

La importància del temps en la construcció dels organismes

Discurs de presentació de Cristina Pujades Corbi
com a membre numerària de la Secció de Ciències
Biològiques, llegit el dia 17 de juny de 2024



Institut
d'Estudis
Catalans

SECCIÓ
DE CIÈNCIES
BIOLÒGIQUES

La importància del temps
en la construcció
dels organismes

La importància del temps en la construcció dels organismes

Discurs de presentació de Cristina Pujades Corbi
com a membre numerària de la Secció de Ciències
Biològiques, llegit el dia 17 de juny de 2024

Barcelona, 2024



Institut
d'Estudis
Catalans

SECCIÓ
DE CIÈNCIES
BIOLÒGIQUES

Biblioteca de Catalunya. Dades CIP

Pujades Corbi, Cristina, autor

La Importància del temps en la construcció dels organismes. - Primera edició

Bibliografia

ISBN 9788499657479

I. Institut d'Estudis Catalans. Secció de Ciències Biològiques. II. Títol

1. Biologia del desenvolupament 2. Cicle cel·lular 3. Cronobiologia

57.017.6

57.034

© Cristina Pujades Corbi

© 2024, Institut d'Estudis Catalans, per a aquesta edició

Carrer del Carme, 47. 08001 Barcelona

Primera edició: juny de 2024

Disseny de la coberta: Azcunce | Ventura

Edició: Flor Edicions, SL

Imprès a Sistemes

ISBN: 978-84-9965-747-9

Dipòsit Legal: B 11637-2024

DOI: 10.2436/10.1500.17.2



Aquesta obra és d'ús lliure, però està sotmesa a les condicions de la llicència pública de Creative Commons. Es pot reproduir, distribuir i comunicar l'obra sempre que se'n reconegui l'autoria i l'entitat que la publica i no se'n faci un ús comercial ni cap obra derivada. Es pot trobar una còpia completa dels termes d'aquesta llicència a l'adreça: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es/deed.ca>.

Life is a symbiotic and cooperative union that allows those who associate to succeed.

Lynn MARGULIS

Des de la formulació de la teoria de la relativitat, els físics tenen una comprensió del temps raonablement bona. En canvi, els biòlegs encara estem esperant una teoria completa del temps en els sistemes vius que ens permeti descriure com les cèl·lules i els organismes poden iniciar i acabar processos precisos en moments determinats. Aquesta manca és particularment visible en la biologia del desenvolupament, en què, per resoldre el gran repte de construir un organisme amb tots els seus òrgans i tipus cel·lulars diferents a partir d'una sola cèl·lula, l'òvul fecundat o zigot, s'han de coordinar mecanismes complexos de diversos ritmes i durades (Duboule, 2003). De fet, el desenvolupament animal no és més que temps. Des del cicle cel·lular fins a l'activitat neuronal, la nostra vida es compon d'una multitud d'oscil·lacions microscòpiques i moleculars. El rellotge animal està format per una varietat de mecanismes de recompte que segueixen regles temporals diferents en diverses freqüències i sovint funcionen en paral·lel sense cap interacció aparent. L'objectiu del rellotge del desenvolupament no és simplement marcar el temps, sinó integrar i unificar la infinitat de senyals temporals rebuts de tot l'organisme. En general, ignorem les regles temporals que regeixen aquesta transformació.

Per poder estudiar el temps en biologia es requereix poder-lo afegir com una quarta dimensió (4D) a les tres dimensions que ocupen els teixits i els òrgans en l'espai, i això ha estat difícil durant molts anys. Només hem pogut començar a somiar que seríem capaces de fer-ho amb el desenvolupament relativament recent de les tècniques d'imatge en viu d'alta resolució, unit a l'augment remarcable de la capacitat de computació i la generació d'algoritmes matemàtics que ens permeten extreure el coneixement biològic a partir de la informació obtinguda de les dades d'imatge

d'alt rendiment. Aquest progrés ens permet aprendre a mirar diferent. L'avenç científic sempre va íntimament lligat al desenvolupament tecnològic.

M'agradaria, doncs, compartir algunes reflexions sobre qüestions que considero importants quant a la biologia del desenvolupament i que encara no hem resolt. Com es construeix un òrgan amb la seva complexitat en tres dimensions? Com es generen els diferents destins cel·lulars dins d'aquest òrgan? Com es passa d'una seqüència de DNA que codifica pels gens a la generació de la forma —la morfogènesi? Aquestes, i altres preguntes fonamentals en la construcció dels òrgans i els organismes tenen implícit un factor, el **temps**. Quina és la funció del temps en tots aquests processos? Actualment, la nostra feina està enfocada a entendre quina és la importància del temps en la construcció del cervell embrionari, per poder generar un òrgan funcional amb els circuits neuronals correctes. Probablement, molts dels mecanismes estaran conservats, no només en diferents teixits, sinó també en diferents espècies, ja que —com s'ha demostrat prèviament— els mecanismes fonamentals per a la construcció dels organismes es conserven en l'evolució. Per tant, allò que entenguem en el nostre model ens permetrà anar molt més enllà del cervell.

LA CONSTRUCCIÓ DEL CERVELL EMBRIONARI, UN MODEL EN 4D ON ESTUDIAR EL FACTOR TEMPS

Per intentar respondre a les qüestions esmentades anteriorment, utilitzem com a sistema model el cervell embrionari, concretament el romboencèfal. En els vertebrats, el cervell embrionari està format per tres vesícules que donen lloc a estructures adultes amb funcions determinades. La vesícula més posterior o romboencèfal dona lloc al tronc cerebral i al cerebel, responsables del control de funcions vitals per a l'individu com la respiració, el ritme cardíac, la circulació sanguínia o la coordinació motora. Per les seves funcions fisiològiques importants, el romboencèfal és la part del cervell més conservada en l'evolució, des de les llamprees —agnats, els vertebrats més primitius— fins als humans (Figura 1) (Murakami *et al.*, 2001; Jiménez-Guri i Pujades, 2011). Aquesta conservació ens permet, a partir dels resultats obtinguts en organismes model com en el nostre cas el peix zebra, inferir els processos i mecanismes emprats en organismes més sofisticats, com ara els humans. El cas és que, com a biòloga, no tinc una visió gaire antropocèntrica de la recerca científica i m'interessa més la diversitat. Com hem acabat treballant en peix zebra deixant el ratolí o passant efímerament pels embrions de pollet, amniotes que han estat utilitzats com a sistemes model per tants grups? Doncs perquè les particularitats del peix zebra ens permeten combinar la genètica i l'edició genòmica amb la imatge en viu d'alta resolució i, per tant, intentar adreçar el factor temps.

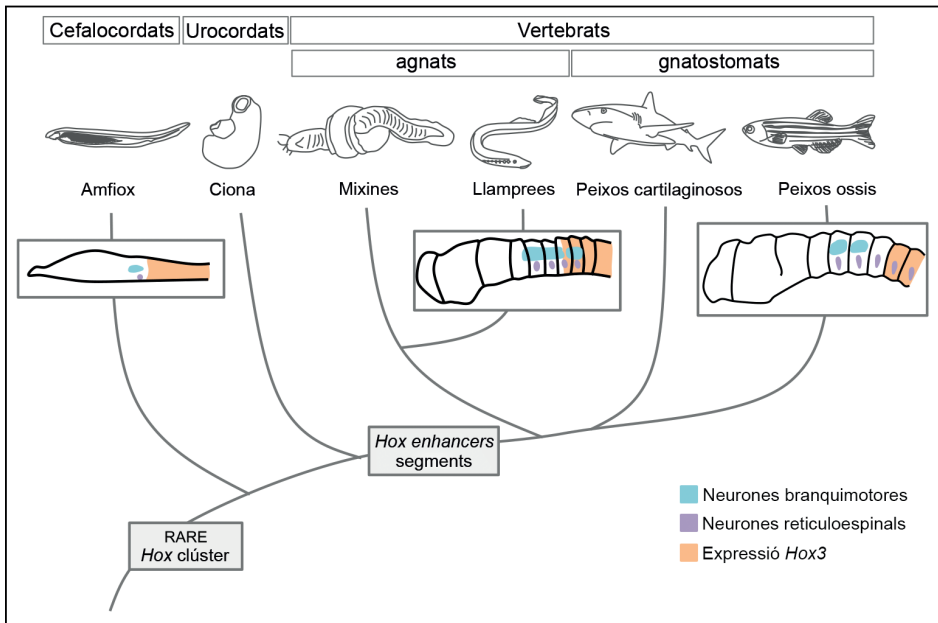


FIGURA 1. Filogènia de vertebrats que indica el possible ancestre de la segmentació del romboencèfal i de l'expressió dels gens *Hox* en segments. Escenari hipotètic de l'evolució del romboencèfal. Els romboencèfals d'amfiox, llamprea i peixos ossis estan emmarcats, i mostren els rombòmers amb la distribució de les motoneurones (blau), les neurones reticuloespinals (lila) i l'expressió de *Hox3* (carbassa). Les caixes en gris indiquen els caràcters adquirits en cada moment del llinatge evolutiu, com els *enhancers* que controlen l'expressió en segments dels gens *Hox*, i els elements de resposta a l'àcid retinoic (RARE) en el clúster *Hox*. Modificat de C. Pujades, 2020, i A. Voltes, manuscrit de tesi, 2018.

El cervell embrionari constitueix un model atractiu per estudiar la generació de la diversitat neuronal, l'organització d'aquestes neurones en circuits funcionals específics i la funció del factor temps en aquests processos, ja que experimenta canvis molt importants en un període temporal relativament curt. El romboencèfal pateix un procés morfogènètic anomenat segmentació en l'eix anteroposterior, que comporta la formació de set segments o metàmers anomenats rombòmers, que són unitats d'expressió gènica i compartiments de llinatge cel·lular. És a dir, cada rombòmer expressa una combinatòria de gens única i genera llinatges cel·lulars específics que no es barregen entre ells (Figura 2). Aquest procés de segmentació estableix el patró estereotipat d'especificació neuronal i governa la morfogènesi craniofacial. Un cop formats els segments, a la interfase entre rombòmers s'especifica una població cel·lular especialitzada, les cèl·lules frontera (Figura 2). Des

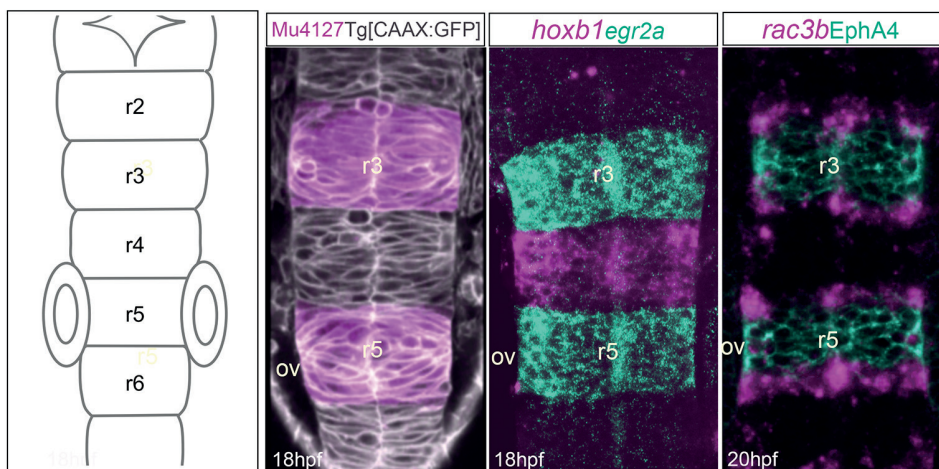


FIGURA 2. **Procés de segmentació del romboencèfal en l'embrió de peix zebra.** Esquema d'un romboencèfal durant el procés de segmentació al llarg de l'eix anteroposterior. Imatges del romboencèfal d'embrions als estadis del desenvolupament indicats amb els marcatges corresponents dalt de cada imatge. Mu4127 és una línia transgènica que marca els rombòmers 3 i 5, mentre que Tg[CAAX:GFP] és una línia transgènica que permet veure les membranes plasmàtiques de totes les cèl·lules. *hoxb1* està només expressat a r4, i *egr2a* a r3 i r5; *rac3b* s'expressa en les cèl·lules de la frontera entre rombòmers, i EphA4 a r3 i r5; r, rombòmer; hpf, hores després de la fertilització; ov indica la posició de la vesícula òtica. Imatges dorsals amb anterior cap dalt.

dels anys 1990, diversos grups de recerca hem estat capaços de construir un coneixement col·lectiu i desxifrar els gens responsables de la formació del patró o *patterning* del romboencèfal; és a dir, com aquest cervell embrionari es regionalitza al llarg dels eixos anteroposterior i dorsoventral seguint unes pautes temporals molt precises perquè les cèl·lules mare o progenitores identifiquin quin lloc ocupen en l'espai i, per tant, puguin saber el seu destí cel·lular i la seva funció ulterior (Krumlauf i Wilkinson, 2021). També hem après que la segmentació i la formació del patró estan coordinades en el temps.

LES DIFERENTS FUNCIONS DE LES CÈL·LULES FRONTERA AL LLARG DEL TEMPS: UN EXEMPLE DE *TINKERING*

Un dels primers descobriments que ens van portar a reflexionar sobre la funció del temps en el desenvolupament va ser observar que les cèl·lules a la interfase entre rombòmers, les cèl·lules frontera, tenien funcions diferents segons el

moment en què les estudiàvem (Figura 3). Durant molts anys es va considerar que les cèl·lules frontera entre dos rombòmers eren cèl·lules relativament estàtiques que proliferaven poc, i en desconeixíem la funció. Tanmateix, ara sabem que l'escenari és més complex perquè hem descobert que aquestes cèl·lules són capaces de desplegar funcions diferents que se superposen parcialment en el temps. Els estudis en viu durant un període de temps determinat —en els quals s'enregistra el comportament de totes les cèl·lules del romboencèfal en termes de proliferació, diferenciació cel·lular i adquisició del destí cel·lular—, ens van permetre descobrir que una mateixa estructura desplega diferents funcions atenent el moment del desenvolupament en què es trobava. A mesura que hem incorporat el concepte de temps en els nostres estudis, hem après que és un factor determinant, malgrat que encara no sabem com les cèl·lules són capaces d'interpretar el pas del temps.

En primer lloc, quan es generen els metàmers o rombòmers, les cèl·lules frontera actuen com a barrera mecànica perquè les cèl·lules dels rombòmers veïns que es divideixen activament es mantinguin segregades. Aquesta extensa proliferació cel·lular desafia contínuament els límits de la frontera, ja que les que hi són properes envaeixen el territori adjacent quan estan en mitosi; però una vegada la mitosi ha acabat, les cèl·lules filles tornen al seu rombòmer d'origen, tot evitant que els diferents llinatges cel·lulars es barregin. Per tant, les fronteres actuen de barreres cel·lulars elàstiques per prevenir la barreja de llinatges cel·lulars diferents (Calzolari *et al.*, 2014; Letelier *et al.*, 2018). En el peix zebra, aquesta funció es deu a l'enriquiment d'estructures d'actomiosina a la membrana apical de les cèl·lules frontera —com passa als compartiments de *Drosophila*—, que generen tensió en aquesta capa cel·lular i la converteixen en una mena de malla elàstica.

Durant la primera fase de neurogènesi, quan les cèl·lules dels rombòmers comencen a especificar-se en neurones expressant els gens proneurals, les cèl·lules frontera romanen com a cèl·lules progenitores i es comporten com un node de senyalització que instrueix la diferenciació i l'organització de les neurones dels rombòmers veïns (Riley *et al.*, 2004; Cooke i Moens, 2002). En aquesta etapa, mentre les cèl·lules frontera secreten molècules de senyalització, totes les cèl·lules del cervell es divideixen i canvien de posició relativa a causa de la morfogènesi del ventricle cerebral i al desplaçament que tenen les neurones quan es diferencien. Així, les cèl·lules progenitores veïnes s'enfronten a un repte a l'hora de calcular la informació posicional, indispensable per saber-ne la identitat cel·lular i, per tant, generar les estructures neuronals estereotipades.

Una mica més tard, les cèl·lules frontera actuen com a mecanosensores, ja que responen a senyals mecànics que tradueixen en senyals bioquímics en activar la via de senyalització Yap/Taz-TEAD. Aquesta senyalització manté les cèl·lules frontera com un *pool* de progenitors proliferatius, per tal d'equilibrar la proliferació i la diferenciació en el teixit (Voltes *et al.*, 2019). I finalment, les cèl·lules frontera, que en

aquests primers estadis havien estat reservoris de cèl·lules mare, entren en neurogènesi i donen lloc a neurones que permeten refinar els circuits neuronals que s'estan establint (Voltes *et al.*, 2019; Hevia *et al.*, 2022; Peretz *et al.*, 2016).

Aquests diferents treballs mostren que una mateixa estructura té distintes funcions en diferents temps del desenvolupament embrionari. Una vegada que la funció no és necessària, es reassigna una nova funció a la mateixa estructura. Podem considerar aquestes diferents propietats funcionals de les cèl·lules frontera com una qüestió de *tinkering*, un concepte descrit per François Jacob en els anys 1970 (Jacob, 1977). Segons François Jacob, «Evolution does not produce novelties from scratch. It works on what already exists, either transforming a system to give it new functions or combining several systems to produce a more elaborated one». És a dir, l'evolució no genera novetats funcionals a partir del no-res —en el seu cas parlava de noves funcions gèniques—, sinó que les novetats es generen a partir d'unitats ja existents en el genoma a les quals s'atorga una nova funció. Funciona sobre allò que ja existeix, ja sigui transformant un sistema per donar-li noves funcions o combinant diversos sistemes per produir-ne un de més elaborat. El mateix passa amb les fronteres del cervell embrionari: una vegada han acabat de fer una funció, es reutilitzen i es readapten per fer-ne una altra (Figura 3) (Pujades, 2020).

L'ASINCRONIA EN L'ADSCRIPCIÓ DE LA CAPACITAT NEUROGÈNICA

Una de les preguntes que encara no hem respost és com les cèl·lules mare perden la seva multipotencialitat i s'especifiquen en diferents destins durant el desenvolupament embrionari. El zigot dona lloc a totes les cèl·lules de l'organisme, i a mesura que aquestes es van dividint i el desenvolupament avança, perden la capacitat de donar tipus cel·lulars diferents. Per tant, un altre moment en el qual el temps té una funció clau durant el desenvolupament del cervell embrionari és l'adquisició de la capacitat neurogènica per diferents grups de cèl·lules mare, ja que implica que no podran donar lloc a cap altre tipus cel·lular diferent. La neurogènesi s'inicia per l'expressió del gens proneurals, factors de transcripció bHLH, que desencadenen l'especificació dels llinatges neuronals afavorint la sortida del cicle cel·lular i activant la cascada de gens de diferenciació (Guillemot, 2007). Els gens proneurals s'expressen en dominis similars al llarg de l'eix anteroposterior del romboencèfal, però aquests dominis canvien al llarg del temps. A més, la seva expressió difereix al llarg de l'eix dorsoventral de manera que es generen diferents poblacions de precursors neuronals caracteritzats per l'expressió de conjunts específics de factors de transcripció. La identitat assignada depèn de la ubicació dels progenitors en el tub neural i de la interpretació de la seva posició al llarg dels eixos anteroposterior i dorsoventral, que determinarà el destí neuronal final. Un cop els

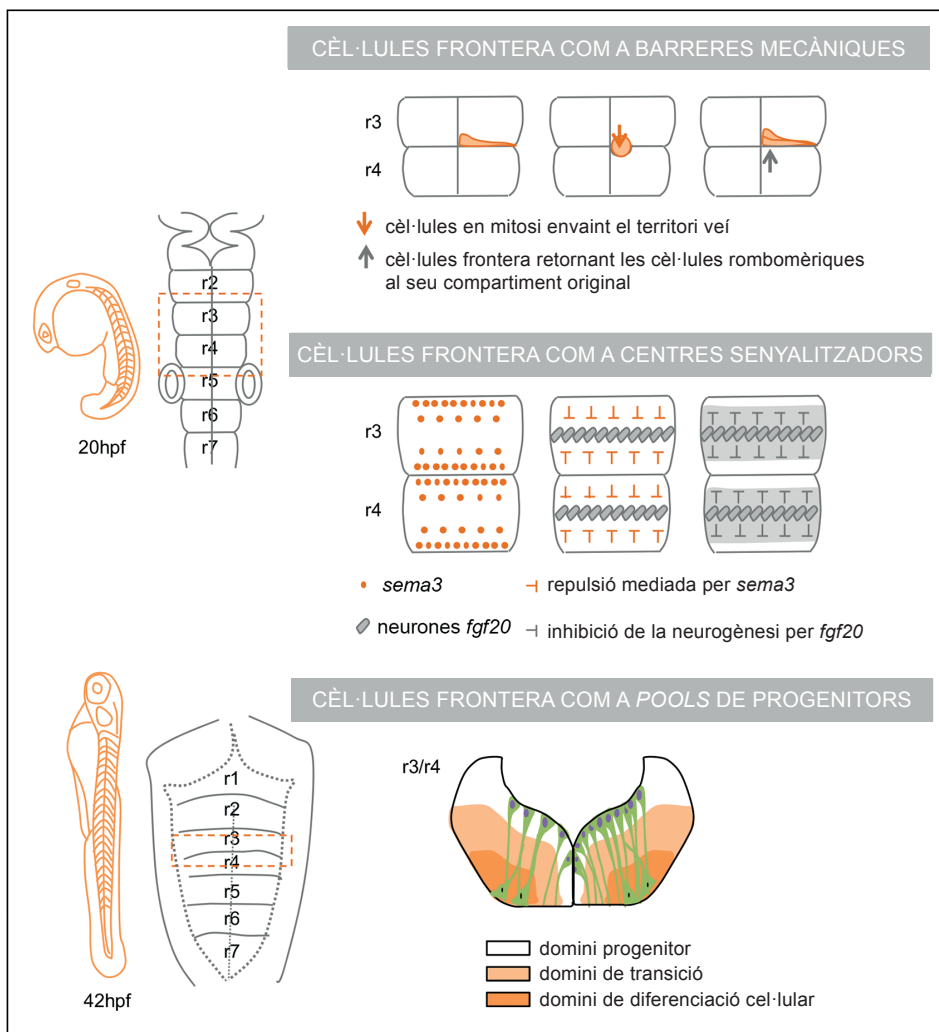


FIGURA 3. **Tinkering boundaries.** Les cèl·lules frontera despleguen funcions diferents al llarg del temps. Esquemes que representen els diferents rols de les cèl·lules frontera del romboencèfal. En primer lloc, actuen com a barreres mecàniques elàstiques per evitar la barreja de cèl·lules quan aquestes entren en mitosi i envaeixen els territoris veïns. Aquesta funció se superposa parcialment amb la de ser nodes de senyalització. Com a exemple, expressen *sema3*, que insruueix la posició de les neurones que expressen *fgf20a* indicant que s'han de mantenir al centre dels rombòmers. Finalment, les cèl·lules frontera actuen com a mecanosensors, de manera que es mantenen com a progenitors neuronals i donen més tard neurones diferenciades; hpf, hores després de la fertilització; r, rombòmer. Modificat de C. Pujades, 2020, i A. Voltes, manuscrit de tesi, 2018.

progenitors neuronals es determinen, entren en diferenciació neuronal, i migren lluny de la zona ventricular —on es mantenen els progenitors— per donar lloc a neurones diferenciades (Figura 4). En el romboencèfal, la neurogènesi és asincrònica. Mentre que els rombòmers participen molt aviat en la neurogènesi i es comporten com a clústers proneurals —depenent del mecanisme d'inhibició lateral de Notch—, les cèl·lules de les fronteres es mantenen com a progenitors durant més temps (Figura 4) (Voltes *et al.*, 2019; Hevia *et al.*, 2022). Ara sabem que això està controlat per l'acció de *her9* en les fronteres, ja que regula els gens del cicle cel·lular, mantenint aquestes cèl·lules com a progenitores proliferants (Engel-Pizcueta *et al.*, 2024). Per tant, com que les cèl·lules del romboencèfal no entren sincrònicament en neurogènesi, es planteja la pregunta següent: quina és l'estratègia que utilitza el cervell embrionari per proveir diferents capacitats neurogèniques?

Durant tot aquest temps de desenvolupament el cervell embrionari creix, i les cèl·lules mare es diferencien; per tant, el sistema o òrgan ha de *monitoritzar* la seva mida a cada moment. El creixement i la morfogènesi dels teixits són processos crucials que estan interrelacionats durant el desenvolupament, i el seu control és essencial per generar teixits d'una mida i forma específiques, pel que comporta la producció coordinada dels diferents destins cel·lulars. El creixement dels teixits durant el desenvolupament afecta dues activitats entrelaçades, la proliferació de grups de progenitors que implica l'augment del nombre de cèl·lules, i la diferenciació de progenitors en cèl·lules postmitòtiques (Zechner *et al.*, 2020). En els teixits homeostàtics —aquells que no estan en creixement—, la proliferació i la diferenciació han d'estar perfectament equilibrades per mantenir un conjunt constant de cèl·lules en cicle. En canvi, en els teixits en desenvolupament, la proliferació i la diferenciació cel·lular s'han de coordinar (Kicheva *et al.*, 2012, 2014). Si bé al principi domina la proliferació cel·lular i el teixit creix, més tard més cèl·lules es diferencien i surten del cicle cel·lular, i la taxa de creixement gairebé s'atura. Així, per entendre com es generen els òrgans amb una mida i una composició cel·lular robustes, és crucial entendre com els progenitors multipotents transiten cap a diferents estats malgrat els mecanismes estocàstics i sorollosos subjacents en qual-sevol sistema biològic.

Com es coordinen el destí cel·lular, la morfogènesi i el temps en el desenvolupament del cervell embrionari? Fins ara el que sabem és que es requereix una exquisida regulació del mode de divisió de les cèl·lules mare. Hi ha tres modes de divisió cel·lular: i) divisió simètrica proliferativa, en què les cèl·lules mare es divideixen per donar lloc a dues cèl·lules mare com elles per expandir el teixit i, per tant, fer créixer l'òrgan; ii) divisió asimètrica, les cèl·lules progenitores es divideixen per donar lloc a dues filles diferents, una cèl·lula progenitora que mantindrà el nínxol de cèl·lules mare i a una neurona que migrarà a la part basal; i iii) divisió simètrica neurogènica, en què els progenitors es dividiran per donar lloc a dues neurones

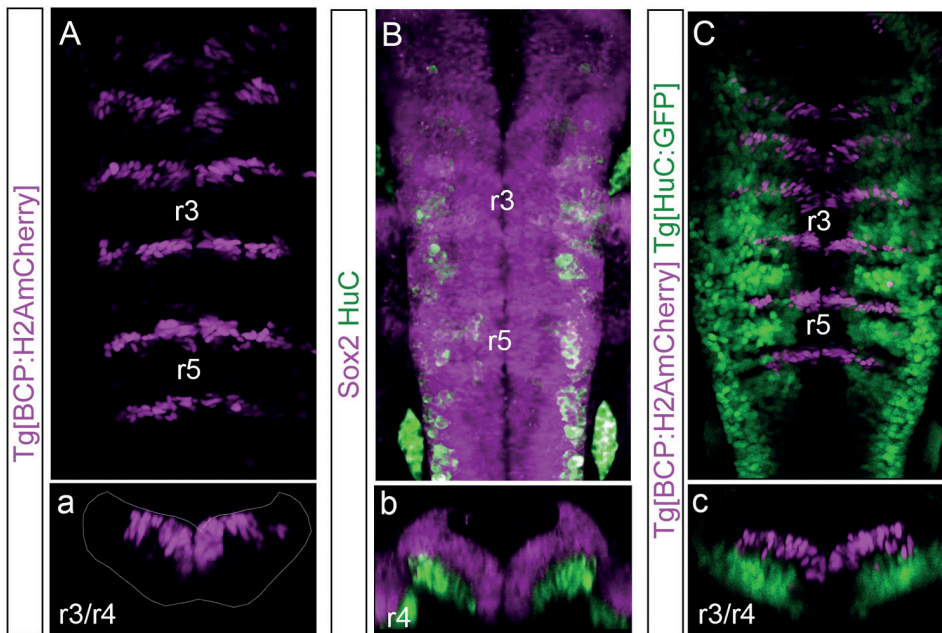


FIGURA 4. Neurogènesi al romboencèfal del peix zebra. (A, a) Línia transgènica que mostra les cèl·lules frontera (Tg[BCP:H2AmCherry]). Visió dorsal i transversal a través de r3/r4, respectivament. (B, b) Marcatge dels progenitors neurals (Sox2) i de les neurones diferenciades (HuC). Visió dorsal i transversal a través de r4, respectivament. (C, c) Doble línia transgènica que mostra les cèl·lules frontera (Tg[BCP:H2AmCherry]) i les neurones diferenciades (Tg[HuC:GFP]). Visió dorsal i transversal a través de r3/r4, respectivament.

que es diferenciaran, exhaurint així el *pool* de cèl·lules mare (Than-Trong i Bally-Cuif, 2015). En estadis primerencs, les cèl·lules mare que componen el cervell embrionari es divideixen de manera simètrica proliferativa. Més tard, amb la neurogènesi comencen les divisions cel·lulars asimètriques, i finalment, es donaran les divisions simètriques neurogèniques. Per tant, en assignar de manera diferent la capacitat neurogènica al llarg del cervell es genera asincronia, i conviuen els diferents modes de divisió cel·lular en un mateix teixit. Però això requereix que aquests diferents modes de divisió cel·lular estiguin perfectament coordinats, al mateix temps que es genera el ventricle del cervell i les cèl·lules canvien de posició quan es diferencien tot afegint complexitat a mesura que l'embrió es desenvolupa (Figura 5).

Per tant, per donar lloc a un òrgan funcional d'una mida adequada i amb el nombre apropiat de neurones, tots aquests processos han d'estar meravellosament orquestrats. A més, ens plantegen una sèrie de qüestions que ens agradaria

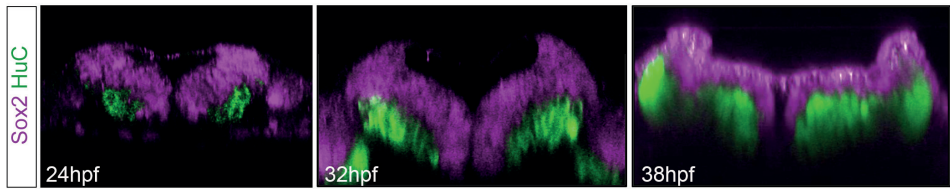


FIGURA 5. **Creixement del domini de diferenciació neuronal.** Durant la neurogènesi, el domini de diferenciació neuronal (HuC) creix a expenses del domini progenitor (Sox2), al mateix temps que el ventricle s'obre. Visions transversals de r4. r, rombòmer; hpf, hores postfertilització.

entendre i en les quals estem treballant: i) com s'adscriu la capacitat neurogènica als diferents territoris; ii) com s'estableix el balanç entre cèl·lules progenitores i neurones en els diferents territoris per obtenir un cervell amb els tipus de neurones necessàries i amb el nombre apropiat; iii) quina funció té el moment de naixement d'una neurona en el seu destí final; iv) quina és la contribució dels diferents *pools* de cèl·lules mare als diferents circuits; o v) com aquests diferents processos que duren períodes de temps diferents es coordinen per donar un cervell amb els circuits neuronals funcionals.

Hem avançat molt en la comprensió de com s'assigna la capacitat neurogènica als diferents territoris, si bé encara no es coneix del tot quins són els mecanismes moleculars que produeixen la gamma completa de subtipus neuronals al cervell posterior. A *Drosophila*, la superposició de programes de regionalització temporal i espacial permet generar un nombre creixent combinatori de subconjunts neuronals a partir d'un nombre limitat de factors de transcripció (Bayraktar i Doe, 2013; Erclik *et al.*, 2017). En vertebrats, alguns treballs han mostrat la importància del moment del naixement de les neurones per atribuir la funció neuronal (Kinkhabwala *et al.*, 2011; Pujala i Koyama, 2019). Nosaltres hem demostrat que l'ordre temporal de diferenciació neuronal prefigura la posició ulterior de les neurones diferenciades al cervell posterior; és a dir, la posició de les neurones diferenciades en el cervell embrionari està relacionada amb la seva data de naixement (Blanc *et al.*, 2022).

DECISIONS SOBRE EL DESTÍ CEL·LULAR: ESTOCASTICITAT VS. DETERMINISME

Una qüestió que encara queda per resoldre és com sorgeix la diversitat cel·lular a partir de grups de cèl·lules progenitores *equivalents*. Entendre com es prenen les decisions del destí cel·lular és crucial per comprendre la dinàmica al llarg de l'espai i del temps en la formació de teixits i òrgans, i per predir els

comportaments cel·lulars. Fins ara teníem una visió força determinista de com era el control del destí cel·lular, probablement perquè les eines experimentals de què disposàvem només ens permetien observar moments puntuals del desenvolupament i ens perdíem la dinàmica del sistema durant el temps. Ens hem inspirat molts anys en l'analogia de Waddington, un dels exemples més coneguts de la presa de decisions sobre el destí cel·lular en un sistema dinàmic (Waddington, 1957), en què les cèl·lules es representen com boles que roden per les valls d'un paisatge de baixada. El camí cap a dos estats o destins cel·lulars diferents s'il·lustra com la ramificació de les valls en un paisatge muntanyós. Aquest model proposa que el potencial de desenvolupament d'una cèl·lula, és a dir, el camí descendent que pren, està marcat per grups de gens o interaccions bioquímiques, cosa que suggereix un control de la decisió del destí cel·lular per les xarxes de regulació gèniques. El model del paisatge proposat per Waddington és general, qualitatiu i, tot i que plasma el concepte de competència cel·lular, no proporciona la posició de la cèl·lula dins del teixit, no considera estats cel·lulars intermedis entre una decisió i la següent, ni té en compte el soroll biològic del sistema. Implica que les boles (cèl·lules) que baixen per les valls escollides (decisió del destí) no poden tornar a la posició anterior un cop han pres aquesta decisió. Malgrat que és molt inspirador, no resol si la decisió d'escollir un camí de desenvolupament és estocàstica o ja determinada. Recentment, diversos estudis de mapatge genètic de destí cel·lular en combinació amb models matemàtics han intentat abordar aquest problema en estructures biològiques específiques (Zechner *et al.*, 2020). No hi ha cap dubte de la gran heterogeneïtat cel·lular que hi ha al sistema nerviós central, però no hi ha una única visió sobre la generació i adquisició d'aquesta varietat de tipus cel·lulars. Si bé algunes línies d'investigació suggereixen que s'ha de correlacionar amb la diversitat de subtipus de progenitors —implicant que el destí cel·lular es determina abans de la diferenciació—, altres estudis suggereixen que el cervell pot albergar progenitors multipotents la decisió dels quals de generar diferents destins és merament estocàstica.

Un dels exemples en què s'ha investigat molt aquesta qüestió és en la formació de l'escorça cerebral de mamífers. Un conjunt important de treballs havia suggerit l'existència d'un programa determinista atenent les decisions del destí de les cèl·lules progenitores, on distints *pools* de progenitors donarien lloc de manera ordenada a diferents destins cel·lulars (Gao *et al.*, 2014). Més recentment, estudis d'anàlisi clonal combinats amb models matemàtics afavoreixen l'existència d'una certa estocasticitat en l'adquisició dels diferents destins neuronals i desafien la visió determinista (Llorca *et al.*, 2019). Aquestes observacions plantegen preguntes com: i) es poden identificar molecularment els subtipus de progenitors o són diferents estats cel·lulars?; ii) els esdeveniments estocàstics es produeixen dins dels progenitors o en la descendència?, i iii) quina és la contribució final

relativa dels processos estocàstics i deterministes? (Klingler i Jabaudon, 2020). L'existència d'estocasticitat en les decisions del destí neurogènic també s'ha demostrat en altres estructures del sistema nerviós central, com el telencèfal del peix zebra adult (Than-Trong *et al.*, 2020) i la retina (He *et al.*, 2012; Zechner *et al.*, 2020). Les nostres dades mostren que ni l'espai ni el temps on estan els progenitors prediuen el comportament posterior de les cèl·lules frontera del romboencèfal (Hevia *et al.*, 2022), i suggereixen que els estats cel·lulars i els destins cel·lulars es poden distribuir de manera aleatòria i, per tant, poden afavorir un model estocàstic.

ELS REPTES DEL FUTUR

Les noves tecnologies i la capacitat de generar grans conjunts de dades, tant transcripcionals com d'imatge, proporcionen noves perspectives per adreçar preguntes encara vigents com ara l'ontogènia, la composició i la funció dels components cel·lulars del cervell. Tanmateix, el progrés no dependrà només de la millora de la capacitat d'adquisició i anàlisi per processar grans quantitats de dades, sinó de la seva aplicació satisfactòria per construir marcs intel·lectuals de treball (Figura 6). Per tant, com diria Richard Feynman, el repte és convertir la informació en coneixement. Serem capaços d'integrar tota aquesta informació per comprendre com es genera un òrgan com el cervell? Pel que fa a la qüestió dels tipus de cèl·lules/identitats cel·lulars i destins cel·lulars/estats cel·lulars, l'opinió predominant encara és determinista, és a dir, cada tipus de neurones utilitza un conjunt específic de característiques com l'expressió gènica, la morfologia, la posició, l'activitat neuronal... per definir la seva identitat cel·lular, que estan regulades per signatures transcripcionals específiques. Això seria coherent amb la idea que la identitat cel·lular està definida pels programes específics d'expressió gènica executats per grans xarxes de regulació gènica (Davidson i Erwin, 2006). Però és suficient el coneixement del transcriptoma neuronal per definir la seva identitat i predir les característiques funcionals? Probablement no, si tenim en compte el paper de les jerarquies cel·lulars i que neurones morfològicament diferents situades en regions distintes del sistema nerviós central poden ser transcriptòmicament similars. Per exemple, les motoneurones del cervell posterior i de la medul·la espinal són força semblants pel que fa a l'expressió gènica, però la seva ontogènia és diferent. Per tant, el llinatge cel·lular —i, en conseqüència, el component temporal— molt probablement és indispensable per comprendre què significa la identitat cel·lular. Podem reconstruir la neurogènesi des del naixement dels tipus cel·lulars fins al circuit funcional sencer? Podem aplicar aquest coneixement als organoides cerebrals derivats de cèl·lules humanes diferenciades induïdes a la pluripotència per imitar els paisatges de desenvolupament espacial i temporal?

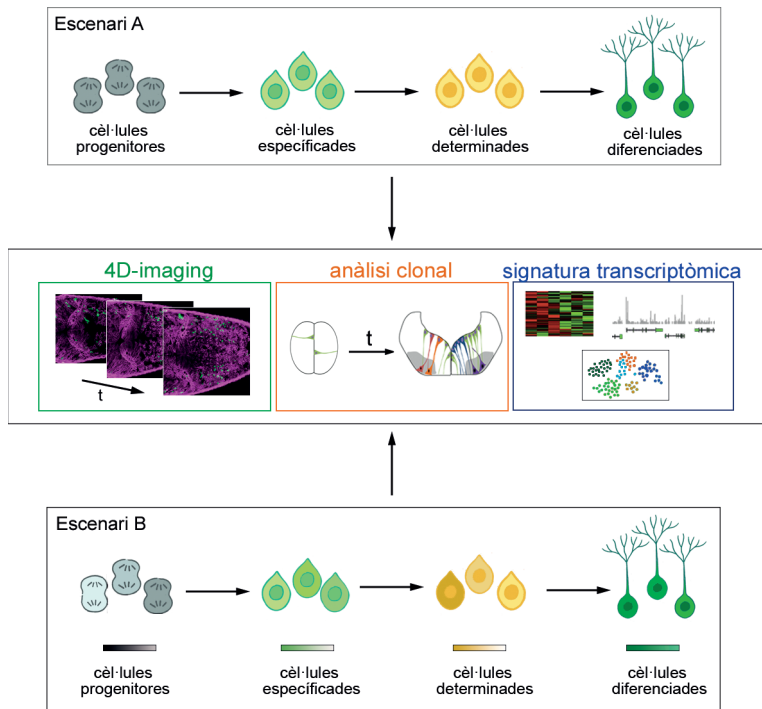


FIGURA 6. Generació dels diferents tipus cel·lulars al llarg del temps en la construcció del cervell embrionari. En l'escenari A es mostra que hi ha grups de progenitors homogenis que donen lloc a cèl·lules amb identitats cel·lulars determinades. En l'escenari B es proposen grups de progenitors amb certa heterogeneïtat, en què no totes les cèl·lules expressen exactament el mateix perfil transcripcional, però són capaces de donar neurones diferenciades de la mateixa població. La integració dels resultats obtinguts a partir de les tècniques d'imatge en viu en 4D, d'anàlisi clonal de llinatge i de transcriptòmica (RNA-seq, ATAC-seq i scRNA-seq entre altres), ens permetran entendre com s'estableixen els diferents llinatges cel·lulars al llarg del temps en la construcció del cervell embrionari. Modificat de Belmonte-Mateos i Pujades, 2022.

I, finalment, podem crear òrgans a demanda per substituir parts dels antics? Totes aquestes preguntes comunes a la biologia del desenvolupament, la biologia sintètica, la medicina regenerativa i l'enginyeria biomèdica constitueixen alguns dels reptes que hem d'afrontar en els pròxims anys. Això implica que hem de treballar de manera multidisciplinària si volem ser capaços de construir marcs intel·lectuals nous que ens permetin avançar en el coneixement de com es genera un òrgan.

EPÍLEG

Quan començava a pensar el que volia compartir en aquest discurs, la lectura del llibre *The exceptions, Nancy Hopkins and the fight for women in science* (Zernike, 2023) em va induir a escriure aquest epíleg.

Com tots sabem —o almenys hauríem de saber—, les dones estem infrarepresentades en llocs de lideratge científic o de recerca quan ens mesuren atenent el nostre potencial científic. Això és així a les universitats, on el percentatge de catedràtiques continua sent baixíssim, als centres de recerca on gairebé no hi ha cap directora, a l'Institut d'Estudis Catalans, on només ens cal veure la distribució de gènere entre els membres, com en tantes altres institucions aquí i arreu del món. En l'última dècada s'ha pres més consciència de la realitat, s'han posat en marxa estudis per entendre les raons i s'han proposat accions per revertir-ho. Però la realitat és crua, i les dades ens mostren que les coses o bé no canvien o, quan ho fan, el canvi és lentíssim. En la meua opinió, per poder revertir el que ocorre no es necessita només un canvi social que ja s'està donant —la societat habitualment sempre va per davant—, sinó que requereix la complicitat de tota la comunitat científica i acadèmica, que moltes vegades està convençuda de fer-ho bé. Només com a exemple que potser ens hauríem de qüestionar una mica més sovint, compartiré una petita experiència.

El llibre en qüestió descriu uns fets que van ocórrer els anys 1990 al Massachusetts Institute of Technology (MIT) de Boston i que van portar la Dra. Nancy Hopkins a liderar, junt amb 16 professores del MIT, una campanya per cridar l'atenció de la discriminació que estaven patint. Es descriuen situacions viscudes en aquells anys 1990, protagonitzades per directors de departament i científics molt coneguts que en aquests moments ens semblen totalment inacceptables, però que aleshores tothom, homes i dones, acceptàvem. Com que vaig tenir l'oportunitat de treballar a Boston entre els anys 1991 i 1995, conec molts dels científics de qui es parla en el llibre, bé perquè teníem reunions regulars per compartir resultats amb els seus grups, o bé perquè eren els supervisors d'amics i companys. He de confessar que, durant el temps que vaig estar a Boston i en què tot això succeïa, no em vaig adonar de res!!! Ara, pensant-hi, no puc entendre que no em sobtessin més coses. M'adono que només vaig conèixer una dona, una sola dona, que era cap de grup a DFCI - Harvard Medical School. En canvi, puc citar més de cinquanta homes que eren caps de grup. Sí que és cert que hi havia científiques que impartien seminaris als congressos, moltes menys que homes, però no em va semblar res extraordinari que fos així. El llibre m'ha fet pensar molt. Em considero una dona feminista i el que això demostra és que fins i tot les que hi estem interessades i implicades, de vegades som refractàries a veure la realitat. Em pregunto com ho viuen els científics/ques que mai no s'han interrogat sobre el tema. Com a societat, no ens podem —ni volem— permetre perdre la

meitat del talent. Obrir-nos a la diversitat implica incorporar el màxim possible de talent divers, les múltiples visions i els lideratges diferents, ja que només així serem capaços de transformar. Si no, perdrem de manera inexorable una gran oportunitat que fa molt de temps que hauríem d'haver estat capaços d'aprofitar.

AGRAÏMENTS

Vull mostrar el meu agraïment molt especialment a la meva família i amics, amb els quals he compartit els moments dolços i m'han ajudat en els difícils durant tota la meva trajectòria professional. En especial, vull agrair a Cristina Junyent la revisió d'aquest text. També vull donar les gràcies a tots els meus mentors, companys de laboratori i totes i tots les que heu passat pel meu grup, perquè clarament sense vosaltres jo no seria ara aquí. Gràcies per ensenyar-me a ser exigent amb mi mateixa, a ser millor mentora i persona, i pel que m'apreneu contínuament.

BIBLIOGRAFIA

- BAYRAKTAR, O. A.; DOE, C. Q. (2013). «Combinatorial temporal patterning in progenitors expands neural diversity». *Nature*, núm. 498, p. 449-455.
- BELMONTE-MATEOS, C.; PUJADES, C. (2022). «From Cell States to Cell Fates: How Cell Proliferation and Neuronal Differentiation Are Coordinated During Embryonic Development». *Front Neurosciences*, Jan 3;15:781160.
- BLANC, M.; DALMASSO, G.; UDINA, F.; PUJADES, C. (2022). «A dynamic and expandable Digital 3D-Atlas MAKER for monitoring the temporal changes in tissue growth during hindbrain morphogenesis». *elife*, Sep 28;11:e78300.
- CALZOLARI, S.; TERRIENTE, J.; PUJADES, C. (2014). «Cell segregation in the vertebrate hindbrain relies on actomyosin cables located at the interhombomeric boundaries». *The EMBO Journal*, núm. 33, p. 686-701.
- COOKE, J. E.; MOENS, C.B. (2002). «Boundary formation in the hindbrain: Eph only it were simple...». *Trends in neurosciences*, núm. 25, p. 260-267.
- DAVIDSON, E. H.; ERWIN, D. H. (2006). «Gene Regulatory Networks and the Evolution of Animal Body Plans». *Science*, núm. 311, p. 796-800.
- DUBOULE, D. (2003). «Time for Chronomics?». *Science*, núm. 301, p. 277-277.
- ENGEL-PIZCUETA, C.; HEVIA C. F.; VOLTES, A.; LIVET, J.; PUJADES, C. (2024). «Her9 maintains hindbrain boundary cells in the progenitor state». *biorxiv*.
- ERLIK, T.; LI, X.; COURGEON, M.; BERTET, C.; CHEN, Z.; BAUMERT, R.; NG, J.; KOO, C.; ARAIN, U.; BEHNIA, R., *et al.* (2017). «Integration of temporal and spatial patterning generates neural diversity». *Nature*, núm. 541, p. 365-370.

- GAO, P.; POSTIGLIONE, M. P.; KRIEGER, T. G.; HERNÁNDEZ, L.; WANG, C.; HAN, Z.; STREICHER, C.; PAPUSHEVA, E.; INSOLERA, R.; CHUGH, K., *et al.* (2014). «Deterministic progenitor behavior and unitary production of neurons in the neocortex». *Cell*, núm. 159, p. 775-788.
- GUILLEMOT, F. (2007). «Spatial and temporal specification of neural fates by transcription factor codes». *Development*, núm. 134, p. 3771-3780.
- HE, J.; ZHANG, G.; ALMEIDA, A. D.; CAYOUILLE, M.; SIMONS, B. D.; HARRIS, W. A. (2012). «How Variable Clones Build an Invariant Retina». *Neuron*, núm. 75, p. 786-798.
- HEVIA, C. F.; ENGEL-PIZCUETA, C.; UDINA, F.; PUJADES, C. (2022). «The neurogenic fate of the hindbrain boundaries relies on Notch3-dependent asymmetric cell divisions». *Cell Reports*, Jun 7;39(10):110915.
- JACOB, F. (1977). «Evolution and tinkering». *Science*, núm. 196, p. 1161-1166.
- JIMÉNEZ-GURI, E.; PUJADES, C. (2011). «An ancient mechanism of hindbrain patterning has been conserved in vertebrate evolution». *Evolution & Development*, núm. 13, p. 38-46.
- KICHEVA, A.; BOLLENBACH, T.; RIBEIRO, A.; VALLE, H. P.; LOVELL-BADGE, R.; EPISKOPOU, V.; BRISCOE, J. (2014). «Coordination of progenitor specification and growth in mouse and chick spinal cord». *Science*, núm. 345, p. 1577-1590.
- KICHEVA, A.; COHEN, M.; BRISCOE, J. (2012). «Developmental Pattern Formation: Insights from Physics and Biology». *Science*, núm. 338, p. 210-212.
- KINKHABWALA, A.; RILEY, M.; KOYAMA, M.; MONEN, J.; SATOU, C.; KIMURA, J.; HIGASHIJIMA, S.; FETCHO, J. (2011). «A structural and functional ground plan for neurons in the hindbrain of zebrafish». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, núm. 108, p. 1164-1169.
- KLINGLER, E.; JABAUDON, D. (2020). «Do progenitors play dice?». *eLife*, núm. 9.
- KRUMLAUF, R.; WILKINSON, D. G. (2021). «Segmentation and patterning of the vertebrate hindbrain». *Development*, 148, dev186460.
- LETÉLIER, J.; TERRIENTE, J.; BELZUNCE, I.; VOLTES, A.; UNDURRAGA, C. A.; POLVILLO, R.; DEVOS, L.; TENA, J. J.; MAESO, I.; RÉTAUX, S., *et al.* (2018). «Evolutionary emergence of the rac3b/rfng/sgca regulatory cluster refined mechanisms for hindbrain boundaries formation». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Apr 17;115(16):E3731-E3740.
- LLORCA, A.; CICERI, G.; BEATTIE, R.; WONG, F. K.; DIANA, G.; SERAFEIMIDOU-POULIOU, E.; FERNÁNDEZ-OTERO, M.; STREICHER, C.; ARNOLD, S. J.; MEYER, M., *et al.* (2019). «A stochastic framework of neurogenesis underlies the assembly of neocortical cytoarchitecture». *eLife*, 8:e51381.
- MURAKAMI, Y.; OGASAWARA, M.; SUGAHARA, F.; HIRANO, S.; SATOH, N.; KURATANI, S. (2001). «Identification and expression of the lamprey Pax6

- gene: evolutionary origin of the segmented brain of vertebrates». *Development*, núm. 128, p. 3521-3531.
- PERETZ, Y.; EREN, N.; KOHL, A.; HEN, G.; YANIV, K.; WEISINGER, K.; CINNAMON, Y.; SELA-DONENFELD, D. (2016). «A new role of hindbrain boundaries as pools of neural stem/progenitor cells regulated by Sox2». *BMC Biology*, núm. 14, p. 57.
- PUJADES, C. (2020). «The multiple functions of hindbrain boundary cells: Tinkering boundaries?». *Seminars in Cell and Developmental Biology*, núm. 107, p. 179-189.
- PUJALA, A.; KOYAMA, M. (2019). «Chronology-based architecture of descending circuits that underlie the development of locomotor repertoire after birth». *eLife*, 8:e42135.
- RILEY, B. B.; CHIANG, M. Y.; STORCH, E. M.; HECK, R.; BUCKLES, G. R.; LEKVEN, A. C. (2004). «Rhombomere boundaries are Wnt signaling centers that regulate metamer patterning in the zebrafish hindbrain». *Developmental Dynamics*, núm. 231, p. 278-291.
- THAN-TRONG, E.; BALLY-CUIF, L. (2015). «Radial glia and neural progenitors in the adult zebrafish central nervous system». *Glia*, núm. 63, p. 1406-1428.
- THAN-TRONG, E.; KIANI, B.; DRAY, N.; ORTICA, S.; SIMONS, B.; RULANDS, S.; ALUNNI, A.; BALLY-CUIF, L. (2020). «Lineage hierarchies and stochasticity ensure the long-term maintenance of adult neural stem cells». *Science advances*, núm. 6, eaaz5424.
- VOLTES, A.; HEVIA, C. F.; ENGEL-PIZCUETA, C.; DINGARE, C.; CALZOLARI, S.; TERRIENTE, J.; NORDEN, C.; LECAUDEY, V.; PUJADES, C. (2019). «Yap/Taz-TEAD activity links mechanical cues to progenitor cell behavior during zebrafish hindbrain segmentation». *Development*, Jul 22;146(14):dev176735.
- WADDINGTON. (1957). *The strategy of the genes*. Londres: Allen & Unwin.
- ZECHNER, C.; NERLI, E.; NORDEN, C. (2020). «Stochasticity and determinism in cell fate decisions». *Development*, núm. 147, p. 1-8.

