

Biología del desarrollo: la capacidad regenerativa de *Holothuria glaberrima*

Developmental Biology: The Regenerative Capacity of *Holothuria glaberrima*

David Quispe-Parra¹

Quispe-Parra, D. Biología del desarrollo: la capacidad regenerativa de *Holothuria glaberrima*. *Tecnología en Marcha*. Edición especial. Movilidad Estudiantil 6, 2019. Pág 126-136

 <https://doi.org/10.18845/tm.v32i8.4570>



¹ Ingeniero en Biotecnología. Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: davidjquispe@gmail.com

Palabras clave

Regeneración; deuterostomado; pepino de mar; ruta de señalización de Wnt.

Resumen

La regeneración es un proceso llamativo que permite la reconstitución de un miembro u órgano afectado o perdido. La regeneración en los organismos depende de sus características filogenéticas, las cuales permiten la agrupación de ciertos seres que son conocidos por su gran capacidad de reconstitución anatómica como es el caso de los platelmintos y equinodermos. Dentro del grupo de los equinodermos, el pepino de mar *Holothuria glaberrima* es un organismo modelo poco común que tiene la capacidad de regenerar sus órganos internos. Es un organismo invertebrado con un desarrollo embriológico similar a los vertebrados y al igual que estos se clasifica como deuterostomado. El estudio de los distintos mecanismos que se producen a partir de su capacidad regenerativa permite obtener valiosa información en el campo de la biología celular y molecular. Gracias al estudio pionero de este organismo por parte del grupo de investigadores del Laboratorio de Neurobiología de la Universidad de Puerto Rico, se ha obtenido información concerniente a procesos celulares que permiten la regeneración de los órganos internos en *Holothuria glaberrima*. Entre los estudios realizados que se han realizado en Puerto Rico, la actividad de la ruta de señalización de Wnt durante el inicio del proceso de regeneración, ha permitido descifrar que tipo de genes están involucrados en la activación de mecanismos celulares durante la regeneración. Estos estudios permiten asociar procesos celulares que pueden activarse en los seres que no gozan de la misma capacidad regenerativa que *Holothuria glaberrima* y así avanzar en el desarrollo de tratamientos médicos.

Keywords

Regeneration; deuterostomes; sea cucumber; Wnt signaling pathway.

Abstract

Regeneration is a striking process that allows the reconstitution of an affected or lost member or organ. The regeneration in organisms depends on their phylogenetic characteristics, which allow the grouping of certain beings that are known for their great capacity for anatomical reconstitution like the case of the flatworms and echinoderms. Within the group of echinoderms, the sea cucumber *Holothuria glaberrima* is an uncommon model organism that has the ability to regenerate its internal organs. It is an invertebrate organism with an embryological development similar to vertebrates and like them it is classified as deuterostome. The study of the different mechanisms that are produced from its regenerative capacity allows obtaining valuable information in the field of cellular and molecular biology. Thanks to the pioneering study of this organism by a group of researchers at the Laboratory of Neurobiology of the University of Puerto Rico, valuable information has been obtained concerning cellular processes that allow the regeneration of the internal organs in *Holothuria glaberrima*. Among the studies carried out in Puerto Rico, the activity of the Wnt signaling pathway during the beginning of the regeneration process has allowed to decipher which type of genes are involved in the activation of cellular mechanisms during regeneration. These studies allow associating cellular processes that can be activated in beings that do not enjoy the same regenerative capacity as *Holothuria glaberrima* and thus advance the development of medical treatments.

Introducción

La regeneración es un proceso de desarrollo donde se involucra la reparación de tejidos, reemplazo de órganos o extremidades y hasta la formación de un nuevo ser a partir de un fragmento del organismo inicial. Juega un papel fundamental en la respuesta a daños o afectaciones de tejidos, órganos y extremidades. De igual forma se considera como un proceso regulatorio importante que está implicado en eventos biológicos de estructuración, reproducción y reconstitución [1].

El entendimiento del proceso regenerativo requiere del uso de modelos experimentales, así como de la función de genes asociados a eventos celulares de proliferación y migración celular. Unos pocos organismos son utilizados como modelos y son considerados como tradicionales para el estudio de la regeneración. Entre estos, los equinodermos son un filo de animales invertebrados que se han usado para investigación durante los últimos años debido a que la regeneración es un aspecto fisiológico común en todas sus clases. Esta característica que los distingue la emplean en la reconstrucción de sus estructuras afectadas y para la reproducción asexual. Su potencial de regeneración no solo les permite reemplazar estructuras externas, sino que también pueden regenerar órganos vitales como las gónadas, intestino y la masa visceral [1].

Características de la Regeneración

La capacidad regenerativa de los organismos depende de muchos factores como la composición anatómica y las características fisiológicas. Cuando se desencadena el proceso regenerativo, existe variabilidad en cuanto al grado de recuperación morfológica y funcional. Este grado de variabilidad se da no solamente entre organismos que no están relacionados genéticamente, sino que también entre organismos cercanos y hasta en órganos y tejidos del mismo organismo. A pesar de la visión de la capacidad regenerativa como una característica propia de organismos simples y primitivos, la misma está ampliamente distribuida a través de la filogenia y es independiente del nivel de complejidad del organismo. Las capacidades regenerativas parecen asociarse mayormente al potencial de plasticidad histogenético y morfogenético del individuo, donde entran en juego la proliferación y migración celular, expresión de genes involucrados en el proceso y el suministro de reguladores tróficos específicos [2] [3] [4]. Mediante los procesos mencionados y de manera tradicional, la regeneración involucra dos mecanismos distintos, epimorfosis y morfálaxis. En la epimorfosis se forman nuevos tejidos a partir de la proliferación activa de células indiferenciadas que se agrupan para dar origen a un blastema. A partir de esta masa de células indiferenciadas se derivan las nuevas estructuras regeneradas. En el caso de la morfálaxis, ocurre un arreglo o reciclaje de los tejidos viejos que se transforman para sustituir los que se han perdido. Este último es un proceso de regeneración localizado donde las células redefinen su identidad [5].

Existen ciertas similitudes entre la regeneración y la embriogénesis que ha permitido una comparación de eventos celulares entre los dos procesos. Las diferencias entre embriogénesis y regeneración se basan al inicio de cada mecanismo, donde en el primero ocurre la unión de gametos en un proceso sexual, mientras que en la regeneración toda la estructura del organismo es creada completamente *de novo*. En la regeneración se recupera una parte definida de la constitución anatómica debido a la pérdida o afectación de la misma. El proceso de regeneración es versátil debido a que el inicio se da en una región donde existen células diferenciadas y bien caracterizadas. Además, la regeneración de diversos tejidos permite tomarla como un proceso de desarrollo distintivo para cada órgano o tejido involucrado [1] [6].

Organismo modelo *Holothuria glaberrima*

Como se mencionó anteriormente, los equinodermos son un gran ejemplo de organismos modelos debido a su gran capacidad regenerativa. Entre los equinodermos mayormente estudiados se encuentran las estrellas de mar, los erizos de mar y los pepinos de mar (figura 1). El último de estos organismos es ampliamente estudiado en Asia debido a que su consumo es habitual en lugares como China y Japón. En estos países la mayoría de estudios se realizan con el pepino de mar *Apostichopus japonicus*, el cual abunda en estos territorios. En el Laboratorio de Neurobiología de la Universidad de Puerto Rico se utiliza *H. glaberrima*, debido a su simplicidad y accesibilidad.

El pepino de mar *H. glaberrima* es considerado un organismo modelo excepcional para el estudio de la regeneración, esto debido a su capacidad para recuperar tejidos y órganos como el intestino, el sistema respiratorio y las gónadas. La mayor cantidad de estudios en este organismo se han centrado en la regeneración intestinal, donde se incluyen investigaciones concernientes a cambios histológicos y actividad celular [7]. Unido a su gran capacidad de reestructuración, su cercanía filogenética como equinodermo a organismos vertebrados permite conocer mecanismos de regeneración que se podrían reactivar en organismos como los seres humanos.



Figura 1. Pepino de mar *Holothuria glaberrima*.²

El desarrollo embriológico de los equinodermos muestra características de organismos más avanzados, lo cual ha servido para que sean clasificados como deuterostomados. Esta clasificación es parte de la misma rama evolutiva donde se encuentran los vertebrados (figura 2). Aparte de los equinodermos los demás invertebrados que pertenecen a este grupo son los tunicados, hemicordados y cefalocordados, mientras que todos los demás pertenecen a los protostomados. Esta cercana relación a los vertebrados convierte a los equinodermos como el pepino de mar en un organismo modelo interesante, especialmente al observar como en otros invertebrados como *Drosophila melanogaster* y *Caenorhabditis elegans* se ha obtenido información importante concerniente a eventos celulares y moleculares [8].

² Ver <https://www.cienciapr.org/es/monthly-story/sea-cucumber-and-regeneration>

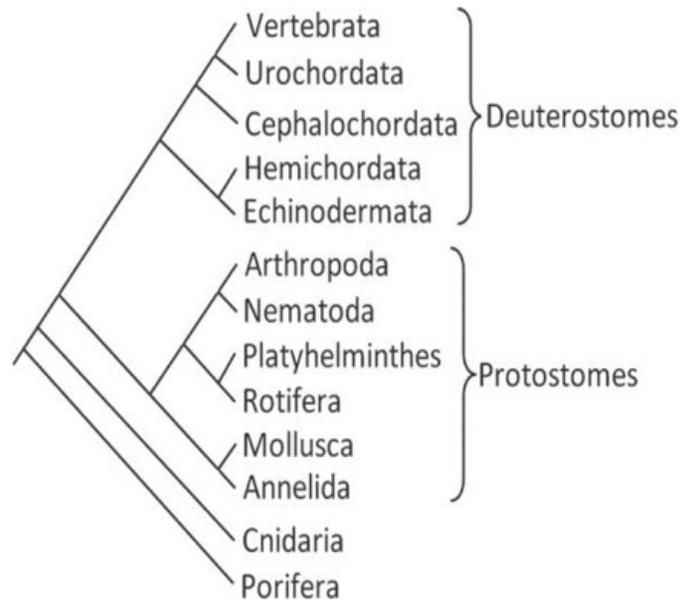


Figura 2. Árbol filogenético representando la relación de los equinodermos con otros filos del reino animal. Fuente: [8].

Regeneración de órganos internos en *Holothuria glaberrima*

La especie *H. glaberrima* tiene la capacidad de expulsar su tracto digestivo (figura 3) en condiciones de estrés. Normalmente esta característica conocida como evisceración, es usada como una estrategia defensiva, sin embargo puede ocurrir por estímulos ambientales e incluso se puede inducir en el laboratorio. La evisceración desencadena el proceso de regeneración del tracto digestivo, compuesto mayormente de intestino grueso y delgado que recorre el tracto. Durante el proceso de regeneración, se demostró que el nuevo intestino se forma por un engrosamiento del mesenterio, el cual da forma a un tejido grueso que conecta el esófago con la cloaca. Eventualmente células del epitelio luminal del esófago y la cloaca migran al tejido regenerado, formando un lumen continuo a lo largo del mismo. Luego de un mes de haber comenzado la regeneración se produce un intestino más pequeño pero aparentemente funcional [9].

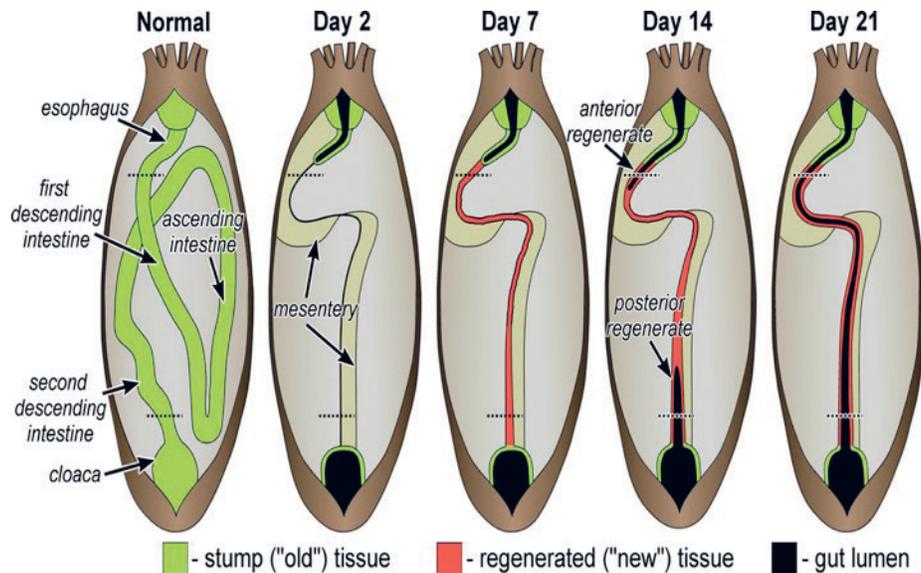


Figura 3. Anatomía del tracto digestivo del pepino de mar *H. glaberrima* en estado normal y en distintos puntos de la regeneración. Fuente: [10].

Se demostró que en este modelo, luego de expulsar la masa visceral, el nuevo intestino empieza a formarse a partir del extremo del mesenterio que queda libre. Durante el proceso, en el mesenterio se da un engrosamiento formando un tejido que se extiende desde el esófago hasta la cloaca. Luego de la formación de esta estructura, ocurre una migración de células epiteliales desde el esófago y la cloaca al tejido conectivo, dando origen a la capa mucosa del lumen intestinal [11]. En todo este proceso de regeneración intestinal, se estudiaron los eventos celulares involucrados los cuales constan de diferenciación celular, reestructuración de la matriz extracelular, división y migración celular. Estos mecanismos son también comunes en otros organismos con capacidades regenerativas como Hydra, Planaria, el pez cebra y algunos anfibios [9].

Aspectos moleculares de la regeneración estudiados en *Holothuria glaberrima*

En análisis de eventos celulares durante la regeneración de equinodermos se identificó un patrón paralelo al proceso correspondiente de regeneración en los vertebrados. Este dato hace pensar que los procesos de regeneración que se han mantenido en estos organismos pueden eventualmente ser reactivados en los vertebrados que no gozan de la misma capacidad [12].

Los procesos moleculares que se desencadenan durante el proceso regenerativo han sido estudiados tanto en *A. japonicus* como en *H. glaberrima*. Sin embargo, en este aspecto la falta de herramientas para caracterizar ampliamente el perfil genómico del pepino de mar y por lo tanto la poca disponibilidad de información en bases de datos ocasiona que algunas veces se marginen los estudios de regeneración modernos en este organismo modelo. A pesar de estas dificultades se realizaron esfuerzos para identificar genes asociados al proceso regenerativo como el establecimiento de una base de datos con más de 7000 marcadores de secuencia expresada a partir de una librería de ADN copia de dos diferentes estados de regeneración [13].

Mediante microarreglos se determinó el perfil de la actividad de distintos genes durante la regeneración intestinal temprana en *H. glaberrima* [14]. Entre los genes que poseen una sobreexpresión llamativa en la regeneración intestinal de *H. glaberrima* se encuentra el Wnt-9

[14]. Este gen codifica una glicoproteína extracelular de la familia proteica Wnt. Al unirse a sus respectivos receptores, estas proteínas intervienen en la ruta de señalización de la β -catenina. La ruta que involucra a Wnt es de interés debido a que está asociada a procesos regenerativos. Se han realizado numerosos estudios donde se encontró la implicación de esta ruta en la formación de blastemas en renacuajos y de tener un rol clave tanto en la proliferación como en la diferenciación de células madre intestinales [15] [16].

La ruta de Wnt y su relación con la regeneración

En conjunto durante todo el proceso regenerativo se llevan a cabo varios mecanismos celulares que involucran proliferación, movimiento y comunicación entre células. Se requiere de una sintonía de procesos que son clave para el desarrollo de un nuevo tejido u órgano. Todas estas actividades celulares dirigen procesos tanto de regeneración como de desarrollo y son originadas por la activación de la ruta de señalización de Wnt que aumentara la concentración de β -catenina y permitirá la expresión de genes asociados a los procesos celulares anteriormente mencionados [17].

Existen tres rutas de señalización de Wnt donde se llevan a cabo varios procesos celulares que involucran a esta glicoproteína. Únicamente la denominada ruta canónica incide sobre la concentración de β -catenina dentro de la célula, por lo tanto esta ruta es la que mayormente se ha estudiado para conocer los eventos celulares que resultan de la activación de la misma [18].

Al ocurrir la activación de la vía canónica, Wnt interactúa con su receptor FZD y un co-receptor lipoproteico de baja densidad denominado LRP5/6. Esta interacción provoca la asociación de la proteína DVL (también llamada "Dishevelled") al receptor FZD. Una vez realizada la asociación de estas proteínas, se produce la retención de un complejo de degradación formado por las proteínas APC, Axina y GSK3-beta. En condiciones de inactivación este complejo se encuentra asociado a β -catenina lo que produce su degradación. Al ocurrir la incorporación de este complejo a FZD/DVL, se promueve la actividad cinasa de GSK3-beta y de caseína cinasa (Ck1) sobre el co-receptor LRP5/6. Las modificaciones producidas al co-receptor provocan la unión de la proteína Axina a los residuos fosforilados de LRP5/6, lo que resulta en la disociación del complejo de degradación. Finalmente en ausencia del complejo, β -catenina se acumula progresivamente en el citoplasma y desencadena una migración al núcleo. Una vez la β -catenina ingresa al núcleo y junto con co-factores transcripcionales como TCF/LEF, se activa un conjunto de genes, entre los cuales se encuentran algunos asociados a la proliferación y la apoptosis [19] [20].

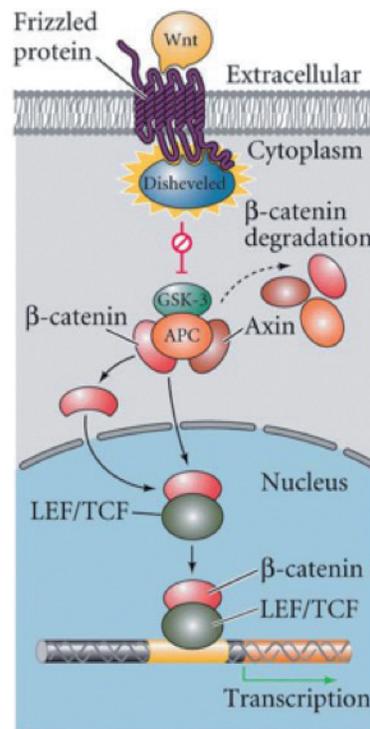


Figura 4. Modelo de la activación de la vía de señalización Wnt/β-catenina. La unión de Wnt al receptor FZD provoca la asociación de la proteína DVL y posteriormente la disociación del complejo de degradación (APC, Axina y GSK3-beta). La β-catenina se acumula e ingresa al núcleo donde participa en la expresión de los genes blanco de la vía de señalización. Fuente: [21]

Un punto importante a tomar en cuenta en la ruta de señalización de Wnt es su sistema de regulación, ya que no se puede tomar como un modelo binario de “encendido y apagado”. Esta ruta requiere una adecuada sintonía de modo que pueda funcionar apropiadamente durante la fisiología normal de un organismo. Esto se puede esquematizar tomando en cuenta los efectos de una alta o baja señalización de Wnt (figura 4). La primera puede resultar en cáncer, mientras que la segunda puede causar fallos cardiacos y osteoporosis (dependiendo del tipo de célula). La importancia de su modulación y el creciente número de enfermedades asociadas a mutaciones dentro de la ruta de señalización de Wnt (23 enfermedades se han asociado a mutaciones en la ruta), provocan la necesidad de elaborar tratamientos terapéuticos que sean específicos para regular esta ruta [22].

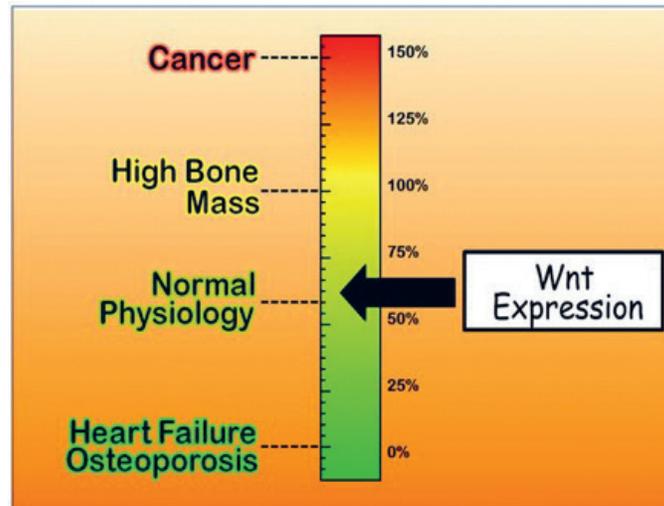


Figura 5. Esquema a modo de termostato de la expresión de Wnt. La expresión se representa como porcentajes donde 0% indica que no hay expresión y 150% representa un 50% más sobre la actividad normal de Wnt. Fuente: [22].

Las proteínas Wnt son reguladas por moléculas que interfieren con la asociación de Wnt y sus receptores. Entre las moléculas antagonistas de esta proteína se encuentran las que son codificadas por los genes de la familia Dickkopf (DKK). Las proteínas DKK son importantes para el desarrollo debido a que regulan la actividad de la ruta de Wnt y en el caso de los vertebrados este aspecto es importante para el desarrollo de miembros, somitogénesis y formación del ojo [23]. Con respecto a este último, se encontró que durante la regeneración de retina del pez cebra, existe una disminución de la expresión de los genes que codifican para proteínas DKK. De igual forma al inducir una sobreexpresión de los genes de DKK, ocurre una supresión de la proliferación de células de Müller, las cuales son necesarias en la regeneración de la retina [24]. En este mismo organismo durante el proceso de regeneración activado por lesiones en la espina dorsal, se demostró que la sobreexpresión de los genes codificantes de DKK1 inhiben la ruta de señalización Wnt/ β -catenina que está involucrada en el proceso de regeneración de la espina dorsal [25].

Consideraciones e importancia del estudio de la regeneración

En el laboratorio de Neurobiología de la Universidad de Puerto Rico se ha realizado un gran esfuerzo por entender el proceso regenerativo en *H. glaberrima*. Las limitaciones en términos de protocolos y herramientas para estudiar este tipo de organismo se han solventado con gran dedicación. Sin embargo, aún falta mucho por estudiar acerca de un organismo que puede brindar mucho más conocimiento acerca de la gran capacidad regenerativa que posee y su posterior activación en otros seres que no gozan de la misma capacidad. La biología regenerativa puede brindar información valiosa en la búsqueda de nuevos tratamientos a condiciones humanas relacionadas a la reparación de tejidos y órganos. De igual forma los procesos a nivel celular y molecular permiten obtener abundante información que posteriormente se puede utilizar para relacionarlo en seres humanos. Entre las vías importantes de estudio y que se encuentran en proceso de investigación, la ruta de señalización de Wnt se posiciona como un tema prometedor para entender los mecanismos moleculares que derivan en los procesos celulares involucrados en la reconstitución anatómica.

Agradecimientos

El autor desea agradecer al Programa de Pasantías para la Movilidad Estudiantil con fondos del sistema Conare y al Departamento de Trabajo Social y Salud por el apoyo financiero brindado para la realización de una pasantía en la Universidad de Puerto Rico. Además, se agradece al Ph.D. José García Arrarás, investigador principal del Laboratorio de Neurobiología de la Universidad de Puerto Rico, al Ing. David García Gómez y Alejandro Hernández Soto, profesores de la Escuela de Biología, por toda la ayuda brindada durante la pasantía.

Referencias

- [1] M. C. Carnevali, "Regeneration in Echinoderms: repair, regrowth, cloning", *Invertebr. Surviv. J.*, vol. 3, n.o 1, pp. 64–76, 2006.
- [2] I. L. Weissman, "Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution", *cell*, vol. 100, n.o 1, pp. 157–168, 2000.
- [3] C. Carnevali y F. Bonasoro, "Introduction to the biology of regeneration in echinoderms", 2001.
- [4] M. Wadman, *The healing touch*. Nature Publishing Group, 2005.
- [5] M. D. Candia Carnevali y F. Bonasoro, "Microscopic overview of crinoid regeneration", *Microsc. Res. Tech.*, vol. 55, n.o 6, pp. 403–426, 2001.
- [6] W. Reik y W. Dean, "Back to the Beginning: Epigenetic Reprogramming", *Nature*, vol. 420, p. 127, 2002.
- [7] V. S. Mashanov y J. E. García-Arrarás, "Gut regeneration in holothurians: a snapshot of recent developments", *Biol. Bull.*, vol. 221, n.o 1, pp. 93–109, 2011.
- [8] J. E. García-Arrarás y I. Y. Dolmatov, "Echinoderms: potential model systems for studies on muscle regeneration", *Curr. Pharm. Des.*, vol. 16, n.o 8, pp. 942–955, 2010.
- [9] J. E. García-Arrarás et al., "Cell dedifferentiation and epithelial to mesenchymal transitions during intestinal regeneration in *H. glaberrima*", *BMC Dev. Biol.*, vol. 11, n.o 1, p. 61, 2011.
- [10] V. S. Mashanov, O. R. Zueva, y J. E. Garcia-Arraras, "Expression of Wnt9, TCTP, and Bmp1/Tll in sea cucumber visceral regeneration", *Gene Expr. Patterns*, vol. 12, n.o 1-2, pp. 24–35, 2012.
- [11] J. E. García-Arrarás, L. Estrada-Rodgers, R. Santiago, I. I. Torres, L. Díaz-Miranda, y I. Torres-Avillán, "Cellular mechanisms of intestine regeneration in the sea cucumber, *Holothuria glaberrima* Selenka (Holothuroidea: Echinodermata)", *J. Exp. Zool.*, vol. 281, n.o 4, pp. 288–304, 1998.
- [12] V. S. Mashanov, O. R. Zueva, y J. E. García-Arrarás, "Transcriptomic changes during regeneration of the central nervous system in an echinoderm", *BMC Genomics*, vol. 15, n.o 1, p. 357, 2014.
- [13] C. Rojas-Cartagena et al., "Distinct profiles of expressed sequence tags during intestinal regeneration in the sea cucumber *Holothuria glaberrima*", *Physiol. Genomics*, vol. 31, n.o 2, pp. 203–215, 2007.
- [14] P. A. Ortiz-Pineda et al., "Gene expression profiling of intestinal regeneration in the sea cucumber", *BMC Genomics*, vol. 10, n.o 1, p. 262, 2009.
- [15] T.-H. Yen y N. A. Wright, "The gastrointestinal tract stem cell niche", *Stem Cell Rev.*, vol. 2, n.o 3, pp. 203–212, 2006.
- [16] H. Yokoyama, H. Ogino, C. L. Stoick-Cooper, R. M. Grainger, y R. T. Moon, "Wnt/ β -catenin signaling has an essential role in the initiation of limb regeneration", *Dev. Biol.*, vol. 306, n.o 1, pp. 170–178, 2007.
- [17] M. Katoh y M. Katoh, "WNT signaling pathway and stem cell signaling network", *Clin. Cancer Res.*, vol. 13, n.o 14, pp. 4042–4045, 2007.
- [18] K. M. Cadigan y Y. I. Liu, "Wnt signaling: complexity at the surface", *J. Cell Sci.*, vol. 119, n.o 3, pp. 395–402, 2006.
- [19] C. Fuerer, R. Nusse, y D. Ten Berge, "Wnt signalling in development and disease", *EMBO Rep.*, vol. 9, n.o 2, pp. 134–138, 2008.
- [20] S. A. Purro, S. Galli, y P. C. Salinas, "Dysfunction of Wnt signaling and synaptic disassembly in neurodegenerative diseases", *J. Mol. Cell Biol.*, vol. 6, n.o 1, pp. 75–80, 2014.



- [21]. S. Gilbert, "Developmental biology" in *Sunderland (Mass.): Sinauer*. 9th Ed. Associates, Inc., Publishers. 2010.
- [22]. J.-P. Rey y D. L. Ellies, "Wnt modulators in the biotech pipeline", *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.*, vol. 239, n.o 1, pp. 102–114, 2010.
- [23]. C. Niehrs, "Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators", *Oncogene*, vol. 25, n.o 57, pp. 7469–7481, 2006.
- [24]. R. Ramachandran, X.-F. Zhao, y D. Goldman, "Ascl1a/Dkk/ β -catenin signaling pathway is necessary and glycogen synthase kinase-3 β inhibition is sufficient for zebrafish retina regeneration", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 108, n.o 38, pp. 15858–15863, 2011.
- [25]. N. S. Strand, K. K. Hoi, T. M. Phan, C. A. Ray, J. D. Berndt, y R. T. Moon, "Wnt/ β -catenin signaling promotes regeneration after adult zebrafish spinal cord injury", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 477, n.o 4, pp. 952–956, 2016.