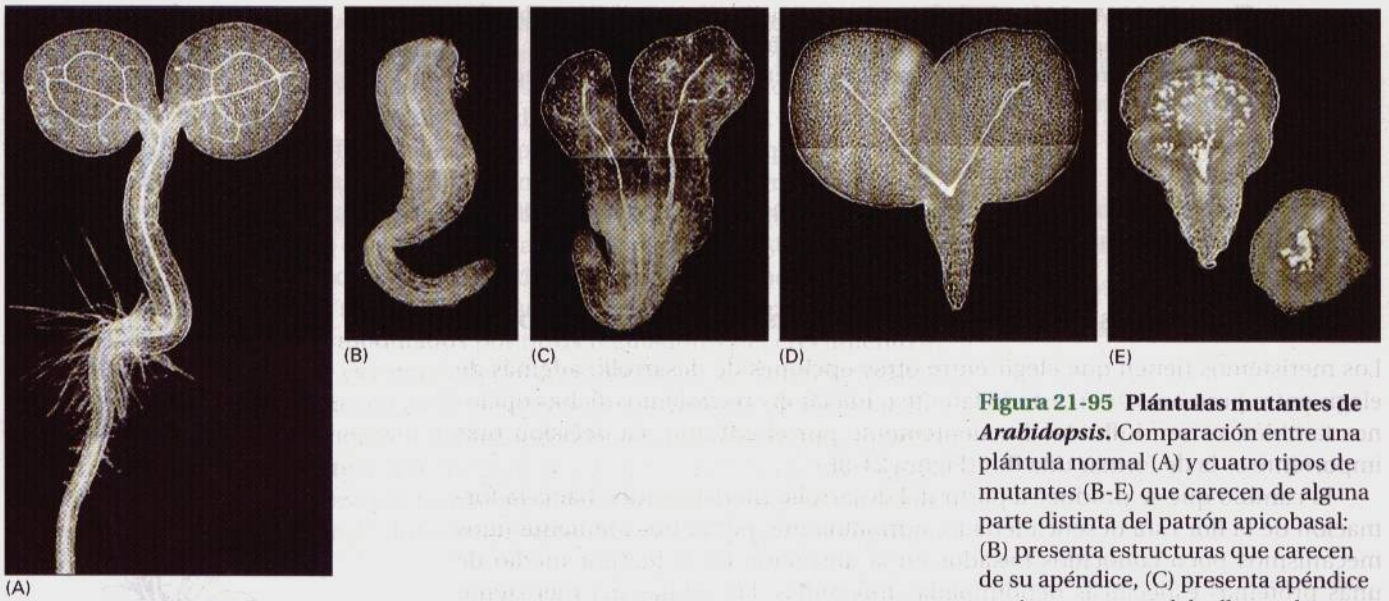


Figura 21-95 Plántulas mutantes de *Arabidopsis*. Comparación entre una plántula normal (A) y cuatro tipos de mutantes (B-E) que carecen de alguna parte distinta del patrón apicobasal: (B) presenta estructuras que carecen de su apéndice, (C) presenta apéndice y raíz pero carece del tallo que las une, (D) carece de raíz, y (E) forma los tejidos del tallo pero presenta carencias en ambos extremos. Las plántulas han sido transparentadas para mostrar los tejidos vasculares de su interior (puntos claros). (Según U. Mayer et al., *Nature* 353:402-407, 1991. © 1991 Macmillan Magazines Ltd.)

una modificación de los mecanismos ordinarios que generan las hojas, se forman siguiendo un orden muy preciso una serie de ápices especializados o verticilos –habitualmente primero los sépalos, luego los pétalos, más adelante los estambres portadores de las anteras que contienen el polen, y finalmente los pistilos que contienen las dos células huevo (véase Panel 21-2, pág. 1189). Al final de este proceso ha desaparecido el meristemo, pero entre su progenie ha producido células germinales.

Las series de hojas modificadas que forman una flor pueden comparase con las series de segmentos corporales que forman una mosca. En las plantas, igual que en las moscas, se pueden encontrar mutaciones homeóticas que convierten una parte del patrón al carácter de otra parte. Los fenotipos mutantes pueden agruparse en tres clases (Figura 21-97) en las que se modifican conjuntos de órganos diferentes pero solapados. Esta primera clase, ilustrada por la mutante *apetala2* de *Arabidopsis*, tienen los dos verticilos externos transformados: los sépalos están transformados en pistilos y los pétalos en estambres. El segundo tipo, ilustrado por *apetala3*, tiene los dos verticilos medio transformados: los pétalos están convertidos en sépalos y los estambres en pistilos. El tercer tipo, ilustrado por *agamous*, tiene sus dos verticilos centrales transformados, con una

Figura 21-96 Estructura de la flor de *Arabidopsis*. (A) Fotografía. (B) Dibujos. (C) Imagen esquemática de una sección transversal. El plano básico, ilustrado en (C), es común a la mayoría de las plantas dicotiledóneas con flores.

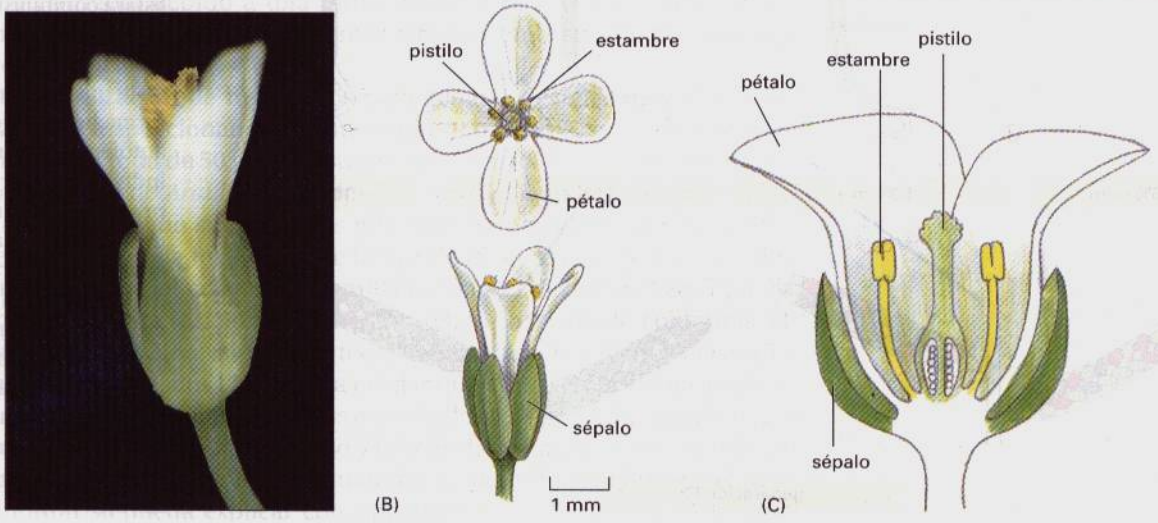


Figura 21-97 Flores de *Arabidopsis* que presentan mutaciones homeóticas. (A) En *agamous*, los estambres se convierten en pétalos y los pistilos en el meristemo floral; (B) en *apetala3*, los pétalos se convierten en sépalos y los estambres en pistilos; (C) en *apetala2*, los sépalos se convierten en pistilos y los pétalos en estambres. Otro gen, *pistillata*, presenta un fenotipo mutante parecido a la *apetala3*; de este modo es posible identificar las tres clases funcionales de genes selectores homeóticos. (D) En una mutante triple que carezca de las tres funciones, todos los órganos de la flor se convierten en hojas. (A-C, cortesía de Leslie Sieburth; D, cortesía de Mark Running.)

consecuencia más drástica: los estambres están convertidos en pétalos, la flor carece de pistilos y en su lugar las células centrales se comportan como un meristemo floral, el cual empieza de nuevo todo el proceso del desarrollo, generando otro conjunto anómalo de sépalos y pétalos que anida dentro del primer meristemo y, potencialmente, otro conjunto anidado dentro del segundo meristemo, y así indefinidamente. Estos fenotipos identifican tres clases de genes selectores homeóticos, los cuales, al igual que los genes selectores homeóticos de *Drosophila*, codifican proteínas reguladoras de genes. Estas proteínas definen las diferencias del estado celular que otorgan a las diferentes partes de una flor normal sus distintos caracteres. La hibridación *in situ* confirma que los genes se expresan según los patrones previstos de acuerdo con esta interpretación (Figura 21-98). En una mutante triple en la cual las tres funciones génicas están ausentes, se obtiene en lugar de una flor una sucesión infinita de hojas anidadas de forma compacta. Por lo tanto las hojas representan un "estado básico" en el cual no se expresa ninguno de estos genes selectores homeóticos, mientras que los otros tipos de órganos son el resultado de la expresión de genes en combinaciones diferentes.

Con la boca de dragón *Antirrhinum majus* se han llevado a cabo estudios similares a éste y se ha identificado un conjunto parecido de fenotipos y genes. La secuenciación de genes revela que, a pesar de la larga distancia en la evolución existente entre *Antirrhinum* y *Arabidopsis*, los fenotipos homeóticos correspondientes surgen a partir de mutaciones en genes homólogos: las plantas, como los animales, han conservado sus sistemas de genes selectores homeóticos. Otra vez, el conjunto de estos genes parece haber surgido por duplicación génica: varios de ellos, necesarios en los diferentes órganos de la flor, tienen secuencias claramente homólogas. No son de la clase homeobox pero están relacionados con otra familia de proteínas reguladoras de genes (la denominada familia MADS) presente en levaduras y vertebrados.

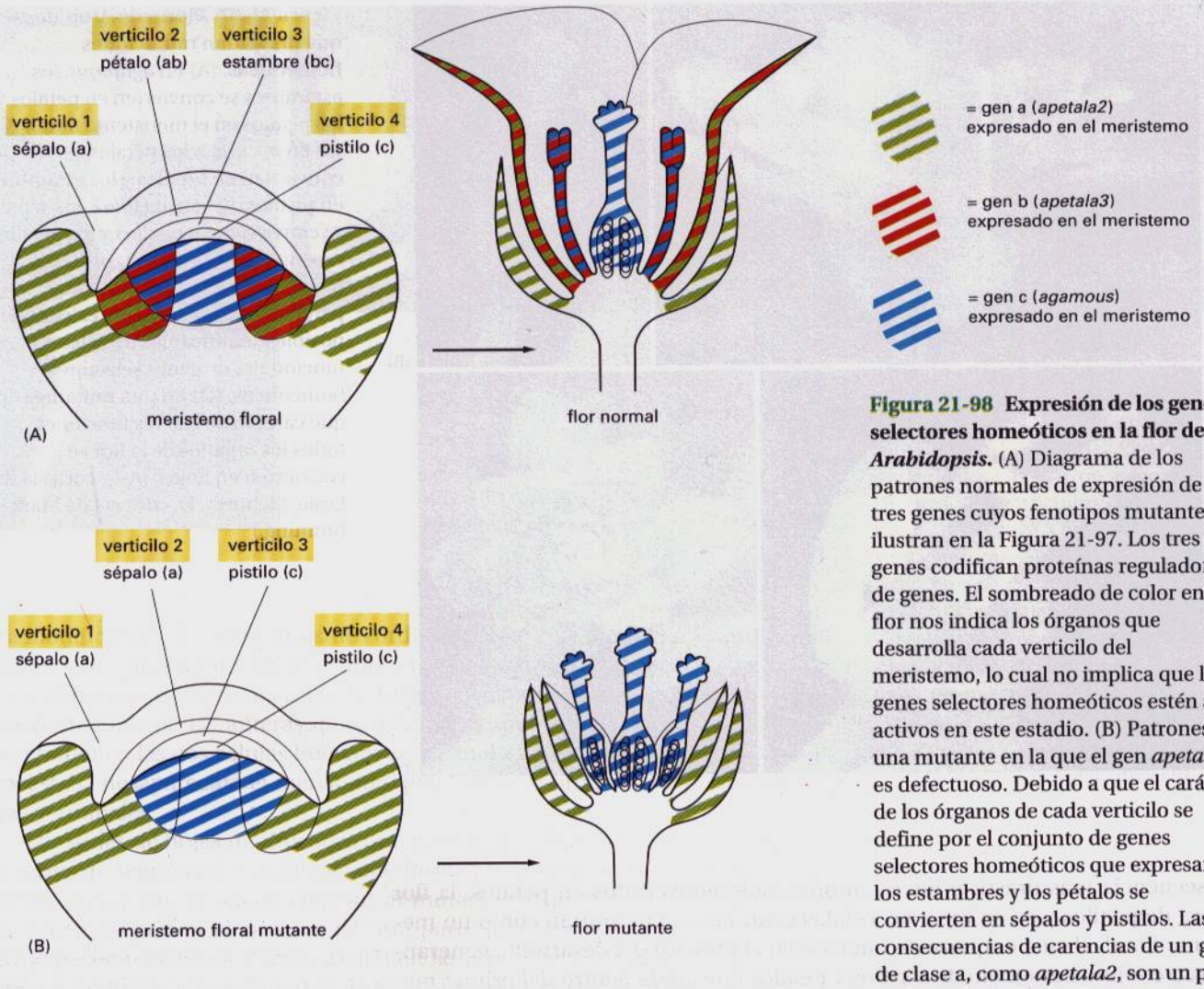


Figura 21-98 Expresión de los genes selectores homeóticos en la flor de *Arabidopsis*. (A) Diagrama de los patrones normales de expresión de los tres genes cuyos fenotipos mutantes se ilustran en la Figura 21-97. Los tres genes codifican proteínas reguladoras de genes. El sombreado de color en la flor nos indica los órganos que desarrolla cada verticilo del meristemo, lo cual no implica que los genes selectores homeóticos estén aún activos en este estadio. (B) Patrones de una mutante en la que el gen *apetala3* es defectuoso. Debido a que el carácter de los órganos de cada verticilo se define por el conjunto de genes selectores homeóticos que expresan, los estambres y los pétalos se convierten en sépalos y pistilos. Las consecuencias de carencias de un gen de clase a, como *apetala2*, son un poco más complejas: la ausencia de un producto génico de clase a permite que el gen de clase c se exprese tanto en el exterior como en el interior de ambos verticilos, haciendo que estos verticilos exteriores se desarrollen como pistilos y estambres, respectivamente. La deficiencia de genes de clase c impide que la región central sufra la diferenciación terminal como pistilo, de forma que continúa su crecimiento como meristemo generando cada vez más sépalos y pétalos.

Las investigaciones sobre la genética molecular del desarrollo vegetal acaban de comenzar. Por el momento, no se conoce casi nada, por ejemplo acerca de los sistemas genéticos responsables de la comunicación local célula-célula ni sobre la señalización posicional en la formación del patrón vegetal. Sin embargo, ya está claro que plantas y animales, a pesar de sus diferencias, han encontrado de forma independiente soluciones muy similares a muchos de los problemas fundamentales del desarrollo pluricelular.

Resumen

El desarrollo de una planta con flores, igual que el de un animal, empieza con la división de un huevo fecundado formando un embrión con una organización polarizada: la parte apical del embrión forma primero el brote, la parte basal (la raíz) y la parte media (el tallo). Primero la división celular se da a lo largo de todo el cuerpo del embrión. No obstante, a medida que el embrión crece, la adición de nuevas células queda restringida a regiones pequeñas denominadas meristemos. Los meristemos apicales, situados en el extremo del brote y en el de la raíz, persisten durante toda la vida de la planta, concediéndole la capacidad de crecer secuencialmente añadiendo nuevas partes del cuerpo a su periferia. Habitualmente, el brote genera series repetitivas de módulos, cada uno de los cuales consta de un segmento de tallo, una hoja y una yema axilar. Una yema axilar es un nuevo meristemo en potencia, capaz de dar lugar a un rama lateral; el entorno puede controlar el desarrollo de la planta regulando la activación de sus yemas. Las señales del entorno

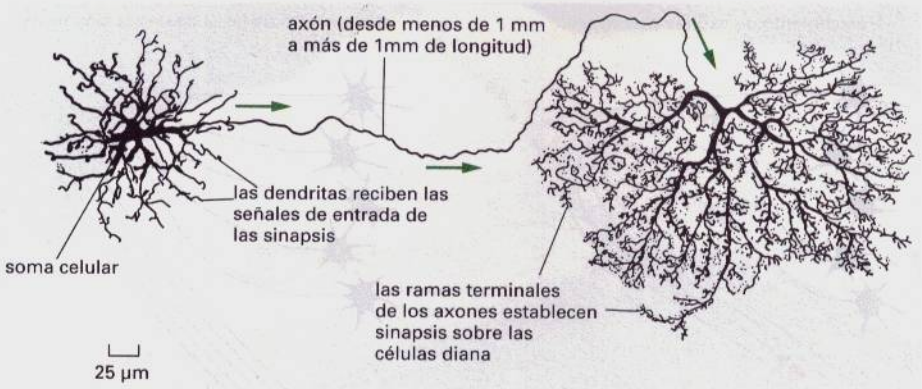


Figura 21-99 Neurona típica de un vertebrado. Las flechas señalan las direcciones en que se transmiten las señales. La neurona representada pertenece a la retina de un mono. Las neuronas más largas y grandes de un humano tiene una extensión de cerca de 1 millón de µm y su axón un diámetro de 15 µm. (Ilustración de la neurona de B.B. Boycott en Essays on the Nervous System [R. Bellairs y E.G. Gray, eds.]. Oxford, UK: Clarendon Press, 1974.)

también pueden provocar que el meristemo apical pase de formar hojas a formar flores. Señales de largo alcance mediadas por hormonas vegetales coordinan los procesos de este desarrollo que tienen lugar en partes distantes de la planta.

Sin embargo, la organización interna de cada módulo de la planta está controlada por mecanismos de formación de patrones muy estrictos, análogos a los que controlan el desarrollo animal. Estos mecanismos actúan en las proximidades del meristemo apical, donde las posiciones relativas de los rudimentos foliares y otros órganos están inicialmente mapados a escala microscópica. El patrón de hojas modificadas –sépalos, pétalos, estambres y pistilos– de una flor se establecen de forma similar. La base genética del patrón de formación de las plantas puede analizarse del mismo modo que el de los animales. La pequeña hierba* Arabidopsis thaliana *es muy utilizada como "planta modelo" en tales estudios. Los genes que controlan la organización del embrión, análogos a los genes de polaridad del huevo y los genes de segmentación de* Drosophila, *pueden ser identificados. La secuencia de las partes en una flor está controlada por genes selectores homeóticos estrechamente análogos (aunque no homólogos) a los de los animales.

El desarrollo neural[77]

Las células nerviosas, o neuronas, son unas de las más antiguas de todos los tipos de células animales especializadas, y son tan importantes para las medusas y anémonas marinas como para los gusanos, las moscas o los humanos. Su estructura es distinta a la de cualquier otro tipo de célula; los problemas que plantea el desarrollo del sistema nervioso no están presentes en otros tejidos. Por encima de todo, lo que sorprende más de una neurona es su forma enormemente extendida, formada por un largo **axón** y **dendritas** que conectan con otras células por medio de las **sinapsis** (Figura 21-99). El principal desafío del desarrollo neural consiste en explicar cómo crecen los axones y las dendritas, cómo encuentran sus compañeros adecuados, y cómo establecen sinapsis selectivas con ellos generando una red funcional (Figura 21-100).

Muchos de los componentes característicos del sistema nervioso –los diversos tipos de neuronas, células sensoriales y musculares– se originan en lugares del embrión muy diferentes e inicialmente están desconectados entre sí. Así

Figura 21-100 La compleja organización de las conexiones de las células nerviosas. Este dibujo semiesquemático ilustra una sección transversal de una pequeña parte del cerebro de mamífero –el bulbo olfativo de un perro, impregnado con la técnica de Golgi. Las manchas negras son neuronas; las líneas delgadas son axones y dendritas, mediante las cuales se interconectan varios conjuntos de neuronas siguiendo reglas muy precisas. (Según C. Golgi, *Riv. sper. freniat. Reggio-Emilia* 1:405-425, 1875; reproducido por M. Jacobson, Developmental Neurobiology, 3rd ed. New York: Plenum, 1992.)

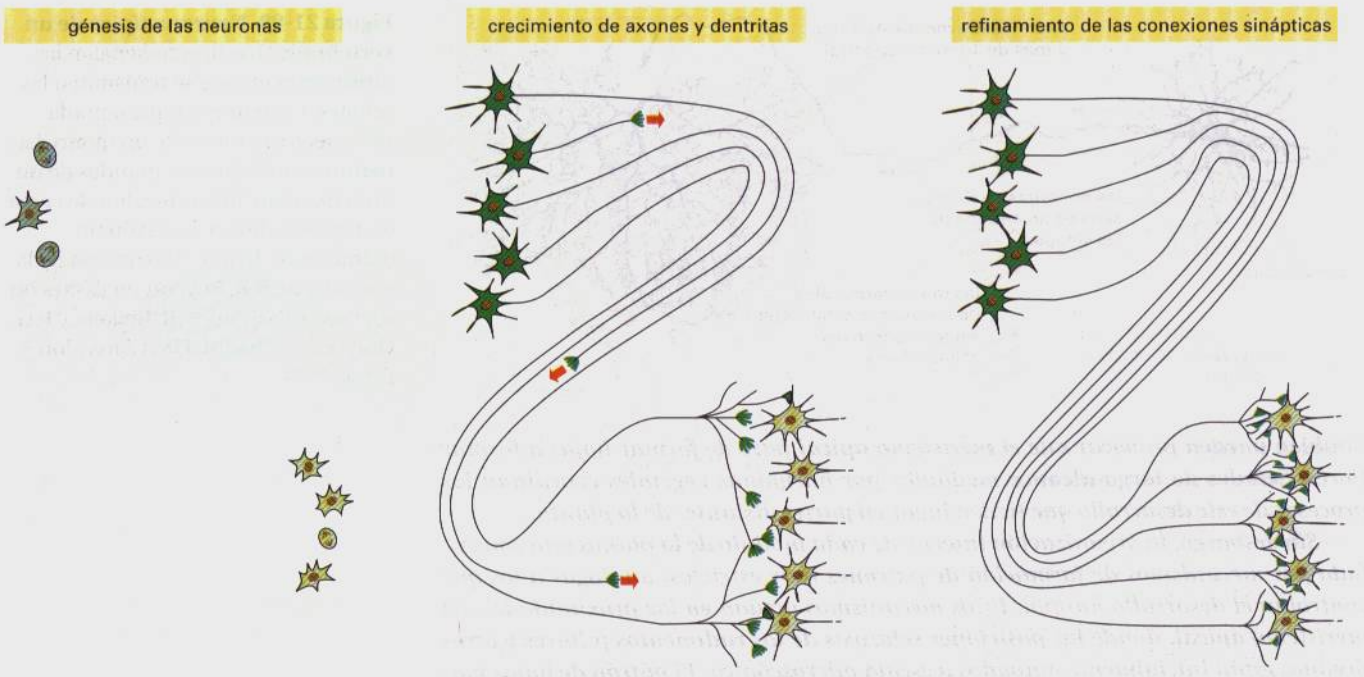


Figura 21-101 Las tres fases del desarrollo neural.

pues, durante la primera fase del desarrollo neural (Figura 21-101), se desarrollan las diferentes partes del sistema neural, según sus programas locales, que actúan de acuerdo a los principios de diversificación celular comunes a otros tejidos del cuerpo que ya hemos visto. La fase siguiente implica un tipo de morfogénesis exclusiva del sistema nervioso: se establece, a lo largo de rutas específicas, un conjunto provisional pero ordenado de conexiones entre las diferentes partes del sistema nervioso, mediante el crecimiento de axones y dendritas, gracias al cual pueden empezar a interactuar. En la tercera y última fase, que se prolongará en la vida adulta, las conexiones se ajustan y perfeccionan a través interacciones entre los diferentes componentes, mediante un mecanismo que depende de las señales eléctricas que transmiten y reciben.

Las reservas de neuronas generadas en el inicio del desarrollo neural no se reemplazarán posteriormente[78]

En todos los animales, el sistema nervioso se desarrolla a partir del ectodermo. Como hemos visto en este capítulo, en los vertebrados, en los cuales nos centraremos, el sistema nervioso deriva principalmente de dos grupos de células –las células del *tubo neural* (una invaginación del ectodermo) y las células de la *cresta neural* (una población de células que se liberan del ectodermo neuronal y migran hacia otras regiones del embrión). El tubo neural forma el sistema nervioso central (la médula espinal y el cerebro, incluyendo la retina del ojo), mientras que la cresta neural da lugar a la mayoría de las neuronas y a las células de sostén del sistema nervioso periférico (Figura 21-102).

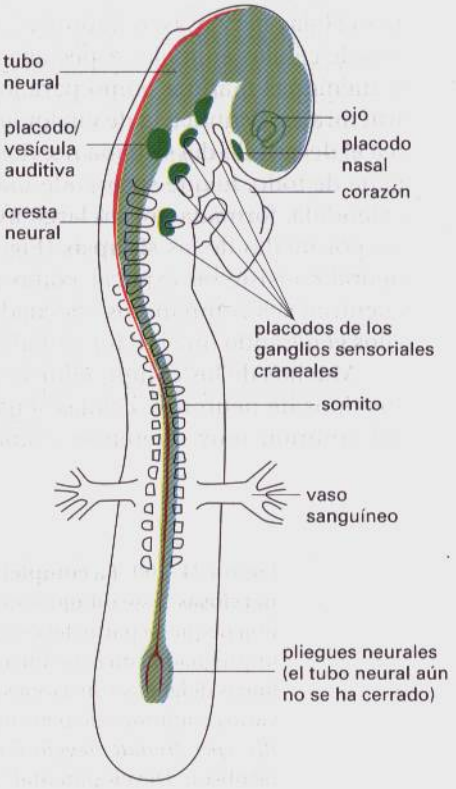


Figura 21-102 Diagrama de un embrión temprano de pollo (2 1/2 días), que muestra los orígenes del sistema nervioso. El tubo neural (en *verde claro*) ya está cerrado, salvo en el extremo de su cola, y yace internamente bajo el ectodermo, al que pertenecía originalmente (véase Figura 21-10). La cresta neural (en *rojo*) yace dorsalmente bajo el ectodermo, dentro o encima del tubo neural. Además, los *placodos* (en *verde oscuro*), engrosamientos de la superficie del ectodermo de la cabeza, dan lugar a algunas células transductoras sensoriales y neuronas de esta región, incluyendo las de la nariz y del oído. Las células de la retina del ojo, por el contrario, tienen su origen en el tubo neural.

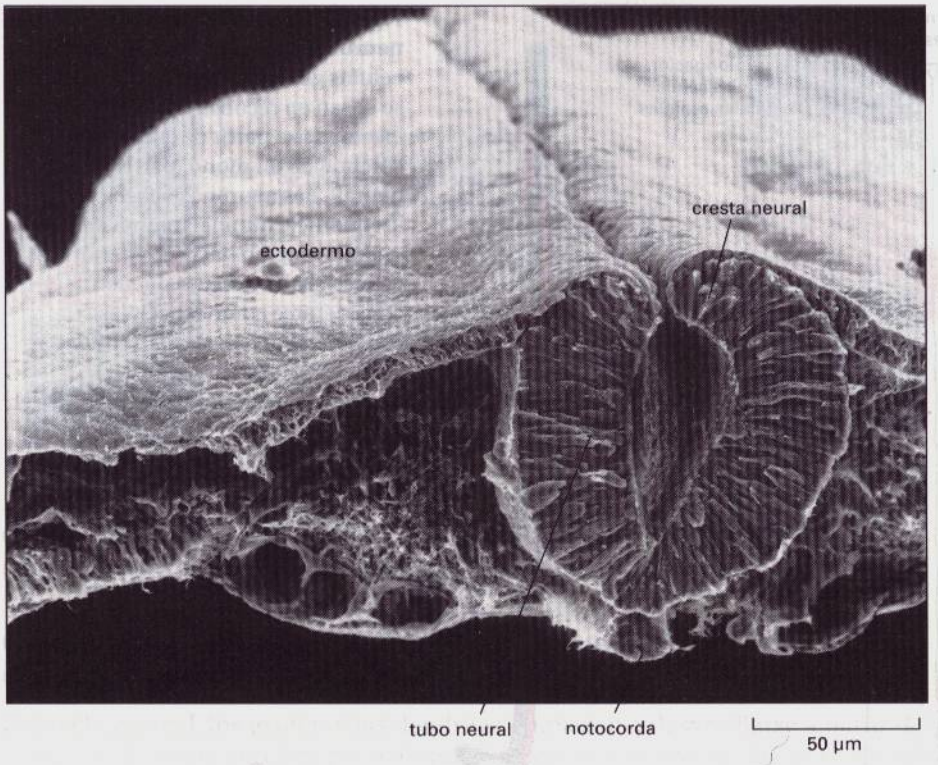


Figura 21-103 Formación del tubo neural. Electronmicrografía de barrido que muestra una sección transversal del tronco de un embrión de pollo de dos días de edad. El tubo neural está a punto de cerrarse y separarse del ectodermo; en este estadio consta (en el pollo) de un epitelio de un grosor de una sola célula. (Cortesía de Jean Paul Revel).

El **tubo neural**, que trataremos más profundamente, consta inicialmente de un epitelio de una sola capa (Figura 21-103) que genera tanto las neuronas como las células de sostén, denominadas **gliales**, es decir las células del sistema nervioso central. Durante el proceso se transforman formando una estructura más gruesa y compleja con muchas capas de células de distintos tipos.

Debido a que las neuronas ya diferenciadas no se dividen, se puede asignar un "nacimiento" a cada una de ellas, definido como el momento en que ocurre la mitosis final que generará la neurona a partir de una célula precursora de neuronas en división. Tanto en los vertebrados superiores como en los invertebrados, todos los nacimientos de las neuronas de un tipo determinado generalmente ocurren en el transcurso de un período estrictamente limitado, tras el cual no se producirán más neuronas de este tipo. Cada región del tubo neural en desarrollo tiene su propio programa de divisiones celulares, y las neuronas con momentos distintos de nacimientos normalmente tendrán funciones distintas. Las células neurales madre no acostumbran a persistir una vez completada la producción de células nerviosas, por lo que las poblaciones de células nerviosas solamente se podrán regular disminuyendo de número, mediante la muerte celular, como veremos más adelante.

El momento y el lugar de nacimiento de una neurona determinarán sus conexiones[79]

Antes de emitir al exterior su axón y sus dendritas, la neurona inmadura o su precursora acostumbran a migrar desde su lugar de nacimiento y se establecen en alguna otra localización. Las células gliales muy a menudo proporcionan una vía para la migración en el sistema nervioso central. Por ejemplo, el tubo neural de un embrión de un vertebrado contiene un armazón de *células gliales radiales*. Cada una de estas células se extiende desde el interior del tubo hacia su superficie exterior, una distancia que en la corteza cerebral del cerebro en desarrollo de un primate puede llegar a representar hasta 2 cm. Las futuras neuronas atraviesan sus últimas divisiones celulares cerca del lumen del tubo neural y entonces se trasladan hacia el exterior arrastrándose sobre las células gliales (Figura 21-104).

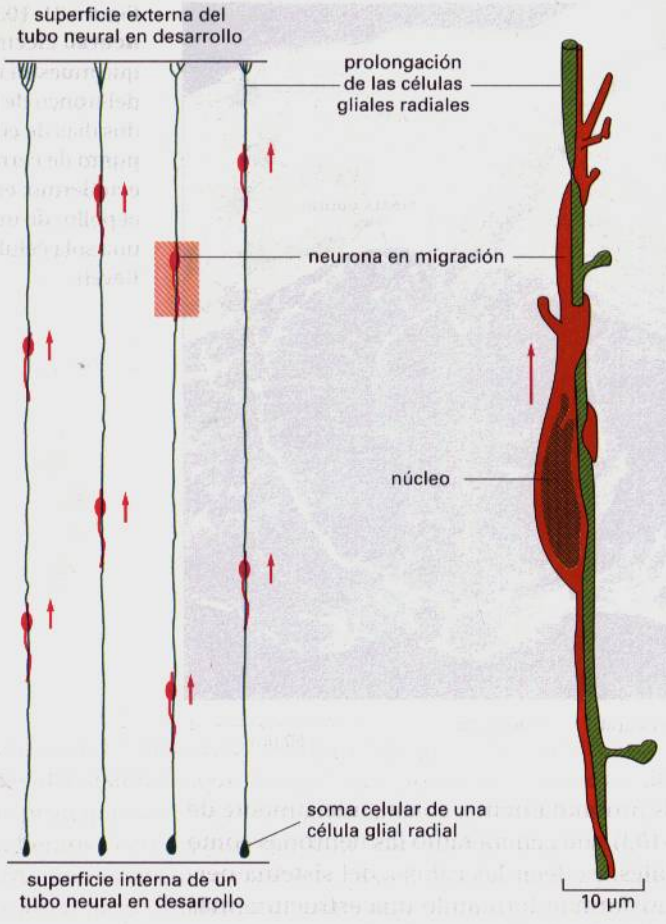


Figura 21-104 Migración de neuronas inmaduras a lo largo de las células gliales radiales. Los diagramas se basan en reconstrucciones efectuadas a partir de la corteza cerebral de un mono (parte del tubo neural). Las neuronas nacen cerca de la superficie luminal interna del tubo neural y migran hacia el exterior. Las células gliales radiales pueden considerarse como las células supervivientes del epitelio columnar original del tubo neural, sorprendentemente estiradas como el grosor de la pared del tubo. (Según P. Rakic, *J. Comp. Neurol.* 145:61-84, 1972.)

Sucesivas cohortes de células migrantes, nacidas en momentos distintos, se establecen en posiciones distintas. Por ejemplo, en la corteza cerebral, las neuronas están dispuestas en capas según su momento de nacimiento, como resultado de una migración en la que las células nacidas más tarde adelantan a las que nacieron antes. Gracias al trasplante de células entre embriones jóvenes y embriones maduros se puede demostrar que las diferentes opciones de futuro ya estaban tomadas antes de iniciar la migración; reflejan diferencias entre los caracteres intrínsecos de las células producidas en momentos distintos –diferencias que influirán también en las conexiones sinápticas que se formarán posteriormente. De este modo, en la corteza cerebral las células nacidas primero (capas internas) enviarán sus axones hacia el exterior de la corteza, mientras que las células nacidas más tarde (capas externas) enviarán sus axones hacia las regiones del interior de la corteza. La relación entre el momento del nacimiento y las conexiones de los axones se mantiene incluso en ratones mutantes cuyas migraciones son anormales e invierten las posiciones finales de las células nacidas primero con las que lo hacen posteriormente, lo que confirma que las conexiones reflejan el carácter intrínseco de las neuronas, más que su localización final (Figura 21-105).

No menos importante que el momento de nacimiento de una neurona es el lugar en que lo hace. Las células de diferentes regiones del tubo neural tienen valores posicionales distintos que controlan las conexiones que formarán. Estas diferencias dependientes de la posición son apreciables tanto en el patrón de expresión de los genes *Hox*, que ya hemos visto, como en un gran grupo de otros genes que codifican proteínas reguladoras de genes y otras moléculas reguladoras. Se conocen muy pocos de los mecanismos que generan las diferencias moleculares entre la futuras neuronas, pero los que se conocen parecen ser muy parecidos a los mecanismos del patrón de formación que vimos anteriormente. Sin embargo, la cuestión que hemos de afrontar ahora es otra: ¿Cómo actúan las

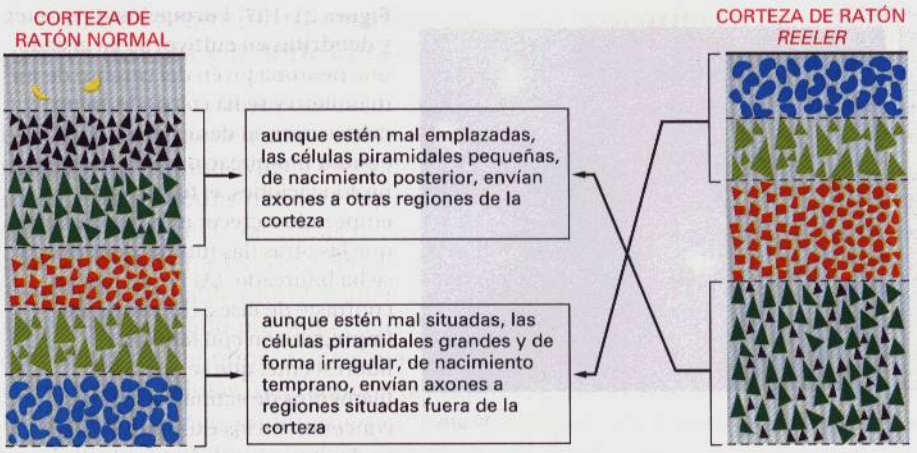


Figura 21-105 Comparación entre la disposición de capas de neuronas de la corteza de ratones normales y *reeler*. En el mutante *reeler* una anomalía en la migración celular provoca una inversión aproximada de la relación habitual entre el momento del nacimiento neuronal y la posición de las neuronas. Sin embargo las neuronas emplazadas de forma incorrecta se diferencian y realizan las conexiones adecuadas según el momento de su nacimiento.

células nerviosas recién nacidas, equipadas con sus marcadores específicos, para establecer un patrón de conexiones bien ordenado?

Cada axón o dendrita se extiende gracias a un cono de crecimiento situado en su extremo[77, 80]

Por regla general, los axones y las dendritas empiezan a desarrollarse a partir del cuerpo de la célula nerviosa poco después de que el soma celular haya alcanzado su localización final. La secuencia de los procesos que se producen se observó originalmente sobre tejido embrionario intacto mediante el método de impregnación de Golgi (véase Figura 21-106). Esta técnica, y otros métodos que se desarrollaron posteriormente, han revelado un engrosamiento irregular y erizado en el extremo de cada prolongación en desarrollo de la célula nerviosa. Parece ser que esta estructura, que se denomina **cono de crecimiento**, se arrastra a través del tejido de su alrededor. Esto incluye la maquinaria que produce el movimiento y el mecanismo que dirige el extremo de cada prolongación por el camino adecuado.

La mayor parte de los conocimientos de que disponemos sobre las propiedades de los conos de crecimiento procede de estudios realizados en cultivos tisulares y celulares. Es posible observar cómo una neurona empieza a extender sus prolongaciones: primero son todas iguales, hasta que uno de los conos de crecimiento acelera su prolongación bruscamente, identificándose esta prolongación con el axón y presentando el conjunto de proteínas específicas del axón

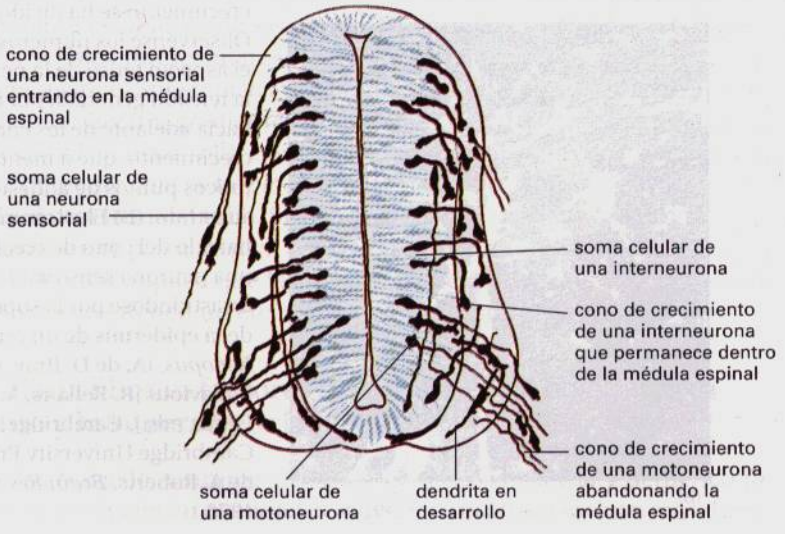


Figura 21-106 Los conos de crecimiento de la médula espinal en desarrollo de un embrión de pollo de 3 días. El dibujo muestra una sección transversal impregnada con la técnica Golgi. Aparentemente la mayoría de las neuronas tiene inicialmente una única prolongación alargada: el futuro axón. Los conos de crecimiento de las interneuronas permanecen dentro de la médula espinal, los de las motoneuronas salen de ella (emprendiendo su camino hacia los músculos) y los de las neuronas sensoriales crecen hacia interior de la médula espinal desde el exterior (donde se hallan sus cuerpos celulares). Muchas de las células de las regiones más centrales de la médula espinal embrionaria aún están proliferando y no han empezado a diferenciarse como neuronas o células gliales. (De S. Ramón y Cajal, Histología del sistema nervioso del hombre y los vertebrados. París: Maloine, 1909-1911; reeditado, Madrid: C.S.I.C., 1972.)

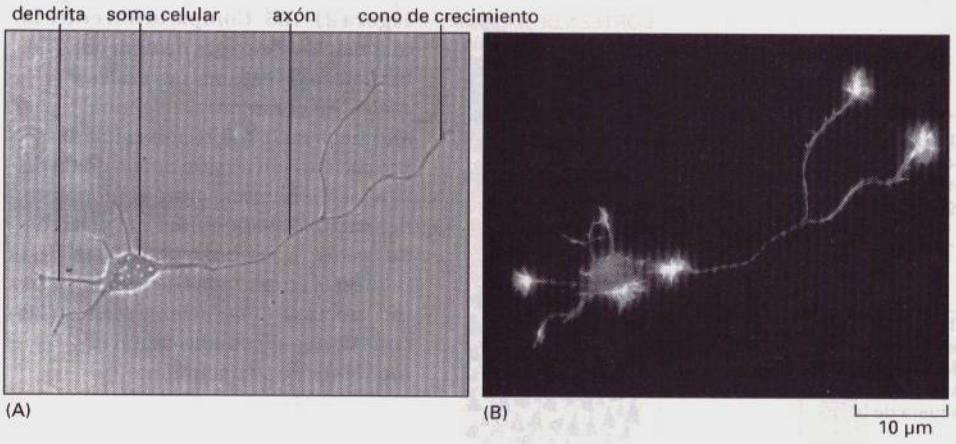


Figura 21-107 Formación de axones y dendritas en cultivo. Se ha aislado una neurona joven del cerebro de un mamífero y se ha colocado en un cultivo para su desarrollo, donde emitirá prolongaciones. Una de estas prolongaciones, el futuro axón, ha empezado a crecer más rápidamente que las otras (las futuras dendritas) y se ha bifurcado. (A) Fotografía en contraste de fases; (B) patrón de impregnación con faloidina fluorescente, que se une a los filamentos de actina. La actina se concentra en los extremos de las prolongaciones de los conos de crecimiento, que son muy activos extendiéndose y en otras actividades de los lamelipodios. (Cortesía de Kimberly Goslin, según Z.W. Hall, An Introduction to Molecular Neurobiology. Sunderland, MA: Sinauer, 1992.)

(Figura 21-107). El contraste entre el axón y las dendritas, establecido en este estadio, provocará que ambos tipos de prolongaciones crezcan hacia direcciones distintas, siguiendo caminos diferentes, y así desempeñando funciones distintas en la formación de las sinapsis.

La distinción entre el axón y la dendrita no es a menudo fácil de observar en una neurona aislada en un cultivo, y es conveniente referirse a ambos tipos de prolongaciones como: *neuritas*. El cono de crecimiento situado en el extremo de una neurita de crecimiento rápido típico, avanza a una velocidad de 1 mm por día. La neurita consta de una extensión ancha y aplanada como la palma de una mano, con numerosas y largas *microespinas* o *filopodios* que se extienden como dedos a partir de ella (Figura 21-108). Estos filopodios permanecen en continua actividad: unos se retraen hacia el cono de crecimiento mientras que otros se alargan, ondulándose y adhiriéndose al substrato. Las "membranas" o "velos" existentes entre los filopodios forman *lamelipodios*, con una membrana fruncida. Todas estas características, al igual que la configuración interna del citoesqueleto, sugieren que el cono de crecimiento avanza arrastrándose de un modo muy parecido al del borde anterior de una célula como un neutrófilo o un fibroblasto, como vimos en el Capítulo 16.

El cono de crecimiento explora con sus filopodios y lamelipodios las regiones del medio situadas en posiciones más avanzadas, en todas direcciones. Si estas protuberancias entran en contacto con una superficie poco favorable, se retraen; si entran en contacto con una superficie más favorable, se mantienen estiradas, orientando la extensión de todo el cono en esa dirección. De esta forma el cono de crecimiento se puede guiar mediante sutiles variaciones de las propiedades de superficie del substrato sobre el que se desplaza.

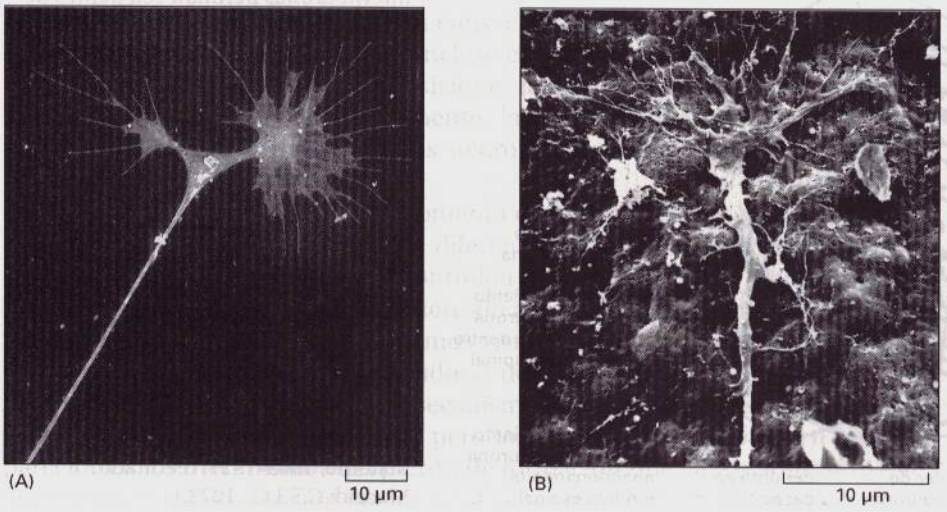


Figura 21-108 Conos de crecimiento neural. (A) Electronmicrografía de barrido de los conos de crecimiento presentes en el extremo de una neurita emitida por una neurona simpática en cultivo. En este caso, un cono de crecimiento se ha divido en dos. Obsérvense los numerosos filopodios y el aspecto tenso de la neurita, debido a la tensión generada por el movimiento hacia adelante de los conos de crecimiento, que a menudo son los únicos puntos de adhesión firme al substrato. (B) Electronmicrografía de barrido del cono de crecimiento de una neurona sensorial *in vivo*, arrastrándose por la superficie interna de la epidermis de un renacuajo de *Xenopus*. (A, de D. Bray, en Cell Behaviour [R. Bellairs, A. Curtis, y G. Dunn, eds.]. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1982; B, de A. Roberts, *Brain Res.* 118:526-530, 1976.)

El cono de crecimiento conduce *in vivo* a la neurita en desarrollo a través de una vía definida con precisión[81-84]

En general en los animales vivos los conos de crecimiento se desplazan hacia sus destinos a lo largo de rutas establecidas, sirviéndose de múltiples señales para encontrar su camino. Muy a menudo toman rutas que ya han sido utilizadas anteriormente por otras neuritas, siguiéndolas mediante guías de contacto. Como consecuencia de ello, las fibras nerviosas de un animal adulto suelen estar agrupadas formando haces compactos y paralelos (denominados *fascículos* o *tractos fibrosos*). Es probable que el avance de los conos de crecimiento a lo largo de los axones esté mediado por moléculas de adhesión célula-célula homofílicas –glucoproteínas de membrana que capacitan a las células que las expresan para adherirse a otras células que también las expresen. Como vimos en el Capítulo 19, dos de las clases más importantes de estas moléculas son las que pertenecen a la *superfamilia de las inmunoglobulinas*, como *N-CAM*, y a la familia de las *cadherinas* dependientes de Ca^{2+}, como la *cadherina N*. Generalmente existen miembros de ambas familias en las superficies de los conos de crecimiento, de los axones y de muchos otros tipos celulares sobre los que se arrastran los conos de crecimiento, incluyendo las células gliales del sistema nervioso central y las células musculares de la periferia del cuerpo. Los conos de crecimiento también migran sobre componentes de la matriz extracelular, especialmente la laminina, a la cual se adhieren mediante receptores de la matriz de la superficie celular de la familia de las *integrinas* (tratados en el Capítulo 19).

En algunos casos se puede demostrar la importancia de una molécula de adhesión célula-célula o célula-matriz simplemente bloqueando su función con un anticuerpo y observando los trastornos causados sobre el crecimiento del axón. Sin embargo, por regla general un cono de crecimiento utiliza varios sistemas de adhesión en sus migraciones, y si utilizamos anticuerpos contra uno solo de ellos, los efectos serán mínimos; sólo cuando se aplican múltiples anticuerpos, de modo que se bloqueen todos a la vez, se retrasa seriamente el viaje del cono de crecimiento. En principio, diferentes combinaciones de moléculas de adhesión proporcionan una gran variedad de propiedades de superficie de los conos de crecimiento y una sutil y compleja selección de vías de acuerdo con las combinaciones de moléculas presentes en las superficies de las células que se encuentran a lo largo de la ruta.

Todavía desconocemos hasta qué punto son suficientes las diferentes combinaciones de proteínas de adhesión como N-CAM, cadherina N e integrinas en la membrana del cono de crecimiento para explicar por qué algunos conos de crecimiento escogen una ruta mientras otros escogen otra, o por qué un conjunto de axones, cuando han llegado a su región diana, son capaces de generar formaciones ordenadas de sinapsis. Seguramente las moléculas de adhesión no son las únicas influencias que participan en estos procesos. Los contactos que un cono de crecimiento establece con las superficies celulares y con la matriz pueden dar lugar a señales intracelulares que, por ejemplo, pueden inhibir activamente cualquier avance. Substancias difundidas a través del medio extracelular también pueden dar lugar a gradientes que proporcionen un guía. Por ejemplo, en la médula espinal en desarrollo existe un grupo de neuronas cuyos axones se desplazan ventralmente, hacia la *placa básica* del tubo neural, cruzando, por esta ruta, hacia el otro lado del tubo. Si colocamos estas neuronas en cultivo cerca de un explante de la placa básica, sus axones orientarán de nuevo su crecimiento hacia él, lo cual implica que las células especializadas de la placa básica secretan moléculas que tienen un efecto de guía quimiotáctica.

Los tejidos diana liberan factores neurotróficos que controlan el crecimiento y la supervivencia de las células nerviosas[82, 85]

La mayoría de los tipos de neuronas del sistema nervioso central y periférico de los vertebrados se producen en cantidades excesivas: un 50% o incluso más de es-

tas neuronas morirán poco después de alcanzar su destino, aunque su aspecto sea perfectamente normal y saludable hasta el momento de su muerte. Por ejemplo, aproximadamente la mitad de todas las motoneuronas que envían axones hacia el músculo esquelético mueren pocos días después de entrar en contacto con sus células musculares diana. La muerte a gran escala de neuronas podría reflejar el resultado de una competencia. Cada tipo de célula diana libera una cantidad limitada de **factor neurotrófico** específico, que necesitan para sobrevivir las neuronas que inervarán esta diana: aparentemente las neuronas compiten para conseguir este factor, y las que no consiguen una cantidad suficiente mueren por muerte celular programada. Este proceso aparentemente inúti, proporciona una medio simple y elegante para ajustar el número de neuronas de cada tipo al número de células diana que inervan.

El primer factor neurotrófico que se identificó, y con diferencia el mejor caracterizado, se conoce simplemente como **factor de crecimiento nervioso**, o **NGF** (de Nerve Growth Factor). Fue descubierto accidentalmente en el transcurso de unos experimentos en los que se trasplantaron tejidos extraños y tumores a embriones de pollo. Los trasplantes de un tumor concreto quedaron excepcional y densamente inervados y provocaron un engrosamiento sorprendente en algunos grupos de las neuronas periféricas en las proximidades del injerto. Sólo se vieron afectadas dos clases de neuronas: las *neuronas sensoriales* y l[illegible]*uronas simpáticas* (una subtipo de neuronas periféricas que controlan la [illegible]tracción del músculo liso y la secreción de las glándulas exocrinas). La búsqueda de una causa para este fenómeno condujo hasta una proteína específica, NGF, y demostró que si se administran anticuerpos anti-NGF a un ratón mientras su sistema nervioso está en desarrollo, la mayoría de las neuronas simpáticas y algunas neuronas sensoriales mueren. Esto mismo ocurre en un cultivo: las neuronas simpáticas y algunas de las neuronas sensoriales mueren en ausencia de NGF; en presencia de NGF, sobreviven y emiten neuritas (Figura 21-109). De forma similar, algunas clases de neuronas del sistema nervioso central dependen de NGF.

El NGF está producido por tejidos inervados por neuronas dependientes de NGF. Manipulaciones experimentales confirman que a mayor cantidad de tejido diana, mayor será el número de neuronas que sobrevivan, y se puede demostrar que este efecto es consecuencia del NGF porque puede ser simulado mediante la manipulación directa de las concentraciones de NGF. Después de que haya terminado la fase de muerte celular, el NGF continúa manteniendo una función reguladora de la densidad de inervación controlando la cantidad de procesos que emitirá el axón. Este mecanismo es esencial para la restitución de la inervación, por ejemplo en tejidos dañados de la piel o del músculo liso. El NGF actúa sobre un tejido intacto de la misma forma que lo hace sobre una placa de cultivo (véase Figura 21-109), preservando la supervivencia de células y estimulando localmente la actividad de los conos de crecimiento y así ajustando el suministro de inervación a las necesidades de la diana.

El NGF es sólo uno de los miembros de la familia de factores neurotróficos homólogos (denominados *neurotrofinas*) que son responsables de este tipo de

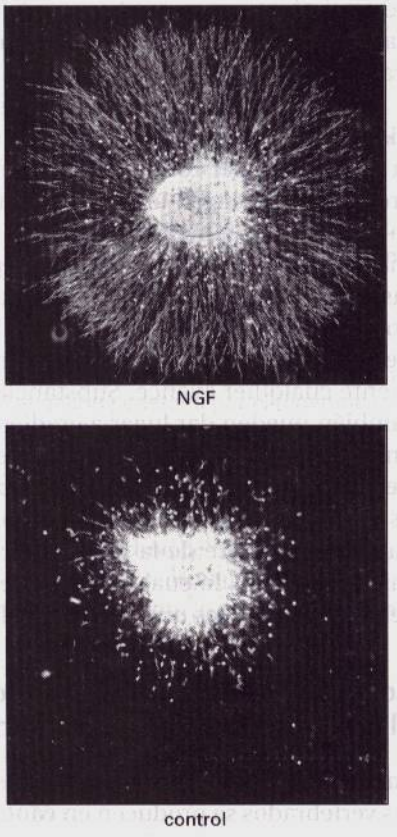


Figura 21-109 Efectos del NGF sobre la génesis de neuritas. Micrografías de campo oscuro de un ganglio cultivado durante 48 horas en presencia (*arriba*) o ausencia (*abajo*) de NGF. Las neuritas se desarrollan y crecen en y desde las neuronas simpáticas sólo en presencia de NGF en el medio. Cada cultivo también contiene células de Schwann (gliales) que han migrado del ganglio; tales células no se ven afectadas por el NGF. El efecto que ejerce sobre los conos de crecimiento es local, directo, rápido e independiente de cualquier comunicación con el soma celular; al eliminar el NGF del medio, los conos de crecimiento deprivados, detienen su desplazamiento durante uno o dos minutos. El efecto de NGF sobre la supervivencia celular es menos inmediato y se asocia con la asimilación de NGF por endocitosis y su transporte intracelular de retorno al soma celular. (Cortesía de Naomi Kleitman.)

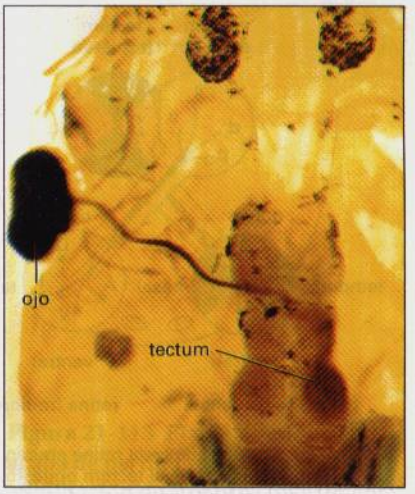


Figura 21-110 Conexiones entre el ojo y el cerebro de un renacuajo de *Xenopus*. En este espécimen se ha inyectado una molécula trazadora en el interior de un ojo (objeto oscuro situado en la *izquierda*), ha sido asimilada por las neuronas presentes, y transportada a lo largo de sus axones, lo cual pone de manifiesto las rutas que toman hacia el tectum óptico en el cerebro. (Cortesía de Jeremy Taylor.)

regulación de las diferentes partes del sistema nervioso de los vertebrados. Se unen a una familia complementaria de proteínas receptoras transmembrana (denominadas así debido a un proto-oncogén llamado *trk* que codifica una de ellas); estas proteínas pertenecen a la clase de receptores tirosina quinasa vistos en el Capítulo 15. Se espera que los factores neurotróficos sean útiles en el tratamiento de las enfermedades neurológicas, como la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de las motoneuronas (la enfermedad de Lou Gehrig), en las que las neuronas degeneran y mueren inadecuadamente.

Ahora volvamos al problema del modelaje espacial de las conexiones nerviosas.

Los valores posicionales de las neuronas guían la formación de mapas neuronales ordenados: doctrina de la especificidad neuronal[86]

Normalmente las aportaciones de información procedentes de órganos sensoriales *trazan mapas* o se *proyectan* de forma ordenada sobre las regiones sensoriales del sistema nervioso central, y las salidas de información de las regiones motoras del sistema nervioso central se trazan de manera ordenada sobre los músculos. Así pues, células nerviosas similares pertenecientes a regiones distintas de la retina de un vertebrado emiten sus axones estableciendo sinapsis con neuronas de regiones correspondientes distintas del *tectum óptico* del cerebro intermedio (Figura 21-110); de la misma forma, motoneuronas similares entre sí de distintas localizaciones de la médula espinal emiten sus axones hacia diferentes músculos.

En principio, los conos de crecimiento se podrían canalizar hacia sus varios destinos simplemente como consecuencia directa de los puntos de partida, como los conductores de una autopista multivía en la que estuviera prohibido cambiar de carril. Esta posibilidad fue comprobada en el sistema visual mediante un famoso experimento en los años cuarenta. Si seccionamos el nervio óptico de una rana, éste se regenera. Los axones de la retina crecen hacia el interior del tectum óptico, restituyendo la visión normal. Si, además, en el mismo momento en que se secciona el nervio se hace girar el ojo, de forma que las células originalmente ventrales de la retina queden en la posición de células dorsales de la retina, todavía se restituiría la visión, pero con una carencia notable: el animal se comporta como si percibiera el mundo al revés. Las células retinales mal emplazadas establecen conexiones apropiadas de acuerdo con su posición *original*, no con sus posición reales (Figura 21-111). Evidentemente las células están dotadas de valores posicionales que contienen una memoria de su posición original, de modo que las células de localizaciones opuestas en la retina son intrínsecamente diferentes. Igual que ocurre en la corteza de un ratón *reeler* (véase Figura 21-105), es el carácter intrínseco, y no la posición, el que elige la localización diana. Tal no equivalencia entre neuronas se denomina **especificidad neuronal**.

Los axones de lados opuestos de la retina responden de forma distinta al gradiente de las moléculas repelentes del tectum[87]

Una vez han alcanzado el tectum, los axones retinales tienen que escoger, según su carácter individual, qué región del tectum inervarán. Por ejemplo, los axones de la retina nasal se proyectan hacia el tectum posterior, y los de la retina temporal (el lado más alejado de la nariz) se proyectan hacia el tectum anterior. Esta opción se controla mediante diferencias del carácter intrínseco de las células de

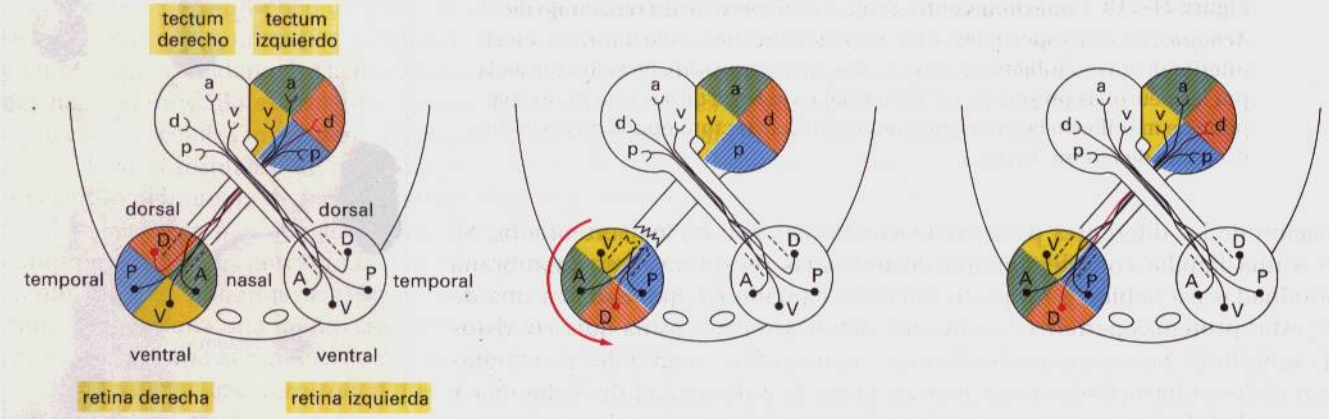


Figura 21-111 Regeneración de las conexiones entre el ojo y el cerebro de un anfibio después de la rotación de un ojo. Los axones de cada parte de la retina girada se regeneran y vuelven a conectar con la parte del tectum adecuada a sus posiciones *originales* en los cuerpos retinales. De este modo, por ejemplo, la luz que cae sobre la parte ventral de la retina girada es percibida como si cayera sobre la parte dorsal, y el animal percibe el mundo al revés; si colocamos alimento por encima de él, el animal se agachará, etc.

diferentes partes del tectum. Así pues, el mapa neuronal depende de la correspondencia entre los dos sistemas de marcadores posicionales, uno situado en la retina y el otro en el tectum.

Experimentos *in vitro* con tejidos de embrión de pollo aportan alguna luz sobre la naturaleza de los marcadores del tectum y la forma en que los axones retinales responden ante ellos. Se colocan fragmentos de retina en un cultivo, permitiéndoles que emitan axones sobre el substrato que está revestido de vesículas de membrana preparadas a partir de células tectales (Figura 21-112). El revestimiento está dispuesto en bandas, de forma que se alternan bandas de membrana del tectum anterior con bandas de membrana del tectum posterior. En función de los detalles de la preparación, los axones de la retina nasal pueden no presentar preferencia alguna y crecer indiscriminadamente o presentar una preferencia, la adecuada, por la membrana del tectum posterior. Los axones procedentes de la retina temporal crecen de forma consistente sólo a lo largo de bandas de la membrana del tectum anterior, en concordancia con su destino habitual. Sorprendentemente, esto no ocurre porque la membrana del tectum anterior sea particularmente adhesiva o atractiva, sino porque la membrana del tectum posterior es especialmente repelente: los filopodios que la tocan se colapsan y se retraen. De hecho, si se hace gotear sobre ellos una suspensión de membrana del tectum posterior, los conos de crecimiento de los axones temporales (pero no los nasales) se colapsan y retroceden. En el caso de una preparación de membranas del tectum anterior, no se produce colapso alguno.

Los efectos peculiares de la membrana del tectum posterior sobre la células de la retina temporal se deben a una glucoproteína inhibidora específica que está distribuida en gradiente desde la parte posterior hasta la parte anterior del tectum. En otras partes del sistema nervioso se puede demostrar que otras mo-

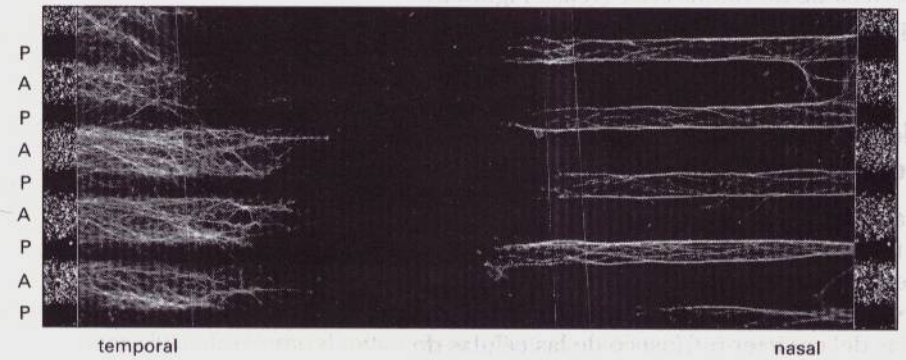


Figura 21-112 La selectividad de los axones de la retina en crecimiento sobre las membranas del tectum. El substrato del cultivo ha sido revestido con bandas alternas de membrana preparadas tanto a partir del tectum posterior (P) como del tectum anterior (A); las bandas del tectum anterior son visibles gracias a la impregnación con marcadores fluorescentes en las bandas verticales de ambos lados de la película. Los axones de la neuronas procedentes de la mitad temporal de la retina (en crecimiento desde la izquierda) siguen las bandas de membrana del tectum anterior pero evitan las membranas del tectum posterior, mientras que los axones de la mitad nasal de la retina (en crecimiento desde la derecha) hacen lo contrario. Así pues el tectum anterior difiere del tectum posterior y la retina nasal de la temporal, y las diferencias guían el crecimiento selectivo de los axones. Estos experimentos se han efectuado con células procedentes de un embrión de pollo. (De Y. von Boxberg, S. Diess y U. Scharwz, *Neuron* 10:345-357, 1993.)

léculas de superficie tienen funciones análogas a las de los repelentes de los conos de crecimiento. Estos sistemas básicos de marcadores son adecuados para definir la *orientación* anteroposterior en el mapa del tectum óptico de la rana. Sin embargo, para trazar el mapa completo con precisión son necesarios otros mecanismos completamente distintos.

Los patrones difusos de las conexiones sinápticas se definen mediante la eliminación de la sinapsis dependiente de actividad[88, 89]

En un animal normal el mapa retinotectal es inicialmente confuso e impreciso. Estudios en ranas y peces demuestran que el axón primero se prolonga de forma profusa en el tectum estableciendo multitud de sinapsis distribuidas a todo lo largo de una ancha área del tectum que se solapa con los territorios inervados por otros axones. Estos territorios se ordenan posteriormente a través de la eliminación de sinapsis y los retrocesos de las prolongaciones de los axones. Este perfeccionamiento del mapa mediante la eliminación de sinapsis está regido por dos reglas de competición que, actuando juntas, crean un orden espacial: (1) los axones procedentes de regiones distantes de la retina, que tienden a excitarse en momentos alternos, compiten por dominar el territorio tectal disponible, pero (2) los axones de localizaciones vecinas a la retina, que tienden a excitarse al mismo tiempo, inervan territorios vecinos del tectum porque colaboran para mantener sus sinapsis con células tectales compartidas (Figura 21-113). El mecanismo subyacente a ambas reglas depende de la actividad eléctrica y de la señalización procedentes de sinapsis ya establecidas. Si se bloquean todas las acciones potenciales por medio de una toxina que se une los canales Na^+ regulados por voltaje, la eliminación de sinapsis se inhibe y el mapa continúa confuso.

El fenómeno de la **eliminación de sinapsis dependiente de actividad** se produce en prácticamente todas las partes en desarrollo del sistema nervioso de un vertebrado. Primero, se establecen muchas sinapsis y se distribuyen sobre una región diana muy amplia; luego el sistema de conexiones se reduce a través de procesos competitivos que dependen de la actividad eléctrica y las señales sinápticas. El proceso de eliminación de sinapsis no tiene nada que ver con la eliminación del exceso de neuronas a través de la muerte celular, ya que tiene lugar después de que el período la muerte neuronal normal haya finalizado.

Los mecanismos celulares de la eliminación de sinapsis comienzan a ser comprendidos gracias a experimentos efectuados sobre la inervación del mús-

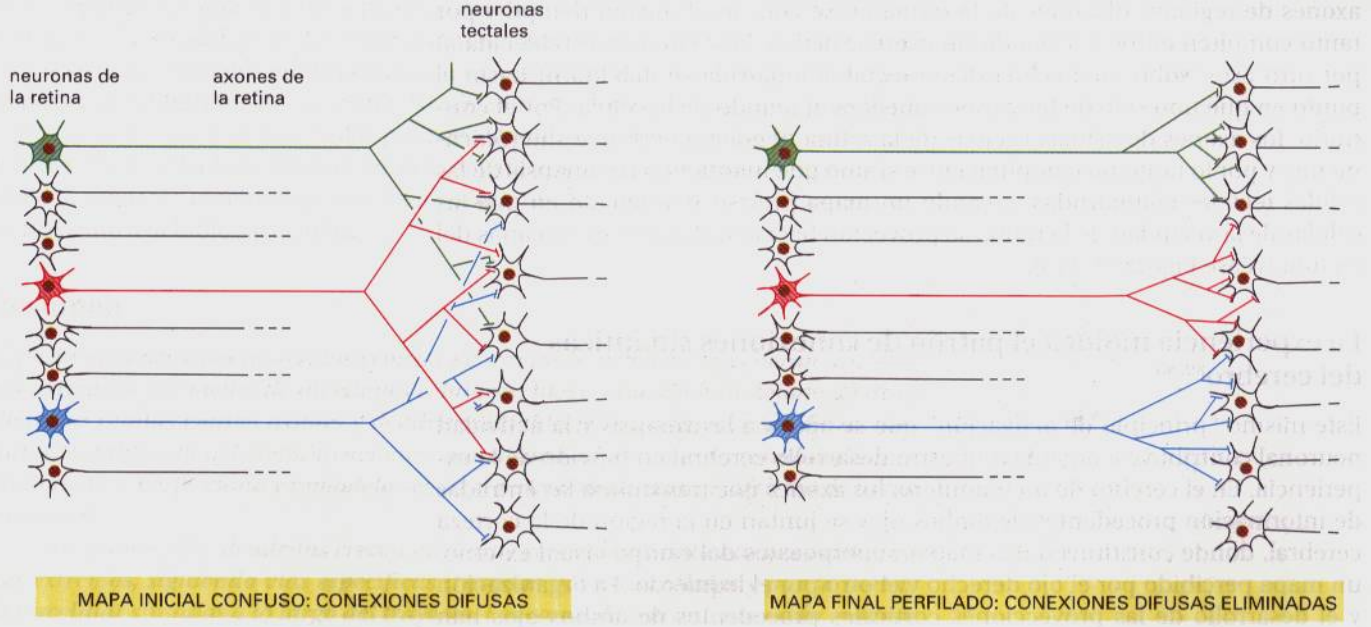


Figura 21-113 El mapa retinotectal se acaba de perfilar mediante la eliminación de sinapsis. Inicialmente el mapa es confuso porque cada axón de la retina se ramifica inervando amplias zonas de una ancha región de tectum, solapando las regiones inervadas por otros axones retinales. El mapa se acaba de perfilar mediante la eliminación de sinapsis. En los lugares en que los axones de partes distantes de la retina establecen sinapsis en la misma célula tectal, se produce una competencia, y las conexiones establecidas por uno de los axones desaparecen. Pero los axones procedentes de células que sean vecinas a la retina cooperan, manteniendo sus sinapsis sobre células del tectum compartidas. Así pues, cada axón retinal termina inervando un territorio tectal reducido, adyacente y en parte superpuesto al territorio inervado por axones procedentes de localizaciones vecinas a la retina.

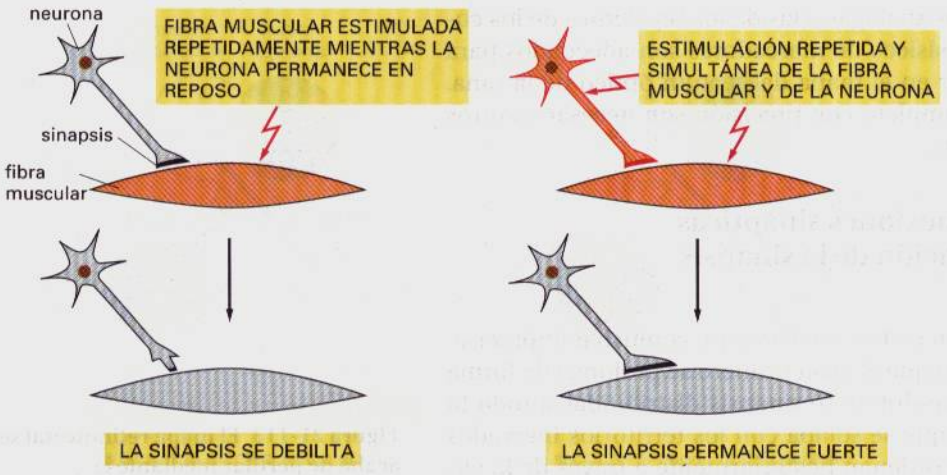


Figura 21-114 Eliminación de las sinapsis y su dependencia del patrón de excitación. En el experimento que aquí ilustramos esquemáticamente, se ha permitido que una neurona y una fibra muscular procedentes de un embrión de pollo establezcan una sinapsis *in vitro*. Entonces se procede a la estimulación de la fibra muscular mediante la aplicación de gotas de acetilcolina (imitando la estimulación neural); esta técnica se aplica tanto sola como en sincronía con la excitación eléctrica de la neurona. Los resultados ilustran un principio general: cada excitación de una célula diana tiende a causar el rechazo de las sinapsis cuyo axón terminal presináptico ha permanecido inactivo, y a mantener las sinapsis cuyo axón ha estado activo en este momento.

culo esquelético en embriones de vertebrados, donde habitualmente cada célula muscular recibe sinapsis de varias neuronas distintas, aunque al final sólo sea una la que inervará. Para el análisis *in vitro* de este mecanismo se utilizan cocultivos de motoneuronas y células musculares. Se puede identificar una célula muscular inervada por una única neurona y entonces excitar directamente la célula muscular mediante un goteo constante de acetilcolina mediante una microaguja cercana de su superficie. Así, la sinapsis establecida por la neurona sobre la fibra muscular estará permanentemente debilitada, a menos que se estimule eléctricamente a la neurona de modo que se active en sincronía con el goteo de acetilcolina sobre la fibra muscular; en este caso la sinapsis permanece en buenas condiciones (Figura 21-114). El debilitamiento, o *represión*, de la sinapsis refleja un cambio en la zona presináptica, que provoca que el extremo del axón libere menos neurotransmisor cuando la neurona se activa. Es fácil de demostrar que la represión sináptica depende de la entrada de Ca^{2+} en el músculo a través de los canales catiónicos asociados con los receptores de acetilcolina. De algún modo, un incremento brusco de la concentración intracelular de Ca^{2+} hace que las célula postsináptica rechacen los terminales axónicos que establecen sinapsis sobre su superficie en las inmediaciones, pero los terminales axónicos que acaban de ser activados son inmunes a este rechazo.

Estos y otros resultados sugieren una interpretación sencilla de las reglas de competencia que rigen la eliminación sináptica en el sistema retinotectal. Los axones de regiones distantes de la retina no se activan al mismo tiempo y por tanto compiten entre sí. Cuando un axón se activa, la(s) sinapsis establecida(s) por otro axón sobre una célula diana tectal compartida se debilita(n) hasta el punto en que uno solo de los axones quedará al mando de la célula. Por el contrario, los axones de células vecinas de la retina tienden a activarse sincrónicamente, y por lo tanto no compiten entre sí sino que mantienen las sinapsis de las células tectales compartidas, creando un mapa preciso y ordenado en que las células de la vecindad de la retina se proyectan hacia localizaciones cercanas del tectum (véase Figura 21-113).

La experiencia moldea el patrón de conexiones sinápticas del cerebro[89, 90]

Este mismo "principio de activación" que se aplica a las sinapsis y la actividad neuronal contribuye a organizar nuestro desarrollo cerebral en función de la experiencia. En el cerebro de un mamífero, los axones que transmiten las entradas de información procedentes de ambos ojos se juntan en la región de la corteza cerebral, donde constituyen dos mapas superpuestos del campo visual externo, un mapa percibido por el ojo derecho y el otro por el izquierdo. La organización y el desarrollo de las proyecciones corticales procedentes de ambos ojos han

sido estudiadas en profundidad, tanto mediante investigaciones anatómicas como mediante pruebas fisiológicas en las que se estudia qué tipos de estímulos visuales excitan células determinadas corticales. Estos estudios revelan una sensibilidad extraordinaria respecto a la experiencia en edades tempranas: si, durante un *período crítico*, se cubre un ojo privándole de estímulos visuales, el ojo tapado pierde sus conexiones sinápticas con la corteza y queda práctica e irreversiblemente ciego. De acuerdo con el principio de activación, ha tenido lugar una competencia en la que las sinapsis de la corteza visual establecidas por axones inactivos se eliminan, mientras que las sinapsis establecidas por axones activos se consolidan. De este modo el territorio cortical se asigna a axones portadores de información y no se desperdicia con los axones que carecen de ella.

Pero el principio de activación también actúa de formas mucho más sutiles estableciendo las conexiones nerviosas que permiten ver. Por ejemplo, la capacidad de ver en profundidad –visión en estéreo– depende de la presencia en la corteza visual de células receptoras de entradas de información procedentes de ambos ojos, transmitiendo información acerca de la misma región del campo visual, pero desde ángulos ligeramente distintos. Las células de conducción binocular nos permiten comparar la visión que obtenemos a través del ojo derecho con la que obtenemos del izquierdo, de modo que seamos capaces de derivar información sobre las distancias en relación a objetos situados a nuestro alrededor. Sin embargo, si se impide que ambos ojos observen la misma escena al mismo tiempo durante un período crítico –por ejemplo, cubriendo primero un ojo y luego el otro en días alternos o simplemente como consecuencia de un estrabismo infantil– prácticamente no se conservarán células de convección binocular en la corteza y la capacidad de ver en estéreo será casi irrecuperable. Evidentemente, según el principio de activación, las entradas de información procedentes de cada ojo recibidas por una neurona de conducción binocular sólo se mantienen si las dos entradas de información se activan sincrónicamente con frecuencia, como ocurre cuando los dos ojos observan juntos una misma escena.

Ya vimos en el Capítulo 15 que los cambios sinápticos que subyacen a la memoria en muchas partes de cerebro giran en torno al comportamiento de un tipo particular de receptor para el neurotransmisor glutamato –el **receptor NMDA**. El flujo de Ca^{2+} hacia el interior de la célula postsináptica, a través de canales abiertos por este receptor, desencadena cambios duraderos en la fuerza de las sinapsis de esta célula, tal como ocurre con la entrada de Ca^{2+} en una célula muscular vía los canales de receptores de acetilcolina, que durante el desarrollo afecta las sinapsis establecidas por las motoneuronas. Los cambios inducidos por el mecanismo dependiente de NMDA en el cerebro adulto obedecen a principios muy próximos al principio de activación del desarrollo. De hecho, el perfeccionamiento y el remodelaje de las conexiones sinápticas que acabamos de describir en los sistemas visuales en desarrollo de mamíferos y anfibios puede bloquearse gracias a un inhibidor del receptor NMDA. En consecuencia, tanto la memoria como los ajustes en el desarrollo pueden depender de los mismos mecanismos fundamentales. La base molecular del mecanismo gracias al cual la experiencia moldea nuestros cerebros es uno de los mayores desafíos que el sistema nervioso presenta a la biología celular.

Resumen

El desarrollo del sistema nervioso consta de tres fases: primero, se generan las células nerviosas por medio de divisiones celulares; luego, cuando han dejado de dividirse, las células emiten axones y dendritas estableciendo sinapsis con células alejadas, entablando así comunicaciones; por último, el sistema de comunicaciones sinápticas se perfecciona y remodela según el patrón de actividad eléctrica de la red neuronal.

Los axones y las dendritas crecen mediante conos de crecimiento que existen en sus extremos, siguiendo vías específicas trazadas por otras células y por la matriz extracelular situadas a lo largo del trayecto. Los conos de crecimiento están guiados

por diversas clases de moléculas de adhesión así como por señales intracelulares y factores que inhiben y repelen el crecimiento de los conos. Conos de crecimiento procedentes de neuronas distintas, no equivalentes, responden de modo desigual a estas señales, y de esta forma se establece el mapa neuronal –proyecciones ordenadas de formaciones de neuronas, una encima de otra. Cuando los conos de crecimiento han alcanzado sus dianas, se producen dos tipos de ajustes básicos. Primero, muchas de las neuronas que inervan mueren como consecuencia de una competencia por factores de supervivencia como el NGF (factor de crecimiento nervioso) secretados por el tejido diana. La muerte celular ajusta la cantidad de inervación al tamaño de la diana. Segundo, las sinapsis individuales retroceden de algunas localizaciones y se refuerzan en otras, generando un patrón de conexiones ordenado con mayor precisión. Este proceso depende de la actividad eléctrica: las sinapsis más activas se refuerzan, y neuronas distintas que contactan con la misma célula diana acostumbran a mantener sus sinapsis en la diana compartida sólo si ambas se activan sincrónicamente con frecuencia. De este modo la estructura del cerebro puede ajustarse reflejando las conexiones entre sucesos del mundo exterior. Los mecanismos moleculares que subyacen a estos mecanismos pueden ser similares a los responsables de la formación de recuerdos en la vida adulta.

Bibliografía

General

Browder, L.W.; Erickson, C.A.; Jeffery, W.R. Developmental Biology, 3rd ed. Philadelphia: Saunders, 1991.

Gilbert, S.F. Biología del desarrollo. Barcelona: Ediciones Omega, S.A., 1988.

Larsen, W.J. Human Embryology. New York: Churchill Livingstone, 1993.

Slack, J.M.W. From Egg to Embryo: Regional Specification in Early Development, 2nd ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1991.

Spemann, H. Embryonic Development and Induction. New Haven: Yale University Press, 1938. Reprinted, New York: Garland, 1988.

Wilkins, A.S. Genetic Analysis of Animal Development, 2nd ed. New York: Wiley-Liss, 1993.

Wolpert, L. The Triumph of the Embryo. Oxford, UK: Oxford University Press, 1991.

Citas

1. Bard, J.B.L. Morpohgenesis: The Cellular and Molecular Processes of Developmental Anatomy. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1990.

   Bray, D. Cell Movements. New York: Garland, 1992.

   Slack, J.M.W., ed. Early Amphibian Development. *J. Embryol. Exp. Morphol. Suppl.* 89, 1985.

   Trinkaus, J.P. Cells into Organs: The Forces That Shape the Embryo, 2nd ed. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall, 1984.

2. Gerhart, J., et al. Cortical rotation of the *Xenopus* egg: consequences for the anteroposterior pattern of embryonic dorsal development. *Development* 107 (Suppl.):37-51, 1989.

   Vincent, J.P.; Oster, G.F.; Gerhart, J.C. Kinematics of gray crescent formation in *Xenopus* eggs: the displacement of subcortical cytoplasm relative to the egg surface. *Dev. Biol.* 113:484-500, 1986.

3. Gilbert, S.F. Developmental Biology, 3rd ed., pp. 75-114. Sunderland, MA: Sinauer, 1991.

   Kirschner, M.; Newport, J.; Gerhart, J. The timing of early developmental events in *Xenopus*. *Trends Genet.* 1:41-47, 1985.

   Wilson, E.B. The Cell in Development and Heredity, 3rd ed. with corrections. New York: Macmillan, 1925, 1928. Reprinted, New York: Garland, 1987.

4. Furshpan, E.J.; Potter, D.D. Low-resistance junctions between cells in embryos and tissue culture. *Curr. Top. Dev. Biol.* 3:95-128, 1968.

   Guthrie, S.C.; Gilula, N.B. Gap junctional communication and development. *Trends Neurosci.* 12:12-16, 1989.

   Kalt, M.R. The relationship between cleavage balstocoel formation in *Xenopus laevis*. II. Electron microscopic observations. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 26:51-66, 1971.

5. Gustafson, T.; Wolpert, L. Cellular movement and contact in sea urchin morphogenesis. *Biol. Rev.* 42:442-498, 1967.

   Hardin, J.D.; Cheng, L.Y. The mechanisms and mechanics of archenteron elongation during sea urchin gastrulation. *Dev. Biol.* 115:490-501, 1986.

   Stern, C.D.; Ingham, P.W., eds. Gastrulation. *Development Suppl.* 1992.

6. Fristom, D. The cellular basis of epithelial morphogenesis. *Tissue Cell* 20:645-690, 1988.

   Gerhart, J.; Keller, R. Region-specific cell activities in amphibian gastrulation. *Annu. Rev. Cell Biol.* 2:201-229, 1986.

7. Spemann, H.; Mangold, H. Induction of embryonic primordia by implantation of organizers from a different species. *Roux's Archiv.* 100:599-638, 1924. (English translation in Foundations of Experimental Embryology, 2nd ed. [B.H. Willier, J.M. Oppenheimer, eds.] New York: Hafner, 1974.)

8. Shi, J.; Keller, R. Cell motility driving mediolateral intercalation in explants of *Xenopus laevis*. *Development* 116:901-914, 1992.

   Spemann, H. Embryonic Development and Induction. New Haven: Yale University Press, 1938. Reprinted, New York: Garland, 1988.

9. Balinsky, B.I. Introducción a la embriología. Barcelona: Ediciones Omega, S.A., 1983.

Beddington, R.S.P.; Smith, J.C. Control of vertebrate gastrulation: inducing signals and responding genes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 3:655-661, 1993.

Langman, J. Medical Embryology, 5th ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1985.

Romer, A.S.; Parsons, T.S. The Vertebrate Body, 6th ed. Philadelphia: Saunders, 1986.

10. Adams, D.S.; Keller, R.; Koehl, M.A. The mechanics of notochord elongation, straightening and stiffening in the embryo of *Xenopus laevis. Development* 110:115-130, 1990.

Yasuo, H.; Satoh, N. Function of vertebrate T gene. *Nature* 364:582-583, 1993.

11. Anderson, D.J. The neural crest lineage problem: neuropoiesis? *Neuron* 3:1-12, 1989.

Le Douarin, N. The Neural Crest. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1982.

Marusich, M.F.; Weston, J.A. Development of the neural crest. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1:221-229, 1991.

12. Morriss-Kay, G.; Tuckett, F. The role of microfilaments in cranial neurulation in rat embryos: effects of short-term exposure to cytochalasin D. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 88:333-348, 1985.

Odell, G.M.; Oster, G.; Alberch, P.; Burnside, B. The mechanical basis of morphogenesis. I. Epithelial folding and invagination. *Dev. Biol.* 85:446-462, 1981.

Ruiz i Altaba, A.; Jessell, T.M. Midline cells and the organization of the vertebrate neuraxis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 3:633-640, 1993.

13. Keynes, R.J.; Stern, C.D. Mechanisms of vertebrate segmentation. *Development* 103:413-429, 1988.

14. Hynes, R.O.; Lander, A.D. Contactc and adhesive specificities in the associationss, migrations, and targeting of cells and axons. *Cell* 68:303-322, 1992.

Nose, A.; Nagafuchi, A.; Takeichi, M. Expressed recombinant cadherins mediate cell sorting in model systems. *Cell* 54:993-1001, 1988.

Takeichi, M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* 251:1451-1455, 1991.

Townes, P.L.; Holtfreter, J. Directed movements and selective adhesion of embryonic amphibian cells. *J. Exp. Zool.* 128:53-120, 1955.

15. Chevalier, A.; Kieny, M.; Mauger, A. Limb-somite relationship: origin of the limb musculature. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 41:245-258, 1977.

Christ, B.; Jacob, H.J.; Jacob, M. Experimental analysis of the origin of the wing musculature in avian embryos. *Anat. Embryol.* 150:171-186, 1977.

16. Bronner-Fraser M. Mechanisms of neural crest migration. *Bioessays* 15:221-230, 1993.

Bronner-Fraser, M. An antibody to a receptor for fibronectin and laminin perturbs cranial neural crest development *in vivo. Dev. Biol.* 2:67-74, 1990.

Morrison-Graham, K.; Takahashi, Y. Steel factor and c-kit receptor: from mutants to a growth-factor system. *Bioessays* 15:77-83, 1993.

17. Gurdon, J.B. The generation of diversity and pattern in animal development. *Cell* 68:185-199, 1992.

18. DiBerardino, M.A.; Orr, N.H.; McKinnell, R.G. Feeding tadpoles cloned from *Rana* erythrocyte nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:8231-8234, 1986.

Gurdon, J.B. Transplanted nuclei and cell differentiation. *Sci. Am.* 219(6):24-35, 1968.

McKinnell, R.G. Cloning-Nuclear Transplantation in Amphibia. Minneapolis: University of Minnesota Press, 1978.

19. Davidson, E.H. Gene Activity in Early Development, 3rd ed., pp. 411-524. Orlando, FL: Academic Press, 1986.

Horvitz, H.R.; Herskowitz, I. Mechanisms of asymmetric cell division: two Bs or not two Bs, that is the question. *Cell* 68:237-255, 1992.

Rebagliati, M.R.; Weeks, D.L.; Harvey, R.P.; Melton, D.A. Identification and cloning of localized maternal RNAs from *Xenopus* eggs. *Cell* 42:769-777, 1985.

Wilson, E.B. The Cell in Development and Heredity, 3rd ed., pp. 1035-1121. New York: Macmillan, 1925, 1928. Reprinted, New York: Garland, 1987.

20. Amaya, E.; Musci, T.J.; Kirschner, M.W. Expression of a dominant negative mutant of the FGF receptor disrupts mesoderm formation in *Xenopus* embryos. *Cell* 66:257-270, 1991.

Cho, K.W.Y.; Blumberg, B.; Steinbeisser, H.; De Robertis, E.M. Molecular nature of Spemann's organizer: the role of the *Xenopus* homeobox gene *goosecoid. Cell* 67:1111-1120, 1991.

Dale, L.; Howes, G.; Price, B.M.J.; Smith, J.C. Bone morphogenetic protein 4: a ventralizing factor in *Xenopus* development. *Development* 115:573-585, 1992.

Hemmati-Brivanlou, A.; Melton, D.A. A truncated activin receptor inhibits mesoderm induction and formation of axial structures in *Xenopus* embryos. *Nature* 359:609-614, 1992.

Slack, J.M.W. From Egg to Embryo: Regional Specification in Early Development, 2nd ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1991.

Smith, W.C.; Harland, R.M. Injected Xwnt-8 RNA acts early in *Xenopus* embryos to promote formation of a vegetal dorsalizing center. *Cell* 67:753-765, 1991.

Smith, W.C.; Knecht, A.K.; Wu, M.; Harland, R.M. Secreted *noggin* protein mimics the Spemann organizer in dorsalizing *Xenopus* mesoderm. *Nature* 361:547-549, 1993.

Thomsen, G.H.; Melton, D.A. Processed Vg1 protein is an axial mesoderm inducer in *Xenopus. Cell* 74:433-441, 1993.

21. Green, J.B.A.; Smith, J.C. Graded changes in the dose of a *Xenopus* activin A homologue elicit stepwise transitions in embryonic cell fate. *Nature* 347:391-394, 1990.

Lewis, J.; Slack, J.M.W.; Wolpert, L. Thresholds in development. *J. Theor. Biol.* 65:579-590, 1977.

Wolpert, L. Positional information and pattern formation. *Curr. Top. Dev. Biol.* 6:183-224, 1971.

22. Servetnick, M.; Grainger, R.M. Changes in neural and lens competence in *Xenopus* ectoderm: evidence for an autonomous developmental timer. *Development* 112:177-188, 1991.

23. Austin, C.R.; Short, R.V., eds. Embryonic and Fetal Development, 2nd ed. Reproduction in Mammls, Ser., Book 2. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1982.

Fleming, T.P.; Johnson, M.H. From egg to epithelium. *Annu. Rev. Cell Biol.* 4:459-485, 1988.

Kaufman, M.H. The Atlas of Mouse Development. London: Academic Press, 1992.

24. Gardner, R.L. Clonal analysis of early mammalian development. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. (Biol.)* 312:163-178, 1985.

Kelly, S.J. Studies of the developmental potential of 4- and 8-cell stage mouse blastomeres. *J. Exp. Zool.* 200:365-376, 1977.

McLaren, A. Mammalian Chimeras. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1976.

Tarkowski, A.K. Experiments on the development of isolated blastomeres of mouse eggs. *Nature* 184:1286-1287, 1959.

25. Capecchi, M.R. The new mouse genetics: altering the genome by gene targeting. *Trends Genet.* 5:70-76, 1989.

Illmensee, K.; Stevens, L.C. Teratomas and chimeras. *Sci. Am.* 240(4):120-132, 1979.

Papaioannou, V.E.; Gardner, R.L.; McBurney, M.W.; Babinet, C.; Evans, M.J. Participation of cultured teratocarcinoma cells in mouse embryogenesis. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 44:93-104, 1978.

Robertson, E.J. Pluripotential stem cell lines as a route into the mouse germ line. *Trends Genet.* 2:9-13, 1986.

Williams, R.L., et al. Myaloid leukemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* 336:685-687, 1988.

26. Weiss, P.A. Principles of Development, pp. 289-437. New York: Holt, 1939.

27. Spemann, H. Über die Determination der ersten Organanlagen des Amphibienembryo I-VI. *Arch. Entw. Mech. Org.* 32:448-555, 1918.

28. Buckingham, M. Making muscle in mammals. *Trends Genet.* 8:144-149, 1992.

Weintraub, H., et al. The *myoD* gene family: nodal point during specification of the muscle cell lineage. *Science* 251:761-766, 1991.

29. Gurdon, J.B. A community effect in animal development. *Nature* 336:772-774, 1988.

Lyon, M.F. Epigenetic inheritance in mammals. *Trends Genet.* 9:123-128, 1993.

Paro, R. Mechanisms of heritable gene repression during development of *Drosophila*. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5:999-1005, 1993.

Riggs, A.D.; Pfeiffer, G.P. X-chromosome inactivation and cell memory. *Trends Genet.* 8:169-174, 1992.

30. Held, L.I., Jr. Models for Embryonic Periodicity. Farmington, CT: Karger, 1992.

Lewis, J.H.; Wolpert, L. The principle of non-equivalence in development. *J. Theor. Biol.* 62:479-490, 1976.

Saunders, J.W., Jr.; Gasseling, M.T.; Cairns, J.M. The differentiation of prospective thigh mesoderm grafted beneath the apical ectodermal ridge of the wing bud in the chick embryo. *Dev. Biol.* 1:281-301, 1959.

Theories of biological pattern formation. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. (Biol.)* 295:425-617, 1981.

Wolpert, L. Pattern formation in biological development. *Sci. Am.* 239(4):154-164, 1978.

31. Bohn, H. Tissue interactions in the regenerating cockroach leg. In Insect Development (P.A. Lawrence, ed.), Royal Entomological Society of London Symposium No. 8, pp. 170-185. Oxford, UK: Blackwell, 1976.

Bryant, P.J. The polar coordinate model goes molecular. *Science* 259:471-472, 1993.

Bryant, P.J.; Bryant, S.V.; French, V. Biological regeneration and pattern formation. *Sci. Am.* 237(1):66-81, 1977.

Bryant, P.J.; Simpson, P. Intrinsic and extrinsic control of growth in developing organs. *Q. Rev. Biol.* 59:387-415, 1984.

Lewis, J. Simpler rules for epimorphic regeneration: the polar-coordinate model without polar coordinates. *J. Theor. Biol.* 88:371-392, 1981.

32. Wolfram, S. Cellular automata as models of complexity. *Nature* 311:419-424, 1984.

33. Sulston, J., et al. The *C. elegans* genome sequencing project: a beginning. *Nature* 356:37-41, 1992.

Wood, W.B., et al. The nematode *Caenorhabditis elegans*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.

34. Kenyon, C. Cell lineage and the control of *Caenorhabditis elegans* development. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. (Biol.)* 312:21-38, 1985.

Sulston, J.E.; Horvitz, H.R. Post-embryonic cell lineage of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 56:110-156, 1977.

Sulston, J.E.; Schierenberg, E.; White, J.G.; Thompson, J.N. The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 100:64-119, 1983.

35. Schnabel, R. Early determinative events in *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1:179-184, 1991.

Sternberg, P.W.; Horvitz, H.R. The genetic control of cell lineage during nematode development. *Annu. Rev. Genet.* 18:489-524, 1984.

36. Ferguson, E.L.; Sternberg, P.W.; Horvitz, H.R. A genetic pathway for the specification of the vulval cell lineages of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 326:259-267, 1987.

Sulston, J.E.; White, J.G. Regulation and cell autonomy during postembryonic development of *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 78:577-597, 1980.

37. Han, M.; Golden, A.; Han, Y.; Sternberg, P.W. *C. elegans lin-45 raf* gene participates in *let-60 ras*-stimulated vulval differentiation. *Nature* 363:133-140, 1993.

Hill, R.J.; Sternberg, P.W. The gene *lin-3* encodes an inductive signal for vulval development in *C. elegans*. *Nature* 358:470-476, 1992.

Sternberg, P.W.; Horvitz, H.R. Signal transduction during *C. elegans* vulval induction. *Trends Genet.* 7:366-371, 1991.

38. Ambros, V.; Horvitz, H.R. The lin-14 locus of *Caenorhabditis elegans* controls the time of expression of specific postembryonic developmental events. *Genes Dev.* 1:398-414, 1987.

Chalfie, M.; Horvitz, H.R.; Sulston, J.E. Mutations that lead to reiterations in the cell lineages of *C. elegans*. *Cell* 24:59-69, 1981.

Ruvkun, G.; Wightman, B.; Bürglin, T.; Arasu, P. Dominant gain-of-function mutations that lead to misregulation of the *C. elegans* heterochronic gene *lin-14*, and the evolutionary implications of dominant mutations in pattern-formation genes. *Development (Suppl. 1)* 1991:47-54.

39. Cooke, J. Properties of the primary organisation field in the embryo of *Xenopus laevis*. IV. Pattern formation and regulation following early inhibition of mitosis. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 30:49-62, 1973.

Edgar, L.G.; McGhee, J.D. DNA synthesis and the control of embryonic gene expression in *C. elegans*. *Cell* 53:589-599, 1988.

Harris, W.A.; Hartenstein, V. Neuronal determination without cell division in *Xenopus* embryos. *Neuron* 6:499-515, 1991.

Rollins, M.B.; Andrews, M.T. Morphogenesis and regulated gene activity are independent of DNA replication in *Xenopus* embryos. *Development* 112:559-569, 1991.

Satoh, N. Towards a molecular understandig of differntiation mechanisms in Ascidian embryos. *Bioessays* 7:51-56, 1987.

40. Ellis, R.E., Yuan, J.V.; Horvitz, H.R. Mechanisms and functions of cell death. *Annu. Rev. Cell Biol.* 7:663-698, 1991.

Vaux, D.L.; Weisman, I.L.; Kim, S.K. Prevention of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* by human *bcl-2*. *Science* 258:1955-1957, 1992.

41. Lawrence, P.A. The Making of a Fly: The Genetics of Animal Design. Oxford, UK: Blackwell Scientific, 1992.

42. Martínez-Arias, A.; Lawrence, P.A. Parasegments and compartments in the *Drosophila* embryo. *Nature* 313:639-642, 1985.

43. Campos-Ortega, J.A.; Hartenstein, V. The Embryonic Development of *Drosophila melanogaster*. Berlin: Springer, 1985.

Foe, V.E.; Alberts, B.M. Studies of nuclear and cytoplasmic behavior during the five mitotic cycles that precede gastrulation in *Drosophila* embryogenesis. *J. Cell Sci.* 61:31-70, 1983.

Leptin, M.; Grunewald, B. Cell shape changes during gastrulation in *Drosophila*. *Development* 110:73-84, 1990.

Technau, G.M. A single cell approach to problems of cell lineage and commitment during embyogenesis of *Drosophila melanogaster*. *Development* 100:1-12, 1987.

44. St. Johnston, D.; Nüsslein-Volhard, C. The origin of pattern and polarity in the *Drosophila* embryo. *Cell* 68:201-219, 1992.

45. Anderson, K.V.; Schneider, D.S.; Morisato, D.; Ferguson, E.L. Extracellular morphogens in *Drosophila* dorsal-ventral patterning. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 58, 1993.

46. Ferguson, E.L.; Anderson, K.V. *Decapentaplegic* acts as a morpohgen to organize dorsal-ventral pattern in the *Drosophila* embryo. *Cell* 7:451-461, 1992.

Govind, S.; Steward, R. Coming to grips with cactus. *Curr. Biol.* 3:351-354, 1993.

Klingler, M.; Erdelyi, M.; Szabad, J.; Nüsslein-Volhard, C. Function of *torso* in determining the terminal anlagen of the *Drosophila* embryo. *Nature* 335:275-277, 1988.

Roth, S., Stein, D.; Nüsslein-Volhard, C. A gradient of nuclear localization of the *dorsal* protein determines dorsovental pattern in the *Drosophila* embryo. *Cell* 59:1189-1202, 1989.

Rushlow, C.A.; Han, K.; Manley, J.L.; Levine, M. The graded distribution of the *dorsal* morphogen is initiated by selective nuclear transpot in *Drosophila*. *Cell* 59:1165-1177, 1989.

47. Ephrusi, A.; Lehmmann, R. Induction of germ cell formation by *oskar*. *Nature* 358:387-392, 1992.

Gilbert, S.F. Developmental Biology, 3rd ed., pp. 273-281. Sunderland, MA: Sinauer, 1991.

Wilson, J.E.; Macdonald, P.M. Formation of germ cells in *Drosophila*. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 3:562-565, 1993.

48. Driever, W.; Nüsselin-Volhard, C. A gradient of *bicoid* protein in *Drosophila* embryos. *Cell* 54:83-93, 1988.

Driever, W.; Nüsslein-Volhard, C. The *bicoid* protein determines position in the *Drosophila* embryo in a concentration-dependent manner. *Cell* 54:95-104, 1988.

Lawrence, P.A. Background to *bicoid*. *Cell* 54:1-2, 1988.

Nüsslein-Volhard, C.; Forhnhöfer, H.G.; Lehmann, R. Determination of anteroposterior polarity in *Drosophila*. *Science* 238:1675-1681, 1987.

49. Nüsslein-Volhard, C.; Wieschaus, E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287:795-801, 1980.

50. Akam, M. The molecular basis for metameric pattern in the *Drosophila* embryo. *Development* 101:1-22, 1987.

Ingham, P.W. The molecular genetics of embryonic pattern formation in *Drosophila*. *Nature* 335:25-34, 1988.

Scott, M.P.; O'Farrell, P.H. Spatial programming of gene expression in early *Drosophila* embryogenesis. *Annu. Rev. Cell Biol.* 2:49-80, 1986.

51. Hafen, E.; Kuroiwa, A.; Gehring, W.J. Spatial distribution of transcripts from the segmentation gene *fushi tarazu* during *Drosophila* embryonic development. *Cell* 37:833-841, 1984.

Hoch, M.; Jäckle, H. Transcriptional regulation and spatial patterning in *Drosophila*. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 3:566-573, 1993.

Hülskamp, M.; Tautz, D. Gap genes and gradients–the logic behind the gaps. *Bioessays* 13:261-268, 1991.

52. Small, S.; Levine, M. The initiation of pair-rule stripes in the *Drosophila* blastoderm. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1:255-260, 1991.

53. Ingham, P.W.; Martínez-Arias, A. Boundaries and fields in early embryos. *Cell* 68:221-235, 1992.

Kornberg, T.B.; Tabata, T. Segmentation of the *Drosophila* embryos. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 3:585-593, 1993.

Struhl, G.; Basler, K. Organizing activity of wingless protein in *Drosophila*. *Cell* 72:527-540, 1993.

54. Lewis, E.B. A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* 276:565-570, 1978.

55. Beeman, R.W.; Stuart, J.J.; Brown, S.J.; Denell, R.E. Structure and function of the homeotic gene complex (HOM-C) in the beetle, *Tribolium castaneum*. *Bioessays* 14:439-444, 1993.

Morata, G.; Lawrence, P.A. Homeotic genes, compartments and cell determination in *Drosophila*. *Nature* 265:211-216, 1977.

56. Akam, M.E. Segments, lineage boundaries and the domains of expression of homeotic genes. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. (Biol.)* 312:179-187, 1985.

Harding, K.; Wedeen, C.; McGinnis, W.; Levine, M. Spatially regulated expression of homeotic genes in *Drosophila*. *Science* 229:1236-1242, 1985.

57. Akam, M. The molecular basis of metameric pattern in the *Drosophila* embryo. *Development* 101:1-22, 1987.

McGinnis, W., et al. A conserved DNA sequence in homeotic genes of the *Drosophila* Antennapedia and Bithorax complexes. *Nature* 308:428-433, 1984.

58. Bender, W., et al. Molecular genetics of the bithorax complex in *Drosophila melanogaster*. *Science* 221:23-29, 1983.

Bergson, C.; McGinnis, W. An autoregulatory enhancer element of the *Drosophila* homeotic gene *Deformed*. *EMBO J.* 9:4287-4297, 1990.

Paro, R. Mechanisms of heritable gene repression during development of *Drosophila*. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5:999-1005, 1993.

Peifer, M.; Karch, F.; Bender, W. The bithorax complex: control of segmental identity. *Genes Dev.* 1:891-898, 1987.

59. McGinnis, W.; Krumlauf, R. Homeobox genes and axial patterning. *Cell* 68:283-302, 1992.

60. Ashburner, M.; Wright, T.F., eds. The Genetics and Biology of *Drosophila*, Vol. 2C. London: Academic Press, 1978.

Hadorn, W. Transdetermination in cells. *Sci. Am.* 219(5):110-120, 1968.

61. Nöthiger, R. Clonal analysis in imaginal discs. In Insect Development (P.A. Lawrence, ed.), Royal Entomological Society of London Symposium No. 8, pp. 109-117. Oxford, UK: Blackwell, 1976.

Stern, C. Genetic Mosaics and Other Essays. Cambridge: Harvard University Press, 1968.

Struhl, G. Genes controlling segment specification in the *Drosophila* thorax. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:7380-7384, 1982.

62. Couso, J.P.; Bate, M.; Martínez-Arias, A. A *wingless*-dependent polar coordinate system in *Drosophila* imaginal discs. *Science* 259:484-489, 1993.

García-Bellido, A.; Lawrence, P.A.; Morata, G. Compartments in animal development. *Sci. Am.* 241(1):102-111, 1979.

Simpson, P.; Morata, G. Differential mitotic rates and patterns of growth in compartments in the *Drosophila* wing. *Dev. Biol.* 85:299-308, 1981.

63. Campuzano, S.; Modolell, J. Patterning of the *Drosophila* nervous system: the *achaete-scute* complex. *Trends Genet.* 8:202-208, 1992.

Ghysen, A.; Dambly-Chaudière, C. Genesis of the *Drosophila* peripheral nervous system. *Trends. Genet.* 5:251-255, 1989.

Ghysen, A.; Dambly-Chaudière, C.; Jan, L.Y.; Jan, Y.N. Cell interactions and gene interactions in peripheral neurogenesis. *Genes Dev.* 7:723-733, 1993.

64. Hartenstein, V.; Posakony, J.W. A dual function of the *Notch* gene in *Drosophila* sensillum development. *Dev. Biol.* 142:13-30, 1990.

Heitzler, P.; Simpson, P. The choice of cell fate in the epidermis of *Drosophila*. *Cell* 64:1083-1092, 1991.

Sternberg, P.W. Falling off the knife edge. *Curr. Biol.* 3:763-765, 1993.

65. McGinnis, W.; Garber, R.L.; Wirz, J.; Kuroiwa, A.; Gehrin, W.J. A homologous potein-coding sequence in *Drosophila* homeotic genes and its conservation in other metazoans. *Cell* 37:403-408, 1984.

Müller, M.M.; Carrasco, A.E.; De Robertis, E.M. A homeobox-containing gene expressed during oogenesis in *Xenopus*. *Cell* 39:157-162, 1984.

66. Bürglin, T.R.; Ruvkun, G. The *Caenorhabditis elegans* homeobox gene cluster. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 3:615-620, 1993.

De Robertis, E.M.; Oliver, G.; Wright, C.V.E. Homeobox genes and the vertebrate body plan. *Sci. Am.* 263(1):26-33, 1990.

Wilkinson, D.G.; Krumlauff, R. Molecular approaches to the segmentation of the hindbrain. *Trends Neurosci.* 13:335-339, 1990.

67. Holland, P. Homeobox genes in vertebrate evolution. *Bioessays* 14:267-273, 1992.

Krumlauf, R. Mouse *Hox* genetic functions. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 3:621-625, 1993.

68. Izpisúa-Belmonte, J.-C.; Tickle, C.; Dollé, P.; Wolpert, L.; Duboule, D. Expression of the homeobox *Hox-4* genes and the specification of position in chick wing development. *Nature* 350:585-589, 1991.

Morgan, B.A.; Tabin, C.J. The role of homeobox genes in limb development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 3:668-674, 1993.

69. Cutter, E.G. Plant Anatomy, 2nd ed., Part 1, Cells and Tissues; Part 2, Organs. London: Arnold, 1978.

Esau, K. Anatomy of Seed Plants, 2nd ed. New York: Wiley, 1977.

Walbot, V. On the life strategies of plants and animals. *Trends Genet.* 1:165-169, 1985.

70. Chasan, R.; Walbot, V. Mechanisms of plant reproduction: questions and approaches. *Plant Cell* 5:1139-1146, 1993.

Johri, B.M. Embryology of Angiosperms. Berlin: Springer-Verlag, 1984.

West, M.A.L.; Harada, J.J. Embryogenesis in higher plants: an overview. *Plant Cell* 5:1161-1169, 1993.

71. Harper, J.L., ed. Growth and Form of Modular Organisms. London: Royal Society, 1986. (En esta colección hay varios artículos importantes.)

Meinke, D.W. (guest ed.). Plant developmental genetics. *Seminars Dev. Biol.* 4:1-89, 1993.

72. Gunning, B.E.S. Microtubules and cytomorhogensis in a developing organ: the root primordium of *Azolla pinnata*. In Cytomorphogenesis in Plants (O. Kiermayer, ed.), pp. 301-325. New York: Springer, 1981.

Lloyd, C.W., ed. The Cytoskeletal Basis of Plant Growth and Form. New York: Academic Press, 1991.

73. Becraft, P.W.; Freeling, M. Cell interactions in plants. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2:571-575, 1992.

Lyndon, R.F. Plant Development: The Cellular Basis. London: Unwin Hyman, 1990.

Steeves, T.A.; Sussex, I.M. Patterns in Plant Development, 2nd ed. New York: Cambridge University Press, 1989.

74. Rothenberg, M.; Ecker, J.R. Mutant analysis as an experimental approach towards understanding plant hormone action. *Seminars Dev. Biol.* 4:3-13, 1993.

75. Jürgens, G. Pattern formation in the flowering plant embryo. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2:567-570, 1992.

Koncz, C.; Chua, N.-H.; Schell, J., eds. Methods in *Arabidopsis* Research. River Edge, NJ: World Scientific Publishing, 1992.

Mayer, U.; Torres Ruiz, R.A.; Berleth, T.; Miséra, S.; Jürgens, G. Mutations affecting body organization in the *Arabidopsis* embryo. *Nature* 353:402-407, 1991.

Meyerowitz, E.M. *Arabidopsis*, a useful weed. *Cell* 56: 263-269, 1989.

76. Coen, E.S.; Carpenter, R. The metamorphosis of flowers. *Plant Cell* 5:1175-1181, 1993.

Coen, E.S.; Meyerowitz, E.M. The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature* 353:31-37, 1991.

77. The Brain. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 55, 1990.

Brown, M.C.; Hopkins, W.G.; Keynes, R.J. Essentials of Neural Development. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1990.

Hall, Z.W. An Introduction to Molecular Neurobiology. Sunderland, MA: Sinauer, 1992.

Jacobson, M. Developmental Neurobiology, 3rd ed. New York: Plenum Press, 1991.

Nicholls, J.G.; Martin, A.R.; Wallace, B.G. From Neuron to Brain, 3rd ed. Sunderland, MA: Sinauer, 1992.

Purves, D.; Lichtman, J.W. Principles of Neural Development. Sunderland, MA: Sinauer, 1985.

78. Williams, R.W.; Herrup, K. The control of neuron number. *Annu. Rev. Neurosci.* 11:423-453, 1988.

79. Caviness, V.S. Neocortical histogenesis in normal and reeler mice: a developmental study based on [3H]thymidine autoradiography. *Dev. Brain Res.* 4:293-302, 1982.

Rakic, P. Mode of cell migration to the superficial layers of the fetal monkey neocortex. *J. Comp. Neurol.* 145:61-84, 1972.

80. Goslin, K.; Banker, G. Experimental observations on the development of polarity by hippocampal neurons in culture. *J. Cell Biol.* 108:1507-1516, 1989.

Harrison, R.G. The outgrowth of the nerve fiber as a mode of protoplasmic movement. *J. Exp. Zool.* 9:787-846, 1910.

Mitchison, T.; Kirschner, M. Cytoskeletal dynamics and nerve growth. *Neuron* 1:761-772, 1988.

81. Chang, S.; Rathjen, F.G.; Raper, J.A. Extension of neurites on axons is impaired by antibodies against specific neural cell adhesion molecules. *J. Cell Biol.* 104:355-362, 1987.

Dodd, J.; Jessell, T.M. Axon guidance and the patterning of neuronal projections in vertebrates. *Science* 242:692-699, 1988.

Neugebauer, K.M.; Tomaselli, K.J.; Lilien, J.; Reichardt, L.F. N-cadherin, NCAM and integrins promote retinal neurite outgrowth on astrocytes *in vitro*. *J. Cell Biol.* 107:1177-1187, 1988.

Rutishauser, U. Adhesion molecules of the nervous system. *Curr. Opin. Cell Biol.* 3:709-715, 1993.

82. Campenot, R.B. Local control of neurite development by nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:4516-4519, 1977.

83. Luo, Y.; Raible, D.; Raper, J.A. Collapsin: a protein in brain that induces the collapse and paralysis of neuronal growth cones. *Cell* 75:217-227, 1993.

Schwab, M.E.; Kapfhammer, J.P.; Bandtlow, C.E. Inhibitors of neurite outgrowth. *Annu. Rev. Neurosci.* 16:565-595, 1993.

84. Patel, N.; Poo, M.-M. Orientation of neurite growth by extracellular electric fields. *J. Neurosci.* 2:483-496, 1982.

Tessier-Lavigne, M.; Placzek, M. Target attraction: are developing axons guided by chemotropism? *Trends Neurosci.* 15:303-310, 1991.

Wilson, S.W. Clues from clueless. (Axonal guidance mutants in *Drosophila*.) *Curr. Biol.* 3:536-539, 1992.

85. Ebendal, T.; Olson, L.; Seiger, A.; Hedlund, K.-O. Nerve growth factors in the rat iris. *Nature* 286:25-28, 1980.

Greene, L.A. The importance of both early and delayed responses in the biological actions of nerve growth factor. *Trends Neurosci.* 7:91-94, 1984.

Thoenen, H. The changing scene of neurotrophic factors. *Trends Neurosci.* 14:165-170, 1991.

86. Sanes, J.R. Topographic maps and molecular gradients. *Curr. Opin. Neurobiol.* 3:67-74, 1993.

Sperry, R.W. Chemoaffinity in the orderly growth of nerve fiber patterns and connections. *Proc. Natl. Acad. Sci.. USA* 50:703-710, 1963.

87. Cox, E.C.; Muller, B.; Bonhoeffer, F. Axonal guidance in the chick visual system: posterior tectal membranes induce collapse of growth cones from temporal retina. *Neuron* 4:31-37, 1990.

Tessier-Lavigne, M. Down the slippery slope. *Curr. Biol.* 2:353-355, 1992.

88. Brown, M.C.; Jansen, J.K.S.; Van Essen, D. Polyneuronal innervation of skeletal muscle in new-born rats and its elimination during maturation. *J. Physiol.* 261:387-422, 1976.

Jennings, C.G.B.; Burden, S.J. Development of the neuromuscular synapse. *Curr. Opin. Neurobiol.* 3:75-81, 1976.

Lo, Y.-J.; Poo, M.-M. Activity-dependent synaptic competition *in vitro*: heterosynaptic suppression of developing synapsess. *Science* 254:1019-1022, 1991.

Shatz, C.J. The developing brain. *Sci. Am.* 267(3):60-67, 1992.

89. Constantine-Paton, M.; Cline, H.T.; Debski, E. Patterened activity, synaptic convergence, and the NMDA receptor in developing visual pathways. *Annu. Rev. Neurosci.* 13:129-154, 1990.

Goodman, C.S.; Shatz, C.J. Developmental mechanisms that generate precise patterns of neuronal connectivity. *Cell 72/Neuron* 10 (Suppl.):77-98, 1993.

Hockfield, S.; Kalb, R.G. Activity-dependent structural changes during neuronal development. *Curr. Opin. Neurobiol.* 3:87-92, 1993.

90. Barlow, H. Visual experience and cortical development. *Nature* 258:199-204, 1975.

Cline, H.T.; Debski, E.A.; Constantine-Paton, M. N-methyl-D-aspartate receptor antagonist desegregates eye-specific stripes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 4342-4345, 1987.

Hubel, D.H.; Wiesel, T.N. Binocular interaction in striate cortex of kittens reared with artificial squint. *J. Neurophysiol.* 28:1041-1059, 1965.

Hubel, D.H.; Wiesel, T.N.; Le Vay, S. Plasticity of ocular dominance columns in monkey striate cortex. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. (Biol.)* 278:377-409, 1977.

Stryker, M.P.; Harris, W.A. Binocular impulse blockade prevents the formation of ocular dominance columns in cat visual cortex. *J. Neurosci.* 6:2117-2133, 1986.