A expressão dos Genes HOX e a má formação da coluna vertebral

The role of HOX genes in the generation of body plan

RESUMO Genes HOX são grupos de genes com fatores de transcrição altamente conservados, originalmente descritos como responsáveis por controlar funções críticas no desenvolvimento do plano corporal ao longo do eixo anteroposterior (AP) em *Drosophila*. Ao longo das últimas três décadas, estudos foram realizados gerando dados no aspecto evolutivo de diversos táxons, onde se destacam claramente que as mudanças nos padrões de expressão destes genes estão estreitamente associadas com a regionalização do eixo AP, sugerindo que os genes HOX têm desempenhado importante papel durante a evolução do plano corporal, em especial a bilateria. Apesar da sua conservação funcional e a importância deste gene na padronização do eixo AP, questões fundamentais permanecem obscuras sobre a biologia molecular do gene HOX. Destaca-se aqui dados recentes sobre a origem do cluster HOX em mamíferos, o papel dos genes HOX na geração do plano corporal, e os possíveis mecanismos utilizados pelos genes HOX para codificar a especificidade do plano corporal, onde a literatura tem sugerido que este gene é o responsável por determinar e diferenciar as estruturas que compõem a coluna vertebral.

PALAVRAS CHAVE: GENE HOX. COLUNA VERTEBRAL. BIOLOGIA.

ABSTRACT HOX genes are groups of highly conserved transcription factors, originally described as responsible for controlling critical features in the development of body plane along the anteroposterior axis (AP) in *Drosophila*. Along the last three decades, studies have been done generating evolutionary data of various taxons, which clearly point out that the changes in the expression patterns of these genes are closely associated with the regionalization of the AP axis, suggesting that HOX genes have an important role during the evolution of body plan from the bilateral. Despite its functional conservation and the importance of this gene in standardization of the AP axis, fundamental questions remain about many obscure aspects of molecular biology of the HOX gene. Here we highlight recent data on the origin of the HOX cluster in mammals, the roles of HOX genes in the generation of body plan, and the possible mechanisms used by HOX genes to encode the specificity of the body plan, where the literature has suggested that this gene is responsible for determining and differentiating the structures that make up the spine.

KEYWORDS: GENE HOX. SPINE. BIOLOGY.

CARLOS ALBERTO SILVA^I

BRUNO FERREIRA GONÇALVES
SILVA^{II}

RENAN RICHARD^{II}

ALEXANDRE REIS TAVEIRA
SOUZA^{II}

PATRÍCIA CARLA PAULINO^I

^IUniversidade Metodista de
Piracicaba (UNIMEP), Piracicaba/
SP – Brasil.

^{II}Universidade Paulista (UNIP),
Campinas/SP – Brasil.

INTRODUÇÃO

Os novos conceitos ligados à biologia molecular são essenciais para a compreensão dos processos evolutivos. As proteínas HOX (gene HOX) fazem parte de um grupo de fatores de transcrição contendo homeodomínios importantes na padronização dos planos corporais dos animais, estando intimamente relacionados a diversos processos de diferenciação celular, como: na embriogênese, morfogênese, neoplasias e na manutenção de funções no âmbito celular, com extraordinária conservação ao considerarmos a linha evolutiva das espécies.^{1,2}

A família dos genes homeobox se divide em 11 classes, dentre elas as mais conhecidas e estudadas são os Para HOX, genes NK e os genes HOX.³ Os genes HOX exercem função de fator de transcrição encarregado de interagir com genes alvos, promovendo sua ativação, repressão ou mesmo modulação.^{4,5,6} Inicialmente, esses genes foram descobertos na mosca da fruta (*Drosophila Melanogaster*) e ficaram conhecidos como complexo HOM-C.^{7,8}

Esse gene desempenha um papel crucial no estabelecimento da identidade Antero-Posterior (3' para 5') na *Drosophila Melanogaster*, onde os indivíduos que contêm uma mutação nesse gene apresentam membros em lugares errados ou até mesmo ausência ou deformidade.⁷ Atualmente, já foi identificado a presença deste gene nas espécies de animais que tiveram seu genoma codificado desde insetos até humanos.^{8,9,10,11}

O gene HOX é considerado um gene primário, pois se acredita que a duplicação desse gene foi responsável por todas as prin-

cipais mudanças nas estruturas dos animais e plantas durante o processo evolutivo^{9,10} e o nível de homologia encontrada entre o genes HOX humano e o da *Drosophila melanogaster* tem perfeita correlação entre a ordem de expressão de 3' para 5' (Anteroposterior). Sua expressão inicia-se na gastrulação, seguindo o padrão de expressão inicial da região 3', seguido pelos genes da região 5', que são expressos mais tardiamente e controlam regiões posteriores do desenvolvimento embrionário.^{12,13}

São ao todo 300 genes homeobox espalhados por todo o genoma, sendo 235 genes funcionais e 65 pseudogenes. Dentre os mais estudados estão os genes da família HOX, esses genes são estruturalmente e funcionalmente homólogos ao complexo HOM-C da *Drosophila*.¹³ Em humanos, há 39 membros da família HOX organizados em quatro grupos de acordo com sua posição e sua similaridade funcional chamados clusters, cada um localizado em um cromossomo diferente: HOXA (loci 7p15.3), HOXB (loci 17p21.3), HOXC (loci 12q13.3) e HOXD (loci 2q31). Levando em conta a homologia da sequência e sua posição no loci, os genes dos clusters podem ser alinhados entre si junto ao genes HOM-C em 13 grupos de genes parálogos, começando do 1 e indo até o 13 começando a partir da extremidade 3' de seu loci.^{4,8}

Durante a evolução dos metazoários, as esponjas do mar divergiram primeiro, em seguida os cnidários (medusas e corais), estes são os grupos mais basais entre os bilaterais. Análises mais detalhadas sobre o genoma da *Amphimedon queenslandica* nos revelaram que as esponjas do mar possuem vários genes homeobox NK, mas não possuem quais-

quer genes HOX ou ParaHOX definidos, em contraste aos Cnidários, onde já foram encontrados, alguns genes HOX-‘definitivos’. No entanto, os padrões de expressão destes genes não seguem um padrão A-P clara, ou mostram qualquer correlação com o código bilateral do gene HOX, na determinação do eixo A-P (14,15). Recentes análises filogenéticas de genes da classe ANTP têm demonstrado que os genes HOX e ParaHOX são mais estreitamente relacionados entre si do que são com a subclasse NK.^{15,16}

Dados genômicos e filogenéticos apoiam a hipótese de que genes NK, HOX e ParaHOX se expressaram antes do surgimento de animais bilaterais. Além disso, foi proposto que as três subclasses de genes são derivadas a partir de um gene ancestral (hipotético) que foi extensivamente duplicado, de forma que novos genes se formassem, criando três grupos de genes distintos.¹⁴ Cada um desses três grupos de genes foi conservado em diferentes extensões, em diferentes linhagens evolucionárias dentro da bilateralidade.^{14,15} Por exemplo, os vertebrados são fortemente ligados aos aglomerados HOX e ParaHOX e aglomerados NK, enquanto que dípteros (incluindo *Drosophila*) exibem um cluster HOX interrompido, mas mantiveram um cluster NK apertado.¹⁴

Normalmente, invertebrados possuem um único cluster HOX, enquanto os vertebrados possuem vários clusters que diferem entre os táxons diferentes. Por exemplo, genomas de mamíferos têm quatro grupos HOX, enquanto peixes teleósteos têm até oito clusters de HOX.¹⁷ Embora os genes HOX e aglomerados sejam relativamente bem caracterizados na maioria dos vertebrados, a evolução desses genes dentro deste

grupo permanece em grande parte obscura da história filogenética em particular. As origens evolutivas dos cromossomos portadores de HOX em mamíferos permanecem altamente controversa.^{18,21}

A visão científica clássica é que os quatro clusters de genes HOX em seres humanos foram originados por meio de duas rodadas de duplicação do genoma inteiro.^{19,21,22} A análise desses conjuntos de dados genômicos emergentes com técnicas filogenéticas avançadas tem gerado dados que são inconsistentes com toda a hipótese de duplicação do genoma, e em vez disso favorecem a hipótese de que as configurações do HOX no cromossomo dos mamíferos pode ser resultado de eventos de pequena escala no início da evolução dos vertebrados, que incluem segmentações, duplicações, duplicação de genes independentes, e translocações.^{3,18}

Os padrões de expressão espaciais e temporais de genes HOX ao longo do eixo A-P na mosca refletem a sua posição no cromossomo: genes na extremidade 3’ são expressos anteriormente no desenvolvimento e na parte mais anterior do embrião, e genes na extremidade 5’ são expressos mais tarde no desenvolvimento em regiões mais posteriores do embrião.¹⁷ Estudos em ratos mostraram que os padrões de expressão espaciais e temporais desses genes são também correlacionados com a sua posição a partir de 3 ‘para 5’ em cada conjunto, indicam que a colinearidade espacial e temporal dos genes HOX é conservada em mamíferos.^{23,25}

Há uma grande quantidade de dados indicando que os genes HOX são fundamentais para padronização do esqueleto axial em vertebrados e que as mudanças na

expressão têm ajudado a moldar a evolução dos planos corporais entre os metazoários.²³

Padrões do gene *HOM-C Ultrabithorax* (*Ubx*) de expressão estão associados com o aumento diferencial de determinados segmentos membros pélvicos em diferentes espécies.^{26,28} Estudos identificaram vários papéis importantes para os genes *HOX* no desenvolvimento de órgãos que correspondem à sua expressão ao longo do eixo A-P. O uso de animais transgênicos com ganho ou perda de funções genicas tem nos respondido diversas questões importantes. Em camundongo e provavelmente em humanos, utiliza-se a teoria de redundância. Essa teoria afirma que o padrão de desenvolvimento de uma célula ou tecido é resultado da expressão de vários membros da família *HOX*, e não da atividade específica ou dominante de um membro individual.²⁹

Um dos melhores exemplos que comprovam essa teoria é demonstrado pelos membros do parálogo 9 (*HOXA9*, *HOXB9*, *HOXD9*) durante o desenvolvimento da glândula mamária. Animais que possuem a expressão desses genes normais não possuem qualquer problema, já indivíduos sem a expressão apresentam uma intensa hipoplasia durante a prenhez e lactação.^{27,28,30} Em uma análise específica do Clusters B (*HOXB2-HOXB6*) durante o desenvolvimento pulmonar de camundongos na embriogênese foi demonstrado que os genes *HOXB3* e *HOXB4* induzem à formação da região cranial (Traqueia e Brônquio principal), enquanto que os genes *HOXB2* e *HOXB5* a região caudal³⁰. Em uma análise subsequente, foi constatado que no pulmão adulto, 11 membros da família *HOX* fazem a manutenção da homeostasia dos tecidos

clusters A (*HOXA2-HOXA6*), Clusters B (*HOXB2-HOXB6*) e o gene *HOXD*.¹³

O esqueleto axial vem recebendo uma considerável atenção na última década pelo fato de indicar como ocorreu a nossa evolução. Estudos em répteis (cobras e lagartos) com relação ao seu plano corporal permitiram uma nítida visão do diferencial de expressão dos genes *HOX* nos padrões corporais de ambos os organismos. Foram observadas duas regiões do esqueleto axial, vértebras torácicas e as vértebras lombares. Em lagartos, as fronteiras do diferencial do padrão de expressão *HOX* são bem nítidas, em relação a cobra, onde existe uma desregionalização dos genes *HOX*, fazendo que os limites de expressão no seguimento corporal não sejam tão nítidos. Isso faz que aumente o número de vértebras e costelas, assim como a redução ou a perda de membros pélvicos e até do esterno.^{29,30}

Estudos com camundongos demonstraram que a inativação de todos os genes parálogos *HOX10* (*HOXA10*, *HOXB10*, *HOXD10*), resulta na transformação das vértebras lombares em uma extensão caudal do tórax, como apresentação ectópica de costelas.³⁰ Esses e muitos outros estudos mostram que o parálogos *HOX10* controla processo chave na modelação somática responsável pelo desenvolvimento da inervação no esqueleto axial. No entanto, análises em embriões de cobras demonstraram que *HOXA10*, *HOXC10* são expressos em região de suporte da inervação no esqueleto axial, o que sugere a possibilidade de que os genes de cobra *HOXA10* e *HOXC10* perderam a capacidade de suprimir suporte de inervação nas vértebras.

Muitos autores afirmaram que as fronteiras morfológicas identificadas recentemente

na coluna vertebral de cobra correspondem à fronteira de expressão semelhante mapeada de parálogos HOX, sugerindo que o eixo AP destes animais é regulado por um código de HOX para funcionar normalmente. De uma perspectiva evolucionária, a desregionalização do esqueleto axial da serpente é feita na suposição de que esse plano corporal evoluiu de um ancestral que exibiu um eixo vertebral AP regionalizado corretamente. Neste caso, a evolução da cobra como plano corporal não é uma exceção, mas sim apenas mais um exemplo da função do gene HOX em esculpir planos corporais diversos na bilatéria.³⁴

A cada novo estudo, uma nova área de controle de gene HOX é descoberta: os genes HOX3 no desenvolvimento do timo, da tireoide e da paratireoide; os genes HOX6 no desenvolvimento do pâncreas, HOX9, HOX10 e HOX11 no trato reprodutor, HOX10 e HOX11, no desenvolvimento do rim.^{25,38,39,48}

Sabe-se do importante papel que os genes HOX possuem em muitas interfaces da organogênese, e está provado que a diversidade funcional ao longo do eixo A-P resulta da expressão diferencial de genes do complexo HOX que, por sua vez, regulam

diferentes conjuntos de genes alvo que regem a formação de regiões anatômicas, bem como, as suas características específicas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A literatura mostra que os genes parálogos HOX10 são responsáveis pelo desenvolvimento do plano corporal do esqueleto axial, na região das vértebras torácicas e lombares, assim, levando em consideração o plano corporal A-P. O que possivelmente indica que os genes parálogos HOX9 também estejam envolvidos com a formação da coluna vertebral e sua inervação durante o processo de embriogênese, onde sua expressão desregulada pode estar intimamente envolvida com diversas doenças relacionadas à má formação da coluna vertebral.

Deste modo, doenças congênitas ligadas ao sistema nervoso central, como a esclerose e a espinha bífida, que sempre foram um desafio para a medicina, podem ser estudadas e entendidas graças à compreensão da expressão do gene HOX ao longo do plano corporal, e a visão molecular da expressão deste gene pode contribuir para o desenvolvimento de planos de ação e entendimento das diferentes afecções.

REFERÊNCIAS

1. Yoshida H, Broaddus R, Cheng W, Xie S, Naora H. Desregulation of the HOXA10 homeobox gene in endometrial carcinoma: Role in epithelial-mesenchymal transition. **Cancer Res.** 2006;66(2):889–97.
2. Sheeba CJ, Logan MP. The Roles of T-Box Genes in Vertebrate Limb Development. **Curr Top Dev Biol.** 2017; 122:355–381
3. Hrycaj SM, Wellik DM. HOX genes and evolution. **F1000 Research.** 2016; 5:856–859.
4. Bürglin TR, Cassata G. Loss and gain of domains during evolution of cut superclass homeobox genes. **Int J Dev Biol.** 2002;46(1):115–23.
5. Abate-Shen C. Deregulated homeobox gene expression in cancer: cause or consequence? **Nat Rev Cancer.** 2002;2(10):777–85.

6. Lawrence HJ, Sauvageau G, Humphries RK, Largman C. The role of HOX homeobox genes in normal and leukemic hematopoiesis. **Stem Cells**. 1996;14(3):281–91.
7. Lewis EB. A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. **Nature** [Internet]. 1978;276(5688):565–70.
8. Holland PW, Booth HAF, Bruford E a. Classification and nomenclature of all human homeobox genes. **BMC Biol**. 2007;5(1):47.
9. Hoegg S, Meyer A. HOX clusters as models for vertebrate genome evolution. **Trends Genet**. 2005;21(8):421–4.
10. Stein S, Fritsch R, Lemaire L, Kessel M. Checklist: Vertebrate homeobox genes. **Mech Dev**. 1996;55(1):91–108.
11. Boucherat O, Montaron S, Berube-Simard FA, Aubin J, Philippidou P, Wellik DM, et al. Partial functional redundancy between HOXA5 and HOXB5 paralog genes during lung morphogenesis. **Am J Physiol – Lung Cell Mol Physiol**. 2013;304(12): L817–30.
12. Mallo M, Alonso CR. The regulation of HOX gene expression during animal development. **Dev Biol**. 2013; 3963:3951–63.
13. Head JJ, Polly PD. Evolution of the snake body form reveals homoplasy in amniote HOX gene function. **Nature**. 2015;520(7545):86–9.
14. Larroux C, Fahey B, Degnan SM, Adamski M, Rokhsar DS, Degnan B. The NK Homeobox Gene Cluster Predates the Origin of HOX Genes. **Curr Biol**. 2007;17(8):706–10.
15. Reddy PC, Unni MK, Gungi A, Agarwal P, Galande S. Evolution of HOX-like genes in Cnidaria: Study of Hydra HOX repertoire reveals tailor-made HOX-code for Cnidarians. **Mech Dev**. 2015;138:87–96.
16. Holland PWH. Did homeobox gene duplications contribute to the Cambrian explosion? **Zool Lett**. 2015;1(1):1.
17. Pascual-Anaya J, D’Aniello S, Kuratani S, Garcia-Fernández J. Evolution of HOX gene clusters in deuterostomes. **BMC Dev Biol**. 2013; 13: 26 - 32.
18. Soshnikova N, Dewaele R, Janvier P, Krumlauf R, Duboule D. Duplications of HOX gene clusters and the emergence of vertebrates. **Dev Biol**. 2013;378(2):194–9.
19. Hokamp K, McLysaght A, Wolfe KH. The 2R hypothesis and the human genome sequence. **J Struct Funct Genomics**. 2003;3(1-4):95–110.
20. Putnam NH, Butts T, Ferrier DEK, Furlong RF, Hellsten U, Kawashima T, et al. The amphioxus genome and the evolution of the chordate karyotype. **Nature**. 2008;453(7198):1064–71.
21. Kuraku S, Meyer A. The evolution and maintenance of HOX gene clusters in vertebrates and the teleost-specific genome duplication. **Int J Dev Biol**. 2009;53(5-6):765–73.
22. Guerreiro I, Nunes A, Woltering JM, Casaca A, Nóvoa A, Vinagre T, et al. Role of a polymorphism in a HOX/Pax-responsive enhancer in the evolution of the vertebrate spine. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2013;110(26):10682–6.
23. Burke AC, Nelson CE, Morgan B a, Tabin C. HOX genes and the evolution of vertebrate axial morphology. **Development**. 1995;121(2):333–46.
24. Wellik DM. HOX patterning of the vertebrate axial skeleton. **Dev Dyn**. 2007;236(9):2454–63.
25. Duboule D, Dollé P. The structural and functional organization of the murine HOX gene family resembles that of *Drosophila* homeotic genes. **EMBO J**. 1989;8(5):1497–505.
26. Mahfooz N, Turchyn N, Mihajlovic M, Hrycaj S, Popadić A. Ubx regulates differential enlargement and diversification of insect hind legs. **PLoS One**. 2007;2(9) 370-376.
27. Mahfooz NS, Li H, Popadić A. Differential expression patterns of the HOX gene are associated with differential growth of insect hind legs. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2004;101(14):4877–82.

28. Stansbury MS, Moczek AP. The function of HOX and appendage-patterning genes in the development of an evolutionary novelty, the *Photuris* firefly lantern. **Proc Biol Sci.** 2014;281(1782):2013-33.
29. Condie BG, Capecchi MR. Mice with targeted disruptions in the paralogous genes HOXA-3 and HOXD-3 reveal synergistic interactions. **Nature.** 1994;370(6487):304-7.
30. Chen F, Capecchi MR. Paralogous mouse HOX genes, HOXA9, HOXB9, and HOXD9, function together to control development of the mammary gland in response to pregnancy. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1999; 96:541-6.

Dados dos Autores

CARLOS ALBERTO SILVA

Doutor em Ciências Fisiológicas pela Universidade Estadual de Campinas. Professor titular da Universidade Metodista de Piracicaba ligado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências do Movimento Humano. Piracicaba/SP – Brasil. casilva@unimep.br

BRUNO FERREIRA GONÇALVES SILVA

Graduando do curso de Medicina Veterinária pela Universidade Paulista. Campinas/SP – Brasil. bruninho0201@hotmail.com

RENAN RICHARD

Graduando do curso de Ciências Biológicas pela Universidade Paulista. Campinas/SP – Brasil. renan_richard_1994@hotmail.com

ALEXANDRE REIS TAVEIRA SOUZA

Mestre em Biologia Funcional e Molecular pela Universidade Estadual de Campinas. Coordenador do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Paulista. Campinas/SP – Brasil. profalexandre2@gmail.com

PATRÍCIA CARLA PAULINO

Mestranda no Programa de Pós-graduação em Ciências do Movimento Humano da Universidade Metodista de Piracicaba. Piracicaba/SP – Brasil. pcpaulin@unimep.br

Submetido em: 19-05-2017

Aceito em: 30-06-2017