

Departament de Genètica
Facultat de Biologia
Universitat de Barcelona

APROXIMACIÓ EVO-DEVO A LA BASE
FILOGENÈTICA DELS BILATERALS: GENES HOX I
PARAHOX A ACELS I NEMERTODERMÀTIDES

Eva Jiménez Guri
Barcelona, 2003

Memòria presentada per **Eva Jiménez Guri** per optar al grau de **Doctor en Biologia**.

Tesi Doctoral realitzada sota la direcció dels doctors Jordi Garcia-Fernàndez i Emili Saló i Boix al Departament de Genètica, UB, dins del Programa de Genètica, bienni 1998-2000.

Els directors,

L'autora,

Emili Saló i Boix

Jordi Garcia-Fernàndez

Eva Jiménez Guri

Barcelona, maig de 2003

Perquè un somni s'ha de perseguir, encara que de vegades en volguem despertar. Si hem arribat fins aquí, el més difícil ja està fet.

Al meu germà
i els meus pares

A la meva àvia

gràcies a l'emili i en jordi per l'oportunitat que m'han donat de fer la tesi en el departament de genètica en un tema que m'ha fascinat. merci per tot el que m'heu ensenyat.

gràcies als meus companys de grup, especialment a la mette (el mundo gana una biòloga, pero pierde una pastelera...), la cristina (respira fondo, que en saps molt i vals per això, de veritat) i la maria (liebe ohna ende), que com que són nenes m'agrades més. els nens (el quique i el javi), de fet, només trien la música...;-)

gràcies a aquelles persones que m'han ajudat, i molt, en aquests anys en el laboratori. a la rebe, per tots els bons consells, i els ànims. a la mari, per totes les vegades que m'ha resolt temes tècnics, no se si podré calibrar cap phmetre sense que ella estigui a la vora. merci també a la gemma, que tan de bo pogués tenir al costat sempre, ja que és molt més útil que el maniatís. al jose i al marc, perquè em van ensenyar que la ciència es pot fer sense perdre el bon humor. al riqui, per haver-me aguantat les tonteries mil, i els mil i un problemes informàtics (i no deixar-me oblidar els meus orígens...). al josep, l'anna (r) i l'èlia per ser el meu alter-grup. a la neus, la mercè, la saretà (merci per tots els ànims donats), la diana, i el jon, perquè és bo tenir-los aprop, en molts sentits. al jordi (p) i l'inaiki, perquè els vaig dir que els posaria als agraïments (bé, suposo que s'ho mereixen... i si no fos pels arbres, també). a sí, i al jordi també pel dna dels nemertos... no sí, al final et perdonaré i tot no haver tocat més el violí per alegrar-nos les tardes... a en jaume, moltes gràcies per les reunions a 4. a en manel per fer que les hores de pràctiques passessin molt i molt ràpides. al david (b), pels tes i les històries. al francesc (m) per parar-me quan no dic hola. al jordi (s), sobre tot pel suport when abroad. a la montse (aguadé) (especialment), la lluisa i el pack corominas-serras per interessar-se de tant en tant per com m'anaven les coses, merci de veritat. al dani, el michael, en sebas, el david (dl), el jose antonio, l'humberto i l'alex (p), perquè els d'evo no estan tant lluny. a la irene i la nùria, per la burocràcia i el típex. a la carmen de radio i al ricardo dels camps. i al toni, perquè em va salvar aquell cop. als actg. i merci també a tota aquella gent maca que ha estat allà en aquests molts anys, que n'hi ha hagut molta. thanks as well to mark and aziz, for the oportunitat to go to their lab and show me what they knew, and that scotland may be wet but amazing.

i moltíssimes gràcies als que m'heu aguantat durant el que ha durat aquesta bojeria. als meus pares i germà, perquè els ha tocat patir-ho de ben aprop. merci especialment per poder riure de les coses per com s'expliquen durant els sopars. gràcies per haver-ho aguantat tan bé, sobre tot al final. a la meva àvia, perquè si algú ha intentat entendre de veritat el que he fet ha estat ella. a la resta de família d'aquí, sempre preguntant que tal va tot, sento no haver pogut donar més info que la que us he anat passant, i a la d'allà, per sempre pensar que ja havia acabat (ahora sí, por fin!). a la rosa, per tots els 26 de gener, i

per ensenyar-me al començar. i als meus amics. els que ja tenia: l'efren, l'andrés (computer-man!), la laia, la xanti, la vero, en joan (fals cdp! ocell, tu també ets el meu no-amic, ho saps?) i en carlos (i la resta de gent de calella, per poder escapar-me de tant en tant i sempre saber on trobar-vos), moltes gràcies per tot. per escoltar-me, per deixar que us escolti, i per ser part del que sóc jo. a aquells que les circumstàncies han fet que els camins se separin, en roger (aquí, malgrat la distancia), l'albert (i família vària), la nat, i sobretot sobretot al dani, perquè sense ell no estaria escrivint aquests agraïments. tan de bo tot hagués anat diferent. espero que tot et vagi molt bé, perquè si algú s'ho mereix ets tu. i als que he fet de nous: a na marta (des de les anades a la font fins al bar tomas, and beyond. nena, que ja estem!), buff! què vols que et digui aquí que no sàpigues, i al miquel, l'expert en música i bones idees, millor tampoc no et dic res. sort de vosaltres. no us penso trobar a faltar, perquè espero que mai estigueu massa lluny. a l'anna pels cafès dels diumenges i els musicals (i per estalviar-me diners quan anem a comprar juntes). to pa and ma (or thomas and marion, whatever you prefer), for everything while i was there with you (both personal and scientific). to thomas for the time here as well. to oliver, of course, first for the emails, then for the flowers and the stars. may everything work out as we expect. i finalment al jordi i l'elena. a ella per ser com és, perquè encara queden persones bones al món, i a ell, vaja, per ser el meu germà gran adoptiu, per tot el que vam compartir quan era aquí, i per no deixar que un oceà ens separi. si algú sap de què va tot això, és ell.

ÍNDEX

INTRODUCCIÓ	1
L'origen dels metazous	3
Filogènia dels metazous	5
Característiques dels bilaterals	9
Quan apareixen els organismes bilaterals?	12
Què hi ha a la base dels bilaterals actuals?	13
Evolució dels gens Hox i ParaHox	14
Filogènia basada en gens Hox	21
Característiques dels acels	23
Els altres acelomorfs, els nemertodermàtides	32
OBJECTIUS	35
MATERIALS I MÈTODES	39
1. Material Biològic	41
2. Obtenció d'àcids nucleics	44
3. Amplificació de DNAs per PCR	47
4. Aïllament de DNAs amplificats	52
5. Clonatge de DNA en plàsmids d' <i>E. coli</i>	52
6. Seqüenciació de DNA	54
7. Construcció d'una genoteca de cDNA	54
8. Marcatge d'àcids nucleics	55
9. Hibridació d'àcids nucleics	57
10. Crivellatge de genoteques	59
11. Obtenció de ESTs	60
12. Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE)	61
13. Captació d'imatges	62
14. Suport informàtic	63
RESULTATS I DISCUSSIÓ	65
Capítol 1. Observació de la morfologia dels acels de l'espècie <i>Symsagittifera roscoffensis</i>	67
Capítol 2. Aïllament i Caracterització de gens tipus Hox i ParaHox a acels	73
2.1 Aïllament dels gens tipus Hox i ParaHox a l'acel <i>Symsagittifera</i> <i>roscoffensis</i>	74
2.2 Aïllament dels gens tipus Hox i ParaHox a l'acel <i>Paratomela rubra</i>	76
2.3 Aïllament dels gens tipus Hox i ParaHox a l'acel <i>Neochildia fusca</i>	78
Capítol 3. Metodologies usades per complertar els gens aïllats	79
Capítol 4. Aïllament i Caracterització de gens tipus Hox i ParaHox a nemertodermàtides	87
Capítol 5. Comparació de les seqüències obtingudes amb les d'altres grups	

de bilaterals	91
Capítol 6. Projecte ESTs de l'acel <i>Symsagittifera roscoffensis</i>	111
DISCUSSIÓ GENERAL	115
Dotació gènica dels complexos Hox i ParaHox dels acels	117
Posició filogenètica dels acels	119
L'explosió càmbrica i els gens Hox	126
Com era el bilateral primitiu?	127
CONCLUSIONS	131
BIBLIOGRAFIA	135

INTRODUCCIÓ

L'ORIGEN DELS METAZOUS

La vida a la Terra va començar fa 3.500 milions d'anys (Ma). Així van aparèixer i es van anar succeint una sèrie de formes de vida procariotes i després eucariotes, possiblement per associacions simbiòtiques de les procariotes (Margulis, 1967, a Sampedro, 2002), que han sigut el únics pobladors de la Terra durant la major part de la història de la vida del planeta. El següent pas, el pas a la multicel·lularitat, va trigar 2.500 Ma en donar-se. Fins fa uns 800 Ma no varen aparèixer els primers animals pròpiament dits, els Metazous.

Tres teories majoritàriament acceptades, entre moltes d'altres, són les que clàssicament han explicat l'origen dels metazous. En principi les tres defensen que aquells van aparèixer a partir de protoctistes amb afinitat animal.

Teoria sincitial ciliada: Segons aquesta teoria, els metazous provenen de sincicis ciliats (estructures polinucleades ciliades) que van passar de ser polienèrgides a estructures mononucleades ciliades. L'estructura polinucleada hauria de tenir simetria bilateral, ja que tots els ciliats la tenen. La major part de podrien haver derivat segons aquesta teoria, però, tanmateix, aquesta té certes mancances. Així, no explica perquè tots els metazous tenen cèl·lules reproductores masculines amb flagell, i pressuposa que la simetria bilateral és la més primitiva, tot i que se sap que la radial ho és més (revisat a Baguñà i col·laboradors, 2003).

Teoria colonial flagellada: Els metazous es formarien segons aquesta teoria a partir d'una colònia de protoctistes amb afinitat animal flagellats que temporalment dividirien les funcions de la colònia, perdent així la totipotència de les cèl·lules, i per tant patint un procés d'especialització. Obtindrien així una simetria radial, que secundàriament esdevindria bilateral i assoliria l'organisme una direccionalitat del moviment que duria a una cefalització. El problema principal d'aquesta teoria és que no s'han observat protoctistes amb afinitat animal colonials, flagellats, ni amb divisió temporal del treball.

Teoria polifilètica: Aquesta teoria propugna que els metazous tenen al menys dos orígens diferents, un segons la teoria colonial flagellada, que hauria donat lloc a esponges i cnidaris, amb dos teixits embrionaris, i un segons la teoria sincitial ciliada, que hauria donat lloc a la resta de metazous, amb tres teixits embrionaris.

A grans trets, dos són els principals grups d'organismes dins dels metazous: els Radiata (radials) i els Bilateria (bilaterals). La diversitat trobada als bilaterals és extraordinàriament més àmplia que en els radials. Hi ha certs trets característics que distingeixen aquests dos grans grups. Els més importants es detallen a continuació:

Eixos corporals: Els organismes radials (diblàstics) només tenen un eix corporal, l'eix oral-aboral (O/AB). Aquest eix s'extén al llarg del cos del cnidari, des de l'obertura de la boca cap al peu en el cas dels pòlips, invertit en el cas de les meduses. A l'adquirir la bilateralitat es defineixen, directament, dos nous eixos, no només l'antero-posterior (AP), sinó també el dorso-ventral (DV). A partir d'ara, els animals poden direccionar el moviment, desenvolupar noves estructures de captació d'informació i concentrar-les a la part del cos cap on es dona el moviment, presentar diferències entre una part dorsal del cos, exposada a l'ambient, que ara l'ha de protegir i una de ventral.

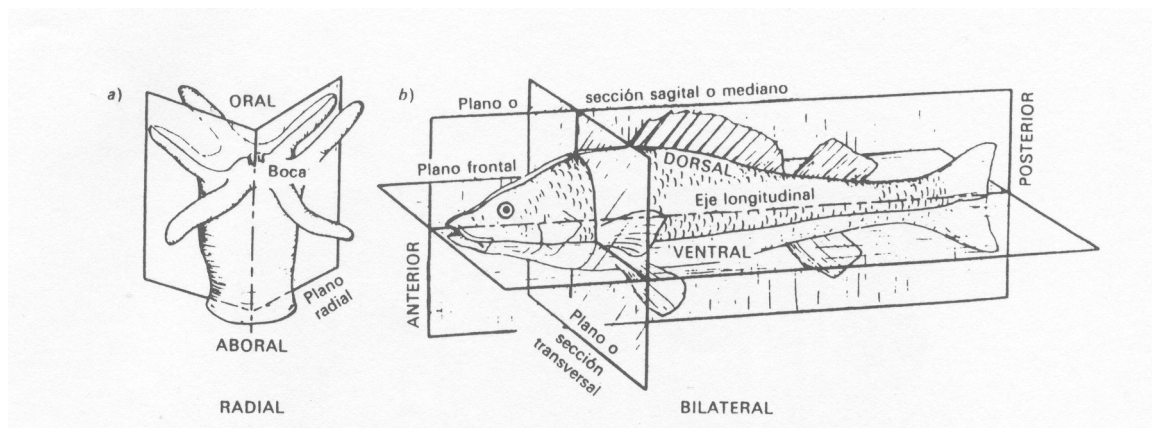


Fig 1. Comparació entre les simetries Radial (a) i Bilateral(b). Remarqui's els eixos i els diferents plans que es poden generar. En endavant anterior serà a l'esquerra i dorsal a dalt si no es diu altrament.

Hi ha dues hipòtesis majoritàries referents a la relació entre l'eix O/AB dels diblàstics i els eixos dels triblàstics. La primera resoldria que l'eix AP dels bilaterals deriva de l'eix O/AB de cnidaris, mentre que el DV apareixeria al desplaçar-se la regió oral (en posició posterior en l'organisme planuloid que fa el canvi a la bilateralitat) cap a la regió ventral per esdevenir boca o anus. La segona, al seu torn, convé que l'eix DV derivaria per compressió del O/AB en un ancestre tipus gastreia, mentre que l'eix AP seria de nova formació al desplaçar-se la placa neural apical cap a la futura part anterior alhora que el blastopor s'elongaria i es tancaria donant la boca i l'anús.

Cefalització: En el moment en que els animals amb simetria bilateral direccionen el moviment surgeix la necessitat de centralitzar els receptors d'informació cap a la banda on l'animal es mou. Així és com apareix la regió cefàlica, ben diferenciada de la caudal pel fet que a la primera s'hi concentren la majoria d'òrgans sensors de l'animal. En el cas dels diblàstics no hi ha cap direccionalitat, donada la seva

simetria, i per tant, no hi ha una zona de màxima concentració de receptors, sinó que tots es disposen de manera simètrica en el perímetre del cos.

Nombre de capes embrionàries: En els animals radials, també anomenats diblàstics, es distingeixen en l'embrió dues capes de teixit, l'endoderm, que queda a l'interior de l'embrió, i l'ectoderm, que queda a la banda externa. En els organismes bilaterals, o triblàstics, la blàstula es desenvolupa de tal manera que apareix un tercer teixit embrionari, el mesoderm. Aquest pot derivar de l'endoderm (endomesoderm) o de l'ectoderm (ectomesoderm). De l'ectoderm es formen l'epidermis i les seves estructures derivades (pèls, plomes, escates, ungles), el sistema nerviós, la part inicial i final del tub digestiu, l'epiteli de transició, i les glàndules sudorípares. De l'endoderm en deriven el teixit respiratori, l'epiteli gastrointestinal i glàndules accessòries a aquest,... El mesoderm dóna lloc a teixit conjuntiu, cartilaginós, òssi, muscular i reproductor (en els diblàstics les cèl.lules reproductores apareixen de cèl.lules indiferenciades). Els individus que tenen mesoderm presenten, en principi, una segona cavitat embrionària, el celoma.

Existència de celoma: El celoma apareix només en els animals triblàstics, ja que el teixit que el defineix es el mesoderm, i ho pot fer de tres maneres diferents en diferents organismes: per esquizocèlia, per enterocèlia o per la via mesenquimàtica. El celoma s'ha usat en diferents animals de tal manera que ha augmentat els seus avantatges. Algunes de les funcions del celoma són la de fer d'esquelet hidràulic, facilitar el transport de substàncies, albergar estructures (com òrgans reproductors, intestí,...). S'ha vist que el celoma no està present en tots els triblàstics, però aquest fet no correspon a una situació ancestral, sinó que hi ha organismes bilaterals que secundàriament l'han perdut (agrupats dins els grups parafilètics dels acelomats i els pseudocelomats).

FILOGÈNIA DELS METAZOUS

L'arbre filogenètic dels metazous va estar durant molt de temps inalterat en la seva estructura bàsica. Aquest arbre es basava en caràcters morfològics i embriològics, com ara l'existència de certes estructures com podria ser el celoma, o bé si es donava segmentació, o el tipus de clivellament de l'embrió i l'existència o no de fases larvàries al desenvolupament. A la base de l'arbre hi quedaven els Radiats, cnidaris i ctenòfors, i ja dins dels bilaterals hi apareixerien successivament els acelomats, els pseudocelomats i els eucelomats. Formant part d'aquest últim grup hi hauria tres associacions més, els protòstoms per una banda i els Lofoforats (braquiòpodes, briozous i forònids) i els deuteròstoms per una altra (fig 2 i 3A).

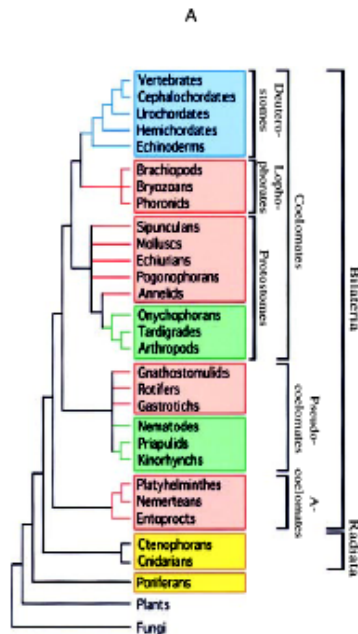


Fig 2. Filogènia tradicional basada en caràcters morfològics. La característica fonamental de classificació és el tipus de celoma present als organismes, i divideix aquests en acelomats, els més basals, Pseudocelomats, més tardans en l'evolució, i finalment Celomats, grup que inclouria Protostomats, Lofoforats i deuteròstoms. (Adoutte i col., 1999)

No obstant això, a mitjans anys vuitanta i sobre tot en els noranta, hi ha hagut una tendència clara a dubtar dels caràcters morfològics per fer aquesta filogènia per diverses raons. Alguns científics van creure que els caràcters que tradicionalment s'havien fet servir per classificar els animals no eren realment informatius, ja que, si bé alguns taxa quedaven clarament posicionats dins de l'arbre, d'altres preniën una posició força o molt més ambigua. Així, es va arribar a la conclusió que l'evolució del celoma, per exemple, no era en absolut com s'havia plantejat anteriorment, és a dir, no correlacionava amb l'aparició dels diferents fílums, sinó que era un caràcter plesiomòrfic a tots els bilaterals i només secundàriament perdut per algun dels fílums. Per tant no era un caràcter apte per fer filogènia (Balavoine, 1998). També caràcters com el tipus de clivellament, posició del sistema nerviós i d'altres es van veure no unívocs i, per tant, es va començar a dubtar, en alguns cercles, sobre la veracitat de la classificació clàssica dels metazous. Ja que la complexitat no era una marca de filogènia, calien noves aproximacions per determinar les relacions entre els fílums.

Amb l'extraordinari avenç de les tècniques de biologia molecular es va començar a plantejar de fer arbres filogenètics basats en les seqüències de gens obtingudes dels diferents fílums. Les seqüències de DNA són, efectivament,

caràcters molt adequats per a aquest menester. Els gens triats a aquest fi existeixen a tots els metazous, i cada una de les bases pot ser presa com un caràcter diferent a cada un dels grups. Cada cop que apareix una mutació en una base d'un gen d'una manera no universal, aquesta base passa a ser informativa del punt de vista filogenètic. Són subjectes a selecció natural i, per tant, la pressió de selecció els afecta com als caràcters morfològics. Tot i això, hi ha alguns problemes que són inherents a la filogènia molecular. Així, cal tenir en compte que no tots els organismes muten a la mateixa velocitat. Entrem aquí en el problema dels organismes *fast-clock*. Aquests organismes tenen una taxa d'evolució (mutació) molt més alta que d'altres, ja que la seva capacitat de mantenir mutacions en el seu genoma ha estat més gran que en els altres. Els organismes amb taxes de canvi elevades en el gen estudiat tendeixen a agrupar-se junts a la base dels arbres filogenètics de manera artefactual en un fenomen conegut com a *long branch attraction* (Adoutte, 1999). Així, aquests organismes donaran senyals falses a l'hora de fer inferències segons les seves seqüències de DNA, ocupant posicions basals que no els corresponen. Cal doncs trobar gens que tinguin una taxa d'evolució apropiada.

L'any 1988, Field i col.laboradors varen presentar la primera filogènia molecular basada en la seqüència de la subunitat petita del DNA ribosomal (SSU RNA o 18S rDNA, des d'ara 18S). La funció d'aquesta molècula és, en associació amb d'altres rDNAs i proteïnes, la de formar els ribosomes de la cèl.lula. Actualment és la molècula que s'ha seqüenciat a més organismes, ja que s'ha revelat com a molt informativa des del punt de vista filogenètic. La universalitat, llargada i patró de variació del gen, alternant parts variables i parts conservades, aporten una eina poderosa per reconstruir l'evolució a gran escala. A més, el procés d'homogenització de les múltiples còpies que existeixen en el genoma aparentment preven qualsevol problema metodològic derivat de duplicacions gèniques (Balavoine, 1998). Diversos treballs sobre aquesta molècula, bàsicament, van conduir a una nova filogènia. El 1995, Halayanch i col.laboradors van presentar un treball en el que es definia un nou grup. Desapareixien els lofoforats com a grup germà dels deuteròstoms, i es posicionaven en canvi dins dels protòstoms, formant de fet un nou grup amb el nom de Lophotrocozoa (lofotrocozous). Aquest nou grup comprenia als antics lofoforats, ara parafilètics, més els mol.luscs i els anèl.lids. Així l'arbre dels bilaterals quedava dividit en dos grans grups: els protòstoms i els deuteròstoms. L'any següent, Cavalier-Smith i col.laboradors van proposar el monofiletisme del regne animal amb el seu estudi sobre les esponges usant aquesta mateixa molècula. L'any 1997, Aguinaldo i col.laboradors van presentar una altra filogènia basada en el 18S en la que s'agrupava la resta de protòstoms en un altre grup, anomenat Ecdysozoa (ecdisozous). Aquest grup comprén els animals que muden, com artròpodes, nemàtodes, tardígrads, onicòfors, kinorhynchs i priapúlids. Entre d'altres conceptes, es trencava aquí la llargament admesa relació entre artròpodes i anèl.lids basada en el fet de ser segmentats (agrupats antigament amb el nom d'Articulata). També es confirmava el fet que organismes celomats i acelomats compartien grups filogenètics

i que, per tant, la possessió de celoma era un caràcter plesiomòrfic als bilaterals. Més endavant, el treball de de Rosa i col.laboradors (1999) va assentar del tot la nova filogènia al demostrar que la dotació de gens Hox de fílums crítics dins dels protòstoms confirmaven aquelles relacions filogenètiques. Així, l'arbre dels bilaterals va quedar definit en tres grans branques, els deuteròstoms per una banda, i dos grans grups de protòstoms, els Lofotrocozoous i els ecdisozoous (fig 3B).

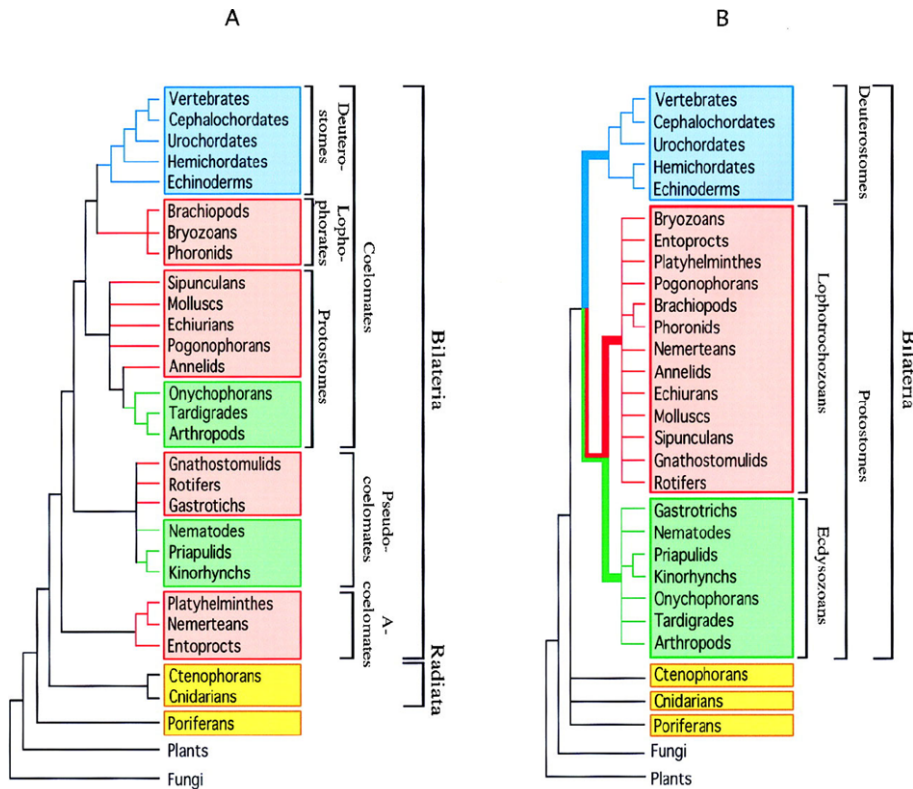


Fig 3. Filogènies dels metazous. 1) Filogènia tradicional basada en caràcters morfològics. La característica fonamental de classificació és el tipus de celoma present als organismes, i divideix aquests en acelomats, els més basals, pseudocelomats, més tardans en l'evolució, i finalment celomats, grup que inclouria protostomats, lofoforats i deuteròstoms. 2) Filogènia basada en dades moleculars. Apareixen els nous grups dels ecdisozoous i els lofotrocozoous, i es mantenen els deuteròstoms. Cal destacar que la divisió per tipus de celoma no es manté en absolut en aquesta nova filogènia. Veure text per a discussió. (Adoutte i col., 1999)

Cal dir, però, que les filogènies basades en la molècula de 18S presenten una extrema dificultat a resoldre els embrancaments dins dels lofotrocozoous o dels Ecdisozoous, ja que han aparegut en una successió històrica molt ràpida. Aquesta molècula tampoc no ha pogut resoldre la filogènia dels diblàstics. Calia, doncs,

iniciar filogènies basades en d'altres molècules per tal d'aclarir punts que quedaven foscos amb el 18S (Adoutte, 2000).

En qualsevol cas, les anàlisi filogenètiques que es duen a terme actualment tendeixen a basar-se en les dades moleculars i recolzar-les amb les morfològiques, en el que s'ha anomenat l'“evidència total” (Peterson i Eernisse, 2001). A més, no només s'estudia la seqüència primària dels gens, si no que també reordenacions genòmiques (com les del genoma mitocondrial), events de transposició (SINEs i LINEs), insercions i delecions, dotacions gèniques en determinades famílies gèniques... El problema amb la majoria d'aquesta mena d'evidències és que cal que s'hagin donat aquests fenòmens en els taxons que s'estudien, fet que no sempre s'esdevé.

CARACTERÍSTIQUES DELS BILATERALS

L'objecte d'estudi d'aquesta tesi és el punt on els metazous adquireixen la bilateralitat, un eix que divideix el cos simètricament en dues meitats, l'esquerra i la dreta. Els organismes bilaterals apareixen després que els radials en l'escala evolutiva, per l'adquisició d'una nova característica, una nova capa de teixit embrionari. Existeixen, com ja s'ha explicat anteriorment, diferències morfològiques importants dels organismes triblàstics respecte als diblàstics, a més del nombre de capes embrionàries: l'existència de celoma, un digestiu veritable (amb anus i boca) i un sistema nerviós central complex (Lundin, 1999). La característica, però, que dona la gran diferència, el gran salt, als triblàstics és, precisament, la bilateralitat.

Tot i que els organismes diblàstics han estat poblant la terra des de fa aproximadament 600 milions d'anys, cap dels descendents d'aquells primers han desenvolupat cap de les adaptacions que sí que han creat els organismes triblàstics (apèndixs, esquelets, cervells, ...). Es fa palesa la importància de l'aparició de la tercera capa embrionària per crear les múltiples estructures que han fet dels metazous bilaterals organismes amb una gran capacitat de diversificació.

L'aparició dels bilaterals es pot explicar per diferents teories (Balavoine, 1998 (2); Baguñà i col.laboradors, 2002). Les quatre més àmpliament debatudes s'expliquen a continuació:

Teoria aceloid-planuloid: Aquesta teoria hipotetitzza que els bilaterals més primitius haurien estat el planuloid i l'aceloid. El planuloid es descriu com a un organisme similar a les larves plànules dels actuals cnidaris compostat per una capa epidèrmica ciliada externa i una capa de massa sòlida interna de cèl.lules entre les quals hi ha disperses les cèl.lules sexuals. Tindria un eix antero-posterior i un òrgan sensorial anterior. D'aquest organisme en derivarien els cnidaris i l'aceloid que

incorporaria estructures diferenciades i que seria similar als actuals acels. D'aquest aceloid en derivarien, després, els organismes bilaterals.

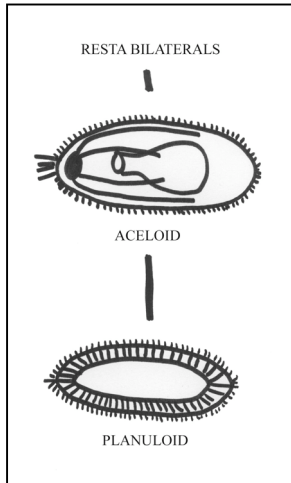


Figura 4. Teoria aceloid-planuloid. L'ancestre dels organismes bilaterals s'assemblaria a un acel, qui derivaria al seu temps d'un planuloid similar a una larva de cnidari (modificat de Balavoine, 1998 (2))

Teoria de la trochaea: L'ancestre postulat per aquesta teoria tindria un cicle vital bifàsic. Així, de la larva microscòpica del bilateral primitiu haurien derivat els fílums actuals pseudocelomats i acelomats per progènia, mentre que de l'adult arquicelomat ho haurien fet els fílums celomats actuals.

Teoria de l'arqueocelomat: Aquesta teoria postula que l'ancestre de tots els bilaterals era un organisme celomat en el que les cavitats celòmiques derivarien de diverticles intestinals semblants als que existeixen als antozous, i que el celoma apareixeria per enterocèlia. Aquesta teoria es una extensió de la teoria de la gastreia proposada per Haeckel (1874). Segons aquesta teoria el bilateral primitiu tindria simetria biradial i quatre diverticles intestinals. D'aquest es generaria el *bodyplan* fonamental dels bilaterals per elongació de l'eix bilateral i tancament dels diverticles,

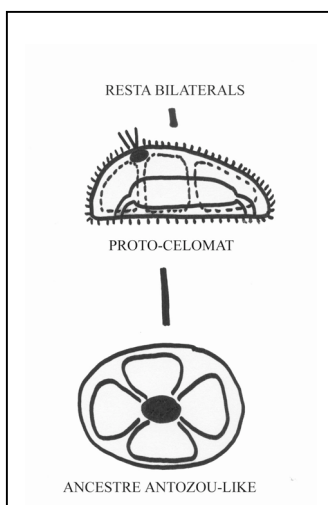


Figura 5. Teoria de l'arqueocelomat. L'ancestre comú als bilaterals és un protocelomat amb tres compartiments celòmics (protocel, mesocel i metacel) derivats dels diverticles gàstrics d'un ancestre amb l'organització interna dels actuals antozous. (modificat de Balavoine, 1998 (2)).

que generarien les cavitats celòmiques bilaterals. Aquest organisme bilateral primitiu tenia un endomesoderm derivat d'evaginacions de l'arquènteron (endoderm), intestí veritable, un cervell veritable amb cordons nerviosos i un celoma tripartit.

Teoria de l'Urbilateria: Basant-se en la comparació de l'expressió gènica en diferents organismes i en xarxes gèniques comparades, aquesta teoria presenta un ancestre macroscòpic, segmentat, celomat, amb apèndixs i aparell circulatori, similar al que presenta la teoria de l'arquicelomat. Es conclou d'aquesta teoria, també, que els organismes acelomats i pseudocelomats són derivats.

Quines són les característiques de cada un dels grups de bilaterals? Tot i l'esmentat anteriorment sobre la no univocitat de la morfologia respecte a la filogènia, sí que es poden definir certes característiques típiques de cada un dels grups dels bilaterals. En una breu pinzellada es podria dir:

Els Lofotrocozoous es caracteritzen fonamentalment per la similaritat en l'aparell alimentador (el lofofos, una banda ciliada a la vora de la boca) (tot i que aquest sembla bé haver aparegut múltiples vegades, bé ésser ancestral però haver estat perdut en mol.luscs i anèl.lids (Halanych, 1995)) i que en els casos en que es presenta una larva, aquesta és una larva trocòfora (d'aquí els ve el nom de lofotrocozoous). A més, es diferencien dels ecdizoous en que en alguns dels primers l'embrió es forma fent un clivellament en espiral (si bé es cert que no tots els membres del grup el presenten). Formen aquest grup briozoous, entoproctes, platihelminths, pogonòfors, braquiòpodes, forònids, nemertins, anèl.lids, equiurs, mol.luscs, sipuncúlids, gnatostomúlids i rotífers.

Els Ecdizoous prenen els seu nom de l'ecdisi, o muda, ja que aquest grup comprén els animals que muden. Aquesta característica hauria aparegut només un cop al llarg de l'evolució (Aguinaldo, 1997). Cap dels seus representants té un desenvolupament que no sigui radial, si bé aquest pot ser molt modificat. Artòpodes, onicòfors, tardígrads, nemàtodes, nematomorfs, priapúlids i cefalorincs són els fílums que formen aquest grup (Zrzavy i col.laboradors, 1998; de Rosa i col.laboradors, 1999).

Els Deuteròstoms agrupen els equinoderms, hemicordats, i cordats (urocordats, cefalocordats i vertebrats). El seu clivellament és radial, com els d'alguns dels lofotrocozoous. Això ha dut a alguns autors a determinar com a l'opció més parsimoniosa que el desenvolupament radial sigui l'ancestral (Valentine, 1997). Altres característiques típiques dels deuterostomats són el tipus de desenvolupament, clàssicament indeterminat (implicant que el destí dels blastòmers a les primeres divisions no està establert irreversiblement), l'existència d'un anus en posició posterior, un mesoderm derivat de l'arquènteron, així com la formació del celoma per enterocèlia (Jessop, 1990 i 1991). S'ha vist que una altra característica

morfològica comuna són les fenadures branquials, presents en algun moment del desenvolupament (tot i que en el grup dels equinoderms només s'han trobat en una espècie fòssil).

QUAN APAREIXEN ELS ORGANISMES BILATERALS?

Tradicionalment es considera que en el període del Càmbric, ara fa 545 milions d'anys, hi va haver una proliferació de formes en els organismes existents que va donar lloc als 38 tipus de plans corporals (fílums) bilaterals que existeixen actualment. Aquesta ràpida diversificació de formes es va donar en un curt període de temps, d'uns 10-20 milions d'anys, que es coneix amb el nom d'“Explosió Càmbrica”. Es defineix aquest període com la repentina aparició d'una fauna moderna com la trobada al jaciment de Burgess Shale amb simetria bilateral al període Càmbric (Balavoine 1998). En el registre fòssil no s'havien trobat traces de bilateralitat abans d'aquesta “explosió”. Les marques precàmbriques que es poden atribuir a metazous són bàsicament d'organismes radials. Tot i això, algunes troballes fòssils dels finals dels anys noranta apunten a que ja abans del Càmbric hi hauria animals bilaterals, com ha postulat S. Conway Morris (1993, 2000). ¿Què va fer que en un període tan curt de temps es donés una tan gran varietat de formes? Hi ha opinions controvertides sobre el moment, la durada i la importància real de l'Explosió Càmbrica.

Els primers animals sembla que van aparèixer uns milions d'anys abans de l'explosió. Les dades paleontològiques no concorden amb les moleculars respecte al quan, donant una discrepància molt notable. Les primeres daten aquest període en fa 600 Ma, i les moleculars en 1000 M. Aquest desacoblament s'ha argumentat que seria degut a la mala interpretació de les dates usant rellotges moleculars, i que la datació més acurada seria la basada en el registre fòssil (Conway Morris, 1998). Hi ha dades que apunten a que abans del Càmbric ja hi haurien organismes triblàstics. Fins i tot s'ha pensat que no hi ha hagut només una explosió càmbrica, sinó que cada un dels tres taxons dels bilaterals (deuteròstoms, lofotrocozous i Ecdisozous) ja eren separats en aquest moment, i que la diversificació del Càmbric es va fer simultàniament en cada un dels tres grups. Així, no parlen de l'Explosió Càmbrica sinó de tres Explosions Càmbriques (Balavoine, 1998).

Sigui com sigui que va anar, el que està clar és que en algun moment cap a fa 600Ma es va fer el pas a la bilateralitat, i que van ser aquests organismes els que després es van diversificar donant la gran majoria de fílums actuals, i un gran nombre de formes i estructures que els diblàstics no han pogut oferir.

QUÈ HI HA A LA BASE DELS BILATERALS ACTUALS?

Amb la filogènia molecular basada en el 18S no només s'ha inferit la divisió dels bilaterals en els tres grups que hem vist anteriorment. L'any 1999 Ruiz-Trillo i col.laboradors varen publicar una filogènia on els acels, cucs plans llargament debatuts com bé éssent el pas directe de diblàstics a triblàstics o bé platihelmints simplificats, quedaven a la base de l'arbre dels bilaterals embrancats com a grup germà d'aquests (fig 6).

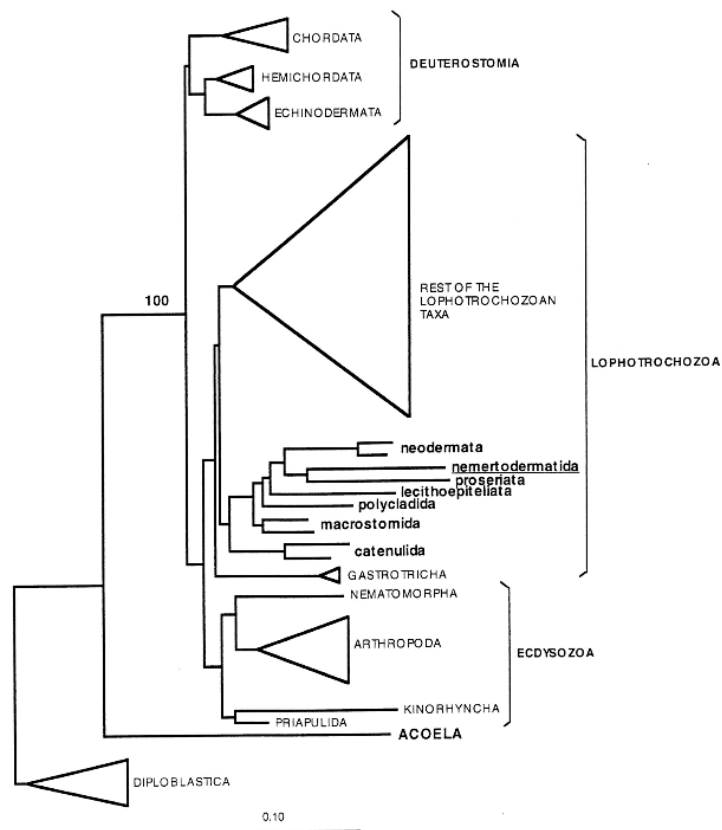


Fig 6. Arbre filogenètic basat en la molècula del 18S. Els acels apareixen a la base dels bilaterals, i no pas en el grup dels platihelmints com havien estat classificats per les filogènies tradicionals. (Ruiz-Trillo i col., 1999)

Aquesta posició basal dels acels ha estat molt controvertida des d'aleshores. Nombrosos articles n'han fet referència, i treballs amb d'altres molècules han donat suport o han desestimat aquesta idea. Així, treballs sobre la molècula *let-7* (Pasquinelli i col.laboradors, 2003), o la cadena pesada de la miosina (Ruiz-Trillo i col.laboradors, 2002) han corroborat el treball amb 18S, mentre que Berney i col.laboradors (2000) varen posicionar-s'hi en contra en el seu treball realitzat sobre

el *factor d'elongació 1-alfa* (per una crítica sobre aquest treball veure Littlewood, 2001).

En aquesta tesi doctoral s'ha intentat una nova aproximació per tal d'aclarir si realment els acels són els actuals descendents dels bilaterals primitius, i per tant no estan dins del altres tres grups de bilaterals, o si, per contra, són part dels platihelminths i, per tant, lofotrocozoous.

Com s'explicarà més endavant, s'ha vist que la història evolutiva dels gens Hox està molt lligada a la dels metazous, i que la seqüència, el nombre i la ordenació d'aquests gens en els diferents organismes donen informació filogenètica de molta qualitat. Filogènies basades en gens Hox han donat resultats perfectament compatibles amb la divisió actual dels metazous en els tres grups ja esmentats (de Rosa i col.laboradors, 1999). Així doncs, en aquesta tesi doctoral es va decidir abordar l'estudi de la posició filogenètica dels acels des del punt de vista dels gens Hox. La disciplina que estudia l'evolució a partir dels gens del desenvolupament es denomina Evo-Devo. L'Evo-Devo combina l'embriologia comparada, la paleontologia, la filogènia molecular i l'anàlisi genòmica per explicar com els processos i mecanismes del desenvolupament es modifiquen durant l'evolució, i com aquestes modificacions fan canvis a la morfologia animal i als *bodyplans* (Holland, 1999).

EVOLUCIÓ DELS GENS HOX I PARAHOX

Els gens Hox són una família de gens que codifiquen per reguladors transcripcionals del desenvolupament i que tenen un domini característic d'unió al DNA anomenat homeodomini. Aquest domini format per 60 aminoàcids és codificat per l'*homeobox*. Aquests factors de transcripció es troben en tots els representants del regne animal (i són una sinapomorfia dels metazous (Slack i col.laboradors, 1993). Durant el desenvolupament dels organismes bilaterals, els gens Hox s'expressen de manera seqüencial al llarg de l'eix antero-posterior de l'embrió (fenòmen conegut com a colinearitat), definint els territoris al llarg de l'eix. En aquells fílums de bilaterals on s'han estudiat, s'ha trobat que els gens Hox estan organitzats en el genoma formant un *cluster* de gens. Això és, els gens estan organitzats de manera linial i consecutiva en el genoma. Aquesta ordenació, a més, reflecteix el seu ordre d'expressió temporal i espacial. Com a mitjana, el *cluster* Hox als bilaterals té uns deu gens (tot i que hi ha organismes que en tenen fins a 14 (Ferrier i col.laboradors, 2000) (figura 7).

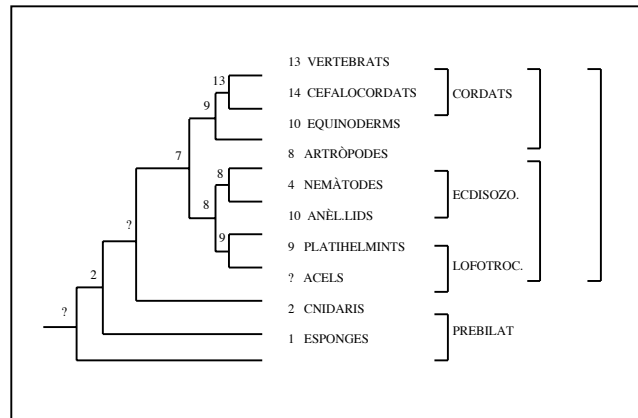


Fig 7. Dotació gènica de cada *cluster* Hox en diferents grups de metazous. (A partir de Solé i col., 1999)

Els gens del *cluster* es divideixen en tres grups principals: anteriors (gens 1 a 3), centrals (gens 4 a 8) i posteriors (gens 9 en endavant). En el cas de vertebrats no només hi ha un *cluster* sinó que n'hi ha quatre, fruit d'una o diverses duplicacions del genoma o de part d'aquest patides per aquest grup. A més, els gens guarden a tots els animals el mateix ordre, si bé hi ha gens que manquen en alguns dels grups. L'ordre en el que els gens estan organitzats en el genoma és l'ordre en el que els gens s'expressen al llarg de l'eix A-P en l'embrió (fenòmen conegut com a colinearitat espacial) i, a més, és el mateix que l'ordre en el que s'expressen en el temps (colinearitat temporal). Així, els primers gens del *cluster* s'expressen més d'hora en l'embrió i a més a la part més anterior d'aquest, mentre que els últims gens del *cluster* s'expressen més tard en el desenvolupament i a la part posterior de l'embrió.

La gran variació morfològica del regne animal no es deu als gens Hox en ells mateixos. Com ja s'ha dit, el mateix tipus de gens Hox existeix a protòstoms i deuteròstoms, si bé en diferent nombre. A més, l'expressió d'aquests gens és conservada en els diferents fílums, especificant territoris al llarg de l'eix antero-posterior. Així doncs, a què es deuen les diferències morfològiques entre grups? La visió actual és que el que varia és la regulació d'aquests gens, i els diferents tipus de gens *downstream* dels Hox. S'han proposat quatre maneres on la variació del patró d'expressió dels gens Hox pot dur a canvis evolutius (Gellon i McGinnis, 1998; Gilbert, 2000):

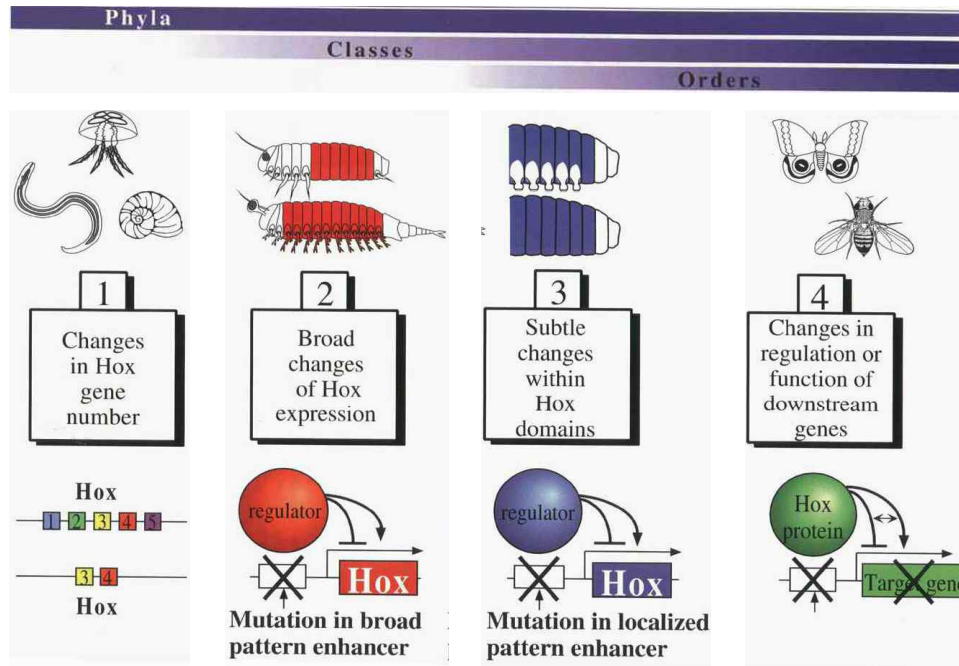


Fig 8. Diferents canvis produïts en la morfologia dels metazous a partir de canvis en el nombre, regulació i zones d'expressió dels gens Hox (veure text per discussió). (Gellon and McGinnis, 1998)

1) Canvis en el nombre de gens Hox- Duu a canvis a nivell de fílum, on un increment en el nombre de gens Hox pot dur a un increment de complexitat. Aquest podria ser el cas de l'augment de complexitat en els vertebrats a l'augmentar considerablement el nombre de gens Hox al tenir 4 *clusters*.

2) Canvis en els patrons de transcripció dels Hox entre diferents parts del cos- Duen a canvis en diferents segments del cos produint diferències al llarg de l'eix antero-posterior. Així poden aparèixer estructures noves en llocs on abans hi havia una repetició de forma, com passa en els diferents tipus i nombre d'extremitats que presenten els crustacis degut a la diferent zona d'expressió dels gens *Ubx* i *abdA* en cada un d'ells.

3) Canvis subtils en el patró de transcripció dels Hox a una part del cos- Poden fer que segments que anteriorment havien estat iguals en diferents espècies pateixin especialitzacions i que, de resultes, aquestes diferents espècies desenvolupin diferents estructures en els mateixos segments del cos. Es pot trobar un exemple en la formació d'apèndixs en dípters i en lepidòpters. *Distal.les (Dll)* a *Drosophila* s'expressa als segments cefàlics i toràcics, i no als abdominals ja que *abdA* i *Ubx* l'inhibeixen. En aquells segments on hi ha *Dll* apareixen els apèndix. El mateix passa a lepidòpters, només que en aquest grup *Dll* també s'expressa, tardanament en el

desenvolupament, en els segments abdominals, i, per tant, els lepidòpters també tenen apèndixs abdominals.

4) Canvis en la regulació o la funció dels elements *downstream* dels gens Hox- Així les estructures que apareixen a diferents organismes fortament emparentats poden patir canvis, com és el cas de la diferència entre el segon parell d'ales als lepidòpters i els alteris als dípters. En els dos casos, el gen *Ultrabithorax (Ubx)* s'expressa al tercer segment toràctic. El que determina l'aparició de cada estructura els dos organismes són els gens regulats per *Ubx* a cada un d'ells, ja que a *Drosophila* i a papallona no són els mateixos ni es regulen de mateixa manera.

La distribució i nomenclatura dels gens Hox als bilaterals es troben il·lustrades a de Rosa i col.laboradors, 1999 (figura 9).

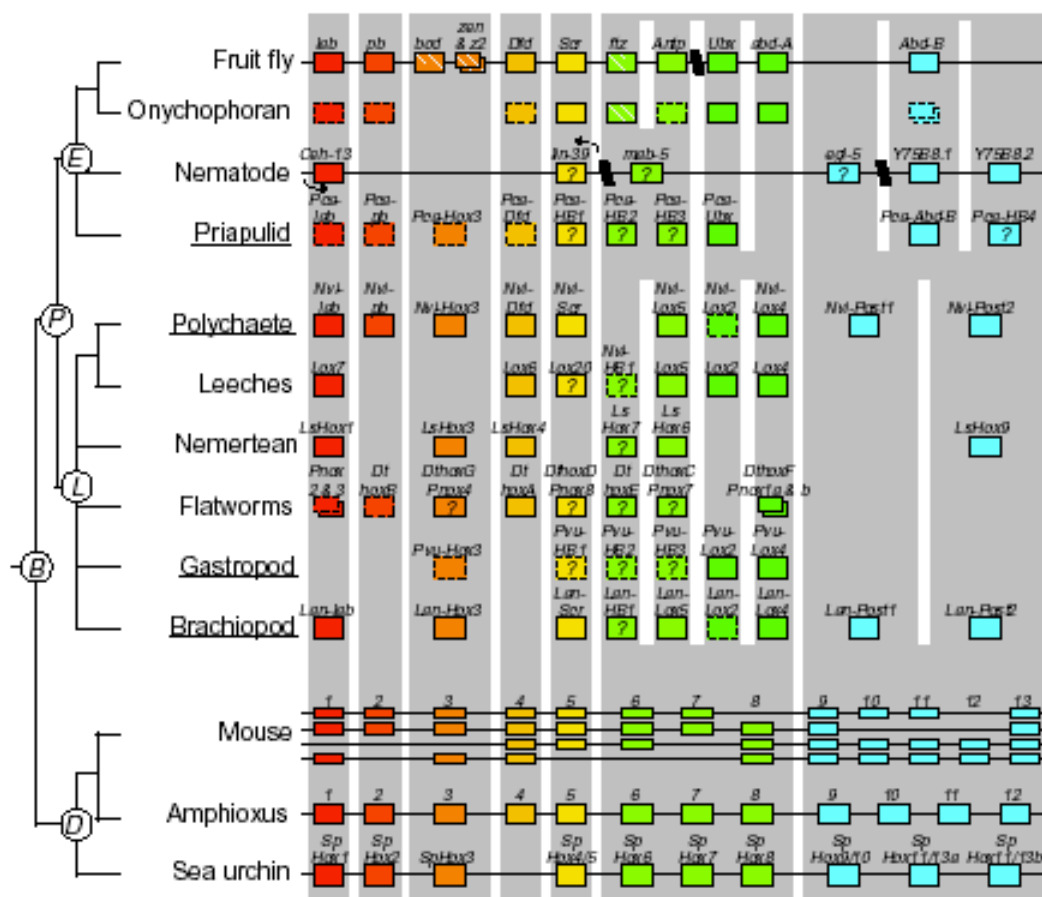


Fig 9. Dotació de gens Hox en diferents grups de bilaterals. Dins de cada grup hi ha gens o posicions aminoacídiques específiques que poden ajudar a fer una filogènia a partir d'aquests gens Hox. (de Rosa i col., 1999)

En el cas dels radials, també existeixen gens Hox, però el nombre i la distribució genòmica és molt diferent. En les esponges (que serien els animals més primitius) només s'ha trobat un gen, però la seva seqüència és extraordinàriament semblant a un gen posterior d'ascídia, cosa que fa pensar que pugui tractar-se d'una contaminació (Ferrier i Holland, 2001). En hidres, en canvi, sí que s'han trobat gens clarament Hox. Schummer i col.laboradors (1992) proposaven que tres gens (els homòlegs a *labial* (*Hox 1*), *proboscipèdia* (*Hox2*) i *abdominal B* (*Hox posterior*)) no es trobaven lligats en el genoma (però no es podia determinar si això era el caràcter primitiu o bé eren lligats i aquesta característica s'havia perdut secundàriament). Aquests gens només presenten colinearitat de tipus temporal en la regeneració, però no en presenten de cap tipus durant el desenvolupament (Schummer, 1992). Ferrier i Holland (2001) diuen, no obstant, que hi ha un gen anterior, un híbrid entre central i posterior, i un posterior, i que aquests sí que estan lligats i, a més, també amb el gen *Evx*, sempre proper al *cluster* Hox. Es veu, doncs, que hi ha una mena d'augment de la complexitat del *cluster* a mida que augmenta la complexitat de l'organisme.

Podrien ser els gens Hox els responsables de la gran diversitat trobada en el Càmbric? Abans que res caldria veure quan i com es va originar el *cluster* Hox. La idea generalment acceptada és que a partir d'un sol gen es van anar succeint una sèrie de duplicacions en tàndem fins a obtenir el *cluster* tal i com és ara. Aquest primer gen original s'ha anomenat *Ur-ProtoHox*. L'*Ur-ProtoHox* va patir unes duplicacions en tàndem fins que es va obtenir un *cluster* format per quatre gens (anterior, *PG3/Xlox*, central i posterior) en el que s'anomena *cluster* ProtoHox (Kourakis i Martindale, 2000; Ferrier i Holland, 2001). Aquest ProtoHox va patir una duplicació, i posterior divergència, que va resultar en l'aparició de dos *clusters*: el Hox, del que ja hem parlat, i el ParaHox (Brooke i col.laboradors, 1998). S'ha postulat, atenent a les característiques dels gens a radials i bilaterals, que aquesta duplicació es va donar després de la separació dels dos superfílums. En els bilaterals, ambdós *clusters*, Hox i ParaHox, van divergir a partir d'aquest moment de manera independent. El *cluster* Hox, com ja s'ha dit, va patir una sèrie de duplicacions en tàndem que van fer que apareguessin dos gens anteriors a partir del gen ProtoAnterior, un de *PG3* a partir del *PG3* al *Protocluster*, cinc de centrals i dos de posteriors. Aquests nombres varien segons diversos autors. Les dades anteriors són de Kourakis i Martindale (2000), si bé de Rosa i col.laboradors (1999) proposen un *cluster* Hox primitiu d'almenys set gens, però de fins a deu. Per altra banda, el *cluster* ParaHox, *cluster* germà del Hox, no només no va patir duplicacions, sinó que a més no s'ha trobat a cap organisme el que seria el gen central d'aquest grup. En els animals en els que s'han trobat els gens germans dels Hox, aquests s'han anomenat *Gsh* (homòleg al Hox anterior), *Xlox* (homòleg al *PG3*), i *Caudal* (homòleg als Hox posteriors). La semblança entre els diferents homòlegs Hox-ParaHox és més gran que entre els gens ortòlegs de cada un dels *clusters*, corroborant la idea que aquests *clusters* provenen de la duplicació del *cluster* ProtoHox (Brooke i col.laboradors, 1998). A més, la relació dels gens Hox i ParaHox entre ells demostren que un *cluster* ProtoHox de 4 gens, i no un amb tres

que després en guanya un al *cluster* Hox, és el correcte (Kourakis i Martindale, 2000). La evolució dels *clusters* Hox i ParaHox s'il·lustra a la figura 10.

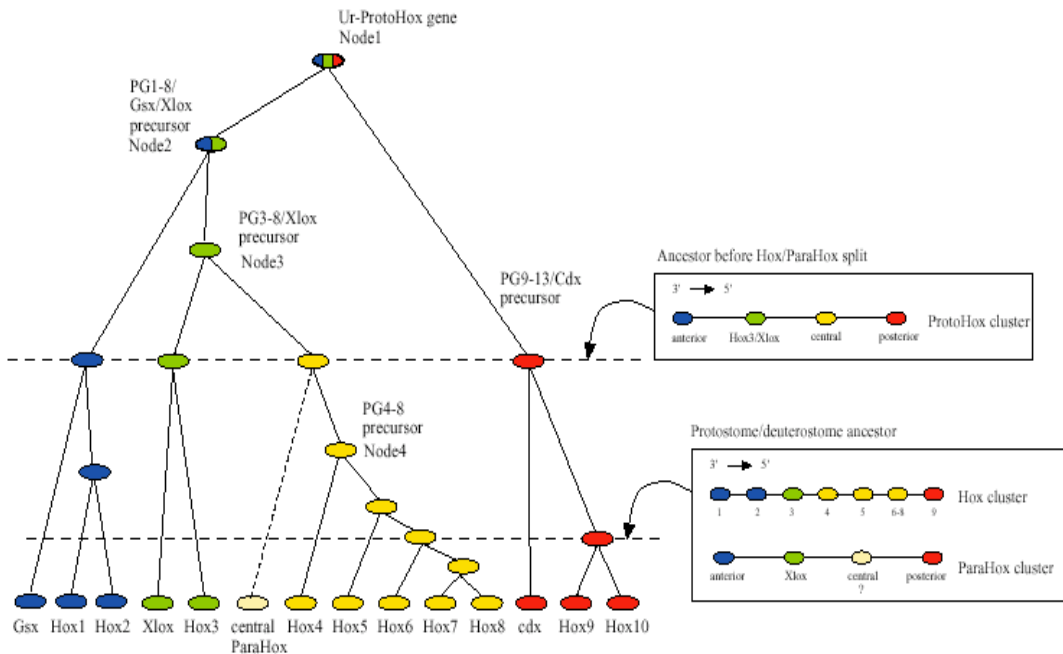


Fig 10. Possible evolució dels complexos gènics Hox i ParaHox a partir d'un gen ancestral comú anomenat Ur-ProtoHox. Es proposa un complex ProtoHox de 4 gens (anterior, PG3, central i posterior) previ a la duplicació que donà els complexos Hox i ParaHox, i es dona un model per a la dotació de cada *cluster* abans de la separació de protostomats i deuterostomats. (Martindale i Kourakis, 2000)

El lligament en *cluster* dels tres gens ParaHox només s'ha demostrat a l'amfiox en una zona d'unes 33 kilobases (Brooke i col.laboradors 1998). En el cefalocordat s'ha vist que l'expressió dels gens ParaHox també presenta el fenomen de la colinearitat, i sembla que aquests gens també especifiquen territoris al llarg de l'eix A-P. En altres organismes s'han trobat els tres gens, com és el cas de ratolí o humans, on, a més, s'ha trobat més d'un *cluster*. En cada un dels *clusters* hi ha diferent nombre de gens. Així, es veu en els gens ParaHox una tendència igual a la que es troba en els Hox de vertebrats, on també hi ha més d'un *cluster*. Fins l'any 2001 no s'havien trobat els tres gens a cap organisme protòstom (hi havia, per exemple, *Cad* i *Gsh* (*ind*) a *Drosophila* (Weiss i col.laboradors, 1998), o *Xlox* i *Cad* a *Discocelis* (Tauler, tesi doctoral), però no els tres alhora). Aquell any es va publicar, tot i que sense lligament, el *cluster* ParaHox d'un sipuncúlid (fílum protostomat) (Ferrier i Holland, 2001). Fins el moment els gens ParaHox publicats estan representants en la figura 11:

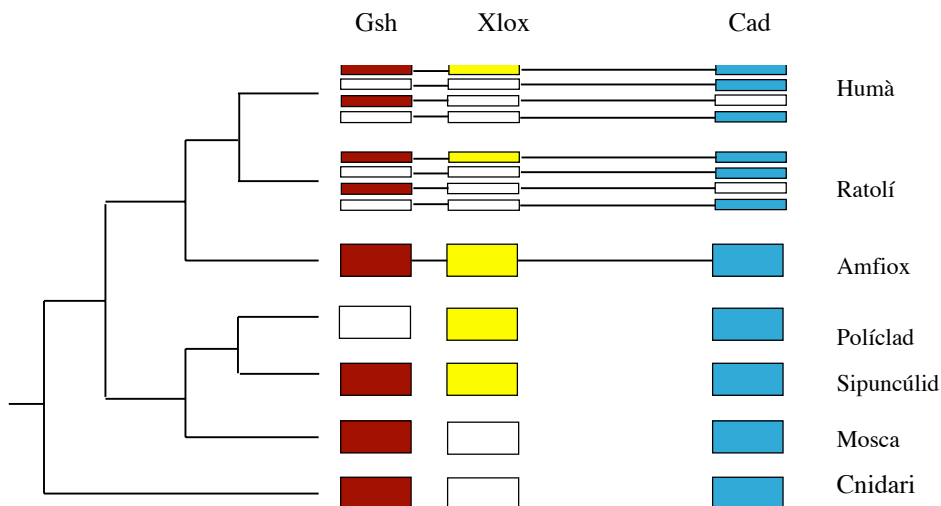


Fig 11. Dotació gènica del *cluster* ParaHox a diferents grups de bilaterals. Cal notar que l'absència d'alguns gens en alguns dels grups es pot assimilar al fet que no s'hagin clonat encara tant com al fet que s'hagin perdut.

A l'inici d'aquesta tesi encara no s'havia adscrit de manera inequívoca cap gen dels trobats a cnidari en un dels grups de Hox ni de ParaHox, ni s'havia determinat encara que les dades de seqüència dels gens trobats responien a característiques exclusivament Hox. Aquest buit d'informació feia pensar que la duplicació del *cluster* ProtoHox en dos s'havia donat ja entre els bilaterals, si no fos fins i tot que el mateix gen *Ur-ProtoHox* no hagués estat encara present en els primers bilaterals. Així, la idea primera fou de buscar el *Protocluster* o l'*Ur-ProtoHox* en els acels, donada la seva possible ubicació en la base dels bilaterals. No obstant això, al cap de pocs mesos es van publicar els primers resultats complets i irrefutables de Hox en diblàstics, i no només això, sinó que fins i tot quedava palès que ja en aquest grup hi havia gens dels dos tipus, Hox i ParaHox. Això sí, no hi havia una gran representació de gens. Fins ara en cnidaris s'han trobat els tres gens Hox ja comentats anteriorment i dos ParaHox, *Caudal* i *Gsh*. Aquestes dades apunten a que la separació dels dos *clusters* es va donar no només abans de la divergència dels tres llinatges de bilaterals, sinó ja abans de la separació dels radials i els bilaterals (fig 12) i, per tant, de l'evolució de l'eix antero-posterior dels bilaterals. Quedava clar, doncs, que no podiem esperar trobar el *Protocluster* en els acels.

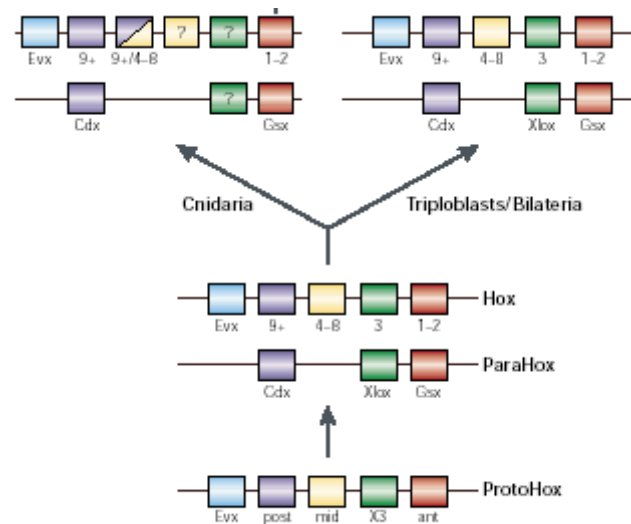


Fig 12. La separació dels llinatges de cnidari i bilaterals va succeir després de l'aparició dels *clusters* Hox i ParaHox, i cada un dels *clusters* van patir una evolució diferent en els dos llinatges. (Ferrier i Holland, 2001)

FILOGÈNIA BASADA EN GENS HOX

Tots els gens ParaHox que s'han trobat fins ara han resultat ser extremadament similars als organismes de diferents fílums i de diferents clades. Ara bé, els gens Hox han patit algunes de les seves duplicacions o bé alguna modificació dins d'algun dels clades, fent que tinguin característiques diferents en diferents grups.

Els gens Hox tenen un paper clau en la formació del patró antero-posterior en els bilaterals (Carroll, 1995). La conservació de la colinearitat i de la funció en l'embrió dels gens Hox demostren que el paper d'aquest *cluster* en la formació del patró axial va aparèixer abans de la divergència de protòstoms i deuteròstoms. La reconstrucció de la història evolutiva d'aquesta família gènica és, per tant, de gran interès per entendre l'evolució dels plans corporals bilaterals i la relació entre complexitat morfològica i genètica. Hi ha dotacions de gens Hox compartides per diferents subgrups de bilaterals. S'ha vist que cada un dels tres superfílums de bilaterals (lofotrocozoous, Ecdizoous i deuteròstoms) té gens Hox característics. S'ha postulat que trobar gens Hox típics d'un o altre grup a un organisme particular reflecteix d'adscripció d'aquest organisme en aquell grup. Així, per exemple, s'han trobat un parell de gens posteriors (*abdominal-B-like*) a Lofotrocozoous, mentre que se n'ha trobat un de diferent a Ecdizoous. A més, cap d'aquests gens posteriors s'ha pogut relacionar amb els gens posteriors de deuteròstoms. Així mateix, els lofotrocozoous es

caracteritzen per la presència de gens centrals *Lox5*, *Lox2* i *Lox 4*, no presents a Ecdisozous, mentre que a aquests últims hi ha els gens centrals *Ubx* i *Abd-A*. Si es trobés en un animal un d'aquests gens en concret se'l podria adscriure, doncs, al grup en el que els gens li són iguals. No tots els animals d'un grup determinat presenten tots els gens característics d'aquest grup, però el trobar un gen "marcador" d'algun d'aquest grups recolza la inclusió d'aquest animals dins aquell grup (de Rosa i col.laboradors, 1999).

A més, de la comparació de la dotació de gens compartida pels integrants dels diferents grups es poden inferir com serien els *clusters* Hox dels ancestres en aquests grups. Així, als primitius lofotrocozous s'ha proposat que hi hauria un *cluster* d'uns 10 gens, mentre que als primitius Ecdisozous al menys 8. De la mateixa manera es proposa que l'ancestre comú als protòstoms tindria al menys 8 gens, i el *cluster* de l'ancestre comú dels bilaterals seria de, al menys, 7 gens (*lab/Hox1*, *pb/Hox2*, *Hox3*, *Dfd/Hox4*, *Scr/Hox5*, gen central, gen posterior) (de Rosa i col.laboradors, 1999).

No només la regió de l'*homeobox* (la més conservada) dels gens Hox ens dóna pistes per adscriure un animal dins d'un o altre superfílum. Hi ha seqüències flanquejans a l'*homeobox* d'alguns dels gens Hox que també permeten discernir entre grups. Els residus de dins i fora les seqüències que ens permeten veure les diferències entre els diferents clades s'anomenen "signatures moleculars". Kobayashi i col.laboradors (1999) van usar un pèptid contingut a la regió carboxi-terminal del gen *antp* (o *Lox5*) anomenat "spiralian peptide" (Bayascas i col.laboradors, 1998) per adscriure els dicèmids (organismes d'adscripció filogenètica molt controvertida fins aleshores) dins del grup dels lofotrocozous. Aquest "spiralian peptide" ha estat trobat només en el gen *Lox5* de lofotrocozous, i mai en l'homòleg a deuteròstoms ni ecdisozous ni en cap altre gen. Hi ha altres exemples de signatures moleculars. Per exemple, un altre pèptid a 5' del gen *Ubx* que només es troba a protòstoms. Telford (2000), però, dóna arguments a tenir en compte al fer aquestes comparacions de signatures moleculars. Cal recordar que només els caràcters derivats, les sinapomorfies, són vàlids per unir clades. Donat que no hi ha un *out-group* sobre el qual determinar la seqüència original dels gens Hox (ja que, com ja s'ha vist, fins i tot els cnidaris tenen gens Hox), cal anar molt en compte ja que les signatures moleculars no es poden provar derivades. Tot i això, també dóna una solució a aquest problema. Si es té en compte que els gens Hox venen d'una duplicació en un ancestre comú, es poden usar comparacions entre gens paràlegs per determinar quin era l'estat ancestral per a cada aminoàcid. Els aminoàcids compartits amb l'*out-group* (i.e. gens paràlegs) són ancestrals, i els no compartits ni amb els gens paràlegs ni amb els ortòlegs són derivats i, per tant, aptes per fer filogènies. En el cas del gen *Lox5* sobre el que es basava l'estudi de Kobayashi, Telford va poder trobar dos aminoàcids derivats que suportaven l'adscripció dels dicèmids en els lofotrocozous.

Respecte al paper dels gens Hox i ParaHox en l'explosió càmbrica, si bé en un inici es va proposar que aquests tenien un paper clar en aquesta (Brooke i col.laboradors, 1998), dades més recents apunten a que varen ser altres les raons d'aquesta explosió, ja que els dos complexos ja existien abans d'aquest període (Ferrier i Holland, 2001). Es discutirà més ampliament aquesta relació en la Discussió General d'aquesta tesi. Tot i això, cal dir que sembla que l'expansió central dels gens Hox en general, i les duplicacions del cluster Hox en els deuterostomats en particular sí que estarien correlacionades amb l'evolució d'aquests grups a partir de l'Explosió Càmbrica (Brooke i col.laboradors, 1998).

CARACTERÍSTIQUES DELS ACELS

Després de les proves filogenètiques aportades per Ruiz-Trillo i col.laboradors (1999) segons les quals les acels eren els animals que queden a la base dels organismes bilaterals, es va decidir aïllar i caracteritzar els gens Hox i ParaHox d'aquests animals per provar una aproximació des de la perspectiva de l'Evo-Devo a aquesta qüestió.

L'ordre acels és un grup morfològicament divers de cucs de mida petita (0.5-10mm de longitud), de cos tou i ovalat, sense estructures superficials evidents com ara apèndixs o marques especials, acelomats i que predominantment ocupen hàbitats marins. Deuen el seu nom a la manca d'una cavitat digestiva definida on la boca (en posició ventral mitja) s'obre al parènquima (endoderm) representat per una massa de teixit no epitelial amb elements de tipus sincitial i cel.lulars (Smith i Tyler, 1985). Aquesta boca és difícil de veure, ja que en la majoria d'espècies és un simple tall en la capa epitelial externa tancada per uns esfínters musculars.

Els acels són els components més nombrosos del grup acelomorfs (acels i nemertodermàtides) i, basat en la filogènia tradicional, un dels onze ordres de turbelaris, dins del fílum dels platihelminths. Aquest clade no compta amb sinapomorfies amb la resta del fílum excepte, potser, la presència de neoblasts (Rieger, 2001). Tot i que la seva posició en l'arbre filogenètic està molt controvertida, com s'ha exposat més amunt, no hi ha dubtes del seu monofiletisme.

La paret corporal dels acels consisteix d'una monocapa d'epidermis ciliada i de capes complexes de musculatura circular, longitudinal i diagonal. Aquesta envolta el parènquima cel.lular perifèric, que inclou teixits mesodèrmics a més de musculatura i estructures reproductives. No només els manca una cavitat corporal, com és el cas de tots els platihelminths, sinó que no tenen una cavitat digestiva amb un recobriment de cèl.lules epitelials. La digestió es duu a terme a la part central del cos, en un teixit que presenta citoplasmes vacuolats i nuclis dispersos. Aquest teixit està rodejat d'un més dens, el parènquima perifèric, en el qual estan distribuïts els pseudo-òrgans que fan el sistema reproductiu hermafrodita. Aquest sistema hermafrodita està format

per algunes estructures reproductives accessòries de complexitat variable i per ous en desenvolupament i esperma biflagellat, que no es formen en òrgans reproductius veritables. Cap de les espècies d'acel té oviductes. El sistema nerviós està organitzat com una xarxa comissural i no com cordons nerviosos ganglionars, i està relacionat amb un estatocist prominent que es localitza a la part anterior de l'animal. En algunes espècies d'acel tot o part del teixit nerviós no és dins del parènquima prop de les cèl.lules musculars de la paret externa, sinó barrejat amb les bases de les cèl.lules epitelials exteriors. Estudis histoquímics del SNC a diferents espècies de platihelminths suggereixen que el cervell dels acels no és homòleg al d'altres espècies d'aquest grup (Reuter i col.laboradors, 1998). Els acels no tenen protonefridis (Henry i col.laboradors, 2000).

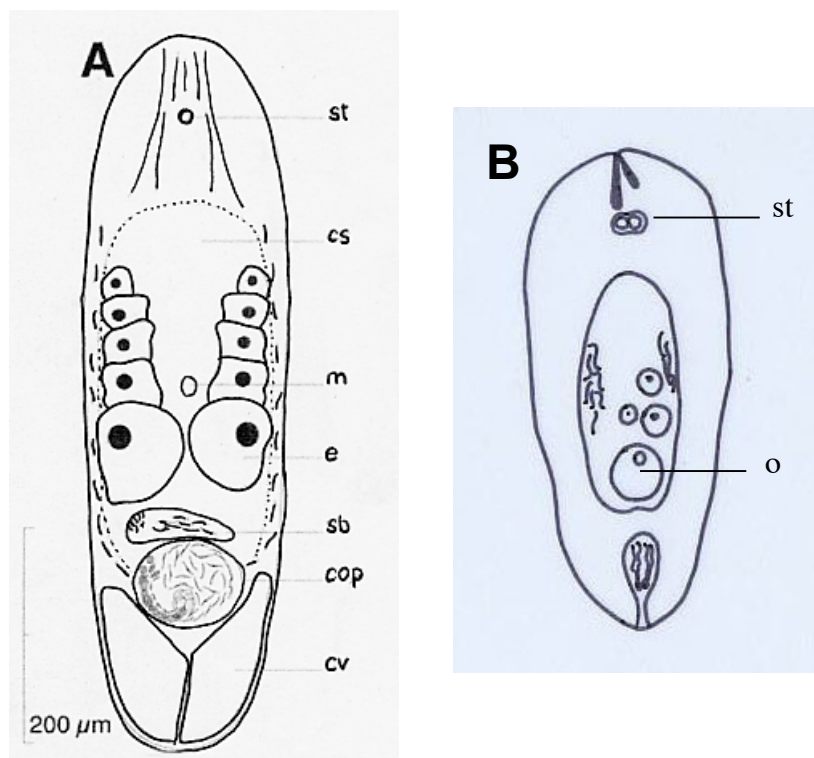


Figura 13. Estructura interna dels acels (A) i nemertodermàtides (B), on es remarca els ous (e), l'estatocist (st) i la boca (m). Modificat de Tyler, pàgina web.

Els acels comparteixen una sèrie d'autapomorfies com ara l'existència d'arrels ciliars complexes amb dos connexions laterals, un estatocist típic que només conté un estatolit, parènquima digestiu, espermatozous amb dos axonemes incorporats i cèl.lules receptores epidèrmiques ciliades amb un sistema d'arrels ciliars especialitzat. Comparteixen amb els nemertodermàtides la presència dels cossos pulsants, cèl.lules epitelials danyades o desgastades que s'internalitzen i es digereixen enlloc de ser expulsades. A més, el seu patró de clivellament espiral és

típicament en duets (Henry i col.laboradors, 2000), enlloc de formar-se quartets de cèl.lules. Aquest caràcter també sembla ser compartit amb els nemertodermàtides (Hooge, 2002). Un esquema d'aquest sistema de clivellament està representat en la figura 14. Un quart dels fílums d'invertebrats actuals presenten clivellament en espiral i un mapa de destins cel.lular conservat. El patró de clivellament d'acels (estudiat en l'espècie *Neochildia fusca*) és absolutament diferent de qualsevol programa fílum-específic. Diverses consideracions argumentades a Henry i col.laboradors (2000) fan difícil de relacionar els patrons de clivellament espiral en duet i quartet. Aquests autors proposen que el clivellament en espiral va aparèixer a partir d'una forma de clivellament radial o biradial, característiques dels programes de clivellament més primitius als metazous.

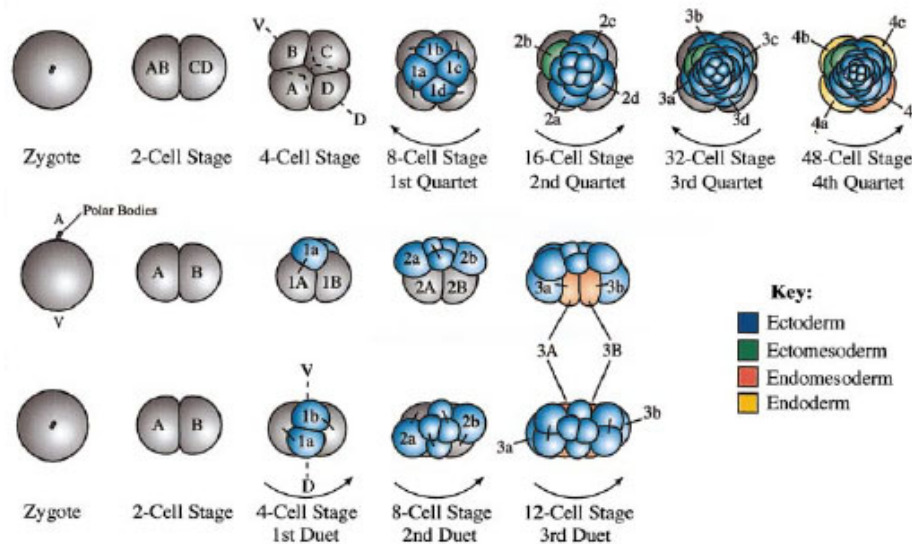


Fig 14. Comparació del clivellament en duet de l'embrió de l'acel *Neochildia fusca*, característica diferencial d'aquest grup, i clivellament en quartets, típic en el desenvolupament espiral. Primera fila: Vista del pol animal d'un desenvolupament espiral en quartets. Segona fila: Vista lateral del desenvolupament en duet de l'acel. Tercera fila: Vista del pol animal del desenvolupament en duet de l'acel (comparable a la primera fila). A més del fet de desenvolupar duets enlloc de quartets, l'acel té altres característiques diferencials, com ara que no hi ha alternància de divisions en sentit horari i antihorari, o bé que no forma ectomesoderm, fets ambdós que sí es donen en el desenvolupament espiral típic en quartets. (Henry i col., 2000)

Existeixen 332 espècies d'acels agrupades en 18 famílies (Tyler i Bush, 2001), com es recull a la taula 1. Aquesta agrupació i la filogènia actual dels acels es basa sobre tot en caràcters morfològics, i especialment en la distribució de la musculatura i la ultraestructura dels espermatozous.

Família	Nombre d'espècies descrites
Actinoposthiidae Dörjes, 1968	43
Anaperidae Dörjes, 1968	12
Antigonariidae Dörjes, 1968	1
Antroposthiidae Faubel, 1976	7
Childiidae Dörjes, 1968	1
<i>Convolutidae Graff, 1905</i>	<i>126</i>
Diopisthoporidae Westblad, 1940	4
Hallangidae Westblad, 1946	2
Haptoposthiidae Westblad, 1948	41
Hofsteniidae Bock, 1923	6
Mecynostomidae Dörjes, 1968	33
Nadinidae Dörjes, 1968	3
Otocelididae Westblad, 1948	18
<i>Paratomellidae Dörjes, 1966</i>	<i>3</i>
Proporidae Graff, 1882	5
<i>Sagittiferidae Kostenko & Mamakaev, 1990</i>	<i>17</i>
Solenofilomorphidae Dörjes, 1968	9
Taurididae Kostenko, 1989	1

Taula 1. Relació de les famílies d'acels i el nombre d'espècies de cada una. Les famílies en que estan les espècies amb les que s'ha treballat es marquen en blau. (Segons Hooge, 2002)

Estudis filogenètics de l'ordre acels basats en caràcters morfològics han donat evidències que el gènere *Paratomella* és el grup germà de la resta d'acels, els anomenats Euacoela. Les proves realitzades amb el 18S (Ruiz-Trillo i col.laboradors, 1999) demostraven que els acels eren monofilètics, i a més les taxes de substitució de *Paratomella rubra* eren les més baixes de tot el grup. *Paratomella rubra* era, doncs, un bon representant dels acels sobre el qual fer les inferències filogenètiques, ja que era un acel basal (Figura 15).

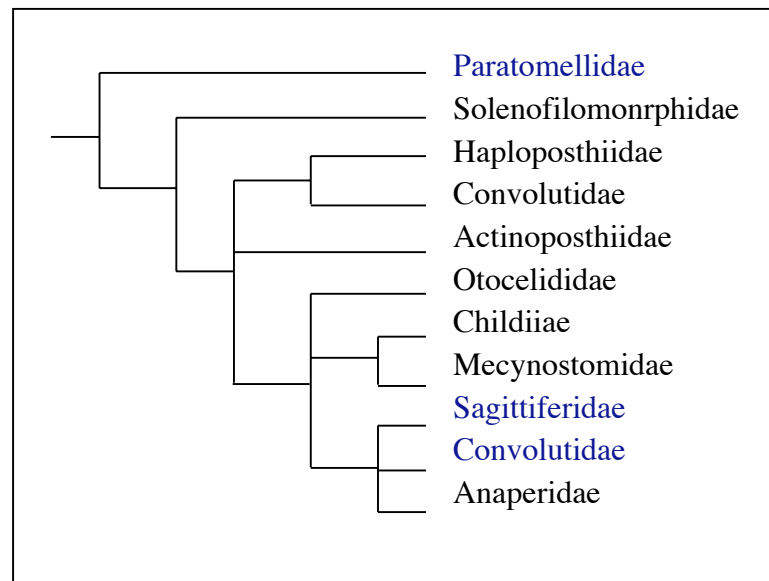


Fig 15. Arbre filogenètic de les famílies més importants d'acels adaptat de Hooge i col.laboradors, 2002. En blau s'han ressaltat les famílies a les que s'adscriuen les tres espècies d'acel usades en aquest treball (Paratomellidae per *Paratomela rubra*, Sagittiferidae per *Symsagittifera roscoffensis* i Convolutidae per *Neochildia fusca*).

En aquest estudi s'han utilitzat tres espècies diferents d'acels: *Paratomela rubra*, *Symsagittifera roscoffensis* (abans *Convoluta roscoffensis*, i abreujada com a Cr per donar nom als gens) i *Neochildia fusca*. A continuació es descriuen les dues espècies de les quals s'ha tingut accés a animals vius:

Symsagittifera roscoffensis

Els acels són animals marins de vida lliure que es distribueixen en els diferents mars i oceans del món. *Symsagittifera roscoffensis* és un organisme descrit primerament a les costes de la Bretanya francesa, tot i que es poden trobar en altres mars i oceans. Són animals triblàstics, amb simetria bilateral, amb polarització anteroposterior, de mida petita, d'entre un i tres mil·límetres de llargada, i d'un color verd fosc característic. És un animal eminentment gregari que habita en el sòl marí en zones amb marea. L'estructura corporal és extremadament senzilla. Allargats i plans, neden direccionalment amb els costats del cos replegats cap a sota de la superfície d'aquest, fent que adoptin una forma aproximadament cilíndrica. La superfície del cos està recoberta de cilis (projeccions protoplasmàtiques de les cèl.lules superficials) que serveixen a l'animal per propulsar-se al nedar.

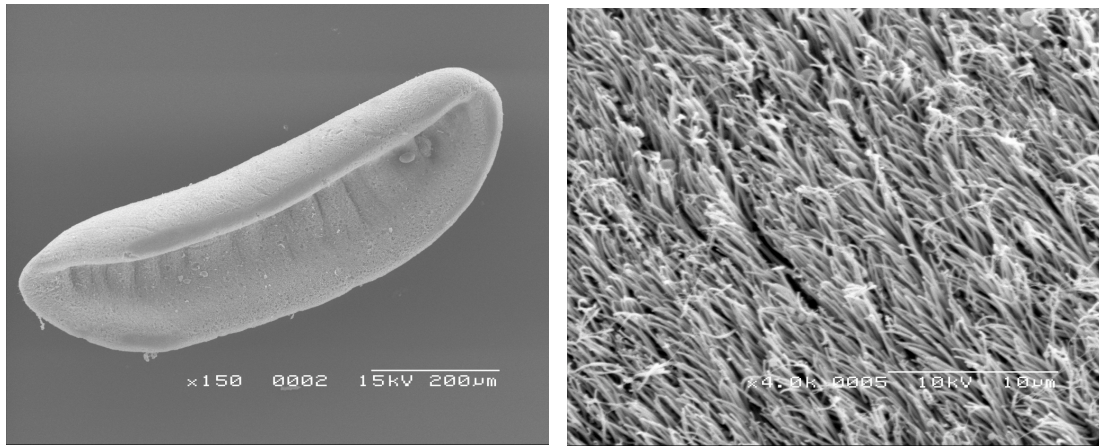


Fig 16. Imatges al microscopi electrònic de rastreig d'un adult de *Symsagittifera roscoffensis* amb la típica forma enrotllada que adopten els animals al nedar (150x), i detall de la superfície corporal, on es poden veure els cilis (4000x) (Fotografies: Eva Jiménez).

Tenen un sistema nerviós ben definit, i òrgans sensorials eficients. Així, es poden distingir a la part anterior, o cap, dos ulls, cadascun dels quals es mostra com una taca petitíssima de pigment taronja que és sota teixit nerviós, que li serveix a l'animal per distingir diferents intensitats de llum. Aquesta funció en *Symsagittifera roscoffensis* és ben important, com es descriurà més endavant al parlar de les seves cèl.lules verdes. A més dels dos ulls principals, contenen també amb una sèrie de glàndules pigmentades taronges distribuïdes al llarg de tot el cos, que probablement siguin utilitzades com a ulls accessoris. Entre mig dels dos ulls principals s'hi troba l'otocist, estructura epidèrmica més evident a l'observar un individu. Aquest otocist és un òrgan que li serveix per detectar canvis gravitacionals, o el que és el mateix, li permet determinar en tot moment el que és "a dalt" i el que és "a baix".

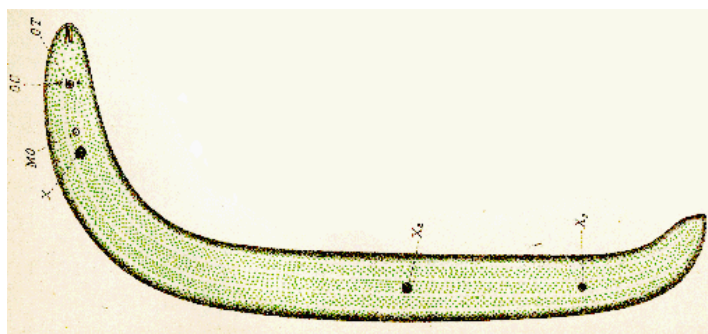


Fig 17. Dibuix d'un adult de *Symsagittifera roscoffensis* on es poden observar diferents estructures superficials com els ulls (oc) i l'otocist (ot). (Keeble, 1910)

Symsagittifera roscoffensis té un sistema muscular ben desenvolupat, que al contraure voluntariament fa que es generi el moviment. El sistema digestiu és bastant primitiu, amb una boca ben desenvolupada a la part ventral, més a prop del cap que de la cua. No té un tub digestiu diferenciat, el menjar passa a vacuoles dins els teixits on és digerit. No té aparell excretor. Els residus no digerits queden dins el cos acumulats en els teixits fins que es truen per qualsevol part del cos, generalment per la part més posterior. No hi ha sistema circulatori. Els materials nutritius passen de cèl.lula a cèl.lula.

Ara bé, el que és més característic i que fa de *Symsagittifera roscoffensis* un animal tan interessant a nivell biològic, deixant de banda la seva possible posició filogenètica, és la presència, entre les seves pròpies, en fileres regulars i molt properes, just a sota de la superfície corporal, d'unes cèl.lules de procedència algal que van fer que aquest animal fos catalogat pels naturalistes del segle dinou com a animals-plantes. En efecte, aquestes cèl.lules verdes deuen el seu color a la clorofila que contenen, en cloroplasts, com qualsevol cèl.lula verda vegetal. Aquestes cèl.lules són capaces de fer la fotosíntesi, fet aprofitat per l'animal que les conté per alimentar-se. Així, ens trobem davant d'una simbiosi entre les algues (*Platymonas convolutae*) i l'animal. L'animal li proporciona un vehicle a l'alga cap a la llum, i l'alga fa de productor primari interior a l'animal. Cal puntualitzar que és només en l'animal adult que es troben aquestes cèl.lules vegetals. Més endavant, en descriure el desenvolupament, es parlarà de l'adquisició d'aquestes cèl.lules.



Fig 18. *Platymonas convolutae*. Foto al microscopi òptic, 40x. per Eva Jiménez

Mirem per un instant l'etologia d'aquest animal, que si curiosa, és ben fàcil d'entendre sota els coneixement de simbiosi que hem explicat. *Symsagittifera roscoffensis* viu, ja s'ha comentat, en zones sotmeses a mareas. Durant la marea alta els animals resten just a sota de la superfície de la sorra, a l'abric de ser escombrats per les onades. Tan bon punt la marea ha baixat els animals surten de la sorra, on es queden al basal d'aigua que ha deixat la marea en la superfície irregular del fons sorrenc. Es troben aleshores en cadascun d'aquests bassals milers i milers d'animals que queden exposats a la llum del sol. Així les algues poden fotosintetitzar. Queda clara ara la funció tant dels ulls (que dirigeixen l'animal cap a la llum) com de l'otocist (que li permet saber cap a on ha de sortir per trobar el sol un cop la marea ha baixat). No és objectiu d'aquesta tesi descriure l'etiologia d'aquests animals, tot i que és absolutament fascinadora i ens permet veure un cop més que la natura és capaç d'enginyar formes de vida que mai cap ment humana podria haver dissenyat. Així doncs, recomanaré la lectura d'un llibre que explica aquesta curiosa forma de vida, i que no ha deixat de sorprendre'm a cada moment: *Plant-Animals, a study in symbiosis* (Keeble, 1910).



Fig 19. Ous a l'interior de l'adult de *Symsagittifera roscoffensis*. Microscopi òptic, 10x. Foto: Eva Jiménez

Symsagittifera roscoffensis és un animal hermafrodita. Els ous, prou grans per ser distingits sota el microscopi dins de l'animal en fase famella, són fertilitzats dins del cos per espermatozous d'un altre individu. Després de la fertilització, els ous es descarreguen en grups de 8 a 15 (postes). Al sortir del cos queden recoberts per una càpsula transparent secretada per glàndules que hi ha a la superfície de la pell. Queda, doncs, una esfera transparent petitíssima distingible a simple vista. A la natura, la posta dels ous dura una setmana.

Després d'aquest període, i relacionat amb el fenòmen de les mareas que és el que condiona la vida d'aquests animals, encara que quedin animals amb ous madurs, el procés es para. Generalment els ous surten del cos del pare continguts en una càpsula gelatinosa comú, que engloba els diferents ous de la posta i els manté agrupats. La posta sol trencar teixits del pare. En aquest cas, l'animal es pot partir pel mig, i la part anterior pot curar la ferida, comportar-se com un animal intacte, i regenerar després les parts que li falten. La part posterior no regenera. Cap a quatre dies després de la posta el juvenil que hi ha dins de cada ou es comença a moure activament dins la seva càpsula individual. Entre els dies cinc i set després de la posta les membranes es parteixen i els individus juvenils queden lliures dins la membrana gelatinosa comú. En aquesta neden lliurement durant un temps, fins que finalment la trenquen i els animals juvenils queden nedant en l'aigua. Aquests animals juvenils no tenen cèl.lules verdes. Fins a arribar a la fase de maduresa, aquests animals menjen voraçment (diatomees, algues unicel.lulars, espores,...). Quan són adults, com ja s'ha explicat, aquests animals deixen de menjar, i passen a alimentar-se gràcies a les algues simbionts. Quan ja són vells, digereixen les cèl.lules verdes, fins que al final moren.

L'adquisició per part dels individus juvenils de les algues simbionts es dona com segueix. Després d'un o dos dies de vida lliure, les algues són adquirides per l'animal, si bé la bibliografia no és molt clara respecte a la manera com passen dins el cos. La opció més plausible és que són ingerides per l'individu juvenil, que s'està alimentant activament, però que al no haver-hi un aparell digestiu aquestes algues passen al parènquima de l'animal, on, a diferència d'altres organismes que aquest ha ingerit, són capaces de reproduir-se. Així doncs, un cop unes poques de les algues han passat a dins de l'animal, aquestes es divideixen fins a formar les fileres que seran ja definitives en els teixits de l'adult. Quan les algues estan ben assentades i han ocupat el lloc que els correspon, l'animal comença a viure d'aquestes, i deixa d'alimentar-se activament. S'ha vist que només en el cas que la colonització per les algues és feta, l'animal segueix el seu desenvolupament i reproducció normals. Si es priva a l'animal de l'alga en el moment en que aquesta ha de passar a formar la

simbiosi, el primer para igualment la seva alimentació activa, no segueix el seu desenvolupament normal, no es fa adult, no és capaç de fer ous i mor.

Paratomella rubra

Es va començar aquest treball sobre *Paratomella rubra*, espècie objecte de l'estudi de Ruiz-Trillo i col.laboradors. Tot i que aquest era l'organisme amb les taxes de substitució més baixes en les seves seqüències, la dificultat d'aconseguir individus va fer que no fos el principal organisme d'estudi d'aquesta tesi. Aquest acel presenta una coloració vermella, degut al fet que conté un pigment vermell similar a l'hemoglobina. A diferència de *Symsagittifera roscoffensis*, aquests animals viuen sempre sota les aigües, ja que a la zona on viuen no hi ha efectes de marea prou importants per deixar-los al descobert i necessiten d'un substrat fi. L'estructura d'aquests animals és semblant a la de *Symsagittifera roscoffensis*; petits, allargats i plans, també es poden distingir ulls i l'otocist a la seva superfície. Tot i això, *Paratomella* té característiques no descrites o inusuals a d'altres acels. S'ha descrit que té una reproducció assexual per paratomia i que presenta un sistema glandular complicat en forma de canals a la regió perifèrica del cos. També es va descriure l'existència d'hepatocilis caudals, un sistema digestiu cel.lular enlloc de sincitial, un complex glandular frontal amb tres menes especials de cèl.lules glandulars enlloc d'un òrgan frontal, un estatocist sense càpsula i l'existència de protonefridis (Ehlers, 1992)



Figura 20. Individu adult de l'acel *Paratomella rubra*. Foto al microscopi òptic, 40x

ELS ALTRES ACELOMORFS, ELS NEMERTODERMÀTIDES

Ja s'ha comentat anteriorment que els acels són els principals representants dels Acelomorpha, grup que formen juntament amb els nemertodermàtides (Ax, 1996.). Després de l'estudi de Ruiz-Trillo i col.laboradors (1999) molts van ser els grups que varen dubtar dels resultats obtinguts. Un dels majors arguments en contra de la posició basal dels acels va ser que el seu grup germà, els nemertodermàtides, no quedaven junt als acels en l'arbre construït segons el 18S. Era clar que les proves tradicionals morfològiques deixaven pocs dubtes sobre la relació dels acels i els nemertodermàtides.

Aquest problema va quedar contestat poc després en un article de Jondelius i col.laboradors (2002) en el que també amb seqüències de 18S els acels i els nemertodermàtides quedaven a la base dels bilaterals, si bé es cert que no de manera monofilètica. Tot i això, un xic més tard va aparèixer una filogènia basada en la cadena pesada de la miosina (Ruiz-Trillo i col.laboradors, 2002) segons la qual els acels (*Symsagittifera roscoffensis*, *Convoluta convoluta* i *Paratomela rubra*) i nemertodermàtides (*Nemertoderma westbladi*) usats en l'estudi quedaven junts formant un grup monofilètic a la base dels bilaterals.

L'ordre nemertodermàtid inclou tres gèneres: *Nemertoderma*, *Meara* i *Flagellophora*. Els nemertodermàtides tenen una morfologia molt similar a la dels acels, amb qui comparteixen l'hàbitat. Això fa que sigui molt difícil d'aïllar-los d'una mostra de sòl amb garanties que el que s'estigui triant sigui realment un nemertodermàtid. S'han proposat tres sinapomorfies pels acelomorfs: una xarxa formada per de cilis epidèrmics en la qual s'observa una discontinuïtat terminal, una estructuració complexa de les arrels ciliars i l'absència de portonefridis (Ax, 1996). Tot i això, s'han determinat algunes autapomorfies pels nemertodermàtides, com ara l'existència d'un estatocist amb diverses cèl.lules parietals i dos estatolits, o bé espermatozous monoflagellats amb prominents derivats mitocondrics. També la presència d'una cavitat intestinal durant al menys part de la seva vida els diferencia dels acels. Les espècies de *Nemertoderma* i *Flagellophora* conegudes són de vida lliure sublitoral, mentre que *Meara* és paràsit de les holotúries. La mida d'aquests animals varia entre 0.5 i 3 mm. La majoria d'espècies d'aquest grup tenen forma ovalada.

El tracte digestiu és una cavitat variable recoberta de per un epitelí que està format per dos tipus diferents de cèl.lules, que s'anomenen cèl.lules ameboides digestives i cèl.lules glandulars "körnerkolben". Aquestes cèl.lules glandulars són un tret característic de l'ordre. La boca es troba en posició ventral, i en la majoria de casos presenta una estructura invaginada de l'epitelí als extrems, si bé hi ha espècies que no presenten cap mena de diferenciació més que el simple tall. El sistema nerviós dels nemertodermàtides és epitelial o subepitelial. El centre cerebral no és

més que una massa nerviosa anterior associada a l'epiteli. També associats amb l'epiteli hi ha al llarg de tot el cos plexes nerviosos difusos. A part de l'estatocist no es poden observar altres estructures sensibles. El sistema reproductiu en aquest grups és simple i semblant al dels acels. *Nemertoderma* no té òrgans reproductius femenins. El porus masculí és situat a la part posterior del cos, en posició ventral *Flagellophora* i en posició terminal a *Nemertoderma* i *Meara*. En *Nemertoderma* es distingeix un antre masculí llarg amb una vesícula seminal i glàndules associades.



Fig 21. *Nemertoderma westbladi*. Foto: Ulf Jondelius

OBJECTIUS

Donades les preguntes ¿què hi ha a la base dels organismes bilaterals? i ¿quin és l'ancestre dels organismes triblàstics?, ens vàrem plantejar de trobar quin seria l'animal existent avui dia que fos descendent directe d'aquell bilateral primitiu. Ens vàrem fixar en els acels degut al treball de Ruiz-Trillo i col.laboradors, que, amb la molècula de 18S, van determinar que podien ser aquests els animals que nosaltres buscàvem. Per tal d'enfortir aquesta hipòtesi vàrem decidir aïllar i caracteritzar els gens Hox i ParaHox dels acels, i més tard dels nemertodermàtides, ja que hi havia cada vegada més dades que apuntaven a la bondat d'aquests gens per classificar les diferents espècies en un o altre grup filogenètic, com ja s'ha explicat en la introducció d'aquesta tesi.

Així, els objectius del treball eren els següents:

- 1) Trobar els gens Hox i ParaHox d'acels i nemertodermàtides, així com la seva ordenació en *clusters*.
- 2) Comparar la dotació i organització gènica d'aquests *clusters* en els acelomorfs i en els altres triblàstics.
- 3) Fer un estudi filogenètic dels acelomorfs basat en el complement Hox i ParaHox.
- 4) Mirar de determinar l'expressió dels gens Hox i ParaHox en acels.
- 5) Trobar altres molècules informatives per fer filogènia molecular.
- 6) Determinar si els resultats obtinguts per Ruiz-Trillo i col.laboradors eren reproduïbles fent les anàlisi amb aquests gens.
- 7) Posicionar finalment els acels i els nemertodermàtides en l'arbre filogenètic dels metazous.

OBJECTIVES

Given the questions ¿what is at the base of the bilaterian organisms? and ¿which is the ancestor to triblastic animals?, we asked ourselves what would be the actual extant bilaterian a direct descendent of that primitive bilaterian. We looked at acoela due to the work by Ruiz-Trillo et al, which based on the 18S molecule determined that those could be the animals we were looking for. To enhance this hypothesis we decided to isolate and characterise the Hox and ParaHox genes of acoela, and their sister group, the nemertodermatida, given the fact that there were data which showed the capacity of those genes to classify the different species in one or another phylogenetic group, as has been outlined in the introduction of this dissertation.

Thus, the objectives of this work were:

- 1) To isolate the Hox and ParaHox genes of acoela and nemertodermatida, as well as their *cluster* organisation
- 2) To compare the genetic complement and organisation of those *clusters* in Acelomorpha and in the other triblastic animals
- 3) To perform a phylogenetic study of Acelomorpha based on the Hox and ParaHox complement
- 4) To determinate the expression of Hox and ParaHox genes in acoela
- 5) To find other phylogenetically informative molecules
- 6) To determine whether Ruiz-Trillo et al.'s results could be reproduced performing the analysis using those other molecules
- 7) Finally, to position the acoela and nemertodermatida in the metazoan phylogenetic tree.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

CAPÍTOL 1. OBSERVACIÓ DE LA MORFOLOGIA DELS ACELS DE L'ESPÈCIE *SYMSAGITTIFERA ROSCOFENSIS*.

Degut a les interessants característiques biològiques dels acels de l'espècie *Symsagittifera roscoffensis*, es van realitzar estudis histològics dels seus teixits per observar la simbiosi amb l'alga *Platymonas convolutae*, així com observacions al microscopi òptic i d'escanning dels individus adults sencers. Així mateix, es va fer un seguiment dels diferents estadis de desenvolupament dels embrions fins a la eclosió dels ous. En aquest capítol es mostren les imatges captades amb aquest objectiu d'observació.

L'ADULT

En l'observació dels animals arribats al laboratori sota el microscopi òptic o la lupa estereoscòpica es van poder trobar les estructures típicament descrites a la literatura, i es va constatar que realment hi ha molt poques estructures externes i aquestes són de difícil localització. Tot i això es ressalten aquí l'estatocist i els ulls, junt amb certes taques pigmentàries (fig 1), i una estructura que podria correspondre a un obertura bucal, que podria ser remissent de la boca juvenil (fig 2). També es poden observar espícules a l'interior del cos dels animals (fig 2b), que podrien respondre a microfilaments relacionats amb la posició dels ous dins dels adults, ja que aquests individus estaven en fase gràvida.

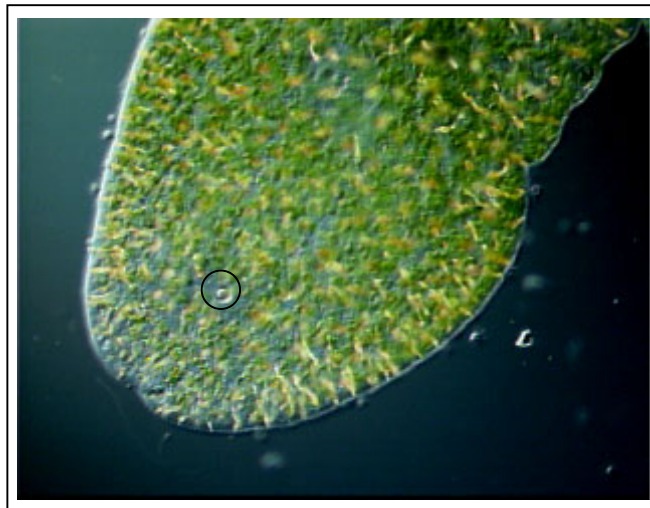


Figura 1. Imatge obtinguda amb el microscopi òptic a 10x, on es poden observar clarament l'otocist (cercle negre) i les taques pigmentàries (taronges).

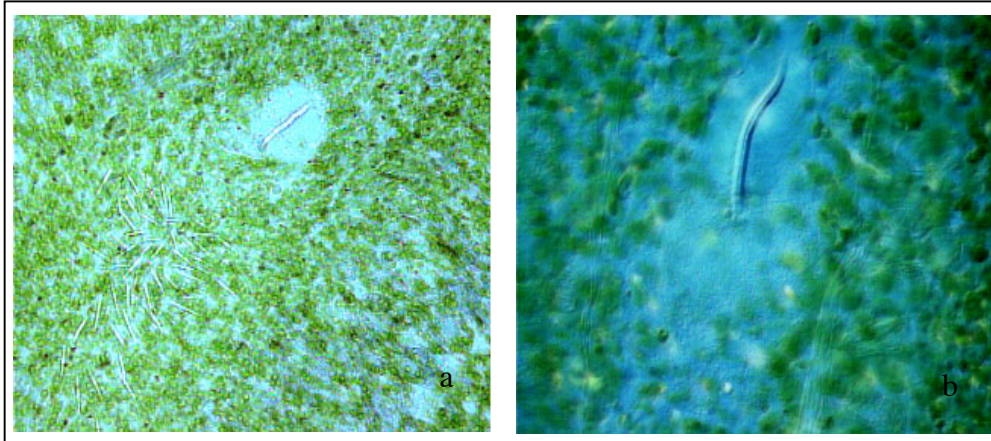


Figura 2. Imatges obtingudes amb el microscopi òptic a 40x on s'observen una obertura a l'exterior, possiblement bucal, i espícules a l'interior de l'individu (b). Noti's també la distribució de les algues que es veuen com a punts verds.

Usant el microscopi d'escanning o rastreig per observar la superfície corporal dels animals no es va poder veure els òrgans sensors descrits, però sí que es veu en detall el fet que la superfície del cos està totalment coberta de cilis (fig 3).

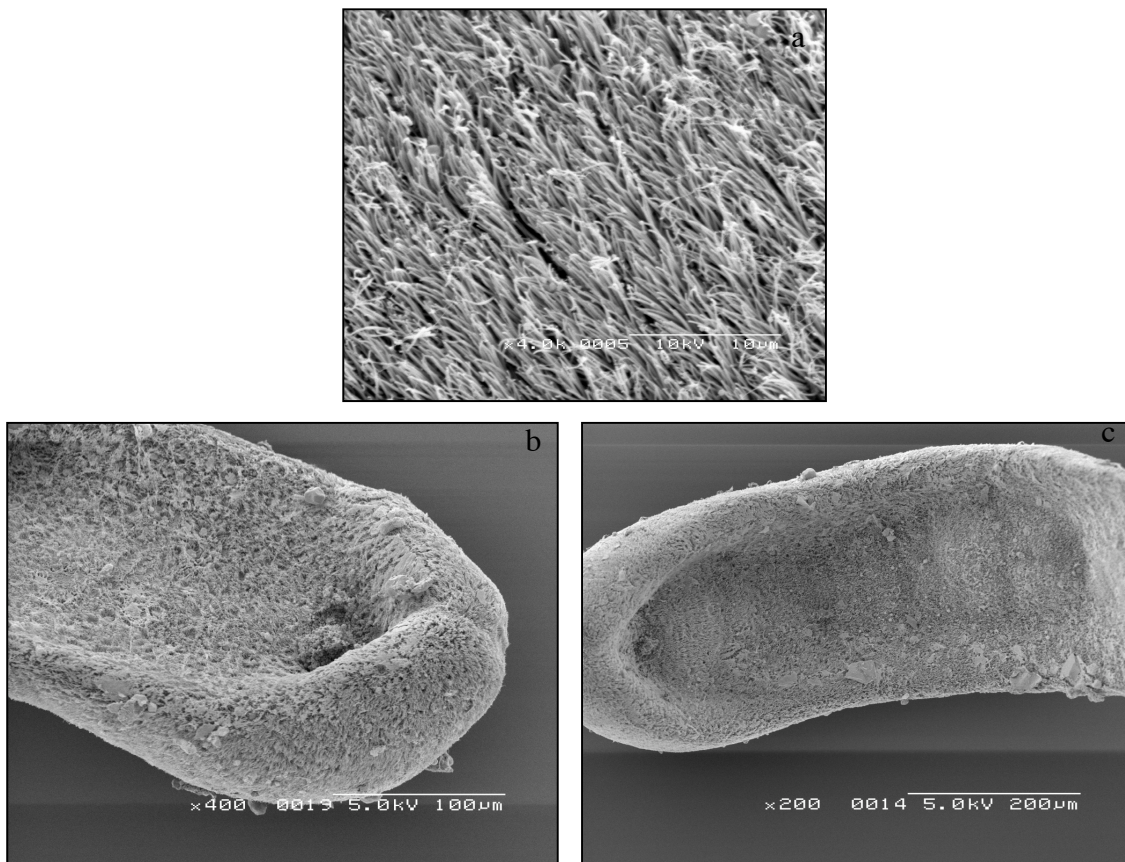


Figura 3. a) Superfície corporal ciliada de l'adult. b) i c) Superfície ventral de l'adult. A destacar la forma cònca, adoptada per desplaçar-se per l'aigua. Imatge obtinguda amb microscopi electrònic de rastreig.

Amb el microscòpi electrònic de transmissió es van prendre imatges dels teixits parenquimàtics dels animals. Si bé la manipulació o bé l'estat dels individus (duien diverses setmanes capturats i ja havien començat a degenerar un xic en el moment de la fixació) o ambdós alhora van fer difícil la distinció de cèl.lules clarament, en aquestes preparacions es poden distingir característiques dels dos tipus de cèl.lules que hi conviuen, les animals i les algues. Destaquen els grànuls de midó al costat dels dipòsits de glicògen, i les membranes tilacoidals (fig 4).

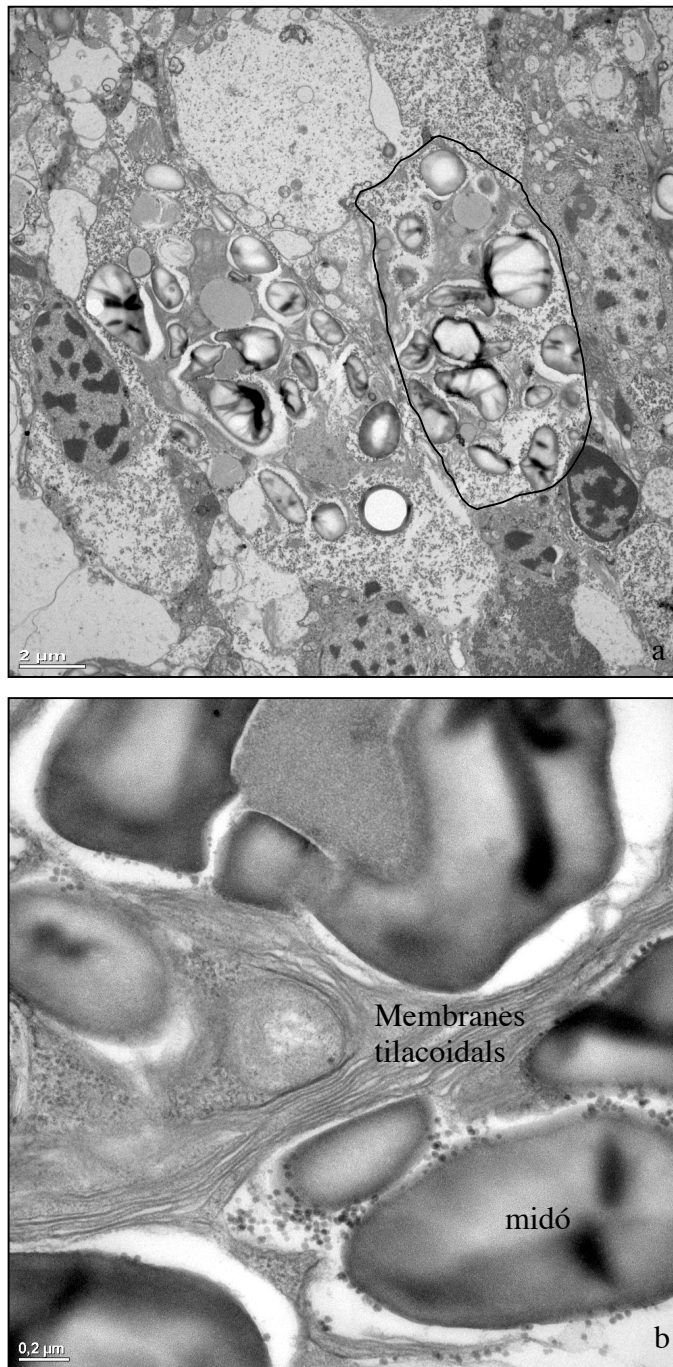


Figura 4. Talls semifins observats amb microscopi electrònic de transmissió. Es perfila el que podria ser el marge d'una cèl.lula vegetal, tot i que no es poden distingir paret ni membranes (a), i s'observen possibles membranes tilacoidals i grànuls de midó (b).

Dels individus observats, una gran part, com ja s'ha comentat, presentaven ous a l'interior del parènquima (fig 5). D'acord amb el descrit a la literatura, no es van observar estructures especialitzades per contenir aquests ous.

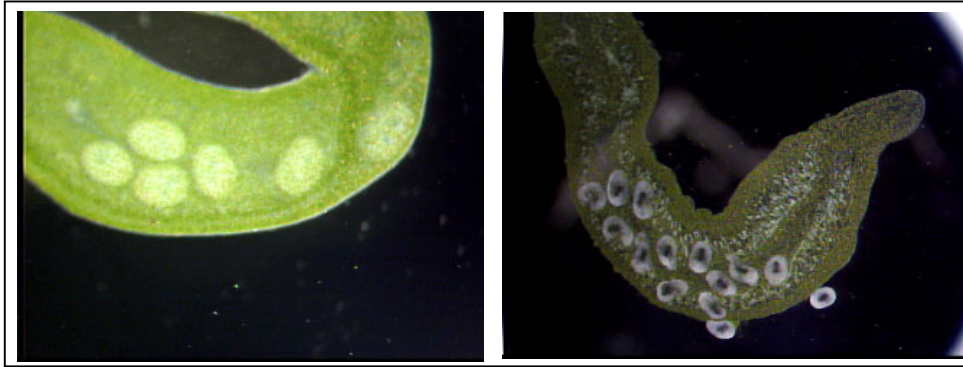


Figura 6. Individus adults mostrant ous ja fecundats al seu interior. Lupa binocular

Degut a que les postes són sincròniques, quan s'esdevenen es poden obtenir un molt elevat nombre d'embrions. Cada animal fa una posta d'entre 7 i 15 embrions (la fecundació és interna), cadascun d'ells rodejat pel seu propi còrion, i tots aquells provinents de la mateixa posta rodejats al seu torn per una segona membrana comuna (figs 7 i 8).

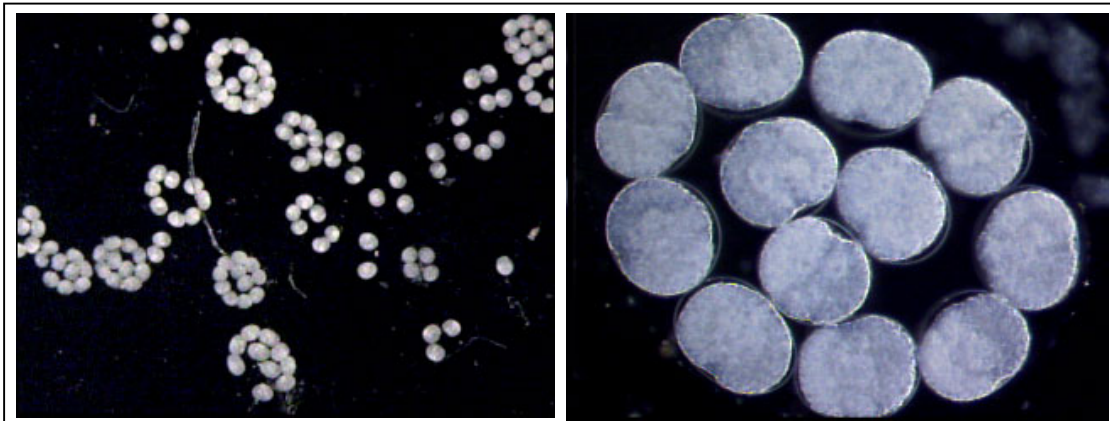


Figura 7. Postes de diversos individus i detall d'una de les postes. Lupa estereoscòpica 3x i microscòpi òptic 40x.

La relació que hi ha entre un individu adults i les postes es pot observar en la figura 8.



Figura 8. Imatge de les postes on es pot observar clarament la membrana comuna dels embrions i veure la relació de mida amb un organisme adult. Lupa estereoscòpica 2.5x.

EMBRIONS

De les imatges captades al microscopi òptic es va poder fer una sèrie on es pot veure el desenvolupament dels embrions. Aquest dura cinc dies des de la posta fins a l'eclosió. A la taula següent es descriu aproximadament aquest període.

Temps	Descripció del Desenvolupament
0-6 hores d.p.	Primeres divisions de l'embrió. Alguns dels ous ja surten de l'adult en estadi d'una cèl.lula amb dos nuclis o bé dues cèl.lules.
6hores-1dia d.p.	Segueixen les divisions fins a obtenir un nombre de cèl.lules incontables però encara distingibles.
1dia-3dies d.p.	El nombre de cèl.lules és molt gran, i aquestes són tan petites que no es distingeixen en la massa total.
4rt dia d.p	L'embrió comença a moure's en moviments rotatoris sobre ell mateix dins del seu còrion. Es comencen a distingir estructures internes degut a la diferent pigmentació, més fosca, del que sembla serà el sistema digestiu juvenil, que més tard degenerarà.
5è dia	Continuen els moviments de rotació si bé molt més ràpids. En un moment determinat, i pel que sembla conseqüència de la rotació, el juvenil trenca el còrion i es queda nedant semi-lliurement dins la membrana comuna de la posta.
dia 5.5	Quan la majoria de juvenils han trencat el seu còrion eventualment un d'aquests trenca la membrana externa i queden tots nedant lliurement al medi. Els individus juvenils tendeixen a menjar de manera àvida, primer el que sembla són partícules d'aliment que estan enganxades a la membrana de la posta, segurament restes provinents del pare i del medi, després pel medi.

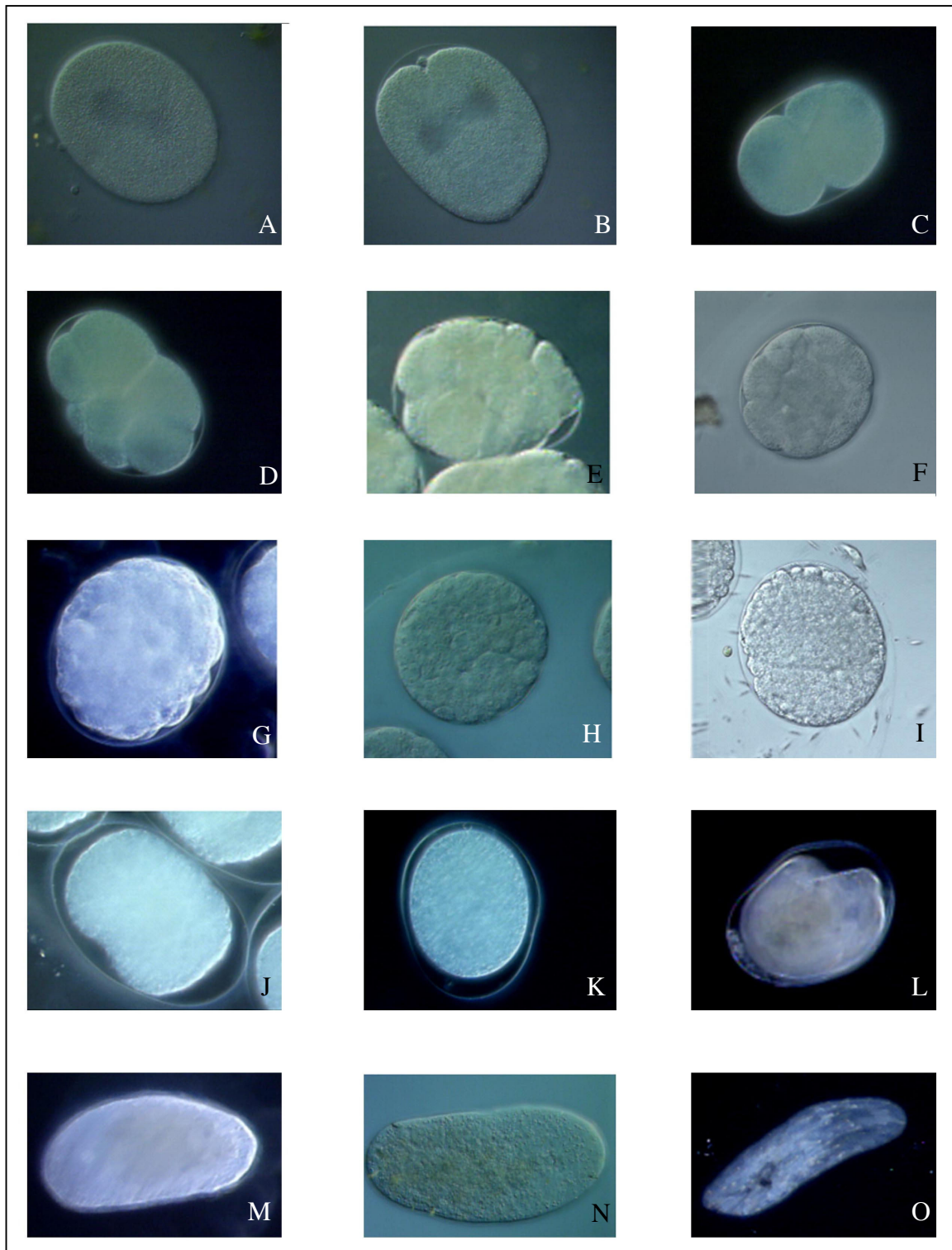


Figura. 10. Sèrie de fotografies realitzades amb la lupa estereoscòpica i el microscopi òptic on es pot observar el desenvolupament embrionari de l'acel *Symsagittifera roscoffensis*. A) una única cèl·lula amb citocinesi. B) Primera divisió. C-G) Primers estadis del clivellament on encara es poden distingir cèl·lules individuals. Encara dia 1 (aprox) després de la posta (d.p.). H-K) Dies 1 a 3 d.p. durant els quals es dona la formació de les estructures de l'embrió. L) L'embrió ja format gira dins el seu còrion. Dia 4 d.p. M-N) Individu juvenil ja alliberat del còrion (dia 5 d.p.). A N es veuen dues pigmentacions. O) Individu juvenil dos dies després de sortir del còrion.

CAPÍTOL 2. AÏLLAMENT I CARACTERITZACIÓ DE GENS TIPUS HOX I PARAHOX A ACELS

A partir dels oligonucleòtids degenerats de regions conservades de les Hèlix 1 i 3 dels gens Hox i ParaHox descrits als Materials i Mètodes es varen fer PCRs per mirar d'aïllar fragments dels diferents gens a acels. Amb aquest procediment es van aïllar fragments dels gens llistats a continuació:

GENS HOX	Tipus anterior	Tipus PG3	Tipus central	Tipus posterior
<i>Symsagittifera roscoffensis</i>	<i>CrIab</i>	–	<i>CrCentral</i>	<i>CrPost</i>
<i>Paratomella rubra</i>	<i>PrHoxI</i>	–	–	<i>PrPost-I</i> <i>PrPost-II</i>
<i>Neochildia fusca</i>	<i>Nflab</i>	–	<i>NfCentral</i>	–

GENS PARAHOX	Tipus <i>Gsh</i>	Tipus <i>Xlox</i>	Tipus <i>Caudal</i>
<i>Symsagittifera roscoffensis</i>	–	–	<i>CrCad</i>
<i>Paratomella rubra</i>	–	–	<i>PrCad</i>
<i>Neochildia fusca</i>	–	–	<i>NfCad</i>

Cal dir que totes aquestes seqüències són parcials, d'una mida aproximada de 117 parells de bases, ja que aquesta és la distància entre les dues hèlix esmentades. Recordem que la seqüència sencera de l'*homeobox* és de 180 parells de bases, i que la del gen sencer varia segons de quin es tracti, però que en qualsevol cas serà més gran que aquells 60 aminoàcids.

Si bé l'estratègia de PCR ha estat similar en cada un dels casos, hi ha hagut petites variacions en el procediment per cada una d'elles. A continuació es descriuen els detalls per a cada una de les espècies. La numeració que apareix a les seqüències correspon a la posició respecte el començament de l'*homeobox* (el primer residu aminoacídic d'aquest ocuparia la posició 1, i l'últim la 60). Quan la seqüència es perllonga més enllà de l'aminoàcid 60 s'ha prescindit de la numeració.

2.1 AÏLLAMENT DELS GENS HOX I PARAHOX A L'ACEL *Symsagittifera roscoffensis*.

Es detallen seguidament aquelles parelles de *primers* que han donat resultats positius a l'usar-los per amplificar gens. La seqüència dels *primers* està descrita a la secció de Materials i Mètodes. Així mateix es llista el DNA usat per fer l'amplificació i la temperatura d'anellament (T° aneal.) dels *primers*:

Gen	Parella de <i>primers</i>	Tipus de DNA	T° aneal.
<i>Caudal</i>	CadRF-SO1	cDNA de Extracció d'adults amb tiocianat de guanidina	45
	AntpRR-SO2		50
	SO1-AntpRF2		50
<i>Antp</i>	SO1-SO2	cDNA de Extracció d'adults amb tiocianat de guanidina	45
	AntpRR-SO2		50
<i>lab</i>	SO1-SO2	cDNA de Extracció d'adults amb tiocianat de guanidina	45
	SO1-SO2 <i>nested</i> sobre $\lambda 5'$ -SO2		50
	SO1-SO2 <i>nested</i> sobre UPM-SO2		50
<i>Post</i>	SO1-SO2 <i>nested</i> sobre SO1- $\lambda 3'$	cDNA SMART de genoteca	53
	BO1F1-KIWFQN	gDNA	45

De les seqüències trobades es deriva que s'han obtingut fragments d'aproximadament 117 parells de bases, sempre continguts entre les hèlix 1 i 3 de l'*homeobox*, homòlogues als gens ja citats *labial* (*CrLab*), *Antennapedia* (*CrCentral*), *abdominal-B* (*CrPost*) i *Caudal* (*CrCad*). Aquestes seqüències són (la numeració és segons el primer nucleòtid i aminoàcid de l'*homeobox*):

CrIab

63 CACTTCAATAGATATCTTACACGAGCTAGGAGGATCGAGATAGCTACT
 21 H F N R Y L T R A R R I E I A T

111 TCGCTGACCTTGAATGAGACTCAGGTCAAGATATG
 37 S L T L N E T Q V K I

CrCentral

63 CCACTTCAACCGGTACCTCACTCGCAGACGGAGGATAGAGATCGCCAA
 21 H F N R Y L T R R R R I E I A N

111 TCTACTCGCACTGACCGAGCGACAGATCAAATA
 37 L L A L T E R Q I K I

CrPost

21 ACCAAGAACCAAACTCTGGAATTGGAGAAAGAGTTTCTCTTCAACACG
 9 T K N Q T L E L E K E F L F N T

75 TACATAACCAGAGAACGTAGACTGGAAATAGCGAGATCACTCAACCTG
 25 Y I T R E R R L E I A R S L N L

123 ACAGATCGCCAAGTCAAGATT
 41 T D R Q V

CrCad

63 CCGTACCAATCAATATATCACCATCCGACGCAAGTCCGAACTGGCCAT
 21 R T N Q Y I T I R R K S E L A M

111 GCAAGTCGGCTTAAGCGAGCGACAAGTTAAGATCTG
 37 Q V G L S E R Q V K I

2.2 AÏLLAMENT DELS GENS HOX I PARAHOX A L'ACEL *Paratomella rubra*.

Si bé s'ha provat d'amplificar seqüències per PCR amb diferents tipus de DNA en aquesta espècie, els millors resultats s'han trobat usant cDNA sintetitzat a partir de RNA obtingut amb Trizol a partir d'animals frescos. Es detallen a continuació les parelles d'oligonucleòtids usades i la temperatura d'anellament a la reacció d'amplificació (T^a aneal.).

Gen	Parella de primers	T^a aneal.
<i>Caudal</i>	SO1-SO2	45
	SO1-WFQNRR	42
	SO1-KIWFQN	42
<i>labial</i>	BO1F1-KIWFQ	42
	BO1F1-WFQNRR	
	SO1-BO2R1	
<i>Post-I</i>	LELEKE-BO2R1	42
	BO1F1-BO2R1	
	SO1-BO2R1	
<i>Post-II</i>	BO1F1-WFQNRRM	42
	SO1-BO2R1	

Les seqüències trobades han estat contrastades al banc de dades i han donat homologia als gens *labial* (*Prlab*), dos gens posteriors (*PrPost-I*, *PrPost-II*) i *Caudal* (*PrCad*), i són com segueix:

Prlab

```

45  GAATTAGAAAAGGAATTCCATTTCAACAAATACTTGACTCGAGCCAGA
15  E L E K E F H F N K Y L T R A R

96  CGCATTGAAATTGCAAGTACATTGAGCTTGAGCGAAACCCAAGTGAAA
32  R I E I A S T L S L S E T Q V K

141 ATATGGTTCCAAAAT
47  I W F Q N

```


PrPost-I

45 GAGTTGGAAAAAATTCTATTTCAACAATTACATTACGAGGGAGCGTC
15 E L E K E F Y F N N Y I T R E R

96 GAGGCGAAATCGCGAAGGTATTAGGGCTTTCTGATCGGCAAGTAAAGA
32 R G E I A K V L G L S D R Q V K

141 TTTGGTTTCAGAAC
47 I W F Q N

PrPost-II

33 GCTTCTAGAGCTTGAATTTGAGAAAGAATTCCTACTAAGCACTTACAT
11 L L E L E F E K E F L L S T Y I

84 AACCAGGGATAGACGTCTGGAGATATCCAAAAGTCTCCATTTATCTGA
28 T R D R R L E I S K S L H L S D

129 TCGACAGGTTAAAATATGGTTCCAGAACCGACGAATG
43 R Q V K I W F Q N R R M

PrCad

63 CGTACCAATCAATATATCACCATCCGAAAAAAGCCGAATTAGCAACT
21 R T N Q Y I T I R K K A E L A T

111 CAGGTTGGCCTATCGGAGAGGCAAGTAAAAATC
37 Q V G L S E R Q V K I

2.3 AÏLLAMENT DELS GENS HOX I PARAHOX A L'ACEL *Neochildia fusca*.

En el cas de *Neochildia fusca* només es va comptar amb el DNA que contenien els fags de la genoteca genòmica cedida pel Dr. M. Martindale, Universitat de Kewalo, Hawaii, EEUU. El crivellatge d'aquesta genoteca va rendir un fragment de mida mitjana del gen *Caudal*, com es descriu en el següent capítol. Al no obtenir cap més resultat d'aquest crivellatge es va iniciar un protocol d'amplificació per PCR sobre els mateixos fags de la genoteca. Aquest procediment té un avantatge respecte al crivellatge, i és que en cada reacció es posen molts més fags que pas es crivellen a cada experiment d'hibridació (al plaquejar la genoteca es van usar 10^6 fags, mentre que a cada reacció de PCR se'n van posar $2 \cdot 10^6$). Així doncs, encara que una genoteca hibridada no hagi donat cap fag positiu real, el crivellar-la per PCR pot donar resultats. Aquests PCRs van donar seqüències homòlogues a les dels gens *labial* (*Nflab*) i *Antennapedia* (*NfCentral*), usant sempre la parella de primers SO1-SO2 i fent la reacció de PCR a 46 o 50°C.

Nflab

```

63  CATTTC AACCGCTACCTGACGCGAGCCCGACGAATAGAGATCGCCACG
21  H F N R Y L T R A R R I E I A T

111 TCGCCTACCCTGAACGAGACGCGAGGTCAAGATATG
37  S P T L N E T Q V K I

```

NfCentral

```

63  CCACTTTAACCGATATCTAACACGGAGACGGAGGATTGAAATCGCAA
21  H F N R Y L T R R R R I E I A N

111 CTTGTTGGGCCTGACAGAACGGCAGATT
37  L L C L T E R Q I

```

CAPÍTOL 3. METODOLOGIES USADES PER COMPLERTAR ELS GENS AILLATS

Un cop es varen haver obtingut les seqüències que s'han descrit al capítol anterior, es va fer mans i mànigues per allargar-les per tal d'obtenir tot l'*homeobox* i les regions flanquejants. A més, així es tindrien les eines més útils per fer la filogènia, ja que la regió entre les hèlix 1 i 3 és massa conservada per a aquest menester. Es descriuen a continuació els passos seguits, tot i que cal dir per endavant que la gran majoria varen ser totalment infructuosos. Es va posar especial èmfasi en trobar la regió 3' de l'*homeobox* del gen central de les diferents espècies, intentant trobar la zona de l'*spiralian peptide*, ja que s'ha demostrat molt informativa a l'hora de resoldre filogènia dins dels protòstoms.

3.1 Crivellatge d'una genoteca de cDNA d'adults de *Paratomela rubra*

Es va obtenir una genoteca de cDNA de tipus SMART a partir d'individus adults de *Paratomela rubra*. Es varen fer dos empaquetaments, amb el resultat d'obtenir un nombre final de fags de 1.300.000. En un primer crivellatge d'aquests fags es varen utilitzar les sondes de 117 pb del gen *PrCad* i d'un altre suposadament homòleg del gen *Antennapedia* de *Drosophila melanogaster* (*PrAntp*), que posteriorment va ser confirmat com a una contaminació del gen *DistoxA* del políclad *Discocelis tigrina* (Tauler, 2000). Es van obtenir 2 fags positius per la sonda *PrAntp* i 5 per la sonda *PrCad*. Al primer recrivellatge es varen perdre els positius per *PrAntp*, i un dels *PrCad*, i al segon només es van recuperar tres dels fags positius per *PrCad*, que van ser seqüenciats. Donat que es tractava d'una genoteca de cDNA no calia fer anàlisi de restricció ja que els inserts del fag tenien una mida prou petita com per ser seqüenciats completament. Les seqüències obtingudes van resultar no tenir cap homologia significativa amb les sondes utilitzades, tot i haver mantingut els resultats positius en els diferents re-crivellatges realitzats.

Posteriorment es va fer un segon crivellatge amb les mateixes sondes que va dur a l'obtenció de 2 nous positius per *PrAntp* i 2 per *PrCad*. Aquests fags es varen tractar amb l'endonucleasa de restricció *SfiI* per tal d'alliberar els inserts i es van seqüenciar amb SO2 i el primer 5' usat al fer l'amplificació del cDNA al fer la genoteca. Cap d'aquestes seqüències va resultar tenir homologia amb els gens que es cercaven.

Es va intentar un tercer crivellatge, aquest cop usant juntes en un dels jocs dels filtres les sondes ja usades anteriorment, més una sonda també de 117 pb pel gen *Xlox*, aquest cop heteròloga, del políclad *Discocelis tigrina*, per a l'altre joc. En aquesta ocasió es van obtenir 15 fags positius per a les sondes *PrCad* i *PrAntp*, i 3 per la sonda *Xlox*. Després de diversos recrivellatges es van confirmar 9 d'aquests positius, 8 per la barreja de sondes i un per *Xlox*. Es va observar que la mida dels inserts variava d'entre 400 pb a 2000pb.

Aquests van ser seqüenciats amb els primers SO2, i 5' i 3' del kit usat per fer el cDNA, i altre cop no es van trobar homologies amb els gens cercats.

Després de fer els tres crivellatges es va decidir abandonar la cerca de gens amb aquesta genoteca. Es va creure que la poca quantitat de material de partida, donat que s'havien trobat pocs individus de l'espècie *Paratomela rubra*, era el principal problema de la genoteca, i que segurament aquesta no estava ben representada, degut al sistema de pre-amplificació que es va haver d'usar al no tenir prou cDNA inicial. Aquest sistema pre-amplifica tota la població de RNA, però és problemàtic si es duu al límit, ja que en gens poc expressats, com ara els Hox i ParaHox, pot ser que aquests quedin sota-representats en benefici d'altres gens majoritaris. Quan un gen té moltes còpies de RNA hi ha més possibilitats que s'amplifiquin aquelles còpies que les de gens poc expressats, i a cada cicle de pre-amplificació el balanç es trenca més. Degut a que es va realitzar el màxim nombre de cicles de pre-amplificació recomenats pel fabricant, és molt realista pensar que aquest problema es va donar en la nostra genoteca. Així doncs, es va decidir fer-ne una d'una altra espècie d'acel de la qual pogués obtenir-se'n més individus, tot i que sabem que era l'espècie *Paratomela rubra* la que és més basal dins del grup acels i menys *fast-clock* i, per tant, més interessant d'estudiar.

3.2 Crivellatge d'una genoteca de gDNA de *Neochildia fusca*

Aquesta genoteca va ser cedida pel laboratori del Dr. M. Martindale. En el seu laboratori ja havia estat crivellada, i s'havien obtingut, però no seqüenciat, tres fags purs positius, dos d'ells putativament iguals, d'un crivellatge amb una barreja de sondes diferents amb fragments de PCR homòlegs als gens *Cad*, *Antp*, *lab* i *Hox7*. Aquests fags es varen tractar amb endonucleases de restricció i el *Southern* del gel es va hibridar amb l'oligonucleòtid SO2. Després de constatar que hi havia un nombre molt elevat de bandes positives es va realitzar un clonatge *Shot Gun*, que va rendir una banda de 4 kb de cada un dels fags i una de 1.5 adicional d'un d'ells. La seqüència d'una de les bandes de 4 kb va resultar ser homòloga al gen *Caudal*, i cobria una regió que anava des de l'hèlix 1 fins a l'extrem 3' de l'*homeobox*, i després es perdia la homologia de seqüència amb els altres gens *Caudal* trobats a la literatura, segurament per la baixa conservació de la seqüència flanquejant a l'*homeobox*. Tot i això, la mida del gen trobat coincideix amb la mida de la majoria de gens trobats al *genebank*. La seqüència d'aquest fag és la següent, i se l'ha anomenat *NfCad*. S'ha marcat la seqüència parcial de l'*homeobox* en gris:

NfCad

```

57  GAATTCAGAAGTGCCCAGTATATCACTATAAAGGAGAAAGTCGGAACCTGGCT
19  E F R S A Q Y I T I R R K S E L A

108 ATGCAAGTTGGGTTGAGTGAGCGCCAGGTTAAAATTTGGTTCCAAAACCGA
36  M Q V G L S E R Q V K I W F Q N R

159 AGAGCCAAAGAACGAAAAGTGTCGCGAAAAGTTCCCGGAGGTGGCAACCAC
53  R A K E R K V S R K V P G G G N H

xx  AGTTCTTCGGATATTGACGACTCGGATAACGAATTAGACGAGGATGAAGAT
xx  S S S D I D D S D N E L D E D E D

xx  GAGGAAAACGAGAGATCTCCGTCCAAACCGAGATCCCAAACGAACACTCA
xx  E E N E R S P S K P R S Q N E H S

xx  CCTTCCAACATTTGCCAAAATGTAGGAAATCAATTATCAATCCTCAAATCG
xx  P S N I C Q N V G N Q L S I L K S

xx  GTAGATTCGCAATTACGATCACCTCTCAACGACATATATCACAGTGCCAAA
xx  V D S Q L R S P L N D I Y H S A K

xx  CTATCATGATCGCCAACAAATCACCTTTACACCAAAGATATCAATTTCTTGAAGAAAT
    L S *
    TCGATTTATTTTGTGTCATTTGAGATTATTTGTCGATAGGGAGAGAAAGAGAGAAAGCACAGCTAAT
    TCGCTGGACCAATTAGGGAAATG

```

Donat que es disposava d'un fragment de mida prou gran es van realitzar arbres filogenètics, però aviat es va veure que la regió obtinguda del gen *Caudal* no és informativa per fer filogènia degut a la gran variació de la seqüència a 3' de l'*homeobox*. Prova d'això és que ni els arbres on només hi apareixien humans, *Drosophila* i ratolí i anèl.lids no donaven una morfologia en absolut semblant a la filogènia establerta. Mostra d'aquesta disparitat és l'alineament de la seqüència *NfCad* i d'altres *Caudals* trobats al banc de dades amb una regió 3' prou extensa.

1 Neochildia	-----EFRSA-QYITIR
2 Human	GTPSSPGAQRTPPYEWMRR--SVAAGGG-----GGSGKTRTKDKYRVVYTDHQRLLELEKEFHYS-RYITIR
3 Mus	GAPSSPGAPRRTPPYEWMRR--SVAAGG-----GGSGKTRTKDKYRVVYTDHQRLLELEKEFHYS-RYITIR
4 Amfiox	-----KDKYRVVYSDHQRLLELEKEFHYSN-KYITIK
5 Patella	GSSEISKAMRAPYEWMKP--AQAPP-----ASGKTRTKDKYRVAYTDHQRLLELEKEFHYS-RYITIR
6 Achaeearanea	-----PQPASPYEWIKRRTSYQSQPNP-----GRTRTKDKYRIVYTDHQRLLELEKEFHYS-RYITIR
7 Triboleum	-----PPPARSPYEWIKRTSYQSQPNPEPADFADAPDAIGKTRTKDKYRVVYTDLQRIELEKEFTFVSKYITIK
8 Drososofila	SNNNRTSPSKPPYFDWMKKPAYPAQPQP-----GKTRTKDKYRVVYTDHQRLLELEKEYCTS-RYITIR
9 C.elegans	---TSMPAISQPVPFWMKMG-----GAKGGESKRTRQTYRSQTLLELEKEFHYS-KYLTRK
1 Neochildia	RKSELAMQVGLSERQVKIWFQNRRAKERKVSRK-----VPGGGNHSSSIDSDNLEDEDED
2 Human	RKSELAANLGLTERQVKIWFQNRRAKERKVNKK-----KQQ
3 Mus	RKSELAANLGLTERQVKIWFQNRRAKERKVNKK-----KQQ
4 Amfiox	RKVQLANEGLSERQVKIWFQNRRAKQRKMAKR-----KEL
5 Patella	RKAEIAAQLALSERQVKIWFQNRRAKERKQNKKGKMDMGMPGKLEYDEPLSPSSGNMSLPNIMNTDIQQHHQQQ
6 Achaeearanea	RKVELAASLNLSEKQIKIWFQNRRAKERKQAKKREE-----
7 Triboleum	RKSELAENLGLSERQIKIWFQNRRAKERKQNKKRIEE-----KSQ-----IDN
8 Drososofila	RKSELAQTLSEKQVKIWFQNRRAKERTSNKKGSDP-----NVMGVGVQHADYSQLLDAKT
9 C.elegans	RRQEISETLHLTERQVKIWFQNRRAKHKKEAKGE-----GG-----SNE
1 Neochildia	EENERSPSKPRSQNEHSP-----SNICQNVGNQLSILKSVDSQLRSLPNDIYHSAKLS--
2 Human	QQQ---PPQPPMAHDITA-----TPAGPSLG---GLCPSNTSLLATSSPMPVKEEFLP-
3 Mus	QQQPPLPPTQLPLPLDGTG-----TPSGPPLG---SLCPTNAGLLGTPSPVVFVKEEFLP-
4 Amfiox	QHFGGQGGSDGGGVMGE-----VSTLTVGPPPH---QLTLNPSGVAASTPQQPPALPSSS
5 Patella	PQQSHYHHQQHHQSHSP-----QPVLSPPTSLPQLMVKSELSAIDLGNVSVPSPHSY---
6 Achaeearanea	LLQKNKDAQVYVYQHTS-----ALNIANISY-
7 Triboleum	LFHNGFMQEQQSTHHQG-----QLVVGLPAPTSSIMMHLVNPQSLNHQEVKAECSDLD
8 Drososofila	KLEPGLHLSHSLAHSMNPMAMNI PAMRLHPLAAHSHSLAAVAASHQLQQQHSQAQMSLRAQWARSRCDTTI
9 C.elegans	SDEESNQDEQNEQHSS-----

Figura 1. Alineament de la regió flanquejant 3' del gen *Cad* de diferents organismes.

Amb fragments d'aproximadament 117 pb corresponents a les seqüències dels gens *labial* i *Antennapedia* que havien en el laboratori del Dr. Martindale, es va crivellar la genoteca genòmica contenint 10⁶ fags. Es van recuperar 15 fags positius del crivellatge primari, dels quals en segon re-crivellatge se'n van poder aïllar 7 de purs. El *Southern* de les digestions d'aquests set fags va revelar que es tractava només de 3 fags diferents, així que es van analitzar només aquests tres. Es van realitzar diversos clonats normals i *Shot Gun* i es van fer múltiples intents per obtenir-ne la seqüència. Degut a la falta de resultats positius es va decidir testar de manera indirecta els fags. Es van fer PCRs amb la parella SO1-SO2 sobre els diferents fags, que van donar resultats negatius. Com que nous *Southern*s i intents de seqüència directa del fag amb el primer SO2 tampoc no van ser exitosos, i amb la perspectiva de la immediata realització d'una genoteca de cDNA de *Symsagittifera roscoffensis*, es va parar el crivellatge d'aquesta genoteca.

3.3 Crivellatge d'una genoteca de cDNA d'embrions de *Symsagittifera roscoffensis*

També es va obtenir una genoteca de cDNA tipus SMART amb els embrions col·lectats al laboratori de l'espècie *Symsagittifera roscoffensis*. Es van fer servir en aquest cas les sondes de *Crlab* i *CrCentral* obtingudes prèviament per PCR com s'ha descrit en

el capítol 2 d'aquests resultats. Amb aquestes es van crivellar $1.5 \cdot 10^6$ fags. La sort dels positius d'aquesta genoteca va anar paral·lela a la dels de la genoteca de *Paratomela rubra*. En un primer crivellatge es van obtenir 24 fags positius, dels quals se'n van recuperar tres que van ser seqüenciats i van resultar ser falsos positius. Dels altres es va fer una segona infecció i es va recuperar el senyal en 15 d'ells. Aquest cop es va decidir fer una amplificació per PCR usant els *primers* del *kit* usats al fer el cDNA i els *primers* SO1 i SO2. Així es va veure que només dos eren positius per la banda SO1-SO2, i aquests van ser seqüenciats. Altra vegada es va obtenir una seqüència no homòloga amb els gens buscats.

Es va fer un segon crivellatge amb les mateixes sondes, ja que el primer havia donat molts falsos positius, com es va comprovar per PCR. D'aquest segon es van obtenir 2 fags positius per la sonda *CrCentral*, i 5 per *Crlab*. Al fer el re-crivellatge es van perdre tots els positius.

Per fer un control sobre la genoteca després dels múltiples problemes amb els que ens havíem trobat es va decidir fer un crivellatge usant sondes heteròlogues però de mida més llarga. Així es va usar un fragment de 250 pb del gen *Prd* del tríclad *G. tigrina* i un fragment genòmic de 1500 pb del gen *Cad* de l'acel *N. fusca*. Es van obtenir 16 fags positius, 8 de cada sonda. Després de dos re-crivellatges es van confirmar 5 positius per *NfCad* i 6 per *GtPrd*. Aquests 11 fags tenien una mida majoritàriament d'entre 250 i 450 i van ser seqüenciats. Cap de les seqüències va donar homologia amb els gens buscats.

Així doncs, després de l'experiència amb els tres tipus de genoteca, podem dir que el fet que aquests animals tinguin un DNA i un RNA difícil d'extreure, si més no pels mètodes emprats per nosaltres, així com haver dut a l'extrem els protocols utilitzats, com ara el de l'*Smart*, fan desaconsellable el plantejament de la construcció d'una nova genoteca fins que els mitjans materials no es vegin incrementats.

3.4 *Inverse PCR* (iPCR) sobre DNA d'adult de *Symsagittifera roscoffensis*.

Es van provar les combinacions de *primers* citades en l'apartat de Materials i Mètodes sobre cada una de les mostres de DNA digerit amb diferents enzims i relligat. Els *primers* s'havien dissenyat a partir de les seqüències de 117 pb trobades per PCR estàndar. Es varen obtenir bandes de resultes d'aquests iPCR en el cas de les combinacions de *primers* iANTP1-iANTP2, però el clonatge i seqüenciació d'aquestes va dur a seqüències de DNA en cap cas homòlogues a gens amb *homeobox*. També es va fer PCR amb la parella de *primers* SO1-SO2 sobre PCRs obtingudes amb les parelles iANTP1-iANTP2, iCAD1-iCAD2 i iLAB1-iLAB2. Tot i que es van obtenir bandes de mida esperada i se'n varen seqüenciar tres, cap no corresponia a seqüències dels gens

esperats. Després de 15 reaccions de PCR sobre cada tipus de DNA i amb cada una de les combinacions de *primers* i no obtenir cap resultat positiu, es va decidir parar també aquest experiment. La principal raó per la qual pensem que aquesta tècnica no va funcionar en el cas de *Symsagittifera roscoffensis*, espècie usada ja que se'n podia obtenir més DNA que amb la resta, seria no només que no obstant això no hi va haver prou material de partida (gDNA) sobre el qual fer les digestions i les lligacions, sinó que, a més, el comportament de les endonucleases de restricció sobre el DNA d'aquest organisme no és gaire òptim. Aquesta observació s'ha corroborat en altres moments d'aquesta tesi doctoral, fent controls de digestió de diversos DNAs, on l'únic dels quals va ser refractari a ser digerit fou el d'acel. A més, altres laboratoris com el Dr. Martindale han confirmat aquesta observació. Tot i això, cal destacar que recentment el Dr. C. Cook de la Universitat de Cambridge (UK), ha obtingut resultats positius usant aquesta tècnica sobre aquesta espècie d'acel. El Dr. Cook confirma que la quantitat de DNA de partida és crucial pel bon funcionament de la iPCR.

3.5 Smart RACE PCR

En principi es va provar la tècnica de RACE PCR sobre el cDNA de l'acel *Paratomela rubra*, ja que en el moment de fer aquesta aproximació només es comptava amb aquesta espècie. Es varen dissenyar oligonucleòtids per allargar les seqüències de Caudal i *Antennapedia* que s'havien trobat. Tot i que es van generar bandes de les PCR amb ambdós tipus de *primers*, tant cap a 5' com cap a 3', cap de les bandes RACEs ni de les bandes dels PCR *Nested* sobre aquests van donar lloc a les seqüències que esperavem de les regions flanquejants d'aquests gens. Cal recordar que en el cas d'*Antp*, el fragment sobre el que es van dissenyar els *primers* era una contaminació del gen *DisthoxA* del políclad *D. tigrina*.

Més endavant es va generar, amb la mateixa tècnica, cDNA SMART RACE de l'acel *Symsagittifera roscoffensis*. Es van dissenyar *primers* també dels gens *Cad* i *Antp*, a partir de seqüències parcials obtingudes per PCR, per poder fer tant RACEs com *nested* a partir d'aquests. Tot i haver obtingut bandes i seqüenciar-les, no es van obtenir, tampoc en aquest cas, seqüències de les regions flanquejants esperades.

3.6 Anchored PCR

Seguint la idea del RACE, que permet allargar extrems de seqüències a l'afegir un adaptador a 3' i 5' del gen del qual se'n farà un dels *primers*, i l'altre que serà de la part de la seqüència incompleta coneguda, es va aprofitar el cDNA RACE que es va utilitzar per fer la genoteca d'embrions de *Symsagittifera roscoffensis* per usar aquest principi. De fet, aquest cDNA té exactament els mateixos adaptadors a cada banda dels cDNAs, única

diferència amb el cDNA de RACE SMART, que genera dues poblacions de cDNA, una amb adaptador a 5' i una amb adaptador a 3'. En el cas que ens ocupa es van fer servir tant *primers* degenerats d'*homeobox* com *primers* específics dissenyats a partir dels fragments trobats per PCR, que es van combinar amb els *primers* dels adaptadors. Sobre els PCR directes també es van provar *nesteds*, amb un o dos *primers* interns. De les múltiples combinacions de *primers* i *nesteds* només es va aconseguir retrobar els fragment que ja es tenien, ja que cap de les seqüències que es van realitzar de les bandes *RACE-like* directes no va donar homologia amb els gens buscats. Tot i això, es van reconfirmar les diverses seqüències de que ja es disposava, fet del qual es va inferir que la tècnica era bona en el cas d'haver de buscar gens novament en un altre organisme. Com es veurà més endavant, aquest mètode es va provar sobre *Nemertoderma westbladi*, donant els resultats esperats de troballa de gens.

3.7 PCR amb *primers* específic de l'*spiralian peptide*.

En un intent per mirar de provar directament si el gen *Antp* d'acels contenia l'*spiralian peptide* que només es troba a lofotrocozous, fet el qual ens indicaria que aquests animals estan dintre d'aquell grup, es van dissenyar *primers* degenerats (SP1, SP2, SP3, descrits en els Materials i Mètodes). Aquests oligonucleòtids cobrien totes les possibilitats que es coneixen de variació sobre aquest polipèptid i es va realitzar PCRs sobre el cDNA de *Symsagittifera roscoffensis* i de *Paratomela rubra*. Com a *primer* 5' es van usar una bateria de *primers* degenerats de l'hèlix 1 de l'*homeobox*, així com *primers* específics pel gen *Antp* de *Symsagittifera roscoffensis*. Tot i obtenir bandes a les PCR, cap no era exactament de la mida esperada, i les seqüències no van mostrar homologia amb el gen *Antp*. No haver trobat aquesta seqüència no implica que els acels no siguin lofotrocozous, ja que no a tots els membres d'aquest grup hi és, aquest pèptid i, a més, pot ser que les reaccions d'amplificació no hagin funcionat. Aquesta prova hauria estat concloent en el cas d'haver-se demostrat l'existència de l'*spiralian peptide* en els acels.

3.8 Gel d'electroforesi en camp pulsant (PFGE)

Donat que no es varen aconseguir allargar els fragments que s'havien obtingut per PCR es va intentar buscar lligament de les seqüències de *Symsagittifera roscoffensis* de que es disposava. Es va fer un PFGE, el *Southern* del qual es va hibridar amb cada una de les tres sondes obtingudes pel Dr. C. Cook al laboratori del Dr. M. Akam a l' Universitat de Cambridge, UK. Aquestes sondes eren fruit de l'iPCR que el Dr Cook havia obtingut i, per tant, eren més llargues que 117 pb. Es comptava amb una sonda del gen *Hox 1* de 599 pb, una del gen *Hox 4/5* de 439 pb, i una del gen posterior de 904 pb. Les sondes es van marcar amb oligonucleòtids específics de cada una de les seqüències. Cap de les múltiples condicions d'hibridació que es va provar (ni augment de concentració de la

sonda ni augment o disminució de la restrictivitat) va dur a cap resultat positiu, si bé controls amb d'altres gens (18S i miosina) van demostrar que el *Southern* era correcte.

3.9 Hibridació “in situ” *Whole mount*

Tot i que en un principi es volien determinar les àrees d'expressió dels gens Hox i ParaHox en acels, el fet de no poder obtenir seqüències prou llargues d'aquests gens en les espècies amb les que es comptava de material sobre el qual fer les hibridacions (*Paratomela rubra* i *Symsagittifera roscoffensis*) va fer que aquestes no es duessin a terme. S'ha vist que en les hibridacions *in situ* la mida de les sondes ha de ser al menys de 200 pb, i només es comptava amb una mida major a aquesta en el cas del gen *Caudal* de *Neochildia fusca*, animal del qual no teníem cap especímen. A més, el treball que hauria dut posar a punt les hibridacions per a acels hauria estat llarg, i no es va considerar necessari de fer-lo fins que no es tinguessin seqüències dels animals amb que sí podíem comptar, especialment amb *Symsagittifera roscoffensis*, ja que d'aquest es podien obtenir embrions, estadi en el qual s'expressen els gens Hox i ParaHox.

CAPÍTOL 4. AÏLLAMENT I CARACTERITZACIÓ DE GENS TIPUS HOX I PARAHOX A NEMERTODERMÀTIDES.

Com ja s'ha comentat en el capítol 3 dels resultats, les seqüències que es varen obtenir amb els nemertodermàtides van ser amplificades amb el mètode d'*anchored* PCR. Es van obtenir seqüències de tres gens Hox i dos ParaHox, com es mostra a la taula següent:

<i>Nemertoderma westbladi</i>	Tipus anterior	Tipus PG3	Tipus central	Tipus posterior
Hox	-	-	<i>NemCentral-I</i> <i>NemCentral-II</i>	<i>NemPost</i>
ParaHox	-	<i>NemXlox</i>	-	<i>NemCad</i>

Les seqüències obtingudes es van originar a partir d'un PCR *nested* amb els òligos SO1-SO2 a 53°C sobre el producte de PCR generat sobre el cDNA SMART per fer genoteca (24 cicles de pre-amplificació) amb els *primers* SO1-λ3' a 50°C. El cDNA fou cedit per Jordi Paps, Universitat de Barcelona. La seqüència *NemXlox* va ser posteriorment allargada cap a 3' en 12 aminoàcids fins a completar l'*homeobox* (posició 60) amb la parella Xlox5'int-λ3' sobre un PCR amb els *primers* Xlox5'ext-λ3'. Així mateix es va intentar allargar els gens usant l'*anchored* PCR amb òligos específics pels fragments *NemPost* i *NemCentral-I* trobats però no es va tenir èxit.

Les seqüències dels gens trobats es descriuen a continuació:

NemCentral-I

```

45  GAGTTAGAGAAGGAGTTTCATTACAACAAGTATTTAACGAGAAGGCCGA
15  E L E K E F H Y N K Y L T R R R

96  AGAATCGAGATAGCCCACGCGCTGAACTTGACTGAACGCCAAATCAAA
32  R I E I A H A L N L T E R Q I K

141 ATCTGGTTTCAAAACCGGA
47  I W F Q N R

```

NemCentral-II

63 GTTCCAATTCAATCATTACCTCACTCGGAAACGGAGAATAGAGGTGGCA
21 F Q F N H Y L T R K R R I E V A

111 CACTCACTATGTCTCACTGAAAGACAGATTAAGATCTGGTTTCAGAAC
37 H S L C L T E R Q I K I W F Q N

159 CGACG
53 R

NemPost

51 TTGGAGAAGGAATTCCTCTTCAATGTCTACATCACCCGCGAGAGGCCT
17 E K E F L F N V Y I T R E R R S

99 TCCGAAATATCCAGGAGTCTCAACCTCACCGACAGACAAGTGAAATTT
33 E I S R S L N L T D R Q V K I W

147 GGTTCAAAACAGCAG
49 F Q N S

NemCad

45 CTTCGGTTTTGGAACCATATTTTTACCTGTCGTTTCGGTAAGGCCTAGT
15 E L E K E F H Y K R Y L T L R R

96 TCACAGGCAAGTTCCACTCGACGTCGGCAGTGTTAAATATCGTTTATA
32 R V E L A C E L G L T E R Q V K

141 ATGGAATTCCTTCTCCAATTC
47 I W F Q N R

NemXlox

45 GAATTGGAGAAGGAGTTTCATTTCAATAAATACATTTCTCGTCCAAGA
 15 E L E K E F H F N K Y I S R P R

 96 CGAATAGAACTGGCAGCCATGCTGAATCTAACAGAACGACATATCAAA
 32 R I E L A A M L N L T E R H I K

 141 ATCTGGTTTCAAAAATCGCCGAATGAAATGGAAGAAAGACGAAGCAAAA
 47 I W F Q N R R M K W K K D E A K

 XX CGACGACCTAGACCATTAAAGTCAGGGAGTTCCCCAGATTCCCCTCCC
 XX R R P R P L K S G S S P D S P P

 XX AGTCCAACCATGTCGTCAC TTTCTGGATCTCCTGTTTAAAGCGAGAC
 XX S P T M S S L S W I S C L K R D

 XX TGACTATAACAATACGATTCCGCGGAAAAGCAGTTTGGACAGGACGGACATATCTCT
 XX *

 CACCAAGTCAGATGTAAAGCATAAAGTACAGGATACAAGTGTCTTAGGACGGAGTCTATGACT
 ATAAAAAGTAGTGCGGTACTTTATGATATTTACATACATATAAACTGCTTATCTTGCTTAAGC
 AGTGGTATCAACGCAGAGTCCCATTTACGGCCGGGTACCCCATTAATAAGATATTGAAATTGC
 CCTTATAGTGAGTCCGC

CAPÍTOL 5. COMPARACIÓ DE LES SEQÜÈNCIES OBTINGUDES AMB LES D'ALTRES GRUPS DE BILATERALS

De totes les seqüències trobades es va fer un alineament per descartar contaminacions creuades entre les espècies subjecte de l'estudi. Aquests alineaments van demostrar que totes les seqüències que es van obtenir eren diferents en les diferents espècies. Així mateix, l'anàlisi de les seqüències i el seu contrast amb els bancs de dades van eliminar les possibles trans-contaminacions amb d'altres espècies en estudi al nostre laboratori en el moment de fer aquest treball (políclads, tríclads i amfiox). A continuació es presenten els alineaments de les seqüències de nucleòtids pels gens trobats en els acels de les espècies *Symsagittifera roscoffensis* (cr), *Paratomela rubra* (pr) i *Neochildia fusca* (nf), i en el nemertodermàtid *Nemertoderma westbladi* (nem). En aquests alineaments s'inclouen, a més, seqüències trobades en l'acel *Convoluta triloba* (ct) pel grup del Dr. Martindale, ja que aquestes es tindran en compte a l'hora de fer la discussió i d'aquesta manera es descarta trans-contaminació en aquesta espècie també (es senyalen els *gaps* amb un guió).

LABIALS

	5	15	25	35	45	55
<i>cr lab</i>	-----	-----CA	CTTCAATAGA	TATCTTACAC	GAGCTAGGAG	GATCGAGATA
<i>pr lab</i>	GAATTAGAAA	AGGAATTCCA	TTTCAACAAA	TACTTGACTC	GAGCCAGACG	CATTGAAATT
<i>nf lab</i>	-----	-----CA	TTTCAACCGC	TACCTGACGC	GAGCCCGACG	AATAGAGATC
<i>ct lab</i>	-----	-----CCA	CTTTAACAGA	TACTTGACAC	GTGCTAGGAG	GATTGAAATC

	65	75	85	95	105	
<i>cr lab</i>	GCTACTTCGC	TGACCTTGAA	TGAGACTCAG	GTCAAGATAT	G-----	-
<i>pr lab</i>	GCAAGTACAT	TGAGCTTGAG	CGAAACCCAA	GTGAAAATAT	GGTTCCAAAA	T
<i>nf lab</i>	GCCACGTCGC	CTACCCTGAA	CGAGACGCAG	GTCAAGATAT	G-----	-
<i>ct lab</i>	GCAACTTCGT	TGGCTCTGAA	CGAAACCCAA	GTT-----	-----	-

CENTRALS

	5	15	25	35	45	55
<i>cr central</i>	-----	-----CCA	CTTCAACCGG	TACCTCACTC	GCAGACGGAG	GATAGAGATC
<i>nf central</i>	-----	-----CCA	CTTTAACCGA	TATCTAACAC	GGAGACGGAG	GATTGAAATC
<i>ct central</i>	-----	-----CCA	CTTCAACAGG	TACCTCACCA	GACGCAGGAG	GATCGAGATT
<i>nem centr-I</i>	GAGTTAGAGA	AGGAGTTTCA	TTACAACAAG	TATTTAACGA	GAAGGCGAAG	AATCGAGATA
<i>nem centr-II</i>	-----	----GTTCCA	ATTCAATCAT	TACCTCACTC	GGAAACGGAG	AATAGAGGTG

	65	75	85	95	105	115
<i>cr central</i>	GCCAATCTAC	TCGCACTGAC	CGAGCGACAG	ATCAAAATA-	-----	-----
<i>nf central</i>	GCAAACCTGT	TGGGCCTGAC	AGAACGGCAG	ATT-----	-----	-----
<i>ct central</i>	GCCAACCTGC	TGGCACTAAC	CGAGCGACAA	ATC-----	-----	-----
<i>nem centr-I</i>	GCCCACGCGC	TGAACTTGAC	TGAAACGCCAA	ATCAAAATCT	GGTTTTCAAAA	CCGGA-
<i>nem centr-II</i>	GCACACTCAC	TATGTCTCAC	TGAAAGACAG	ATTAAGATCT	GGTTTTCAGAA	CCGACG

POSTERIORES

	5	15	25	35	45	55
<i>cr post</i>	ACCAAGAACC	AAACTCTGGA	ATTGGAGAAA	GAGTTTCTCT	TCAACACGTA	CATAACCAGA
<i>pr post 2</i>	-----GCTTC	TAGAGCTTGA	ATTTGAGAAA	GAATTCCTAC	TAAGCACTTA	CATAACCAGG
<i>pr post 1</i>	-----	-----GA	GTTGGAAAAA	GAATTCCTATT	TCAACAATTA	CATTACGAGG
<i>nem post</i>	-----	-----	-TTGGAGAAG	GAATTCCTCT	TCAATGTCTA	CATCACCCGC

	65	75	85	95	105	115
<i>cr post</i>	GAACGTAGAC	TGGAAATAGC	GAGATCACTC	AACCTGACAG	ATCGCCAAGT	CAAGATT---
<i>pr post 2</i>	GATAGACGTC	TGGAGATATC	CAAAAGTCTC	CATTTATCTG	ATCGACAGGT	TAAAATATGG
<i>pr post 1</i>	GAGCGTCGAG	GCGAAATCGC	GAAGGTATTA	GGGCTTTCTG	ATCGGCAAGT	AAAGATTTGG
<i>nem post</i>	GAGAGGCGTT	CCGAAATATC	CAGGAGTCTC	AACCTCACCG	ACAGACAAGT	GAAAATTTGG

	125	135
<i>cr post</i>	-----	-----
<i>pr post 2</i>	TTCCAGAACC	GACGAATG
<i>pr post 1</i>	TTTCAGAAC-	-----
<i>nem post</i>	TTCCAAAACA	GCAG----

CAUDALS

	5	15	25	35	45	55
<i>cr cad</i>	-----	-----	-----	-----CCGTA	CCAATCAATA	TATCAC-CAT
<i>pr cad</i>	-----	-----	-----	-----CGTA	CCAATCAATA	TATCAC-CAT
<i>nf cad</i>	-----	-----	-----TC	GAATTCAGAA	GTGCCCAGTA	TATCAC-TAT
<i>ct cad</i>	ACCGATCGAC	AGAGAGCGGA	GCTTGAGAAT	GAATTCAGAA	GTGCCCAGTA	TATCAC-TAT
<i>nem cad</i>	-----	-----GA	ATTGGAGAAG	GAATTCCATT	ATAAACGATA	TTTAACACTG

	65	75	85	95	105	115
<i>cr cad</i>	CCGACGCAAG	TCCGAACTGG	CCATGCAAGT	CGGCCTAAGC	GAGCGACAAG	TTAAGATCTG
<i>pr cad</i>	CCGAAAAAAA	GCCGAATTAG	CAACTCAGGT	TGGCCTATCG	GAGAGGCAAG	TAAAAATC--
<i>nf cad</i>	AAGGAGAAAAG	TCGGAACTGG	CTATGCAAGT	TGGGTTGAGT	GAGCGCCAGG	TTAAAAATTTG
<i>ct cad</i>	AAGAAGAAAAG	TCGGAACTGG	CTATGCAAGT	TGGGTTGAGT	GAGCGC----	-----
<i>nem cad</i>	CCGACGTCGA	GTGGAACTTG	CCTGTGAACT	AGGCCTTACC	GAACGACAGG	TAAAAATATG

	125	135	145	155	165	175
<i>cr cad</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>pr cad</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>nf cad</i>	GTTCCAAAAC	CGAAGAGCCA	AAGAACGAAA	AGTGTCGCGA	AAAGTTCCCG	GAGGTGGCAA
<i>ct cad</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>nem cad</i>	GTTCCAAAAC	CGAAG-----	-----	-----	-----	-----

Un cop es van haver descartat errors en la determinació dels gens i vist que cada un d'ells era diferent en algunes bases en els diferents organismes estudiats, es va passar a fer un anàlisi comparatiu de les seqüències d'aminoàcids per mirar de trobar semblances o diferències entre les seqüències en acelomorfa i la resta de bilaterals.

Els quadres presentats a continuació són alineaments de fragments de l'*homeobox* dels diferents grups de bilaterals. La llegenda numèrica representa la posició de l'aminoàcid que es troba sota la cota dins de l'*homeobox*.

En font blava es presenten els representants dels deuteròstoms

Hum per *Homo sapiens* (vertebrat),

Bfl o Amphi per *Branchiostoma floridae* (cefalocordat),

Cin per *Ciona intestinalis* (urocordat) i

Stp per *Strongilocentrotus purpuratus* (equinoderm).

En font vermella els representants d'ecdisozous

Ack per *Acanthokara kaputensis* (onicòfor),

Act per *Achaearanea tepidariorum* (artròpode quelicerat),

Afr per *Artemia franciscana* (artròpode crustaci),

Bmo per *Bombix mori* (artròpode hexàpode),

Cel per *Caenorhabditis elegans* (nemàtode),
Dme per *Drosophila melanogaster* (artròpode hexàpode),
Hpi per *Hirtodrosophila pictiventris* (artròpode hexàpode),
Juc per *Junonia coenia* (artròpode hexàpode),
Lat per *Lithobius atkinsoni* (artròpode miriàpode),
Pfe per *Pachymerium ferrugineum* (artròpode miriàpode),
Sac per *Sacculina carcini* (artròpode crustaci),
Sca per *Schistocerca americana* (artròpode hexàpode),
Sgr per *Schistocerca gregaria* (artròpode hexàpode),
Stt per *Steatoda triangulosa* (artròpode quelicerat),
Tca per *Tribolium castaneum* (artròpode hexàpode) i
Zvi per *Zaprionus vittiger* (artròpode hexàpode).

En font verda els lofotrocozous

Chv per *Chaetopterus variopedatus* (anèl.lid poliquet),
Cts per *Ctenodrilus serratus* (anèl.lid poliquet),
Distox o Dist per *Discocelis tigrina* (platihelminth tríciclad),
Dj per *Dugesia japonica* (platihelminth tríciclad),
DtHox per *Dugesia (Girardia) tigrina* (platihelminth tríciclad),
Eus per *Euprymna scolopes* (mol.lusc cefalòpode),
Hme per *Hirudo medicinalis* (anèl.lid hirudini),
Hts per *Helobdella triserialis* (anèl.lid hirudini),
Lsa per *Lineus sanguineus* (nemertí),
Nmi per *Nephasoma minuta* (sipuncúlid),
Nvi per *Nereis viridens* (anèl.lid poliquet),
Pnox per *Policelis nigra* (platihelminth tríciclad),
Pex per *Perionyx excavatus* (anèl.lid oligoquet),
Psi per *Pheretima sieboldi* (anèl.lid oligoquet),
Pst per *Phascolion strombi* (sipuncúlid) i
Pvu per *Patella vulgata* (mol.lusc gasteròpode).

Els acels s'han subratllat en gris fosc (Cr per *Symsagittifera roscoffensis*, Pr per *Paratomela rubra*, Nf per *Neochildia fusca* i Ct per *Convoluta triloba*), i el nemertodermatid en gris clar (Nem). Així mateix, s'alternen colors clars i foscos al marcar les posicions aminoacídiques més interessants per fer més fàcil l'observació dels alineaments, i no degut a cap altre motiu.

COMPARACIÓ DELS GENS HOX ANTERIORS ALS DIFERENTS GRUPS

	15	20	30	40	50
*	**.....
Hum <i>HoxA1</i>	ELEKEFHFNKYL	TRARRVEIAAS	SLQLNETQVKI	WFQNR	
Bfl <i>Hox1</i>	ELEKEFHFNKYL	TRARRVEIAAAL	NLNETQVKI	WFQNR	
Stt <i>lab</i>	HFNKYL	TRARRIEIAS	SLGLNETQVKI		
Ack <i>lab</i>	HFNKYL	TRARRIEIATA	LQLNETQVKI		
Dme <i>lab</i>	ELEKEFHFNRYL	TRARRIEIANT	LQLNETQVKI	WFQNR	
Tca <i>lab</i>	ELEKEFHFNKYL	TRARRIEIASA	LQLNETQVKI	WFQNR	
Lat <i>lab</i>	HFNKYL	TRARRIEIATA	LQLNETQVKI	WFQNR	
Pfe <i>lab</i>	ELEKEFHFNKYL	TRARRIEIASA	LQLNETQVKI		
Sgr <i>lab</i>	FHNKYL	TRARRIEIASA	LQLNETQVKI	W	
Psi <i>lab</i>	ELEKEFHFNRYL	TRARRIEMAS	SLGLNETQVKI	WFQNS	
Chv <i>lab</i>	HFNKYL	TRARRIEIAAAL	LGLNETQVKI		
Eus <i>lab</i>	ELEKEFHFNKYL	TRARRIEIAAA	-----	KIWFQNR	
Nvi <i>lab</i>	ELEKEFHFNKYL	TRARRIEIAAAL	LGLNETQVKI	WFQNR	
Hts <i>lab</i>	HFNKYL	TRARRIEIAS	TLGLNETQVKI		
<i>Distox A</i>	ELEKEFYFNKYL	TRARRIEIANAL	LGLNETQIKI		
<i>Pnox 3</i>	ELEKEFHFNQYL	TRARRIEIAKS	MTLSETQIKI		
Cr <i>lab</i>	HFNRYL	TRARRIEIATS	TLNETQVKI		
Pr <i>lab</i>	ELEKEFHFNKYL	TRARRIEIAS	TLSETQVKI	WFQ	
Nf <i>lab</i>	HFNRYL	TRARRIEIATS	TLNETQVKI		
Ct <i>lab</i>	HFNRYL	TRARRIEIATS	LALNETQV		

*Posicions d'interés *lab*: 24, 36, 37

En el cas dels gens anteriors, tres dels quatre acels seqüenciats tenen una base exclusiva del grup en la posició 24, éssent aquesta una R enlloc d'una K. Cal destacar que l'espècie que manté en aquesta posició la K és *Paratomela rubra*, que és la més basal. Així doncs pot ser que es tracti d'una variació ja dins del grup dels acels. En aquest cas no s'ha pogut identificar el gen en els nemertodermàtides, cosa la qual hauria pogut aportar llum a resoldre aquesta possibilitat. Així mateix, les mateixes tres espècies comparteixen el doblet TS en les posicions 36 i 37, mentre que *Paratomela rubra* té aquí una inversió (ST). En les altres espècies mostrades es troba en els ecdisozous una T o una S en aquesta posició i en dos dels lofotrocozous una S. En la posició 37 hi ha una S en un dels ecdisozous i una S o una T en alguns dels lofotrocozous. En qualsevol cas no es manté el doblet TS en cap altre grup, i només a *Helobdella triserialis* es dona el doblet ST com a *Paratomela rubra*. Un altre residu a mencionar és el que ocupa la posició 39. En el cas de la resta de bilaterals aquesta posició l'ocupa bé una G bé una Q. En canvi, en

el cas dels acels hi ha variació, però en cap cas no es troben aquells dos residus. Cal destacar que en el tríclad *Polycelis nigra* en aquesta posició s'hi troba una T, com a *Symsagittifera roscoffensis* i a *Neochildia fusca*. Tot i aquesta darrera coincidència concloem que no es troben evidències que agrupin els acels més propers a lofotrocozous que a la resta de grups, donades les altres posicions aminoacídiques.

COMPARACIÓ DELS GENS HOX CENTRALS ALS DIFERENTS GRUPS

	15	20	30	40	50
	***
Hum <i>HoxA4</i>	ELEKEFHFNRYL	TRRRRIEIAHTL	CLSERQVKIWFQ	NRR	
Bfl <i>Hox4</i>	ELEKEFHFNKYL	TRRRRIEIAHSL	GLTERQIKIWFQ	NRR	
Act <i>Antp</i>		HFNRYLTRRRRIEIAHAL	CLSERQIKI		
Stt <i>Antp</i>		HFNRYLTRRRRIEIAHAL	CLSERQIKI		
Ack <i>Antp</i>	ELEKEFHFNRYL	TRRRRIEIAHAL	CALTERQIK		
Dme <i>Antp</i>	ELEKEFHFNRYL	TRRRRIEIAHAL	CALTERQIKIWFQ	NRR	
Eus <i>Antp</i>	ELEKEFHFNRYL	TRRRRIEIAHAL	CALTERQIKIWFQ	NRR	
Eus <i>lox5</i>	ELEKEFHFNRYL	TRRRRIEIAHSL	GLSERQIKIWFQ	NRR	
Lsa <i>Hox7</i>	ELEKEFHFNKYL	TRRRRIEIAHAL	CALTERQIKIWFQ	NRR	
DtHoxC		HFNKYLTRRRRIEIAHTL	LILTERQIKI		
DtHoxE		HFNKYLTRRRRIEIAHGL	SLTERQIKI		
Cr <i>central</i>		HFNRYLTRRRRIEIANL	LALTERQIKI		
Nf <i>central</i>		HFNRYLTRRRRIEIANL	LGLTERQI		
Ct <i>central</i>		HFNRYLTRRRRIEIANL	LALTERQI		
Nem <i>central-I</i>	ELEKEFHYNKYL	TRRRRIEIAHAL	NLTERQIKIWFQ	NRR	

*Posicions d'interés *Antp*: 36, 37, 39.

En el cas dels gens centrals, hi ha una posició molt conservada en tots els grups que és la H en posició 36. Però en tots els acels en els que s'ha trobat aquest gen central hi ha en aquesta posició una N. Altra vegada els nemertodermàtides comparteixen residu amb la resta de grups i no amb els acels, com passava en el cas del gen *Caudal*. També cal destacar el residu en posició 37, majoritàriament ocupat per una A, mentre que en tots els acels hi ha una L. En la posició 39, tot i no haver-hi un gran consens, podem veure que els acels no presenten l'aminoàcid majoritari. Altre cop, tot i que l'observació de les seqüències no agrupa els acels i els nemertodermàtides, sí que agrupa clarament els acels i, a més, cap dels dos grups no s'assembla més a un o altre grups de bilaterals. A destacar sobre tot el fet que les posicions especialment esmentades tampoc són compartides amb els representants de platyhelminths, i que d'altres posicions sí compartides amb diferents grups no ho són amb aquests (i.e. posició 24, sí compartida amb els nemertodermàtides).

Amb comparació de seqüències, hem determinat que el gen *NemCentral-II* té més homologia als gens centrals posteriors (*Hox 6-8*) que als anteriors, als que correspondria el gen *NemCentral-I*. Així doncs, es compara aquest gen *NemCentral-II* amb els gens de tipus *Ubx/Lox2-Lox4* a continuació.

COMPARACIÓ DELS GENS CENTRALS *UBX/LOX2-LOX4* ALS DIFERENTS GRUPS

	15	20	30	40	50
	*...*	*...*
Hum <i>Hox A6</i>	ELEKEFHFSKYL	TRRRRIE	IATTLKL	TEMQIKI	WFQNR
Bfl <i>Hox6</i>	ELEKEFHFNKYL	TRKRRRIE	IAHLLGL	TERQIKI	WFQNR
Ack <i>Ubx</i>	ELEKEFHFTFHYL	TRRRRIE	MAHALCL	TERQIKI	WFQNR
Bmo <i>Ubx</i>	ELEKEFHFTNHYL	TRRRRIE	MAHALCL	TERQIKI	WFQNR
Sca <i>Ubx</i>	ELEKEFHANHYL	TRRRRIE	MAHQCL	TERQIKI	WFQNR
Lat <i>Ubx</i>	HTNHYL	TRRRRIE	MAHALCL	TERQIKI	WFQNR
Juc <i>Ubx</i>	ELEKEFHFTNHYL	TRRRRIE	MAHALCL	TERQIKI	WFQNR
Pex- <i>Lox 2</i>	KFNRYL	TRRRRIE	IAHCLCL	TERQI	
Pex- <i>Lox 4</i>	QFNRYL	TRKRRRIE	IAHCLCL	TERQI	
Eus <i>Lox 4</i>	ELEKEFQYNNYL	TRKRRRIE	VAHALNL	SERQV	KIWFQNR
<i>Distox F</i>	ELEKEFOYSRYL	TRRRRIE	IAHMLQL	TERQIKI	WFQNR
<i>Dthox F</i>	ELEKEFOFNHYL	TRRRRIE	IAHNLCL	SERQIKI	WFQNR
Nvi <i>Lox2</i>	FKTFHYL	TRKRRRIE	LSHMLCL	TERQIKI	
Hme <i>Lox4</i>	ELEKEFOFNRYL	TRKRRRIE	IACALCL	TERQIKI	WFQNR
Nem <i>central-II</i>	FQFNHYL	TRKRRRIE	VAHSLCL	TERQIKI	WFQNR

*Posicions d'interés *Central-II*: 21, 24, 29, 34, 36.

En el cas d'aquest gen, ja que tan sols s'ha pogut clonar a nemertodermàtides, és encara més difícil de decidir alguna conclusió de la seqüència de la proteïna, sobretot donat el cas que no hi ha posicions conservades massa clares. Tot i això, en aquest cas hi ha una tendència, si bé aquesta no és en absolut clara, a agrupar els nemertodermàtides més amb els lofotrocozous que pas amb els ecdisozous. Així veiem que en posició 21 hi ha una Q que es comparteix entre els nemertodermàtides i la majoria de lofotrocozous. Tanmateix, una H en posició 24 és compartida per tots els ecdisozous usats i el nemertodermàtid, tot i que dos dels 7 lofotrocozous també tenen una H en aquesta posició. Mentre tots els ecdisozous tenen una R en posició 29, 4 dels lofotrocozous hi tenen una K, com el nemertodermàtid, tot i que el cefalocordat també comparteix aquest residu. Per últim, una V en posició 34 present al nemertodermàtid és únicament compartida pel lofotrocozou *Euprymna scolopes* (mol.lusc). Només la S en posició 36 és única a nemertodermàtid, tot i que aquesta posició és altament variable en tots els grups.

COMPARACIÓ DELS GENS HOX POSTERIORS ALS DIFERENTS GRUPS

	15	20	30	40	50
	*****.....
Hum <i>Hox A9</i>	ELEKEFLE	NMYL	TRDRRYEVAR	LLNL	TERQVKIWFQNR
Bfl <i>Hox9</i>	ELEKEFLY	NMYL	TRRREYEISQ	HVNL	TERQVKIWFQNR
Act <i>abdB</i>		LQCLCFKQ	KRW-DC	QNLNL	TERQVKI
Ack <i>abdB</i>	ELEKEFLE	NAYVSKQ	KRWELARN	LN	TERQVKI
Zvi <i>abdB</i>		EFHFNAYE	SKQKRWEL	ARNLQ	TERQVKIWFQNR
Hpi <i>abdB</i>		EFHFNAYV	SKQKRWEL	ARNLQ	MERQVKIWFQNR
Sac <i>abdB</i>	ELEKEFLE	NAYVSKQ	KRWELARN	LN	TERQVKIWFQNR
Afr <i>abdB</i>	ELEKEFLE	NAYVSKQ	KRWELARN	LN	TERQVKI
Dj <i>AbdBa</i>	ILESEYV	GNTT	TITRQKRW	EIA	ACKLHLSERQIKVWFQNR
Eus <i>post 1</i>	ELEREYAL	STYISK	SRWEL	SQ	LLNL
Nvi <i>post 1</i>	ELEKEYV	NNTYIT	KPKRWEL	SQ	RLNL
Eus <i>post 2</i>	VLENEFL	NSSYIT	RQKRW	EIS	CKLQ
Nvi <i>post 2</i>	VLENEFM	GNSYIT	RQKRW	EIS	CKLHLSERQVKVWFQNR
Pex <i>abdB</i>		VSNSYIT	RQKRW	EIS	CKLHLSERQV
Cr <i>post</i>	TKNQTLE	LEKEFL	NTYITR	RRLEI	ARSLNLTDRQV
Pr <i>post-II</i>		ELEKEFY	FNNYIT	RRRGEI	AKVLGLSDRQVKIWFQ
Pr <i>post-I</i>	LLELEFE	KEFL	LSTYIT	TRDRR	LEISKSLHLSDRQVKIWFQNR
Nem <i>post</i>		EKEFLE	NVYITR	RRSEI	SRSLNLTDRQVKIWFQNSX

*Posicions d'interés *post*: 22, 26, 27, 28, 29, 30, 32, 34, 35, 36, 41, 42.

La posició que més agrupa els acels i nemertodermàtides en el cas dels gens posteriors és la 42, ja que així com aquests hi tenen una D, la resta de bilaterals hi tenen una E. La resta de posicions són molt més ambigües i menys conservades. N'hi ha algunes que també separen els acelomorfa de la resta de protostomats, com ara la R en posició 30 o la E o D en posició 29. Aquestes es comparteixen, però, amb els deuterostomats. També en la posició 32, els protostoms hi mostren una W, els deuteròstoms una Y i, en canvi, acels i nemertodermàtides no tenen cap d'aquests dos, si bé no hi ha consens en el residu. Semblant és el cas de la posició 36, que mentre en la resta de bilaterals majoritàriament hi ha una K o N, en acelomorfa majoritàriament hi ha una S. En posició 22 trobem la única agrupació clara en aquest gen entre acelomorfa i ecdisozous. En canvi, en posició 26 una I és compartida per acelomorfa i lofotrocozous. Similarment passa en les posicions 27 i 28, tot i que en aquest cas també els deuteròstoms comparteixen residus amb lofotrocozous i acelomorfa. Això podria fer pensar en un canvi en els ecdisozous, ja que la resta de grups guarden un consens. La posició 34 agrupa acelomorfa amb el gen *posterior 2* de lofotrocozous, però no hi ha altres evidències

d'aquest possible agrupament. Per últim, les posicions 35 i 41 mostren que dels dos residus que apareixen a acelomorfa en les mateixes proporcions, un és típic de lofotrocozous i l'altre d'eclisozous. Així doncs, tot i la complicada homologia dels gens posteriors, altra vegada resulta difícil poder adscriure els acels i nemertodermàtides en un o altre grup.

COMPARACIÓ DELS GENS *XLOX* ALS DIFERENTS GRUPS

	15	20	30	40	50

Cin <i>Xlox</i>			YISRPRIELAAMLNL	TERHIKIWFQ	NRR
Hum <i>Xlox</i>	ELEKEFLFNKYI	SRPRVELAVMLNL	TERHIKIWFQ	NRR	
Bfl <i>Xlox</i>	ELEKEFHFNKYI	SRPRIELAAMLNL	TERHIKIWFQ	NRR	
Stp <i>Xlox</i>	ELEKEFHFNKYI	SRPRIELAAMLNL	TERHIKIWFQ	NRR	
Cts <i>Xlox</i>		HFNKYISRPRIELAAMLNL	TERHIKI		
Chv <i>Xlox</i>		HFNKYISRPRIELAALLNL	TERHIKI		
Nmi <i>Xlox</i>	ELEKEFHFNKYI	SRPRIELAAMLNL	TERHIKI		
Pst <i>Xlox</i>	ELEKEFHFNKYI	SRPRIELAAMLNL	TERHIKI		
Nem <i>Xlox</i>	ELEKEFHFNKYI	SRPRIELAAMLNL	TERHIKIWFQ	NRR	

En el cas del gen ParaHox *Xlox* no es troba cap residu diferent en la seqüència d'aminoàcids amb la resta de proteïnes amb les que s'ha comparat, excepte per la V en posició 32 a humans. Si bé no es poden veure, doncs, caràcters diferents a la resta de grups, cosa que de tota manera seria poc conclouent al tractar-se d'una sola seqüència a comparar, sí que es pot adscriure aquest gen de nemertodermàtid al grup dels *Xlox*, ja que hi ha residus específics per aquest gen, com ara la P en posició 28, la L en posició 34, la A en posició 36 o la H en posició 44. Tot i això, cal dir que no s'ha trobat en el banc de dades cap seqüència *Xlox* corresponent a organismes del grup dels edisozous. El fet de trobar *Xlox* a lofotrocozous i deuteròstoms podria apuntar més aviat a una pèrdua o poca conservació del gen *Xlox* dins dels edisozous.

COMPARACIÓ DELS GENS *CAUDAL* ALS DIFERENTS GRUPS

	15	20	30	40	50
 *...*****
Hum <i>Cad</i>	ELEKEFHYSRYITIRRKSELAANLGLTERQVKIWFQNR				
Bfl <i>Cad</i>	ELEKEFYSNKYITIKRKVQLANELGLSERQVKIWFQNR				
Tca <i>Cad</i>	ELEKEFTVSKYITIKRKSELAENLGLSERQIKIWFQNR				
Dme <i>Cad</i>	ELEKEYCTSRYSRYITIRRKSELAQTLSSLERQVKIWFQNR				
Ack <i>Cad</i>	HYSRYITIRRKSELAQALNLSERQVKI				
Act <i>Cad</i>	ELEKEFHYSRYITIRRKVELAASLNLSEIQIKIWFQNR				
Cel <i>Cad</i>	ELEKEFHTSPFITSDRKSQSLSTMLSLTERQIKIWFQNR				
Pvu <i>Cad</i>	ELEKEFHYSRYITIRRKAEIAAQLALSERQVKIWFQNR				
Chv <i>Cad</i>	HYSRYITIRRKAEIQAQLSLSERQVKI				
Dist <i>Cad</i>	ELEKEFLTQKYVNARRKSEMARALQLTERQVKIWFQNR				
Nmi <i>Cad</i>	HYSRYITIRRKAEIQAQLSLSERQVKI				
Pst <i>Cad</i>	ELEKEFHYSRYITIRRKAEIQAQLSLSERQVKI				
Cr <i>Cad</i>	RTNQYITIRRKSELAMQVGLSERQVKI				
Pr <i>Cad</i>	RTNQYITIRKKAELATQVGLSERQVKI				
Nf <i>Cad</i>	EFRSAQYITIRRKSELAMQVGLSERQVKIWFQNR				
Ct <i>Cad</i>	TDRQRAELENFRSAQYITIRRKSELAMQVGLSER				
Nem <i>Cad</i>	ELEKEFHYKRYLTLRRRVELACELGLTERQVKIWFQNR				

*Posicions d'interés *Cad*: 21, 24, 36, 37, 38, 39.

En el cas del fragment *Caudal* amplificat per PCR hi ha quatre posicions en les que els acels tenen un residu conservat només en el seu grup. Aquests residus són la R en la posició 21, la Q en la posició 24, la M en posició 36, i la V en posició 38. De les posicions que no són conservades a tots els grups, els acels comparteixen certs aminoàcids amb uns i certs amb d'altres. Així doncs, la G en posició 39 que tenen tant acels com nemertodermàtides no és compartida amb els representants de lofotrocozous, però sí amb els deuteròstoms i amb un dels quatre ecdisozous amb els que es comparen. Tanmateix, la Q en posició 37 és present només en els acels i en un dels representants de lofotrocozous. Altres residus a tenir en compte per les seves diferències són la posició 23 i la 32. En la 23 tots els grups amb els que els comparem tenen una S o una Q, excepte l'amfiox que hi té una N. Així mateix, els acels hi tenen bé una N, bé una A, tret que els distingeix de la resta. En aquesta posició els nemertodermàtides hi tenen una K, també única. En la posició 32 la majoria de lofotrocozous excepte *Discocelis tigrina*, hi tenen una A, mentre que els ecdisozous hi tenen una S. En aquesta posició la majoria d'acels hi tenen una S, excepte *Paratomela rubra* que hi té una A. En el cas dels nemertodermàtides no hi ha cap residu que els distingeixi clarament o que els uneixi amb els acels, però al

només ser una espècie amb la que s'ha treballat és difícil generalitzar a partir d'una sola seqüència. L'únic residu no compartit amb cap dels altres grups és la L en posició 26, que a més és una posició totalment conservada en els altres grups (I). De les altres dues posicions que els nemertodermàtides comparteixen variacions amb algun dels grups (32 i 41) cal destacar que aquests són els ecdisizous o els deuteròstoms, però no els lofotrocozous (excepte en el cas de la posició 41 on també el lofotrocozou *Discocelis tigrina* té el mateix residu). Així mateix val a dir que la seqüència del gen *NemCad* és molt divergent respecte a la resta, molt més que no pas les dels acels, i tant com la del nemàtode *C. elegans* o el políclad *D. tigrina*.

En la l'alineament de les pàgines 81 i 82 d'aquest apartat de Resultats i Discussió es pot comprovar que les regions flanquejants del gen *Caudal* no són conservades en els diferents filums, i és aquesta la raó per la qual no s'ha inclòs aquí un estudi comparatiu d'aquesta regió, tot i que s'ha aconseguit un bon troç de la seqüència d'aquesta en l'acel *Neochildia fusca*.

Així doncs, de l'observació dels fragments de seqüències del gen ParaHox *Caudal* podríem concloure que tots els acels tenen variacions consistents, que els nemertodermàtides tenen el gen més divergent en aquesta regió i que en qualsevol cas, no s'observa cap tendència que faci pensar que les seqüències d'acels o nemertodermàtides s'assemblin més a lofotrocozous que als dos altres grups. Cal afegir, a més, que la seqüència de nemertodermàtides és tan diferent a les dels acels com a les de la resta de grups.

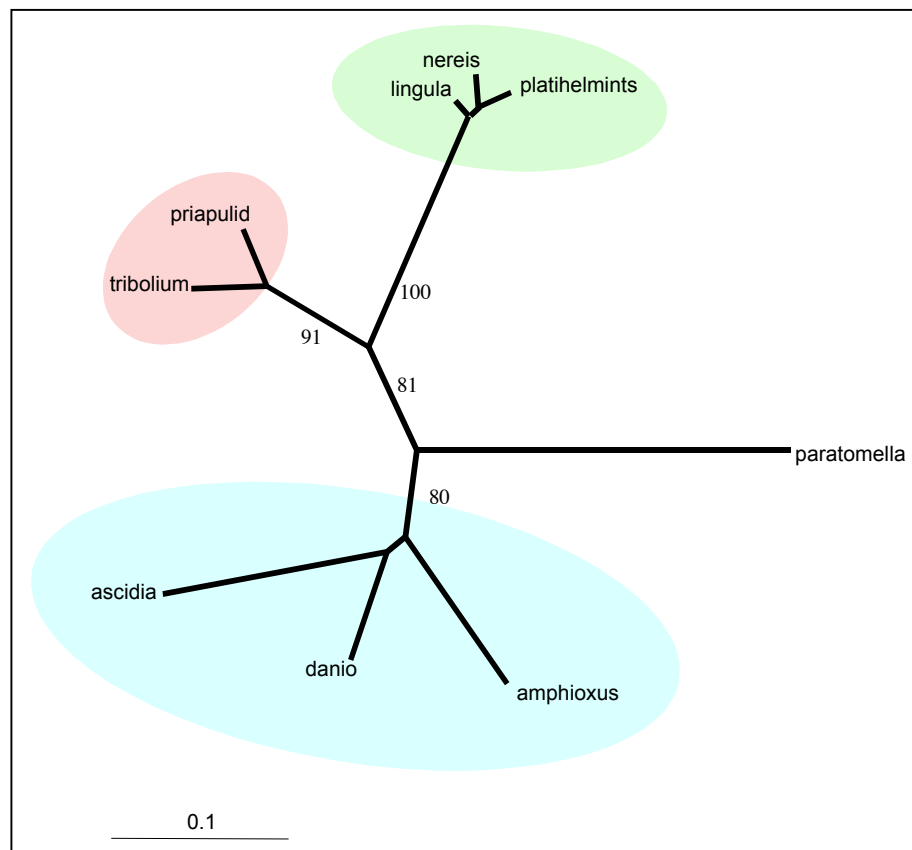
Després de la comparació de seqüències dels gens Hox i ParaHox trobats a acels i nemertodermàtides, podem dir que hi ha 29 posicions aminoacídiques que ens donen algun tipus d'informació. D'aquestes, 12 donen força a la diferència dels acels respecte els altres grups, fins i tot respecte als nemertodermàtides. 6 posicions, però, apropen els acelomorfa. 4 més són diferents entre acelomorfa i la resta de bilaterals. Respecte als altres grups dins dels bilaterals, 1 posició els apropa més a deuteròstoms, 3 a lofotrocozous i 2 a ecdisizous. La resta de residus estan compartits pels dos darrers grups i acelomorfa. Així doncs, aquesta comparació de seqüències no és conclouent pel que fa a poder adscriure els acels en un o altre grup filogenètic i, de fet, els aparta una mica d'aquells. Això es pot deure a una divergència del clade acels o acelomorfa o bé degut a un posicionament basal dels acels. La divergència de seqüències amb els nemertodermàtides no ajuda a resoldre aquest dubte. Tot i així, el nombre reduït de gens de tipus Hox i ParaHox que hem trobat en aquestes espècies apunta a una posició basal.

Tenint en compte el fet que les seqüències de que es disposava eren massa curtes per a poder fer arbres filogenètics, vàrem decidir de fer concatàmers de les seqüències a fi i

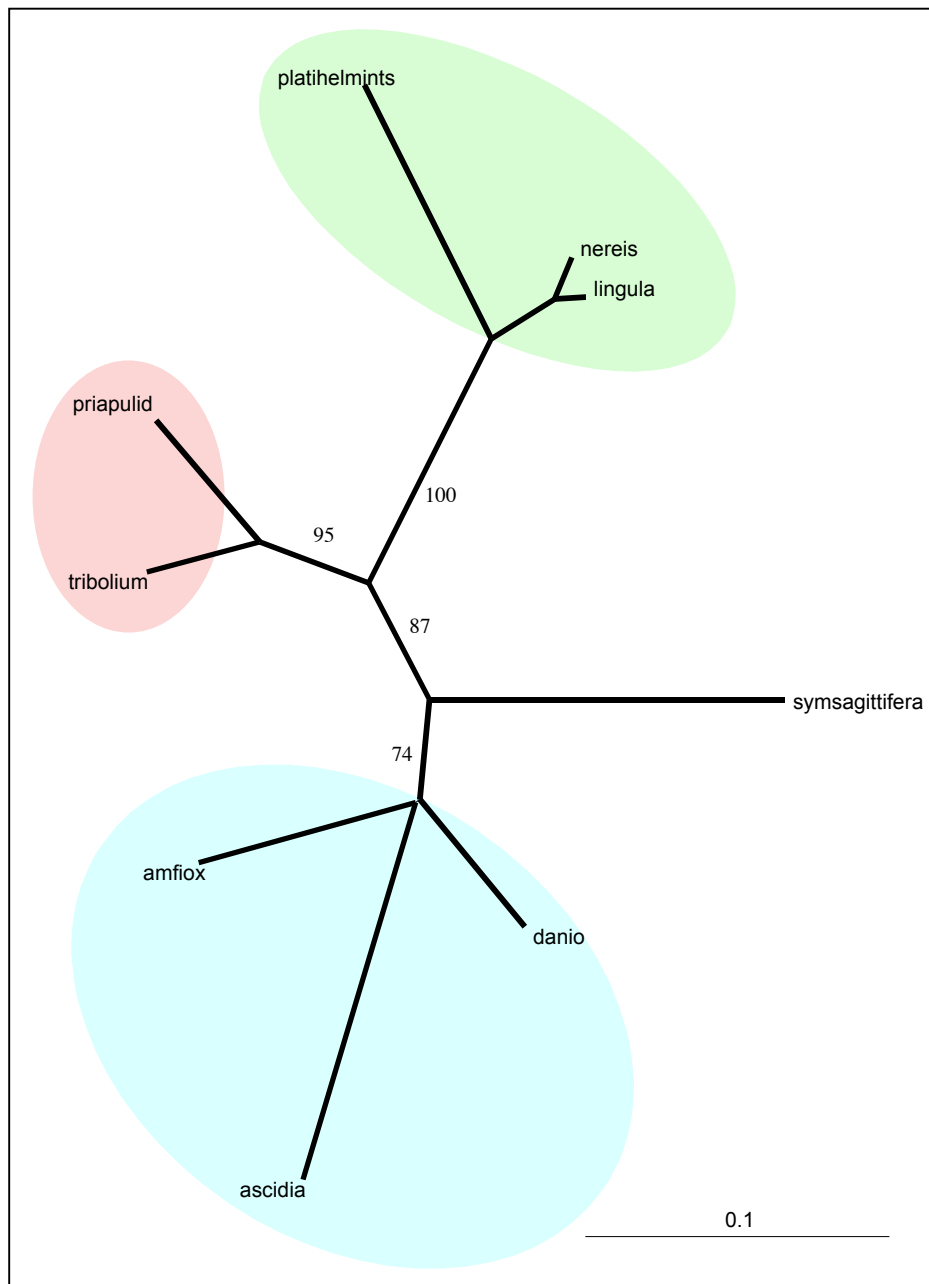
efecte de tenir més posicions i, per tant, més informació, a l'hora de construir l'arbre. Al banc de dades *GeneBank* es van buscar seqüències dels gens Hox anteriors, centrals i posteriors d'animals dels diferents grups de bilaterals dels que es coneguessin els tres, per a poder fer els arbres amb les seqüències d'acel i nemertodermàtid que nosaltres havíem trobat. Tot i concatenar les seqüències, cal remarcar que les posicions informatives no són moltes. Tot i això, tots els arbres realitzats han donat resultats congruents. Els fragments de seqüències aminoacídiques usats es mostren ens l'alineament següent (en verd lofotrocozous, en vermell eccdisozous i en blau deuteròstoms):

	30	40
	
<i>Nereis virens labial</i>	-FNKYLTRARRRIEIAAALGLNETQVVKI	
<i>Nereis virens scr</i>	-FNRYLTRRRRIEIAHALNLTERQIKI	
<i>Nereis virens Post2</i>	-GNSYITRQKRWEISCKLHLSEKQVKV	
<i>Lingula anatina lab</i>	-FNKYLTRARRRIEIAAALGLNETQVVKI	
<i>Lingula anatina scr</i>	-FNRYLTRRRRIEIAHALNLTERQIKI	
<i>Lingula anatina Post-2</i>	-NNAYITRQKRWEISCKLHLSEKQVKV	
<i>Discocelis tigrina Hox1/lab</i>	-FNKYLTRARRRIEIANALGLNETQVVKI	
<i>Dugesia japonica PLOX4-Dj</i>	-YNQYLTRRRRIEIANSVCLSERQIKI	
<i>Dugesia japonica DjAbd-Bb</i>	-GNAYITRQKRWEISCKLHLSEKQVKV	
<i>Priapulius caudatus lab</i>	-FNKYLTRARRRIEIAASLGLNETQVVKI	
<i>Priapulius caudatus HB1</i>	-FNRYLTRRRRIEIANVLRRLTERQIKI	
<i>Priapulius caudatus abd-B</i>	-FNAYVSKQKRWEILARTLNLTQVVKI	
<i>Tribolium castaneum lab</i>	-FNKYLTRARRRIEIASALQLNETQVVKI	
<i>Tribolium castaneum scr</i>	-FNRYLTRRRRIEIAHALCLTERQIKI	
<i>Tribolium castaneum abd-B</i>	-FNAYVSKQKRWEILARNLNLTQVVKI	
<i>B. floridae AmphiHox1</i>	-YNKYLTRARRVEIAAALNLNETQVVKI	
<i>B. floridae Hox-5</i>	-FNRYLTRRRRIEIAHALCLTERQIKI	
<i>B. floridae Hox-10</i>	-FNMYVSRERRQEISRHNLSDRQVKI	
<i>Halocynthia roretzi HrHox-1</i>	-FNKYLTRARRVEIAAALLNETQVVKI	
<i>Ciona intestinalis Hox5</i>	-YNRYLTRRRRIEVAHTLCLTERQIKI	
<i>Ciona intestinalis Hox10</i>	-YNQYLSRERRLEVAKSVKLTDRQVKI	
<i>Danio rerio Hoxala</i>	-FNKYLTRARRVEIAASLQLNETQVVKI	
<i>Danio rerio hoxb5b</i>	-FNRYLTRRRRIEIAHALCLSERQIKI	
<i>Danio rerio hoxb10a</i>	-FNMYLTRRRRLEISRSINLTDQVVKI	
<i>S. roscoffensis lab</i>	-FNRYLTRARRRIEIAATSLTLNETQV--	
<i>S. roscoffensis central</i>	-FNRYLTRRRRIEIANLLALTERQI--	
<i>S. roscoffensis post</i>	-FNTYITRERRLEIARSLNLTDRQV--	
<i>P. rubra lab</i>	-FNKYLTRARRRIEIASTLSLSETQV--	
<i>P. rubra post2</i>	-FNMYITRERRGEIAKVLGLSDRQVKI	
<i>P. rubra post I</i>	-LSTYITRDRRLEISKSLHLSDRQVKI	
<i>N. fusca lab</i>	-FNRYLTRARRRIEIAATSLTLNETQV--	
<i>N. fusca central</i>	-FNRYLTRRRRIEIANLLGLTERQI--	
<i>N. westbladi centrall</i>	-YNKYLTRRRRIEIAHALNLTERQI--	
<i>N. westbladi post</i>	-FNVYITRERRSEISRSINLTDQVVKI	

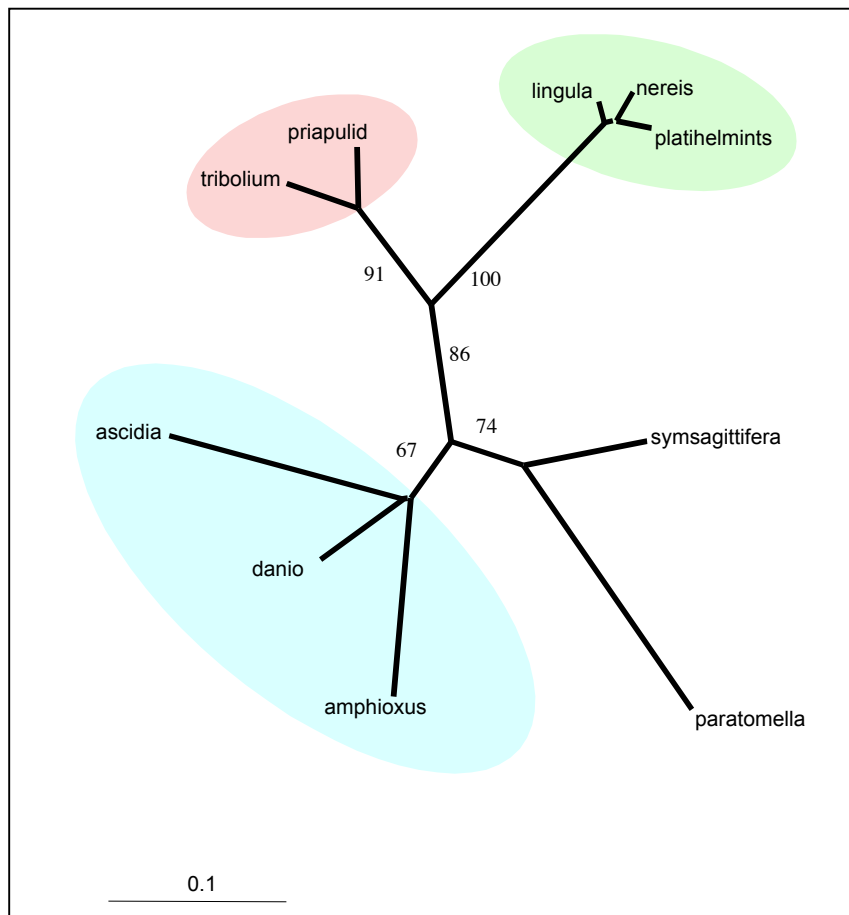
S'han realitzat diferents arbres, que es detallen a continuació. El mètode utilitzat ha estat el Fitch (basat en matrius de distàncies) (veure detalls en l'apartat de Materials i Mètodes, suport informàtic). Les agrupacions s'han fet segons els tres grans grups de bilaterals: encerclats en blau els deuteròstoms, en verd els lofotrocozous i el vermell els ecdisozous. Cal afegir que no són arbres amb arrel, i per tant no es pot determinar basalitat o no. En tot cas, sí que es pot veure amb aquests arbres la posició relativa d'un organisme respecte als diferents grups:



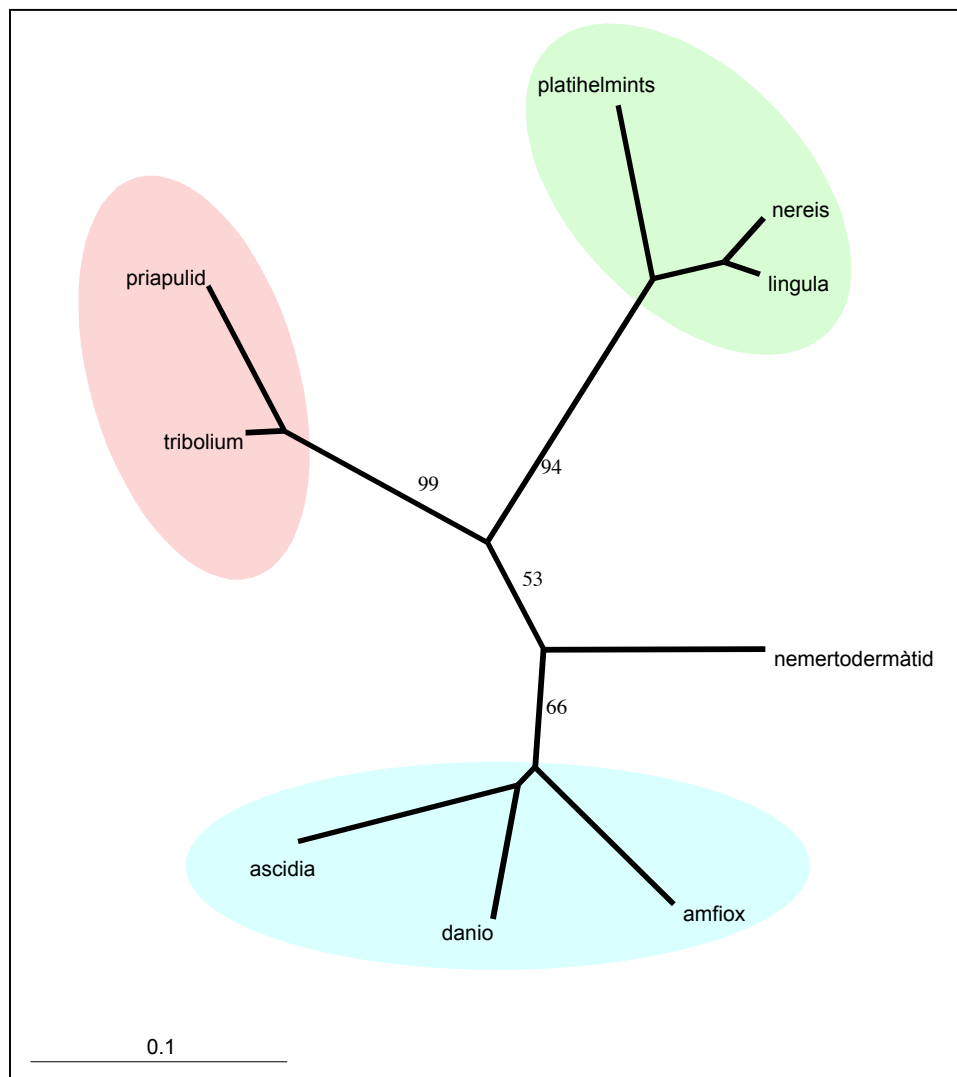
Arbre 1) Sobre l'alineament dels gens *labial* i *posterior* de cada organisme triat del banc de dades amb aquests gens de *Paratomela rubra*, com a exemple d'acel basal. L'acel queda fora de la resta de grups.



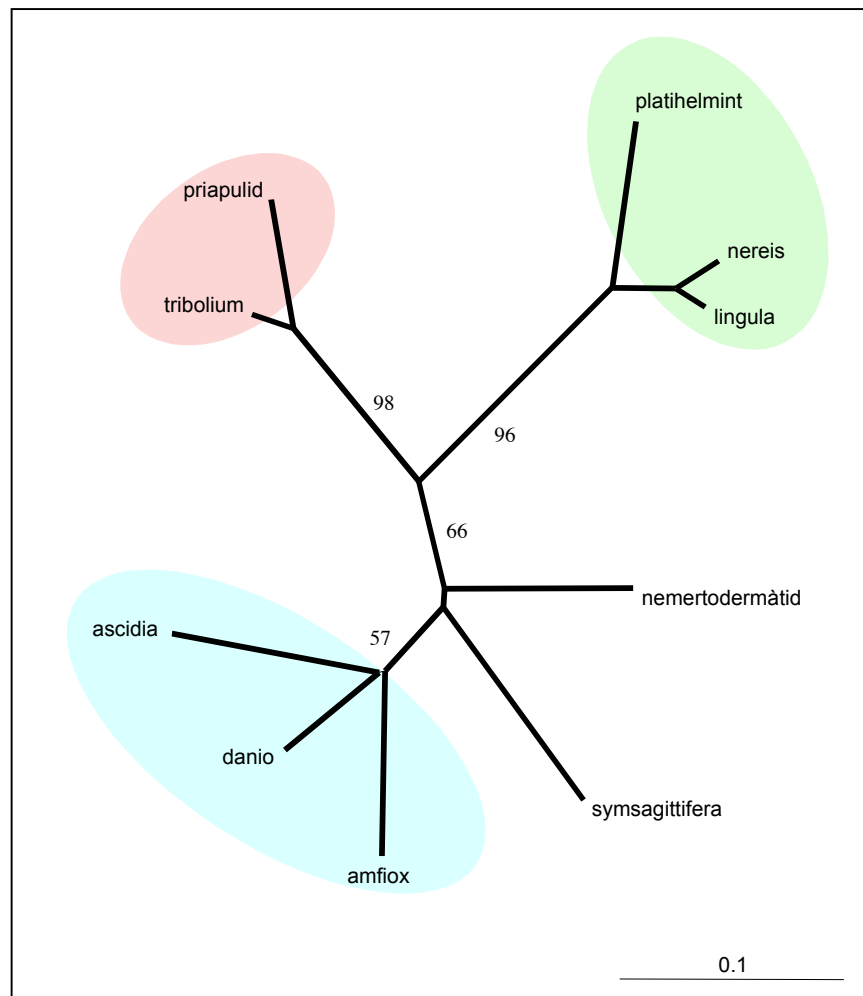
Arbre 2) Sobre l'alineament dels tres gens (*labial*, *central* i *posterior*) de cada organisme triat del banc de dades amb els tres gens de *Symsagittifera roscoffensis*, com a exemple d'acel no basal. Aquest acel també queda fora de la resta de grups.



Arbre 3) Sobre l'alineament dels gens *labial* i *posterior* de cada organisme triat del banc de dades amb aquests gens de *Paratomela rubra* i *Symsagittifera roscoffensis*. No s'han pogut usar les seqüències de l'acel *Neochildia fusca* degut a que aquest no presenta el gen posterior. Però arbres fets amb les seqüències dels gens *anterior* i *central* de *Neochildia fusca* i *Symsagittifera roscoffensis* donen resultats equivalents a aquest. Aquest arbre s'ha fet per confirmar que els dos acels quedaven dins d'un sol grup tot i que un fos basal i l'altre més derivat. En aquest cas els acels queden junts i fora de la resta de grups.



Arbre 4) Sobre l'alineament dels gens *central* i *posterior* de cada organisme triat del banc de dades amb aquests gens del nemertodermàtid *Nemertoderma westbladi*. El nemertodermàtid queda fora de la resta de grups.



Arbre 5) Sobre l'alineament dels gens *central* i *posterior* de cada organisme triat del banc de dades amb aquests gens a *Symsagittifera roscoffensis* i *Nemertoderma westbladi*, per testar la posició del grup Acelomorpha. En aquest cas, tot i que ambdós queden fora de la resta de grups i, fins i tot, junts en un embrancament, no hi ha suport de bootstrap del grup. És a dir, acels i nemertodermàtides queden fora de la resta de grups, però no hi ha suport estadístic pel grup dels acelomorfs. Aquest fet es discutirà a la Discussió General.

Dels diferents arbres realitzats, si bé no es pot afirmar que siguin basals, sí es pot concloure que els acels i nemertodermàtides no estan dins de cap dels grans grups de bilaterals (lofotrocozoous, ecdisozoous ni deuteròstoms). Tot i això, cal posar èmfasi en dir que aquests arbres han estat generats a partir de poques posicions informatives i que, per tant, no són proves finals de la posició filogenètica dels acelomorfs. En aquest sentit, el treball de Cook i col.laboradors (en procés) aporta arbres realitzats sobre concatàmers de seqüències més complertes dels gens *labial*, *central*, *posterior* i *caudal* de *Symsagittifera*

roscofensis que mostren una topologia igual a la dels arbres aquí realitzats. Això prova que aquestes topologies es mantenen a l'augmentar el nombre de residus de l'anàlisi.

CAPÍTOL 6. PROJECTE ESTs DE L'ACEL *SYMSAGITTIFERA ROSCOFFENSIS*.

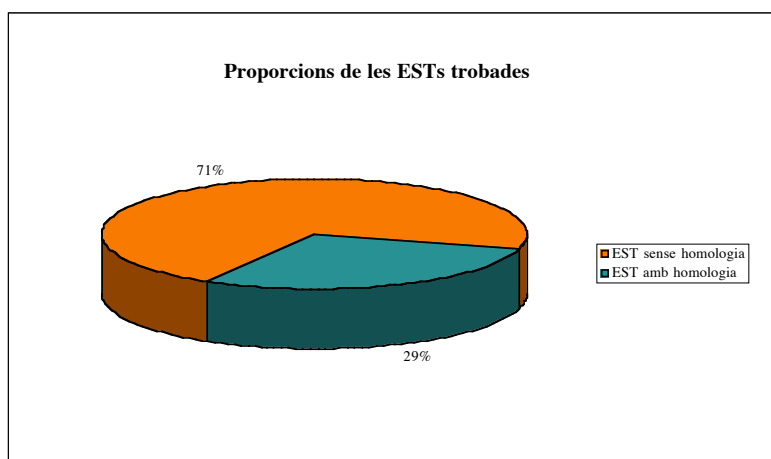
En col.laboració amb el laboratori del Dr. Mark Blaxter en el ICAB a la University of Edinburgh, Regne Unit, es va iniciar un projecte d'ESTs sobre la genoteca d'embrions SMART de *Symsagittifera roscoffensis*. Amb aquest es pretenia generar un nombre elevat de seqüències d'acel, ja que no hi havia fins aleshores un gran *pool* de seqüències conegudes en aquests animals. L'objectiu amb aquestes noves seqüències era de fer anàlisi filogenètiques amb aquelles que fossin informatives, donat que a més gens informatius inclosos en un estudi filogenètic, millors els resultats que es poden obtenir. Passaríem doncs de tenir una desena de gens amb els que tractar el problema que ens ocupa a tenir-ne centenars.

A partir del mateix DNA obtingut per fer la genoteca de cDNA d'embrions que es va crivellar es va fer un nou empaquetament amb un resultat d'uns 1.5 milions de fags. Es van processar més de 2500 fags dels quals es varen seleccionar per mida uns 1100, que van ser seqüenciats. Les seqüències obtingudes es van comparar i es van agrupar, donant un total de 627 *clusters*. Cada *cluster* és el resultat d'empalmar seqüències que s'han demostrat ser del mateix gen en diferents posicions contigües solapants, de manera que s'ha pogut obtenir una seqüència més llarga d'aquell gen. La majoria de *clusters* corresponien a una sola seqüència, si bé és cert que alguns venien de 8, 14, i fins a un màxim de 29 seqüències.

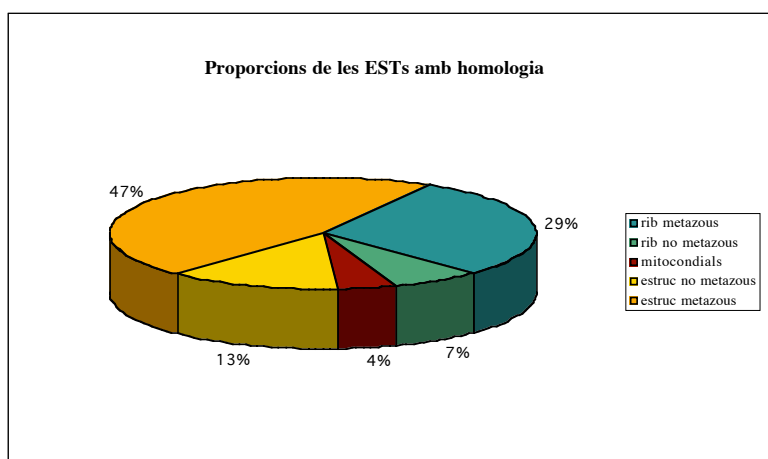
Amb les tècniques informàtiques desenvolupades al laboratori del Dr. Blaxter es poden comparar les seqüències obtingudes de *Symsagittifera roscoffensis* amb dades d'ESTs d'altres organismes que tenen al banc de dades amb una eina anomenada SimiTri (veure Materials i Mètodes). Aquestes anàlisi van conduir a la conclusió que en la nostra genoteca de cDNA hi havia tres poblacions de DNA, provinents de tres organismes diferents: un animal (l'acel), un vegetal (l'alga simbiònt, que tot i no ser present en els embrions dels quals s'havia generat el cDNA sí que ho estava en els pares i en el medi, i podien així quedar adosades en els embrions), i un fong, l'origen del qual no és clar. Tot i això, fent servir aquesta eina, es va poder observar que no hi ha en els gràfics de les dades per les tríades lofotrocozous/ecdisozous/*Symsagittifera roscoffensis*, lofotrocozous/deuteròstom/*Symsagittifera roscoffensis* i ecdisozous/deuteròstom/*Symsagittifera roscoffensis*, cap tendència a agrupar les seqüències de l'acel en un o altre grup dels esmentats.

En el nostre grup de EST, la gran majoria (445 de les 627) no van donar homologia a cap proteïna existent al banc de dades. Aquesta dada no deixa de ser sorprenent si es té en compte que ja hi ha alguns genomes sencers seqüenciats, ja que hauríem de suposar que els gens que hi ha a *Symsagittifera roscoffensis* haurien de ser-hi també, majoritàriament,

a la resta d'organismes. Val a dir, també, que hi havia un gran nombre de seqüències que provenien de les algues i del fong (37 de les 182 que sí donaven homologia). De les seqüències que donaven homologia amb seqüències de metazous o bé a metazous i altres regnes alhora, moltes eren de gens ribosomals, algunes eren gens mitocondrials (*CoxI*, *CoxII*, *CoxIII* i *Cytb*), i la resta (aproximadament la meitat) eren enzims o gens estructurals, però amb baixa representació i baixa homologia per la seqüència del *genebank* en general. La població de les ESTs es descriu als gràfics següents:



Gràfic 1. Proporció de ESTs de *Symsagittifera roscoffensis* que donaven homologia amb gens ja existents al banc de dades (taronja) o que no (verd).



Gràfic 2. Proporcions dins de les ESTs amb homologia. rib metazous: seqüències ribosomals de metazous i altres. rib no metazous: seqüències ribosomals de plantes i/o fongs. mitocondrials: seqüències mitocondrials de metazous. estruc no metazous: seqüències de proteïnes estructurals de plantes i/o fongs. estruc metazous: seqüències de proteïnes estructurals de metazous i altres.

Després d'un crivellatge de totes aquelles seqüències es va decidir de fer un estudi filogenètic basat en aquelles que havien estat seqüenciades prou vegades en diferents animals i que a més estaven formades per un còntig de, pel cap baix, dues seqüències. Amb aquestes característiques quedaven, a més de seqüències que ja s'havien usat en altres estudis per fer filogènia, com ara el 18S o el 28 S, el factor d'elongació 1-alfa i els gens mitocondrials, la β -tubulina, l' α -tubulina 1 i una xaperona. Donat que la màxima homologia de les seqüències que es van trobar en aquests casos eren per seqüències de metazous, vàrem suposar que aquests gens venien del *pool* d'acel, i no de la planta o el fong. D'aquestes proteïnes es van buscar seqüències d'altres animals al banc de dades i es van construir arbres filogenètics. Malauradament, les filogènies obtingudes no van ser correctes, donada no només l'adscripció atípica dels acels, sinó de, de fet, tots els metazous utilitzats. Així doncs, ens vam decantar per fer filogènies també amb d'altres gens, tot i que els còntigs d'aquests comptessin només amb una seqüència. Els gens triats van ser l'actina, la catepsina, la tropomiosina, les histones H4 i H2, i la proteïna 14-3-3. Es van provar amb aquests gens diferents arbres, tant amb amino-àcids com amb nucleòtids, i d'aquests, amb totes les posicions o només amb la primera i la segona. Altra vegada, les filogènies presentaven una topologia no adequada ni tant sols pels grups ja determinats.

D'aquest estudi de les ESTs de l'acel *Symsagittifera roscoffensis* es desprèn que les molècules trobades no són informatives per a fer filogènia, i demostra, altra vegada i com es discuteix a la Discussió General d'aquesta tesi, que no es pot fer servir qualsevol molècula per a fer filogènia, ja que, bé per ser massa conservades, bé per ser-ho massa poc, totes les que s'han intentat han resultat no adients. A més, cal dir també que el que una molècula no resolgui filogènies en el nivell que aquí ens ocupa, no vol dir que no sigui bona per resoldre'n a un altre nivell, i que cada vegada s'ha de tornar a provar aquella molècula si el que ens interessa és resoldre a nivell d'espècie, fílum, o d'altres.

DISCUSSIÓ GENERAL

DOTACIÓ GÈNICA DELS HOX I PARAHOX DELS ACELS

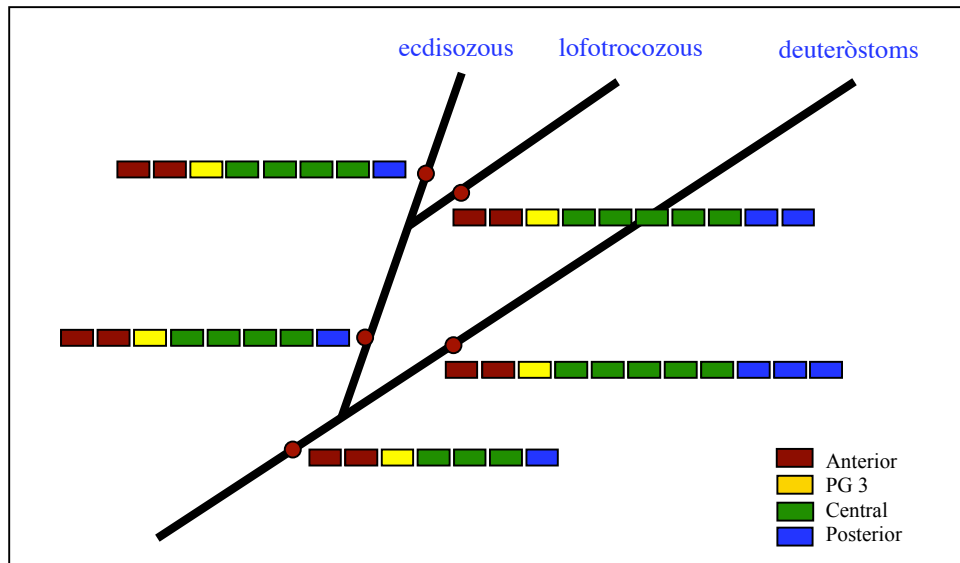


Figura 1. Model proposat per als complexos Hox presents en l'origen dels diferents grups de bilaterals.

La dotació gènica del *cluster* Hox a l'origen dels diferents grups de bilaterals està resumida en la figura 1. Així doncs, tot i que diferents autors han donat diferents quantitats per aquest nombre mínim de gens inicials (de Rosa i col.laboradors, 1999, Kourakis i Martindale, 2000, Balavoine i col.laboradors, 2002), els més petits són els referits a la figura. Com es pot veure, en el cas de l'ancestre comú a protòstoms i deuteròstoms, hi ha al menys set gens en el *cluster* Hox.

Com s'ha exposat en el capítol de Resultats, el nombre de gens Hox i ParaHox trobat en acels i nemertodermàtides és significativament reduït, tot i l'ampli ventall d'oligonucleòtids degenerats utilitzats que permetrien, en principi, amplificar qualsevol tipus de gen Hox. Si es té en compte el trobat en els organismes estudiats en aquest treball, podem veure que la dotació dels acels i nemertodermàtides podria correspondre a la d'un organisme que fos derivat directament d'aquell ancestre comú.

El fet que s'hagi trobat un nombre de gens Hox i ParaHox reduït pot ser degut a diverses raons. Una d'elles és la tècnica, i és evident que fins que no es demostrï lligament entre cada un dels gens trobats i es verifiquin les regions flanquejants d'aquest *cluster* per demostrar que no hi ha més gens no es pot concloure de manera inequívoca que la dotació Hox i ParaHox d'aquests animals és la que es descriu aquí. De fet, seria esperable trobar un representant dels gens Hox corresponents al *PG3* i un dels gens

ParaHox *Gsh*. Cal tenir en compte que s'ha provat que hi pot haver pèrdua gènica en el *cluster* Hox (Aboobaker i col.laboradors (2002) troben pèrdua de gens del *cluster* en el nemàtode *C. elegans*). Tot i això, en el cas que la dotació simple sigui artefactual, s'haurien de trobar altres membres de cada un dels grups de gens com passa en la resta de bilaterals (en el cas anterior dels nemàtodes, per exemple, altres espècies conserven alguns dels gens Hox que ha perdut *C. elegans*). En qualsevol cas, donades les dades que es tenen, i tenint en compte que aproximadament el mateix nombre reduït de gens s'ha trobat a les 4 espècies estudiades d'acel, i similar en la de nemertodermàtid utilitzada, creiem que els nostres resultats apunten a una dotació gènica Hox i ParaHox realment reduïda en els acelomorfs.

Cal esmentar, però, el cas dels dos gens posteriors observats únicament a *Paratomela rubra*. De la comparació de seqüències amb d'altres gens posteriors d'altres bilaterals es desprén que aquests dos podrien provenir d'una duplicació pròpia dins del grup de *Paratomella*, més que no pas correspondre a una situació basal. Aquesta afirmació es fa sobre la base que en els altres acelomorfa estudiats sols hi ha un gen posterior, i, a més, que els dos posteriors de *Paratomela rubra* no corresponen als dos posteriors de lofotrocozous, sinó que són més semblants a ells mateixos que a altres gens posteriors duplicats en altres grups.

Tot i que en els diferents apartats d'aquesta tesi s'ha parlat de tres grups de bilaterals, els deuteròstoms, els lofotrocozous i els ecdisozous, hi ha una tendència a agrupar els lofotrocozous i els ecdisozous en el grup clàssic dels protòstoms. Si bé aquesta classificació tradicional està basada en diferents caràcters que sempre han donat aquesta separació entre deuteròstoms i protòstoms, i aquesta encara es continua utilitzant, cal destacar que els estudis de filogènia molecular encara no han demostrat en cap cas aquesta relació, sinó que sempre agrupen els tres grups de manera politòmica en els arbres (Ruiz-Trillo, comunicació personal).

POSICIÓ FILOGENÈTICA DELS ACELS

Com s'ha després de l'apartat de Resultats d'aquesta tesi, no hi ha a la fi cap prova concloent que dugui a localitzar els acels, ni els nemertodermàtides, inequívocament en l'arbre filogenètic del metazous. No s'ha trobat cap gen que adscrigui aquests a un o altre grup, ja que les seqüències trobades no estan polaritzades (i.e., no tenen característiques d'un o altre grup). Tot i això, els resultats de nombre i tipus de gens Hox i ParaHox que s'han trobat en aquest treball, juntament a altres proves dutes a terme per altres grups investigadors sí mostren una tendència.

Ja s'ha comentat el fet que els grups estudiats només han mostrat una sèrie petita de gens Hox i ParaHox. Si es té en compte la possible història evolutiva d'aquests gens es pot dibuixar una posició basal en el grup dels acelomorfa. Així, si es considera que els gens Hox i ParaHox van aparèixer a partir de la duplicació d'un *cluster* ProtoHox de 4 gens, i que els *clusters* primitius van evolucionar de manera que el Hox va patir una sèrie de duplicacions en els bilaterals, caldrà que s'espera d'un organisme a la base d'aquests que tingui un *cluster* Hox amb una dotació gènica més minsa que als altres grups triblàstics. El model basal, tal i com es descriu ja a la Introducció d'aquesta tesi, proposa que el cluster Hox ancestral, just després de la duplicació del cluster ProtoHox en Hox i ParaHox, consistia de quatre gens (anterior, PG3, central i posterior), així com el ParaHox probablement també presentava quatre gens, tot i que el central s'hauria perdut tempranament en tots els fílums. Tot això ens porta a proposar que donat que els acels i nemertodermàtides tenen una dotació Hox semblant a la proposada com a primitiva, el *cluster* Hox dels acelomorfa correspon a aquell esperable en un animal basal, tal i com es mostra a la figura 2. Noti's que aquesta proposta és perfectament conforme a la separació dels *clusters* abans de la divergència de cnidaris i bilaretals.

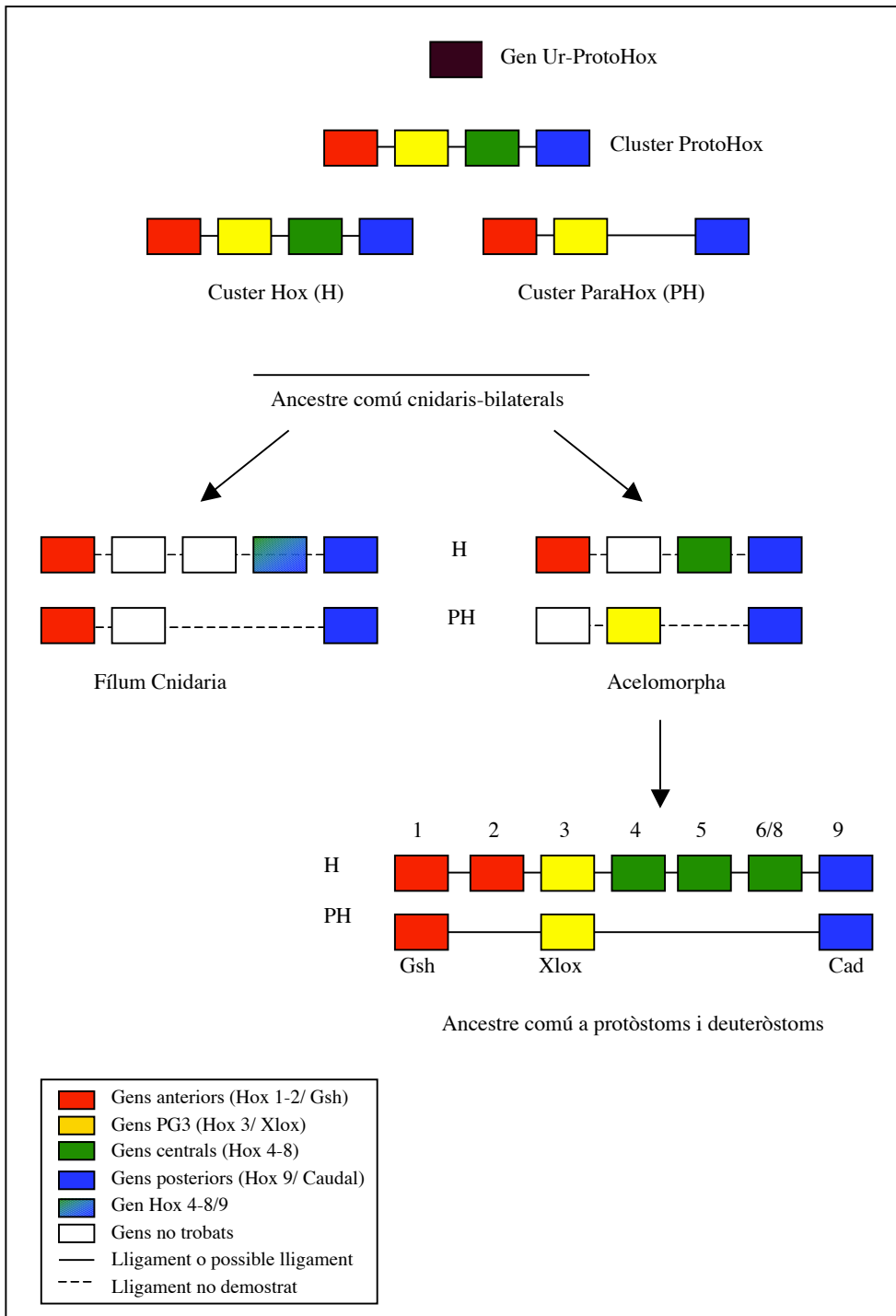


Figura 2. Model proposat d'evolució dels complexos gènics Hox i ParaHox a partir d'un gen ancestral Ur-ProtoHox. Un cop formats els *clusters* Hox i ParaHox, i no abans, es va donar la separació entre diblàstics i triblàstics. Es proposa la dotació gènica dels acelomorfa en el complex Hox com a ancestral a la resta de bilaterals.

Quan es té en compte la seqüència dels gens Hox i ParaHox trobats s'observa una divergència notable dels nemertodermàtides i els acels, si bé els dos es separen de la resta de bilaterals. Aquesta diferència en el que se suposa són grups germans (fet corroborat per les filogènies clàssiques així com per les moleculars (Littlewood i col.laboradors, 2001; Ruiz-Trillo i col.laboradors, 2002)) la justifica el fet que només una espècie de nemertodermàtid ha estat subjecte d'estudi, podent esbiaixar els resultats. A més, cal tenir en compte que el fet que acels i nemertodermàtides siguin grups germans no ha d'implacar necessàriament que tinguin una història evolutiva comuna massa llarga. Així, suposant que realment fossin el grup germà de la resta de bilaterals, pot ser que poc després de la separació d'aquests i els acelomorfs, aquests últims també se separessin, corrent històries evolutives diferents. Si això fos així, el temps abans de la divergència d'acels i nemertodermàtides no hauria estat prou gran com perquè certes molècules prenguessin caràcters comuns i diferents de la resta de bilaterals, o si fou així, el temps de divergència posterior ha estat prou gran com per tornar a perdre els caràcters comuns. Aquest punt de vista també explicaria certes diferències morfològiques dramàtiques entre acels i nemertodermàtides, com ara l'estructura del cervell, els espermatozous, etc. Tot i això, en aquest estudi s'ha observat que hi ha una sèrie de residus aminoacídics que agrupen acels i nemertodermàtides, i no la resta de bilaterals, com es subratlla en capítol 5 de l'apartat de Resultats i Discussió.

Cal dir que la petita col.lecció de gens Hox a acels i nemertodermàtides trobada en aquest treball podria ser fruit d'una més gran homologia dels *primers* utilitzats pels gens trobats, però també cal destacar que en els tres laboratoris dels que es té constància s'hagin buscat els Hox d'acels s'ha trobat la mateixa baixa representació de gens (i no de classes de gens) tot i usar diferents tècniques i oligonucleòtids. Així doncs, es pot interpretar aquesta poca quantitat de gens com a representació de la característica basal de la dotació Hox a acels. És evident, però, que el fet que els acels tinguin un nombre baix de gens Hox podria ser una característica derivada. El fet que el grup germà dels acels, els nemertodermàtides, tinguin també la mateixa mena de dotació apunta més a que aquesta sigui la situació basal i no la derivada. No obstant, si es trobés una dotació més gran a la actualment descrita, aquesta no seria prova suficient per dir que els acelomorfa no són basals, ja que l'ancestre comú a protòstoms i deuteròstoms, com s'ha exposat, se suposa dotat de set gens Hox.

També cal veure el tipus de gens Hox i ParaHox que s'observen en els animals a estudi. A la Introducció s'ha dit que hi ha una sèrie de residus característics a diferents gens Hox que permeten incloure aquell gen dins del grup dels lofotrocozous o dels ecdisozous. En els fragments de gens que s'han trobat en aquesta tesi no hi ha els llocs

més inequívocament informatius, com ara l'*spiralian peptide* de l'*antennapedia* lofotrocozou o l'*ubx peptide* dels protòstoms. Ara bé, sí que s'han pogut comparar les seqüències d'acels i nemertodermàtides amb les d'altres bilaterals, i aquesta comparació ha demostrat que, amb els petits fragments dels que es compta, no hi ha cap argument a favor d'una major adscripció dels acelomorfs dins els lofotrocozous que en els altres grups. És més, en alguns casos els residus aminoacídics d'acels estaven més relacionats amb els d'ecdisozous que amb els lofotrocozous. Així doncs, altre cop es deriva d'aquesta observació que els acels podrien estar a la base dels bilaterals, ja que comparteixen característiques diferents amb els tres grups de bilaterals. A més, amb els arbres realitzats amb els concatàmers de les seqüències de gens Hox trobades es veu que els acels i els nemertodermàtides queden sempre fora de qualsevol dels tres grups de bilaterals. Al no ser arbres amb arrel no es pot concloure res sobre basalitat. Cal recordar que els arbres s'han fet sobre una regió curta i que hi ha pocs residus informatius, però tot i això el suport estadístic és prou gran. Estudis filogenètics realitzats amb altres molècules han mostrat també una relació parafilètica entre acels i nemertodermàtides (Ruiz-Trillo i col.laboradors, 1999; Jondelius i col.laboradors, 2001). El fet que els nemertodermàtides i els acels no quedin monofilètics en l'anàlisi amb un suport estadístic suficient està en consonància amb allò explicat anteriorment en aquesta Discussió sobre la possible curta història evolutiva comuna que han tingut aquests dos grups.

De l'estudi de les ESTs obtingudes també es deriva que alguns dels gens que s'han demostrat provenir dels acels no tenen més afinitat amb els de lofotrocozous que amb els ecdisozous o deuteròstoms, quedant tan allunyades de les seqüències d'uns com dels altres. Així, si bé no s'ha pogut comptar amb seqüències de gens filogenèticament massa informatius (bé perquè eren gens massa conservats, bé per tot el contrari), si que de l'anàlisi dels *clusters* (o còntigs) d'acel s'ha pogut inferir que, en global, no es mostra cap tendència clara que pugui agrupar els acels en un o altre grup.

Fins aquí les proves indirectes que aquest treball pot aportar en la discussió sobre la posició filogenètica dels acels. Val a dir, però, que els treballs portats a terme amb altres molècules i altres característiques validen aquests resultats, alhora que tots en conjunt aporten més força al posicionament basal dels acels.

1. Ruiz-trillo i col.laboradors, 1999. Aporten la primera prova molecular sobre la qual basar la posició primitiva dels acels: el 18S. Com ja s'ha comentat en la introducció, en aquest estudi l'acel *Paratomela rubra* era el que se situava a la base dels bilaterals en fer una filogènia basada en la molècula del 18S. El problema d'aquest

estudi fou que els nemertodermàtides no quedaven agrupats amb els acels, cosa que feia que no es veiés aquesta filogènia com a gaire fiable des del punt de vista d'alguns autors.

2. Henry i col.laboradors, 2000. Estudis sobre el clivellament de l'acel *Neochildia fusca* demostren que els acels tenen un patró de clivellament espiral molt especial, formant duets enlloc de quartets de micròmers. Aquest tipus de desenvolupament també s'ha observat en els políclads, si bé és cert que encara hi ha diferències entre aquests dos tipus de clivellament. A destacar l'existència d'un tipus de larva de Müller en els políclads, inexistent en els acels. En qualsevol cas, el clivellament en duets separa una mica més els acels de la resta de lofotrocozous.

3. Jondelius i col.laboradors, 2001. Altre cop es fa una filogènia amb la molècula del 18S, amb noves seqüències de nemertodermàtides. Aquest cop els acels i els nemertodermàtides apareixen junts a la base dels bilaterals. A més, es dóna una possible raó del perquè els nemertodermàtides a Ruiz-Trillo i col.laboradors, 1999 no quedessin amb els acels, ja que la seqüència d'aquell primer nemertodermàtid no queda junt amb la dels nous aportats ara. Es va determinar que la seqüència del primer article era una contaminació, bé la seqüència en ella mateixa o bé per una mala classificació de l'animal del qual es va extreure el RNA. Tot i que acels i nemertodermàtides quedaven agrupats de forma parafilètica, els detractors del primer treball amb 18S de Ruiz-Trillo i col.laboradors van haver d'admetre que aquest cop els contres a l'estudi eren molt menors.

4. Ruiz-Trillo i col.laboradors, 2002. Presenten aquest cop un treball basat en la molècula de la cadena pesada de la miosina tipus II. En aquest, els acels i els nemertodermàtides no només tornen a aparèixer a la base, sinó que, a més, ho fan formant un grup monofilètic.

5. Pasquinelli i col.laboradors, 2003. En el seu treball sobre la presència del stRNA (small temporal RNA) *let-7* en un ampli nombre d'organismes troben que aquest RNA de 22 nucleòtids s'expressa a tots els grups de bilaterals estudiats (entre els quals es troben deuterostomats (vertebrats, urocordats, hemicordats i equinoderms), ecdisozous (artròpodes i nemàtodes) i lofotrocozous (mol.luscs, anèlids, nemertins i platihelminths, entre els quals trícclads i políclads) i quetoagnats) excepte en els acels (dels quals s'han testat tres espècies de dues famílies diferents), i a cap grup dels diblàstics estudiats (cnidaris, ctenòfors i porífers).

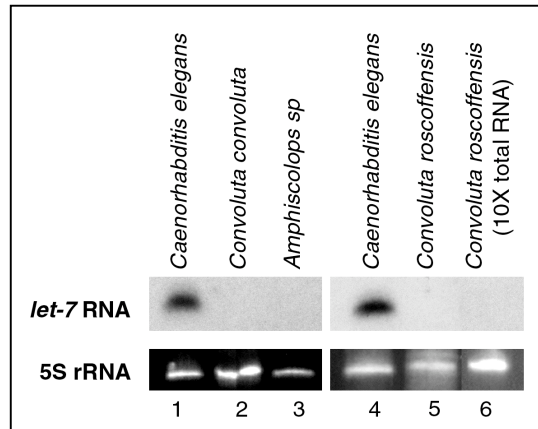


Figura 3. Detecció del RNA de *let-7* per *Northern*. Noti's que en els carrils control per *C. elegans* (1 i 4) hi ha expressió de *let-7*, com es dona a tots els bilaterals que s'han estudiat, i no així els diblàstics sotmesos a estudi. En tots els acels estudiats no hi ha expressió de *let-7* (carrils 2, 3, 5 i 6), si bé el control positiu (5S rRNA) si s'expressa. Pasquinelli i col.laboradors, en premsa.

6. Cook i col.laboradors, treball en procés. En l'estudi de gens *Hox*, trobat un gen posterior quasi complert de l'acel *Symsagittifera roscoffensis*, aquest és més semblant als gens dels PG9/10 de deuteròstoms que no pas als *Abd-B* a ecdisozous ni a *Post 1* o *Post 2* de lofotrocozous, i talment diferent a qualsevol dels gens dels dos grups de protòstoms. També es pot comprovar que aquest gen és més semblant a aquells de bilaterals que no pas als de cnidaris.

A més, cal tenir en compte les característiques morfològiques típiques d'acels i nemertodermàtides, ja presentades a l'introducció, que no comparteixen amb d'altres platihelminths. El fet que els acelomorfa no tinguin les sinapomorfies típiques dels platihelminths els allunya, també, d'aquest grup.

Tots aquests treballs en conjunt aporten una sèrie més amplia d'evidències, i cal mirar aquest conjunt per veure que hi ha diverses proves que ens duen a pensar que, efectivament, els acels no són platihelminths i estan dins els lofotrocozous sinó que, per contra, són organismes a la base dels bilaterals. Així proposem un arbre filogenètic com el que es mostra a la figura 4.

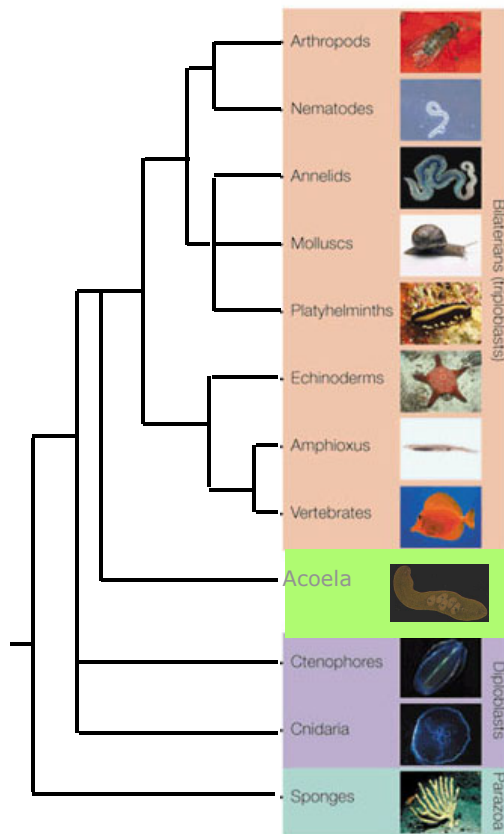


Figura 4. Possible posició filogenètica dels acels a la base dels bilaterals. Modificat de Ferrier i Holland, 2001.

Hi ha altres grups que han intentat refutar aquestes proves, sobretot les basades en filogènia molecular a partir dels gens 18S, com és el treball de Berney i col.laboradors amb el factor d'elongació $1-\alpha$ (2000) (veure també Littlewood i col.laboradors, 2001 per una crítica al de Berney). Cal tenir en compte que hi ha moltes molècules amb les quals es pot fer filogènia, però que algunes no són bones per resoldre els arbres en el nivell que aquí s'està plantejant. Cal veure, doncs, que per estudiar a nivell de famílies d'organismes es necessiten molècules diferents a les que es fan servir per estudiar a nivell d'espècie, i aquestes són diferents a les que resolen a nivell de fílum. Com que la disciplina de la filogènia molecular és relativament nova cal anar amb compte amb errors d'aquests tipus, o de voler imposar una filogènia basada en una molècula per sobre d'una altra. No només cal tenir clar que cal escollir bé les seqüències que es trien, sinó que a més quantes més molècules s'usin per fer un arbre filogenètic major és la informació que es té, i per tant, millor pot ser l'arbre. Entrar en una lluita per l'"hegemonia" d'una molècula no té cap mena de sentit i va en contra de qualsevol pensament científic. S'ha de fer, doncs, una filogènia amb el major nombre de molècules possibles, ja que això trenca amb el soroll de fons que les molècules per separat poden donar segons la seva història evolutiva.

L'EXPLOSIÓ CÀMBRICA I ELS GENS HOX

La visió que hi ha de l'explosió càmbrica, les seves raons, i el paper dels gens Hox en ella és un tema controvertit, o, si més no, hi ha diferents punts de vista. En aquell moment apareixen una sèrie de formes moltes de les quals no es conserven després d'aquesta explosió. S'ha postulat que aquella explosió de formes que va succeir al principi del Càmbric va tenir a veure amb l'adquisició de gens Hox. Tot i això, cal no perdre de vista que s'ha determinat que en el moment històric en el que es dona l'explosió càmbrica hi va haver canvis en la química del mar i en els corrents (Knoll i Carrol, 1999) i, així mateix, hi va haver canvis ecològics per fets com ara l'increment de la predació macroscòpica i una més eficient alimentació per filtració (Conway Morris, 2000).

L'estudi dels gens Hox i la seva evolució ha portat a la conclusió que no ha estat l'aparició d'aquests el que va donar lloc a la gran diversitat de formes que es troben a partir de fa 540 Ma en el registre fòssil. Ja a la separació dels llinatges dels Cnidaris i els bilaterals existien no només els gens Hox primitius o ProtoHox, sinó que ja hi havia dos *clusters* de gens, el Hox i el ParaHox, cadascun amb al menys 4 gens (Ferrier i Holland, 2001). Així doncs, no va ser el fet que els animals adoptessin aquest conjunt de gens el que els va donar la possibilitat d'adquirir noves formes (García-Fernández i col.laboradors, 1994, referint-se a vertebrats). A més, diferents proves han dut a concloure que hi ha dos moments cabdals en l'evolució dels bilaterals abans de la explosió càmbrica: l'evolució del llinatge primigeni que va dur a l'aparició de l'Urbilateria o ancestre comú a protòstoms i deuteròstoms (PDA) i la diversificació dels tres clades principals dins dels bilaterals (Knoll i Carroll, 1999). En aquests dos moments el tipus de gens Hox que existien ja eren els que es troben actualment, i tal i com s'ha mostrat a la figura 1 de la Discussió, els ancestres a cada un dels grups de bilaterals ja tenien una dotació Hox més àmplia. Així doncs, cal buscar un motiu diferent a l'aparició dels gens Hox per explicar la gran diversificació a l'origen del Càmbric. Cal no perdre de vista l'ecologia i la selecció natural per trobar una explicació a aquest *boom*.

En la Introducció d'aquesta tesi s'ha comentat la funció i manera com els gens Hox i els que amb ells estan relacionats poden regular estructures a diferents nivells, no només els canvis fins en les estructures corporals sinó també canvis dràstics que donin formes diferents en diferents organismes. En un moment on les condicions ecològiques del medi no canviaven, les mutacions en el genoma podien tendir a no quedar fixades, ja que els individus amb l'innovació no eren seleccionats positivament, i simplement la seva mutació quedava diluïda a l'infinit entre tot el *pool* genètic envoltant. Si

s'esdevingués un canvi que portés associat un avantatge per aquells que tinguessin la mutació, aquest passaria a ser seleccionat positivament i, per tant, fixar-se en la població en un temps relativament curt. A més nínxols ecològics més formes possibles per ocupar-los. Quantes més formes possibles apareguin més n'apareixeran per mirar de millorar la primera i ocupar el nínxol que aquella ocupa. És clar que moltes de les formes primeres que apareguin duraran poc, desplaçades per d'altres mínimament millors. És per això que en el registre fòssil en l'estrat de l'explosió càmbrica hi ha un nombre tan elevat de formes que no s'han conservat en els fílums actuals, ja que després d'un temps curt de prova es van demostrar funcionalment no prou bones. Fos quina fos la raó que va disparar les formes a l'explosió càmbrica, aquesta no va ser l'existència dels gens Hox. El que va fer reaccionar els organismes bilaterals de forma explosiva sí que va poder tenir a veure amb el nombre d'aquests gens, però en qualsevol cas hi va haver una raó que va fer que la possessió d'aquell major nombre de gens fos selectivament avantatjosa. El que sí cal dir és que en el llinatge dels vertebrats, per exemple, la duplicació del *cluster* Hox (dues vegades, complet o no) va correlacionat amb l'aparició d'unes estructures noves i molt avantatjoses. Aquest fet dona força a l'afirmació que l'increment en el nombre de gens Hox pot anar lligat a major complexitat morfològica (tot i que, evidentment, no sempre una duplicació comporta una millora evolutiva, com s'han donat casos en artròpodes, amfibis o platihelminths, on aquestes duplicacions són silencioses). El mètode pel qual es dona aquest increment passaria per bé una adquisició de noves funcions especificant, per exemple, nous territoris (com és el cas de la reutilització dels Hox posteriors per la formació de les extremitats en els vertebrats), bé per la possibilitat de generar nous gens (per mutació d'un dels primitius amb l'adquisició de noves funcions), bé d'altres.

COM ERA EL BILATERAL PRIMITIU?

Bàsicament dues són les visions que hi ha sobre la forma del bilateral primitiu (revisat darrerament per Davidson i Erwin, 2002). La primera propugna un animal essencialment similar en complexitat als bilaterals actuals, ja amb moltes estructures característiques diferenciades, en el que s'hi distingeixen un celoma, segmentació, sistema nerviós i cavitat gàstrica complexa i, fins i tot, apèndixs. Els defensors d'aquesta teoria es basen en la conservació de les xarxes gèniques per determinar aquestes estructures al llarg dels diferents fílums. Defensen que si els diferents fílums usen els mateixos gens per construir estructures complexes, aquesta estructura ja devia existir en l'ancestre. La segona proposa un ancestre molt més senzill, sense segmentació, sense celoma i amb poques o cap estructura externa clarament especialitzada, així com uns sistemes poc desenvolupats. A favor d'aquesta teoria hi ha les dades paleontològiques, ja que un organisme complex com el que els primers proposen hauria de deixar fàcilment

traces en el registre fòssil, dades que no apareixen en els estrats de l'època on se suposa hauria aparegut l'ancestre bilateral. De fet, aquest registre mostra que hi ha un augment de complexitat progressiu en el temps dins del llinatge dels bilaterals. Per decidir quina de les dues propostes és més plausible caldria trobar aquell animal que fos més semblant a aquells primers bilaterals entre els metazous existents actualment. Alguns autors, però, argumenten que pot ser que no es trobi cap animal existent actualment que compleixi aquesta característica de basalitat a la que ens referim. Tot i això, com s'ha proposat al llarg d'aquesta tesi, hi ha proves que apunten a que hi ha un grup que ocupa aquesta posició basal. Si, com és el parer dels autors d'aquest treball i dels autors d'altres descrits en el segon punt d'aquesta Discussió, els acels fossin els representants vius d'allò que més s'assembla als primers bilaterals, es podria inferir que aquell ancestre triblàstic devia ser simple, i la complexitat trobada en molts dels fílums actuals seria una característica derivada. Aquesta mena d'evolució explicaria més fàcilment el pas dels organismes radials als bilaterals, ja que d'un organisme radial és més fàcil que en derivi un de morfològicament senzill que un molt complexe, donat l'estructura simple dels radials. Si es mira el registre fòssil, la manca de formes complexes en l'origen dels bilaterals, i el fet que sí que s'hagin trobat formes semblants a larves plànules de cnidaris o similars a acels (Conway Morris, 1998), dóna força a aquesta possibilitat d'un ancestre senzill. A més, determinar que una estructura és homòloga a una altra perquè els gens que la defineixen són els mateixos i basar-se en això per decidir que el primer bilateral fou complex és, si més no, no evident. Així, que un gen tingui capacitat per regular-ne d'altres de manera que es pugui fer una xarxa gènica per desenvolupar una estructura, això no vol dir que aquella estructura hagi de ser ancestral. Els gens poden ser presents en l'ancestre, i l'afinitat d'uns gens i altres que farà que actuïn com una xarxa també, però l'estructura pot no ser present pel simple fet que pot ser que en origen aquella estructura no fos necessitada. En el moment que aquella estructura augmenti la *fitness* dels organismes (i de ben segur quan una estructura es avantatjosa en un determinant hàbitat aquesta ho és per tots o la majoria dels organismes que l'habiten), serà quan els gens que tenen compartits actuaran de manera semblant per generar una estructura semblant.

Un altre punt que ha causat molta controvèrsia és quina mena de desenvolupament és el primitiu en els bilaterals, el directe (aquell que es desenvolupa sense fases intermitges entre l'embrió i la forma juvenil de la forma reproductiva) o l'indirecte (aquell en el que es troba al menys una fase larvària entre l'embrió i la forma reproductiva). Molts diferents grups de metazous presenten una fase larvària, i aquests grups estan distribuïts tot al llarg de l'arbre filogenètic. Tant a ecdisozous (com seria el cas d'hexàpodes) com a lophotrocozous (políclads, mol.luscs,...) i deuteròstoms (equinoderms, urocordats), moltes són les formes de les diferents larves que es poden

trobar. Alguns autors han considerat que un fenòmen tan extès en les diferents branques dels bilaterals ha de ser un caràcter primitiu. Altres, no obstant, han usat la disparitat de formes en els diferents tipus de larves com a prova que no provenen tots d'un ancestre comú, i, per tant, es tracta d'un caràcter derivat convergent. També cal dir que el desenvolupament directe està així mateix extès a tots els grups. Si, en el cas que ens ocupa, els acels fossin els bilaterals primitius, donat que tant ells com el seu grup germà, els nemertodermàtides, tenen desenvolupament directe, i si en aquests grups aquesta és la característica primitiva (bastant provable ja que els dos grups comparteixen aquest tret), això podria voler dir que, en origen, el desenvolupament dels bilaterals fou directe, i que, en tot cas, després es van desenvolupar els diferents tipus de larves en els grups que les tenen. La principal raó que es pot donar per aquesta aparició de larves secundàriament podria ser, altre cop, medioambiental i ecològica.

CONCLUSIONS

Del treball realitzat es conclou que:

- 1) En els acels estudiats s'ha trobat una dotació gènica Hox i ParaHox simple:
 - *Symsagittifera roscoffensis* té representants dels gens Hox anteriors, centrals, i posteriors, que s'han anomenat **CrLab**, **CrCentral** i **CrPost** respectivament. Així mateix té un ParaHox posterior que s'ha anomenat **CrCad**.
 - A *Paratomela rubra* s'han trobat un representant dels Hox anteriors, anomenat **PrHoxI**, i dos Hox posteriors, anomenats **PrPost-I** i **PrPost-II**. Així mateix té un representant dels ParaHox posteriors anomenat **PrCad**.
 - *Neochildia fusca* compta amb dos gens Hox, un anterior (**NfLab**) i un central (**NfCentral**), així com amb un gen ParaHox de tipus posterior (**NfCad**).

- 2) En el representant de nemertodermàtides estudiat (*Nemertoderma westbladi*) s'ha observat una dotació gènica Hox i ParaHox petita, on es troben dos gens Hox de tipus central (**NemCentral-I** i **NemCentral-II**) i un de tipus posterior (**NemPost**), i un gen ParaHox central (**NemXlox**) i un posterior (**NemCad**).

De 1) i 2) inferim que l'existència d'un nombre reduït de gens Hox similar al proposat com a ancestral en tipus i nombre de gens per diversos models, junt amb evidències independents de filogènia molecular amb d'altres molècules que suporten la posició basal dels acels, suggereix que el complement Hox caracteritzat a acels i nemertodermàtides es podria considerar basal.

- 3) De l'alineament d'aquestes seqüències es desprén que els gens Hox d'acels i nemertodermàtides no són més semblants a lofotrocozous que a ecdisozous o deuteròstoms. Els arbres filogenètics construïts a partir d'aquestes seqüències corroboren que acels i nemertodermàtides són fora de la resta de grups de bilaterals.

- 4) Les ESTs de *Symsagittifera roscoffensis* semblen no mostrar més afinitat per seqüències de lofotrocozous que per aquelles d'ecdisozous.

From our work we conclude:

1) In the Acoela subject of study we have found a simple Hox and ParaHox complement:

- *Symsagittifera roscoffensis* has representatives of the anterior, central and posterior Hox genes which we have named **CrLab**, **CrCentral** and **CrPost** respectively. It also has a posterior ParaHox gene that we have named **CrCad**.
- In *Paratomela rubra* we have found one representative of the anterior Hox genes, named **PrHoxI**, and two posterior Hox genes, named **PrPost-I** and **PrPost-II**. We have also found one representative of the posterior ParaHox genes, which has been named **PrCad**.
- *Neochildia fusca* has two Hox genes, an anterior (**NfLab**) and a central one (**NfCentral**), as well as a posterior ParaHox gene (**NfCad**).

2) Within the Nemertodermatida species (*Nemertoderma westbladi*) we have found a small Hox and ParaHox complement with two central type Hox genes (**NemCentral-I** i **NemCentral-II**) and a posterior one (**NemPost**), as well as a central (**NemXlox**) and a posterior (**NemCad**) ParaHox genes.

From 1) and 2) we infer the existence of a reduced number of Hox genes, similar to the proposed as the ancestral complement in different models in terms of number and type of genes. In addition, independent molecular phylogeny evidence also support the basal position of acoels, suggesting that the Hox complement characterised in acoels and nemertodermatids could be considered basal.

3) From the alignment of these sequences one can see that both acoela and nemertodermatida Hox and ParaHox genes are as similar to lophotrocozoan genes as to ecdysozoan or deuterostoms. From the phylogenetic trees built from those sequences we conclude that acoels and nemertodermatids are outside of the three major bilaterian clades.

4) The *Symsagittifera roscoffensis* ESTs show no more affinity for the lophotrocozoan sequences than for those of ecdysozoans.

BIBLIOGRAFIA

- Aboobaker, A. A. and M. Blaxter. 2003. Hox gene loss during dynamic evolution of the nematode cluster. *Current Biology* **13**: 37-40.
- Adoutte, A. 2000. Evolutionary biology. Small but mighty timekeepers. *Nature* **408**: 37-38.
- Adoutte, A., G. Balavoine, N. Lartillot, and R. de Rosa. 1999. Animal evolution. The end of the intermediate taxa? *Trends Genet* **15**: 104-108.
- Adoutte, A., G. Balavoine, N. Lartillot, O. Lespinet, B. Prud'homme, and R. de Rosa. 2000. The new animal phylogeny: reliability and implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 4453-4456.
- Adoutte, A. and E. Boncinelli. 2000. Genomes and evolution. Editorial overview. *Curr Opin Genet Dev* **10**: 593-595.
- Aguinaldo, A.M., J.M. Turbeville, L.S. Linford, M.C. Rivera, J.R. Garey, R.A. Raff, and J.A. Lake. 1997. Evidence for a clade of nematodes, arthropods and other moulting animals. *Nature* **387**: 489-493.
- Ax, P. 1996. Multicellular animals: A new approach to the phylogenetic order in nature. Springer-Verlag, Berlin.
- Babbitt, C., M. Giorgianni, and A. Price. 2002. Evo-devo comes into focus. *Bioessays* **24**: 677-679.
- Baguña, J., I. Ruiz-Trillo, J. Paps, and M. Riutort. 2002. Origen y evolución de los ejes corporales y la simetría bilateral en animales. In *Evolución. La base de la Biología* (ed. M. Soler).
- Balavoine, G. 1997. The early emergence of platyhelminths is contradicted by the agreement between 18S rRNA and Hox genes data. *C R Acad Sci III* **320**: 83-94.
- Balavoine, G. 1998. Are Platyhelminthes coelomates without a coelom? An argument based on the evolution of Hox genes. *American Zoologist* **38**: 843-858.
- Balavoine, G. and A. Adoutte. 1998. One or three cambrian radiations? *Science* **280**: 387-398.
- Balavoine, G., R. de Rosa, and A. Adoutte. 2002. Hox clusters and bilaterian phylogeny. *Mol Phylogenet Evol* **24**: 366-373.
- Bayascas, J.R. 1998. Estudi comparatiu de gens reguladors del desenvolupament: Caracterització de gens amb Homeobox del complex Hox i de la família OTX a planàries. *Tesi Doctoral*.
- Bayascas, J.R., E. Castillo, and E. Salo. 1998. Platyhelminthes have a hox code differentially activated during regeneration, with genes closely related to those of spiralian protostomes. *Developmental Genes and Evolution* **208**: 467-473.

- Berney, C., J. Pawlowski, and L. Zaninetti. 2000. Elongation factor 1-alpha sequences do not support an early divergence of the Acoela. *Mol Biol Evol* **17**: 1032-1039.
- Boyer, B.C., J.J. Henry, and M.Q. Martindale. 1998. The cell lineage of a polyclad turbellarian embryo reveals close similarity to coelomate spiralian. *Dev Biol* **204**: 111-123.
- Brooke, N.M., J. Garcia-Fernandez, and P.W. Holland. 1998. The ParaHox gene cluster is an evolutionary sister of the Hox gene cluster. *Nature* **392**: 920-922.
- Bush, L.F. 1981. Marine Flora and Fauna of the Northeastern United States. Turbellaria: Acoela and Nemertodermatida. *NOAA Technical Report NMFS*.
- Cameron, R.A., K.J. Peterson, and E.H. Davidson. 1998. Developmental gene regulation and the evolution of large animal body plans. *American Zoologist*: 609-620.
- Carroll, S. 1995. Homeotic genes and the evolution of arthropods and chordates. *Nature* **376**: 479-486.
- Cavalier-Smith, T., M. Allsopp, E. Chao, and N. Boury-Esnault. 1996. Sponge phylogeny, animal monophyly, and the origin of the nervous system: 18S rRNA evidence. *Canadian Journal of Zoology* **74**: 2031-2045.
- Conway Morris, S. 2000. The Cambrian "explosion": slow-fuse or megatonnage? *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 4426-4429.
- Conway-Morris, S. 1998. Metazoan phylogenies: falling into place or falling into pieces? A palaeontological perspective. *Current Opinion in Genetics and Development* **8**: 662-557.
- Cook, C. E., E. Jiménez, M. Akam and E. Saló. Submitted. The Hox gene complement of Acoel flatworms, a basal bilaterian clade. *PNAS*
- Cook, C.E., M.L. Smith, M.J. Telford, A. Bastianello, and M. Akam. 2001. Hox genes and the phylogeny of the arthropods. *Curr Biol* **11**: 759-763.
- Davidson, E.H., K.J. Peterson, and R.A. Cameron. 1995. Origin of bilaterian body plans: evolution of developmental regulatory mechanisms. *Science* **270**: 1319-1325.
- de Rosa, R. 2001. Molecular data indicate the protostome affinity of brachiopods. *Syst Biol* **50**: 848-859.
- de Rosa, R., J.K. Grenier, T. Andreeva, C.E. Cook, A. Adoutte, M. Akam, S.B. Carroll, and G. Balavoine. 1999. Hox genes in brachiopods and priapulids and protostome evolution. *Nature* **399**: 772-776.
- Douglas, A.E. 1983. Establishment of the symbiosis in *Convoluta roscoffensis*. *J. mar. biol. Ass. U.K.*: 419-434.

- Ehlers, U. 1992. On the fine structure of *Paratomella rubra* Rieger & Ott (Acoela) and the position of the taxon *Paratomella* Dörjes in a phylogenetic system of the Acelomorpha (Plathelminthes). *Microfauna Marina*: 265-293.
- Ferrier, D.E. and P.W. Holland. 2001. Ancient origin of the Hox gene cluster. *Nat Rev Genet* **2**: 33-38.
- Ferrier, D.E. and P.W. Holland. 2001. Sipunculan ParaHox genes. *Evol Dev* **3**: 263-270.
- Ferrier, D.E. and P.W. Holland. 2002. *Ciona intestinalis* ParaHox genes: evolution of Hox/ParaHox cluster integrity, developmental mode, and temporal colinearity. *Mol Phylogenet Evol* **24**: 412-417.
- Finnerty, J.R. and M.Q. Martindale. 1998. The evolution of the Hox cluster: insights from outgroups. *Curr Opin Genet Dev* **8**: 681-687.
- Finnerty, J.R. and M.Q. Martindale. 1999. Ancient origins of axial patterning genes: Hox genes and ParaHox genes in the Cnidaria. *Evol Dev* **1**: 16-23.
- Fortey, R.A., D.E.G. Briggs, and M.A. Wills. 1997. The Cambrian evolutionary "explosion" recalibrated. *BioEssays* **19**: 429-434.
- Galliot, B. 2000. Conserved and divergent genes in apex and axis development of cnidarians. *Curr Opin Genet Dev* **10**: 629-637.
- Garcia-Fernández, J. 1992. Aïllament, caracterització i anàlisi de l'expressió temporal i espacial de gens amb homeobox en planaries. *Tesi Doctoral*.
- Garcia-Fernandez, J. and P.W. Holland. 1994. Archetypal organization of the amphioxus Hox gene cluster. *Nature* **370**: 563-566.
- Gauchat, D., F. Mazet, C. Berney, M. Schummer, S. Kreger, J. Pawlowski, and B. Galliot. 2000. Evolution of Antp-class genes and differential expression of Hydra Hox/paraHox genes in anterior patterning. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 4493-4498.
- Gellon, G. and W. McGinnis. 1998. Shaping animal body plans in development and evolution by modulation of Hox expression patterns. *Bioessays* **20**: 116-125.
- Georgévitch, J. 1899. Étude sur le développement de la *Convoluta roscoffensis* Graff. *Arch. Zool. Exptl. Gén.*: 343-361.
- Gilbert, S.F. 2000. *Developmental Biology* (ed. I. Sinauer Associates).
- Giribet, G., D.L. Distel, M. Polz, W. Sterrer, and W.C. Wheeler. 2000. Triploblastic relationships with emphasis on the acoelomates and the position of Gnathostomulida, Cycliophora, Plathelminthes, and Chaetognatha: a combined approach of 18S rDNA sequences and morphology. *Syst Biol* **49**: 539-562.

Halanych, K.M., J.D. Bacheller, A.M. Aguinaldo, S.M. Liva, D.M. Hillis, and J.A. Lake. 1995. Evidence from 18S ribosomal DNA that the lophophorates are protostome animals. *Science* **267**: 1641-1643.

Hall, B.K. 2000. Evo-devo or devo-evo--does it matter. *Evol Dev* **2**: 177-178.

Henry, J.Q., M.Q. Martindale, and B.C. Boyer. 2000. The unique developmental program of the acoel flatworm, *Neochildia fusca*. *Developmental Biology* **220**: 285-295.

Holland, P.W. 1999. The future of evolutionary developmental biology. *Nature* **402**: C41-44.

Holland, P.W. 1999. Gene duplication: past, present and future. *Semin Cell Dev Biol* **10**: 541-547.

Holland, P.W. 2001. Beyond the Hox: how widespread is homeobox gene clustering? *J Anat* **199**: 13-23.

Holligan, P.M. and G.W. Gooday. 1975. Symbiosis in *Convoluta roscoffensis*. .

Hooge, M.D., P.A. Haye, S. Tyler, M.K. Litvaitis, and I. Kornfield. 2002. Molecular systematics of the Acoela (Acoelomorpha, Platyhelminthes) and its concordance with morphology. *Mol Phylogenet Evol* **24**: 333-342.

Jeffery, W.R. 2001. Cavefish as a model system in evolutionary developmental biology. *Dev Biol* **231**: 1-12.

Jessop, N.M. 1990. Zoologia Invertebrados (ed. I.-MacGraw- Hill).

Jessop, N.M. 1991. Zoologia Vertebrados (ed. I.-MacGraw-Hill).

Keeble, F. 1910. Plant-Animals. A study in symbiosis (ed. C.U. Press), Cambridge.

Knoll, A.H. and S.B. Carroll. 1999. Early animal evolution: emerging views from comparative biology and geology. *Science* **284**: 2129-2137.

Kobayashi, M., H. Furuya, and P.W. Holland. 1999. Dicyemids are higher animals. *Nature* **401**: 762.

Kourakis, M.J. and M.Q. Martindale. 2000. Combined-method phylogenetic analysis of Hox and ParaHox genes of the metazoa. *J Exp Zool* **288**: 175-191.

Kuhn, K., B. Streit, and B. Schierwater. 1999. Isolation of Hox genes from the scyphozoan *Cassiopeia xamachana*: implications for the early evolution of Hox genes. *J Exp Zool* **285**: 63-75.

Littlewood, D.T., P.D. Olson, M.J. Telford, E.A. Herniou, and M. Riutort. 2001. Elongation factor 1-alpha sequences alone do not assist in resolving the position of the acoela within the metazoa. *Mol Biol Evol* **18**: 437-442.

Long, S. and M. Byrne. 2001. Evolution of the echinoderm Hox gene cluster. *Evol Dev* **3**: 302-311.

Lundin, L.G. 1999. Gene duplications in early metazoan evolution. *Semin Cell Dev Biol* **10**: 523-530.

Martindale, M.Q., J.R. Finnerty, and J.Q. Henry. 2002. The Radiata and the evolutionary origins of the bilaterian body plan. *Mol Phylogenet Evol* **24**: 358-365.

Martindale, M.Q. and M.J. Kourakis. 1999. Hox clusters. Size doesn't matter. *Nature* **399**: 730-731.

Muscatine, L., J.E. Boyle, and D.C. Smith. 1974. Symbiosis of the acoel flatworm *Convoluta roscoffensis* with the alga *Platymonas convolutae*. *Proceedings of the Royal Society of London*: 221-234.

Papillon, D., Y. Perez, L. Fasano, Y.L. Parco, and X. Caubit. 2003. Hox gene survey in the chaetognath *Spadella cephaloptera*: evolutionary implications. *Development Genes and Evolution*.

Pasquinelli, A.E., A. McCoy, E. Jiménez, E. Salo, G. Ruvkun, M.Q. Martindale, and J. Baguña. In press. Expression of the 22 nucleotide *let-7* heterochronic RNA throughout the Metazoa: A role in life history evolution? *Evolution and Development*.

Pasquinelli, A.E., B.J. Reinhart, F. Slack, M.Q. Martindale, M.I. Kuroda, B. Maller, D.C. Hayward, E.E. Ball, B. Degnan, P. Muller, J. Spring, A. Srinivasan, M. Fishman, J. Finnerty, J. Corbo, M. Levine, P. Leahy, E. Davidson, and G. Ruvkun. 2000. Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature* **408**: 86-89.

Pennisi, E. 2002. Evolutionary biology. Evo-devo enthusiasts get down to details. *Science* **298**: 953-955.

Peterson, K.J., R.A. Cameron, and E.H. Davidson. 1997. Set-aside cells in maximal indirect development: evolutionary and developmental significance. *Bioessays* **19**: 623-631.

Peterson, K.J., R.A. Cameron, and E.H. Davidson. 2000. Bilaterian origins: significance of new experimental observations. *Dev Biol* **219**: 1-17.

Peterson, K.J. and D.J. Eernisse. 2001. Animal phylogeny and the ancestry of bilaterians: inferences from morphology and 18S rDNA gene sequences. *Evol Dev* **3**: 170-205.

Provasoli, L., T. Yamasu, and I. Manton. 1968. Experiments on the resynthesis of symbiosis in *Convoluta roscoffensis* with different flagellate cultures. *J. mar. biol. Ass. U.K.*: 465-479.

Raff, R.A. 2000. Evo-devo: the evolution of a new discipline. *Nat Rev Genet* **1**: 74-79.

Reuter, M., O.I. Raikova, and M.K.S. Gustafsson. 1998. An endocrine brain? The pattern of FMRF-amide immunoreactivity in Acoela (Platyhelminthes). *Tissue & cell* **30**: 57-63.

Rieger, R. and P. Ladurner. 2001. Searching for the stem species of the Bilateria. *Belgian Journal of Zoology* **131 (Supl. 1)**: 27-34.

Rieger, R.M. 1994. The biphasic life cycle- A central theme of metazoan evolution. *American Zoologist*: 484-491.

Ruiz-Trillo, I. 2002. Acels i nemertodermàtides: bilaterals basals o Platihelminths? Aproximació multigènica a l'origen dels metazous bilaterals. *Tesi Doctoral*.

Ruiz-Trillo, I., J. Paps, M. Loukota, C. Ribera, U. Jondelius, J. Baguna, and M. Riutort. 2002. A phylogenetic analysis of myosin heavy chain type II sequences corroborates that Acoela and Nemertodermatida are basal bilaterians. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 11246-11251.

Ruiz-Trillo, I., M. Riutort, D.T. Littlewood, E.A. Herniou, and J. Baguna. 1999. Acoel flatworms: earliest extant bilaterian Metazoans, not members of Platyhelminthes. *Science* **283**: 1919-1923.

Saló, E., J. Tauler, E. Jimenez, J.R. Bayascas, J. Gonzalez-Linares, J. Garcia-Fernández, and J. Bagaña. 2001. Hox and ParaHox genes in flatworms: Characterisation and expression. *American Zoologist*: 652-663.

Sambrook, J., E. Frisch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A laboratory manual* (ed. C.S.H.L. press).

Sampedro, J. 2002. *Deconstruyendo a Darwin* (ed. Critica), Barcelona.

Sarkar, I.N., J.W. Thornton, P.J. Planet, D.H. Figurski, B. Schierwater, and R. DeSalle. 2002. An automated phylogenetic key for classifying homeoboxes. *Mol Phylogenet Evol* **24**: 388-399.

Schierwater, B. and R. Desalle. 2001. Current problems with the zootype and the early evolution of Hox genes. *J Exp Zool* **291**: 169-174.

Schummer, M., I. Scheurlen, C. Schaller, and B. Galliot. 1992. HOM/HOX homeobox genes are present in hydra (*Chlorohydra viridissima*) and are differentially expressed during regeneration. *Embo J* **11**: 1815-1823.

Tabin, C.J. and R.L. Johnson. 2001. Developmental biology: clocks and hox. *Nature* **412**: 780-781.

Tauler, J. 2000. Organització genòmica i expressió de gens amb "Homeobox" tipus Hox a políclads. *Tesi Doctoral*.

- Telford, M.J. 2000. Turning Hox "signatures" into synapomorphies. *Evol Dev* **2**: 360-364.
- Valentine, J.W. 1997. Cleavage patterns and the topology of the metazoan tree of life. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 8001-8005.
- Valentine, J.W., D.H. Erwin, and D. Jablonski. 1996. Developmental evolution of metazoan bodyplans: the fossil evidence. *Dev Biol* **173**: 373-381.
- Valentine, J.W., D. Jablonski, and D.H. Erwin. 1999. Fossils, molecules and embryos: new perspectives on the Cambrian explosion. *Development* **126**: 851-859.
- Weiss, J.B, T. Von Ohlen, D.M. Mellerick, G. Dressler, C.Q. Doe and M.P. Scott. 1998. Dorsoventral patterning in the Drosophila central nervous system: the intermediate neuroblasts defective homeobox gene specifies intermediate column identity. *Genes Dev* **12**:3591-602
- Wolpert, L. 1999. From egg to adult to larva. *Evol Dev* **1**: 3-4.
- Wray, G.A. and E. Aqbouheif. 1998. When is homology not homology? *Current Opinion in Genetics and Development* **8**: 675-680.
- Yanze, N., J. Spring, C. Schmidli, and V. Schmid. 2001. Conservation of Hox/ParaHox-related genes in the early development of a cnidarian. *Dev Biol* **236**: 89-98.
- Zrzavy, J., S. Mihulka, P. Kepka, A. Bezdek, and D. Tietz. 1998. Phylogeny of the metazoa based on morphological and 18S ribosomal DNA evidence. *Cladistics* **14**: 249-285.