



# ¿Qué son los genes *Hox*? Su importancia en la enfermedad vascular y renal

O. Hernández Perera\*, A. Marrero\* y J. C. Rodríguez Pérez\*\*\*

\*Unidad de Investigación y \*\*Servicio de Nefrología. Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Las Palmas de Gran Canaria.

## INTRODUCCIÓN

Los genes *Hox* codifican una amplia familia de factores de transcripción caracterizados por poseer el homeodominio en su estructura. Esta secuencia de unión al DNA, muy conservada a través de la evolución, está constituida por 61 aminoácidos formando 3  $\alpha$ -hélices. Los genes *Hox* juegan un papel central durante el desarrollo embrionario, determinando la identidad de los somitas y regulando la organogénesis<sup>1</sup>. Durante los últimos años los genes *Hox* han sido encontrados en contextos genéticos diferentes, tanto en el desarrollo embrionario como en el adulto, habiendo sido relacionados con diversas patologías como la anirinia (*Pax6*), simpolidactilia (*HoxD13*) y varios tipos de cáncer como el rabdomiosarcoma alveolar (*Pax3*) o los tumores intestinales (*CDX2*).

Las enfermedades vasculares y renales son patologías complejas. En función del tipo celular afectado y del daño específico subyacente se pondrán en marcha procesos de proliferación, hipertrofia, desdiferenciación o apoptosis. En estos procesos, el ciclo celular ocupa un lugar central, coordinando de cierta forma las distintas respuestas celulares posibles. Asimismo, desde un punto de vista molecular, existen grandes similitudes en los procesos involucrados en el desarrollo de la aterosclerosis y la glomerulosclerosis. En ambas patologías, independientemente del efector responsable de la enfermedad, tienen lugar procesos de inflamación, proliferación y fibrosis, pudiendo concurrir procesos de remodelado tisular. Por otra parte, se han encontrado importantes analogías entre la arquitectura glomerular y la vascular, pudiéndose considerar al glomérulo como una variación estructural de los vasos sanguíneos.

Los genes *Hox* han sido relacionados con los procesos de remodelado vascular y angiogénesis pre y postnatales, así como con la regulación del ciclo celular. Además, existen importantes similitudes entre los procesos de regeneración tisular y los procesos de organogénesis, donde los genes *Hox* juegan un papel relevante. En los últimos años se han descubierto similitudes genéticas notables, como la expresión de algunos genes típicos del desarrollo embrionario durante los procesos patológicos del riñón en el adulto<sup>2-4</sup>. Estos hechos nos inducen a pensar que los genes *Hox* juegan un papel central en la patología vascular y renal.

## GENES HOX

El homeodominio es un motivo de unión al DNA y su nombre deriva de un término anterior, la homeosis. Bateson acuñó esta palabra en 1894 para referirse a las variaciones naturales donde ciertas partes del cuerpo muestran características de otras regiones<sup>5</sup>. Años más tarde Bridges recupera este término para las mutaciones homeóticas, donde la identidad de una parte del organismo es convertida en otra. De hecho, la primera mutación homeótica fue descrita por Bridges a principios del siglo pasado. Cribando mutaciones en *Drosophila* en el laboratorio de Thomas H. Morgan encontró una mosca donde la parte anterior del tercer segmento torácico había sido reemplazada por la parte anterior del segundo segmento torácico<sup>6</sup>. Este fenotipo fue bautizado como *bithorax*. A finales de los años 70 Lewis logró aislar y caracterizar el gen responsable del fenotipo *bithorax*, bautizándolo con el mismo nombre<sup>7</sup>. A partir de entonces se han aislado muchas proteínas más con el homeodominio en su estructura, aunque sólo algunas se encuentran relacionadas con las mutaciones homeóticas.

La clasificación de los genes *Hox* es compleja<sup>8</sup>, por lo que habitualmente se dividen en dos grupos:

1. Genes *Hox* *senso estricto* (*Hox s.e.*): aquellos genes *Hox* que se encuentran en alguno de los 4 clusters *Hox*.

**Correspondencia:** Prof. José C. Rodríguez Pérez  
Unidad de Investigación  
Servicio de Nefrología  
Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín  
35010 Las Palmas de Gran Canaria  
E-mail: jrodperd@gobiernodecanarias.org

2. Genes *Hox senso lato* (*Hox s.l.*): genes que presentan el homeodominio, excluyendo los anteriores.

Aunque no se trate de una clasificación natural, esta división es frecuentemente utilizada, ya que los genes *Hox s. e.* poseen una organización genómica y un sistema de expresión característica que aconsejan un tratamiento especial.

### GENES HOX SENSO ESTRICTO

Los genes *Hox s.e.* son también conocidos en la literatura anglosajona como *antennapedia-type* o *clustered Hox genes*. Tienen la peculiaridad de encontrarse agrupados en cuatro clusters (*HoxA-D*), distribuidos en diferentes cromosomas. Los genes *Hox s.e.* se dividen en 13 grupos parálogos según el lugar que ocupan en el cluster y la similitud de secuencias (fig. 1). Durante los primeros estadios del desarrollo embrionario juegan un papel central, estableciendo la identidad de los somitas. En este momento el perfil de expresión de los genes *Hox s.e.* es temporal y espacialmente colineal respecto a su posición en el cluster, habiendo sido este hecho relacionado con un aumento paulatino de la concentración de ácido retinoico a lo largo de esta fase del desarrollo embrionario. Sin embargo, el mecanismo mediante el cual se coordina la expresión entre ellos

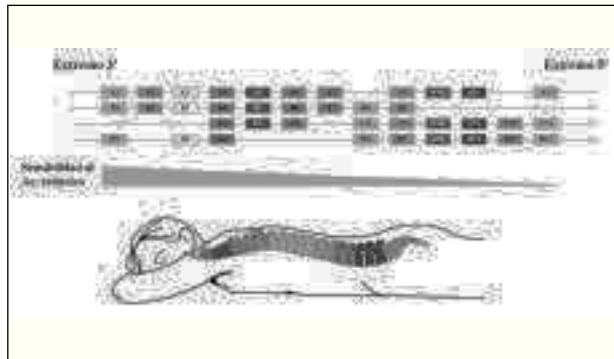


Fig. 1.—Organización y expresión de los genes *Hox* senso estricto. En humanos y ratones existen 39 genes *Hox s.e.* que se agrupan en 4 clusters designados con una letra cada uno (*A-D*) y localizados en cromosomas diferentes. Se piensa que los clusters se originaron mediante sucesivas duplicaciones. El patrón de expresión de los genes *Hox* es espacial y temporalmente colineal con su posición dentro del cluster. La expresión de los genes *Hox s.e.* depende de la concentración ambiental de ácido retinoico, aumentando el grado de sensibilidad a esta molécula hacia el extremo 3'. El aumento paulatino de la concentración del ácido retinoico hace que los genes *Hox s.e.* se activen secuencialmente. La expresión de estos genes determinará la identidad de los diferentes segmentos del cuerpo.

y la causa de que se encuentren agrupados en clusters son poco conocidos, aunque debe existir alguna relación entre ambos. Recientemente se han descubierto varios microRNA dentro de los clusters con secuencias complementarias a diferentes genes *Hox*, postulándose que puedan actuar de alguna forma en la coordinación de su expresión.

A finales de los años 80 los genes *Hox s.e.* comenzaron a encontrarse en contextos diferentes al del desarrollo embrionario. Primero se relacionaron con la eritropoyesis en el adulto<sup>9-11</sup> y a principios de los años 90 con el sistema cardiovascular<sup>12</sup>. Resulta interesante que se haya documentado expresión de genes *Hox* en los linajes sanguíneo y endotelial, pues ambos derivan del mismo precursor celular, el hemangioblasto.

El primer grupo que encontró expresión de genes *Hox s.e.* en el sistema cardiovascular fue el de Gorski<sup>12, 13</sup>. A partir de librerías de cDNA de células de músculo liso vascular de aorta de rata se aislaron varios genes *Hox s.e.*, *HoxA2*, *HoxA4*, *HoxA5*, *HoxA11*, *HoxB1*, *HoxB7* y *HoxC9*, poniendo de relieve la importancia de estos genes en la vida postnatal. Un trabajo posterior comparó la expresión de los genes *Hox* entre células musculares lisas embrionarias y adultas, encontrándose una mayor tasa de expresión de *HoxB7* y *HoxC9* en las células de origen embrionario, por lo que se especula que estos genes pueden jugar un papel como inductores de la proliferación celular<sup>14</sup>. Sin embargo, *HoxA5*, *HoxA11* y *HoxB1* presentaron un nivel de expresión reducido y similar en ambos tipos celulares.

*HoxA9* ha sido relacionado con la angiogénesis. La inhibición de *HoxA9* disminuye la formación de vasos y la migración de las células endoteliales *in vitro*<sup>15</sup>. Esta actividad proangiogénica de *HoxA9* está relacionada, al menos en parte, con la capacidad de regular transcripcionalmente la expresión del receptor EphB4<sup>15</sup>, que ha sido implicado en los procesos angiogénicos y hematopoyéticos<sup>16, 17</sup>. EphB4 debe jugar también algún papel específico en el desarrollo del glomérulo, pues ratones transgénicos que sobreexpresan EphB4 en el riñón desarrollan malformaciones glomerulares que desembocan en glomerulopatías<sup>18</sup>. Una variación transcripcional de este gen, *HoxA9EC* ha sido descrita recientemente<sup>19</sup>. Su expresión es inhibida por el Factor de Necrosis Tumoral (TNF) y por el momento sólo ha sido encontrado en células endoteliales de humanos<sup>20</sup>. Nuestro grupo, trabajando en corteza de riñón de rata, no ha encontrado expresión de esta forma de *splicing* alternativo, aunque sí de *HoxA9* (fig. 2). La comparación de las secuencias genómicas de *Homo sapiens* y *Rattus norvegicus* en la región donde se produce el *splicing* alternativo revelaron notables

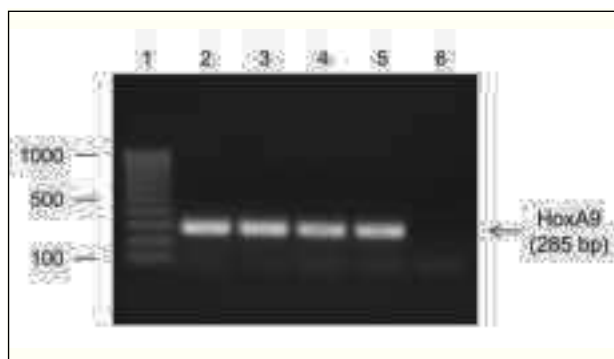


Fig. 2.—Expresión de HoxA9 en corteza de riñón de rata. Se aisló el RNA total de corteza renal de ratas Sprage-Dawley. La expresión de HoxA9 se confirmó mediante RT-PCR y secuenciación del producto amplificado. Se utilizaron primers específicos para rata localizados a ambos lados de una secuencia donde en el humano se encuentra el sitio de splicing alternativo de HoxA9. En el riñón de rata no tiene lugar la expresión de una proteína alternativa de mayor peso molecular que sea equivalente a la encontrada en humano, ya que en caso contrario deberíamos haber encontrado una banda adicional de 1434 bp en nuestras muestras. 1, marcador de peso molecular; 2 y 3, ratas control; 4 y 5, ratas con ablación de 5/6 de la masa renal, y 6, reacción de amplificación sin cDNA.

diferencias, por lo que pensamos que esta variación génica podría tener un papel modulador sólo en algunas especies.

*HoxB3* y *HoxD3* parecen estar involucrados en la angiogénesis y en la diferenciación de las células endoteliales. *HoxD3* es expresado con mayor intensidad en células proliferativas y su expresión es activada por el Factor de Crecimiento de Fibroblastos básico (bFGF)<sup>21</sup>. Se piensa que *HoxD3* está relacionado con la actividad migratoria o invasiva de las células endoteliales<sup>21</sup>, mientras que *HoxB3* trabaja de una forma diferente, actuando más bien sobre la subsiguiente morfogénesis de los nuevos vasos formados. Estas observaciones han llevado a sugerir que ambos genes Hox realizan actividades complementarias dentro de un determinado tejido<sup>22</sup>.

*HoxB5* ha sido relacionado con la diferenciación en angioblastos. *HoxB5* es capaz de regular la expresión de flk1/KDR (VEGFR-2), un receptor del Factor de Crecimiento del Endotelio Vasculoso, solapándose las zonas de expresión de *HoxB5* y flk1/KDR durante los primeros estadios de la diferenciación de los angioblastos. Además su expresión resulta suficiente para iniciar la diferenciación en células endoteliales<sup>23</sup>.

*HoxB7* ha sido citado en varios estudios como un elemento activador de la angiogénesis. Se ha encontrado activación de *HoxB7* en tumores de mama y melanomas, actuando como un promotor de la

proliferación y la formación de nuevos vasos<sup>24,25</sup>, por lo que ha sido propuesto como posible diana antitumoral. La actividad angiogénica de *HoxB7* ha sido relacionada con la capacidad de activar la síntesis de varios factores angiogénicos, péptidos vasoactivos e interleukinas, como bFGF, VEGF, angiotensina-II e interleuquina-8 en diferentes líneas tumorales<sup>24-26</sup>. *HoxB7* también se expresa en placas de ateroma y su sobreexpresión en células C3H10T1/2, una línea de células pluripotenciales, hace que aumente su actividad proliferativa y se active la diferenciación a células musculares lisas<sup>27</sup>. Todo ello induce a pensar que *HoxB7* puede tener alguna función remodeladora del sistema vascular.

*HoxD10*, al contrario que *HoxB7*, ha sido citado como un agente con actividad anti-angiogénica. *HoxD10* se expresa preferentemente en las células endoteliales en estado no proliferativo, inhibiendo su migración y la formación de nuevos vasos. De forma consistente con estos hallazgos, *HoxD10* parece bloquear la acción proangiogénica, tanto de bFGF como de VEGF<sup>28</sup>.

El grupo de genes parálogos *HoxA11/HoxC11/HoxD11* juega un papel central en la inducción y desarrollo de los riñones metanéricos. *HoxA11* y *HoxD11* regulan la ramificación del uréter durante el desarrollo embrionario, actuando de forma sinérgica, de tal forma que la eliminación de uno de ellos solamente no tiene consecuencias, mientras que los dobles mutantes presentan riñones rudimentarios o incluso, en casos extremos, carecen de ellos<sup>29</sup>. La eliminación de los tres genes produce la completa desaparición del riñón metanérico, aunque curiosamente la expresión de los genes Pax-2 y Wnt-1, fundamentales en el desarrollo renal, no se modifica en estos mutantes<sup>30</sup>. Por otra parte, *HoxA11* podría regular la expresión de la integrina  $\alpha 8$  durante la morfogénesis renal. De hecho, los ratones knockout de esta integrina presentan un fenotipo muy similar al doble knockout *HoxA11/HoxD11*<sup>31</sup>, lo que sugiere que estos genes Hox podrían estar actuando sobre la misma ruta de señalización.

No obstante, las variaciones morfológicas encontradas en los estudios realizados en animales knockouts de genes Hox s.e. deben analizarse con suma precaución. A veces puede resultar complicado establecer si éstas se deben a un problema de establecimiento de identidad relacionado con la función nativa de los genes Hox s.e. en los primeros estadios del desarrollo o a una función diferente del gen en el tejido estudiado en etapas posteriores. Además el sinergismo que presentan los genes Hox s.e. parálogos es otro factor que complica los estudios con animales transgénicos.

**GENES HOX SENSO LATO**

El grupo de los genes Hox *s.l.*, también llamados *non-anntenapedia-type* o *non clustered Hox genes*, es bastante heterogéneo. Dentro de este subgrupo estarían el resto de los genes Hox, aquellos que poseyendo el homeodominio, no se encuentran en ninguno de los cuatro clusters Hox tradicionales. Nosotros nos centraremos en cuatro de ellos *Cux-1*, *Gax*, *Hex* y *Prx-1*, genes que directa o indirectamente han sido relacionados con las patologías vascular y renal.

**Cux-1**

*Cux-1* es el gen homólogo en mamíferos del gen *cut* de *Drosophila*, por lo que también se le conoce como *Cutl-1* (*cut-like gene*). El gen *cut* en *Drosophila* interviene en la determinación del tipo celular en numerosos tejidos, resultando esencial para el desarrollo normal de los túbulos de Malphigi, el sistema excretor en los insectos<sup>32,33</sup>.

Durante el desarrollo, *Cux-1* se expresa en diversos órganos, entre ellos el riñón mesonéfrico y metanéfrico, con una mayor expresión en las áreas nefrógenas, tanto en células mesenquimales como epiteliales, así como alrededor del mesénquima nefrógeno<sup>34</sup>. El patrón de expresión de *Cux-1* coincide en el tiempo y en el espacio con el de los genes Notch. Estos genes codifican receptores de membrana que han sido relacionados tanto con el desarrollo embrionario del riñón como con la reparación renal en el adulto<sup>35</sup>. Se ha especulado con la idea de que *Cux-1* pueda actuar como gen efector de Notch. En este sentido, se ha observado que la línea celular RKE de epitelio renal, que expresa constitutivamente Notch, presenta niveles elevados de *Cux-1*<sup>36</sup>. Al final de la diferenciación *Cux-1* es inhibido o pierde su capacidad de unión a sus dianas, detectándose sólo una señal mínima en glomerulos y túbulos maduros<sup>34</sup>. Este patrón temporal de expresión induce a pensar que *Cux-1* debe jugar algún papel importante en el desarrollo renal.

La expresión de *Cux-1* se ha relacionado con aumentos en la proliferación celular (fig. 3), actuando probablemente como un represor de la transcripción de los inhibidores del ciclo celular p27<sup>kip1</sup> (p27) o p21<sup>Cip1</sup> (p21). En diversos modelos experimentales de enfermedad renal se han detectado alteraciones del ciclo celular (ver recuadro). En este sentido, la reducción de la expresión de p21 y p27 se ha relacionado bien con una activación de la respuesta proliferativa de la célula mesangial, bien con el desarrollo de glomeruloesclerosis e hipertrofia glome-

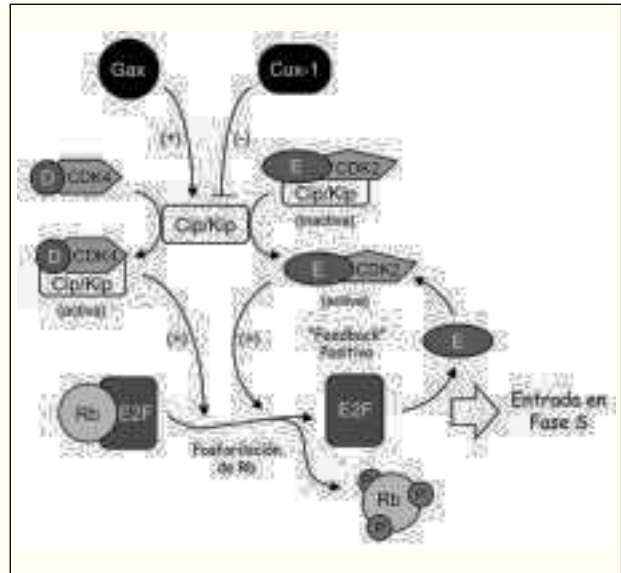


Fig. 3.—Efectos de *Cux-1* y *Gax* sobre en el ciclo celular. Los inhibidores de CDKs p21<sup>Cip1</sup> y p27<sup>Kip1</sup> actúan en el ciclo celular dando lugar a una parada en la transición G<sub>1</sub>/S. Estas proteínas regulan el ciclo celular mediante su interacción con los complejos ciclinaD-CDK4 (o CDK6) y ciclinaE-CDK2. El secuestro de las proteínas Cip/Kip por el complejo ciclinaD-CDK4 facilita la activación del complejo ciclinaE-CDK2. Las quinasas CDK2 y CDK4 (o CDK6) activadas contribuirán secuencialmente a la fosforilación de la proteína del retinoblastoma (*Rb*), anulando su capacidad para reprimir a los miembros de la familia E2F y dando lugar a la activación de genes requeridos para la entrada en Fase S. *Cux-1* y *Gax* actúan de forma opuesta sobre la expresión de p21 y p27. *Gax* es un activador, provocando parada del ciclo celular, mientras que *Cux-1* inhibe la expresión de p21 y 27, favoreciendo así la transición G<sub>1</sub>/S.

ular<sup>37, 38</sup>. Los experimentos con ratones transgénicos parecen ser congruentes con estos datos. Así, ratones knockout p27<sup>-/-</sup> presentan problemas proliferativos que conducen a una hiperplasia multiorgánica<sup>39-41</sup>, de forma parecida a lo que ocurre en ratones transgénicos que expresan *Cux-1* constitutivamente<sup>42</sup>. Un estudio posterior con ratones transgénicos que expresan *Cux-1* constitutivamente, más centrado en el riñón, encontraron que estos animales desarrollaban glomeruloesclerosis y fibrosis intersticial, con un aumento específico de colágeno IV en matriz<sup>43</sup>. También se han encontrado relaciones entre p21 y *Cux-1*. La expresión constitutiva de *Cux-1* produce la inhibición de p21, pero sólo en la fase S del ciclo celular, momento en que se detecta tanto un aumento en la síntesis de *Cux-1* como de la actividad desfosforiladora del homeodominio de *Cux-1* por Cdc25A<sup>44</sup>. La relación de *Cux-1* con p27 y p21 también ha sido encontrada en quistes renales. En ri-



ñones poliquísticos de ratones C57BL/6J-cpk/cpk la expresión de *Cux-1* se encuentra aumentada en el epitelio de los quistes<sup>34</sup>, estando también modificada la expresión de p21 y p27, aunque de forma diferente dependiendo del modelo de ratón utilizado<sup>45</sup>.

Los datos experimentales de cultivo de piezas de riñón embrionario *in vitro* también relacionan a *Cux-1* con el ciclo celular. Estos experimentos determinaron que la inhibición de *Cux-1* con oligonucleótidos antisentido causa un aumento de la apoptosis y un retardo en el crecimiento de los órganos<sup>46</sup>. Este grupo atribuye el aumento de la tasa de apoptosis a una desregulación de los procesos de proliferación/diferenciación, lo que daría lugar a una salida del ciclo hacia la apoptosis<sup>47</sup>.

## Gax

El gen *Gax* fue clonado por primera vez en 1993, observándose una fuerte inhibición de su expresión durante la transición G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> en células musculares lisas<sup>48</sup>. El gen *Gax* se expresa en el tejido cardiovascular adulto incluyendo corazón, pulmones y en las células musculares de la capa media arterial. En tejidos embrionarios se ha detectado expresión en los tres linajes musculares (estriado, liso y cardíaco), así como en el cerebro<sup>49</sup>. La expresión de *Gax* solapa con la del Factor Amplificador de Miocitos 2 (MEF2), un homólogo del Factor de Respuesta al Suero (SRF), que actúa como un regulador transcripcional en células musculares y neuronales y cuya actividad se regula post-traduccionalmente<sup>50</sup>. MEF2 es capaz de unirse específicamente al promotor de *Gax* y activar su síntesis<sup>51</sup>.

*Gax* es rápidamente inhibido en células musculares lisas por señales mitogénicas tales como la Angiotensina II, el Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF) y el suero<sup>48, 52</sup> e inhibido más lentamente por señales de parada de crecimiento como el péptido natriurético del tipo C o la privación de suero<sup>48, 52</sup>. De forma similar, *Gax* es inhibido durante la respuesta proliferativa característica del modelo de daño vascular con balón en arteria carótida de rata<sup>53</sup>. La microinyección de *Gax* en células musculares lisas así como su sobreexpresión en células musculares lisas o fibroblastos producen la parada del ciclo celular en G<sub>1</sub> y la detención de la proliferación celular<sup>54</sup>. *Gax* inhibe la proliferación celular a través de la activación de la expresión de p21 (fig. 3) en células musculares lisas y fibroblastos<sup>54</sup>. También se ha encontrado inhibición del crecimiento por *Gax* en cultivos de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) con un aumento paralelo de la expresión de p21<sup>55</sup>.

La sobreexpresión de *Gax* produce una marcada disminución de la capacidad migratoria en células musculares lisas. Esta actividad, no obstante, no tiene lugar en células p21<sup>-/-</sup>. Paralelamente, *Gax* inhibe la expresión de varias integrinas, aunque este efecto tampoco está presente en células p21<sup>-/-</sup><sup>56</sup>. Por tanto, la actividad antimigratoria de *Gax* y su potencial para modificar la expresión de integrinas probablemente estén relacionadas con su actividad antiproliferativa a través del ciclo celular. En consonancia con estos datos, ratones knockout *Gax*<sup>-/-</sup> muestran una disminución importante en la cantidad de músculo esquelético en las extremidades, debido posiblemente a una disminución de la capacidad migratoria de los precursores del músculo estriado<sup>57</sup>.

Resulta interesante el estudio de Perlman y cols. donde observan que la sobreexpresión de *Gax* en células musculares lisas induce la entrada en apoptosis<sup>58</sup>. La expresión forzada de *Gax* en estas células inhibe la síntesis de Bcl-2 y activa la de Bax. Bax es una proteína proapoptótica de la familia Bcl-2 cuya actividad es bloqueada por la formación de un heterodímero con Bcl-2<sup>59</sup>. De forma consistente con estos datos, fibroblastos embrionarios de ratón Bax<sup>-/-</sup> resultaron insensibles a la inducción de apoptosis por *Gax*. Esta actividad sólo tuvo lugar en células proliferativas y fue independiente de p53 y de p21<sup>58</sup>.

Un estudio reciente ha puesto en evidencia la existencia de interacciones de *Gax* con NF-kappaB. La transfección de células endoteliales con un vector de expresión del gen *Gax* provoca la inhibición de NF-kappaB y de diversas moléculas proinflamatorias<sup>60</sup>, poniendo de manifiesto el potencial antiinflamatorio y antiproliferativo de este gen.

## Hex

Este gen, conocido también como *Prh* (*proline-rich homeodomain gene*), se encontró por primera vez en tejido hematopoyético, pulmones e hígado durante el desarrollo<sup>61,62</sup>. Sin embargo, también se expresa en los primeros estadios del desarrollo embrionario, durante la formación de la gástrula, estando implicado en la determinación de la identidad del área anterior en el embrión<sup>63</sup>, así como en la asimetría lateral<sup>64,65</sup>. Más tarde se descubrió que *Hex* también se expresa en tejidos adultos, jugando un papel central en la hematopoyesis<sup>66,67</sup>.

*Hex* se expresa de forma transitoria en endocardio y en angioblastos embrionarios, actuando además como un marcador temprano de células precursoras del endotelio que desaparece al comienzo de la diferenciación celular<sup>65</sup>. *Hex* también activa la

transcripción del gen SMemb/NMHC-B (cadena pesada de la miosina no muscular tipo B de músculo liso embrionario), un marcador de cambio fenotípico de la célula muscular lisa<sup>68</sup>.

En *Xenopus laevis* ha sido aislado el gen homólogo, *Xhex* que se expresa en células endoteliales vasculares durante el desarrollo de la red vascular. Su expresión en el tejido vascular comienza poco después de que se detecte expresión de *flk-1*, que codifica para el receptor VEGFR-2, esencial en el desarrollo vascular. La sobreexpresión de *Xhex* da lugar a un aumento en el número de células en el endotelio vascular (Newman y cols., 1997). Para otros autores, *Hex* actúa también como inhibidor de la angiogénesis, bloqueando la expresión de los receptores VEGFR-1 y, en especial, de VEGFR-2, teniendo poca o nula acción sobre la diferenciación<sup>69</sup>. La expresión de *Hex* puede incrementarse en respuesta a la acción del factor de crecimiento transformante- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) en células endoteliales. Además, se ha demostrado que TGF- $\beta$ 1 actúa como inhibidor de la expresión de VEGFR-2, bloqueando la unión del factor de transcripción GATA-2 al promotor de VEGFR-2, a través de la formación de un complejo inhibitorio formado por *Hex* y GATA-2<sup>70</sup> (fig. 4). Estos datos sugieren que *Hex* pudiera mediar las acciones anti-angiogénicas del TGF- $\beta$ 1 en células endoteliales. El mecanismo mediante el cual TGF- $\beta$ 1 induce la expresión de *Hex* permanece sin dilucidar. Se sabe que el TGF- $\beta$ 1 induce la actividad de las proteínas Smad-2 y Smad-5 en células endoteliales. Además, la señalización mediada por Smad se ha relacionado con el control de la expresión de *Hex*<sup>71</sup>. En este sentido apuntan los datos obtenidos en ratones transgénicos deficientes en Smad-2. Estos ratones carecen de niveles detectables de *Hex* y fallecen durante la fase de embrión. Analizados en conjunto, estas observaciones parecen sustentar la posibilidad de que la señalización del TGF- $\beta$ 1 esté acoplada a la inhibición de VEGFR-2 mediada por *Hex* a través de alguna vía dependiente de Smad-2 y pone de relieve la importancia que podría tener *Hex* en los mecanismos de transducción de la señal de TGF- $\beta$ 1.

En las células mieloides *Hex* inhibe la expresión del factor eucariótico iniciador de la traducción 4E (eIF4E), regulando posiblemente la transcripción de una forma tejido-específica<sup>72</sup>. Este factor se ha relacionado con los mecanismos de activación de VEGF en células epiteliales renales expuestas a angiotensina II<sup>73</sup>. También hay referencias de que el gen *HoxA9* modula positivamente la actividad del factor eIF4E, compitiendo, a juicio del autor, con *Hex* por el sitio activo<sup>74</sup>.

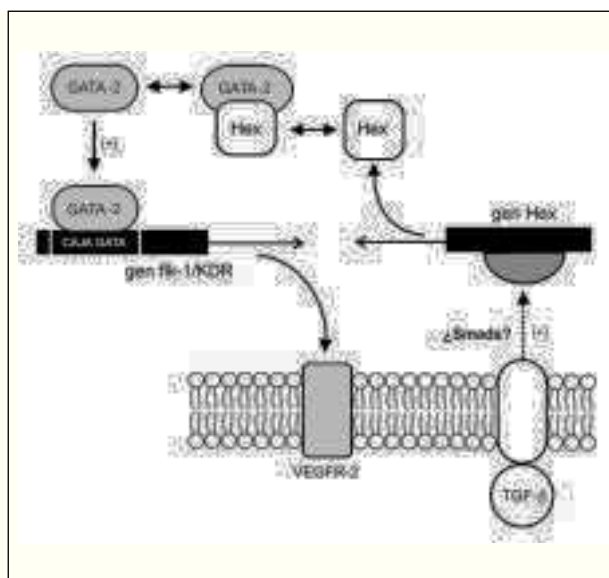


Fig. 4.—Papel de Hex en la regulación de *flk-1* por TGF- $\beta$ 1. TGF- $\beta$ 1 activa el promotor de *Hex*, probablemente a través de la activación de las proteínas Smad. A su vez, *Hex* es capaz de secuestrar el factor nuclear GATA-2, inhibiendo así la transcripción del gen *flk-1*. Esta vía podría estar involucrada en el papel anti-angiogénico del TGF- $\beta$ 1.

El grupo de Schaefer ha relacionado a *Hex* con la familia de factores de transcripción Jun (c-Jun, JunB y JunD), cuya expresión puede estar alterada en diversas patologías vasculares, y modular de esta forma la capacidad transactivadora de estas proteínas, especialmente cuando están formando heterodímeros con c-Fos<sup>75</sup>.

Los experimentos con ratones transgénicos han arrojado resultados divergentes. En un trabajo se encontró que el knockout heterocigótico *Hex*<sup>+/-</sup> presentaba un fenotipo normal, mientras que el homocigoto *Hex*<sup>-/-</sup> moría alrededor del día 11,5 *post coitum*. Su muerte se atribuyó a la incapacidad para desarrollar el hígado, sin que se detectaran señales de problemas vasculares importantes<sup>76</sup>. Sin embargo, en un trabajo posterior se encontró que los ratones *Hex*<sup>-/-</sup> morían alrededor del día 14,5 *post coitum*, mostrando un desarrollo anormal del corazón, una vasculogénesis impedida y niveles elevados de VEGF tipo A<sup>77</sup>.

#### Prx-1

*Prx-1*, también conocido como MHox y PHox, fue clonado por primera vez en 1992<sup>78</sup>. Durante el desarrollo embrionario del ratón se expresa exclusivamente

en las células derivadas del mesodermo, mientras que en el ratón adulto su expresión se detecta en el músculo esquelético, corazón y útero<sup>79</sup>. A *Prx-1* se le ha atribuido una función reguladora del establecimiento de los diferentes linajes mesodérmicos.

La hipertrofia inducida por angiotensina II en células musculares lisas se ha relacionado con un aumento en la transcripción de la  $\alpha$ -actina. El tratamiento de cultivos de células musculares lisas con angiotensina II también produce un aumento de la transcripción de *Prx-1*. Esta proteína es capaz de unirse al promotor de la  $\alpha$ -actina y activar su transcripción, actuando conjuntamente con el factor de respuesta al suero (SRF) y la miocardina, un cofactor de SRF específico de célula muscular lisa (fig. 5)<sup>80, 81</sup>. *Prx-1* (y también el gen homólogo *Prx-2*) ha sido relacionado con la proliferación de células musculares lisas en enfermedades vasculares pulmonares. *Prx-1* colocaliza con el cofactor tenascina-C, que ha sido implicado en la vasculogénesis. La angiotensina II también activa la transcripción de tenascina-C. Esta actividad de la angiotensina II podría estar mediada probablemente por *Prx-1*, ya que *Prx-1* es capaz de transactivar *in vitro* el promotor del factor tenascina-C en células musculares lisas<sup>82</sup>.

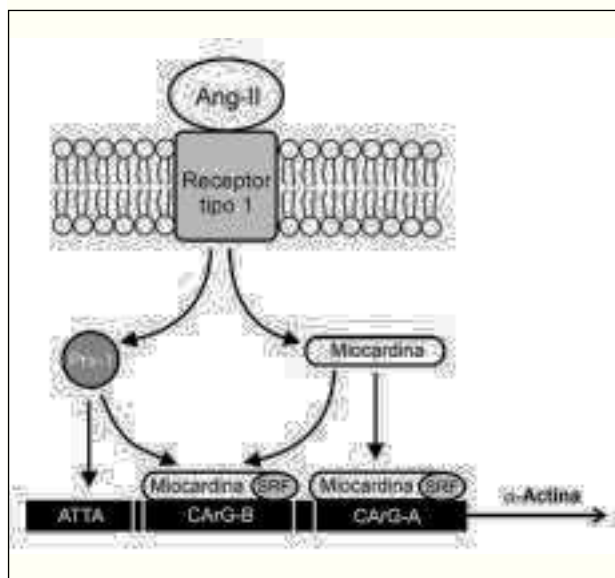


Figura 5.—*Prx-1* como mediador del sistema Renina-Angiotensina. El sistema renina-angiotensina ha sido relacionado con la fibrosis e inflamación renal. *Prx-1* es inducido por la angiotensina II y es capaz de activar el promotor de la  $\alpha$ -actina en células musculares lisas. Para ello se une al promotor de la  $\alpha$ -actina en la caja ATTA, que constituye la secuencia de reconocimiento del homeodominio. También contribuye a la formación de un complejo de activación con SRF y miocardina que se unirá a la caja CA/G-B del promotor.

Respecto a los estudios con ratones knockout, se ha encontrado que *Prx-1* participa en el desarrollo del sistema vascular y de la matriz perivascular, existiendo cierto sinergismo con *Prx-2*. No obstante, mientras que el ratón *Prx-2*<sup>-/-</sup> es viable y no presenta anomalías cardiovasculares importantes, el knockout de *Prx-1* y el doble knockout *Prx-1/Prx-2* presentaron fenotipos similares, con graves defectos en el sistema cardiovascular, aunque más serios si cabe en el doble mutante<sup>83</sup>.

## CONCLUSIONES

Sin duda los genes Hox se encuentran implicados en el desarrollo embrionario del sistema cardiovascular y renal. La cuestión por dilucidar es si están involucrados en las patologías cardiovasculares y renales del adulto y, en caso afirmativo, a qué nivel y cuál es su función. Los datos disponibles parecen indicar que efectivamente existen relaciones entre los genes Hox y las enfermedades vasculares.

Los genes Hox son genes directores con un papel clave durante el desarrollo embrionario<sup>1</sup>. Si en la fase adulta se produce una reactivación de las mismas rutas que actúan durante el desarrollo, muy probablemente estos genes también estén involucrados. La evolución tiende a reutilizar los mecanismos existentes para resolver los nuevos problemas. No se trata de una actuación dirigida, sino que simplemente resulta más sencillo (y por lo tanto, más probable) modificar una respuesta existente que crearla desde cero.

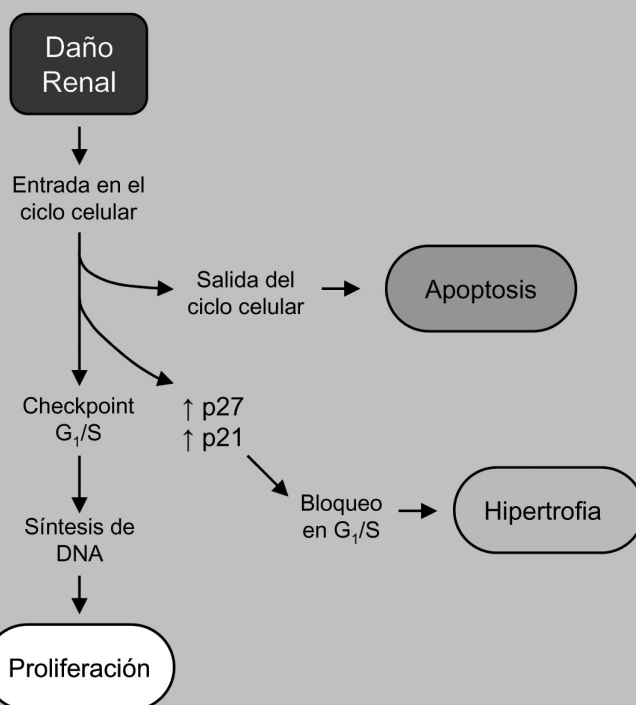
No debe sorprender que ciertos genes del desarrollo actúen también en la edad adulta. Diversos autores afirman que durante la reparación de los tejidos dañados se activan las mismas rutas que durante el desarrollo embrionario<sup>84</sup>. Ya a finales de los años 80 Bacallao avanza esta teoría<sup>85</sup>. Un número importante de datos indica un gran paralelismo entre la resolución de las patologías renales y el desarrollo embrionario del riñón. En este sentido, las altas tasas de síntesis de DNA<sup>86</sup> y de apoptosis<sup>87</sup> encontradas en la regeneración son similares a las encontradas durante el desarrollo<sup>88</sup>. Tanto el riñón dañado<sup>87, 89</sup> como el riñón en desarrollo<sup>90</sup> muestran una vasoconstricción importante, siendo incapaces de producir orina a la máxima concentración. Además, en los últimos años se han descubierto similitudes genéticas notables, como la expresión de algunos genes típicos del desarrollo durante los procesos patológicos renales<sup>2-4</sup>. No obstante, hay que decir que ambos procesos tienen algo que los diferencia: la respuesta inmune. En el adulto después del daño tisular, además de los mecanismos de reparación, se

### Control del Ciclo Celular y Enfermedad Renal

Una célula se reproduce realizando una serie ordenada de eventos que tienen como consecuencia la duplicación de su contenido y la división subsiguiente en 2 células. Este ciclo de duplicación y división es conocido como ciclo celular y está gobernado por una compleja red de interacciones proteicas. El núcleo del sistema de control del ciclo celular consiste en una serie de complejos proteicos compuestos básicamente por una ciclina y una quinasa dependiente de ciclina (CDK). Durante la progresión del ciclo existen varios puntos de chequeo (*checkpoints*) donde éste puede ser bloqueado, dependiendo del medio ambiente celular, el estado de progresión del ciclo y el daño celular existente. Las proteínas que se encargan de este cometido son principalmente las proteínas inhibidoras de ciclín kinasas (CKIs). Entre ellas merece la pena destacar a p21 y p27 por su papel central en la regulación del ciclo celular<sup>91</sup> y por haber sido relacionadas con la enfermedad renal.

Como consecuencia del daño renal pueden producirse diferentes respuestas celulares. Tres son las más habituales: aumento del número de células (proliferación), muerte programada de determinadas células (apoptosis) y/o aumento del tamaño celular (hipertrofia)<sup>38, 92</sup>. Estas respuestas se encuentran interconectadas y reguladas a través del ciclo celular. La proliferación celular tiene lugar cuando las células avanzan a través del ciclo celular, la hipertrofia se relaciona con entrada en el ciclo celular y parada en G<sub>1</sub> y la apoptosis se produce cuando la célula sale del ciclo celular, normalmente durante G<sub>1</sub>.

Los estudios del ciclo celular en riñón están empezando a dar sus frutos. Un artículo de 1997 demostró que el fármaco roscovitine, un antagonista de CDKs, puede frenar la deposición de matriz extracelular en un modelo de glomerulonefritis experimental (Thy 1.1), probablemente inhibiendo la proliferación de las células mesangiales<sup>93</sup>. En 2004 otro artículo puso de manifiesto los efectos beneficiosos del roscovitine en ratones con glomerulopatía colapsante<sup>94</sup>. Otras moléculas inhibidoras de CDKs que se encuentran en pruebas clínicas para el cáncer<sup>95</sup> podrían también revelarse útiles en el tratamiento de patologías renales en un futuro.





ponen en marcha procesos inflamatorios, inexistentes en el embrión. Esta parece ser la razón por la que en la reparación de los tejidos embrionarios no se producen cicatrices, excepto lógicamente en las últimas etapas del embarazo, cuando el sistema inmune está ya activo<sup>84</sup>. Tal vez sean precisamente las complicaciones derivadas de la respuesta inmune las que hacen evolucionar algunos modelos experimentales de enfermedad renal crónica hacia la insuficiencia renal crónica irreversible.

En conclusión, en las enfermedades cardiovasculares y renales tienen lugar fenómenos de remodelado tisular. A este proceso parecen contribuir las alteraciones en la expresión de genes que regulan el ciclo celular y aquellos que son mediadores de la inflamación y la fibrosis. Los genes Hox desempeñan un papel de enorme trascendencia en la morfogénesis, pero también en los procesos de remodelado vascular y angiogénesis postnatales. En estos procesos se han descrito mecanismos moleculares análogos a los que tienen lugar en las distintas fases de las enfermedades vasculares.

Por todo lo expuesto anteriormente creemos, que en la búsqueda de nuevos genes implicados en las enfermedades cardiovasculares y renales con utilidad y aplicabilidad diagnóstica o terapéutica, los genes Hox son firmes genes candidatos.

## BIBLIOGRAFÍA

- Favier B, Dolle P: Developmental functions of mammalian Hox genes. *Mol Hum Reprod* 3: 115, 1997.
- Imgrund M, Grone E, Grone HJ, Kretzler M, Holzman L, Schlondorff D, Rothenpieler UW: Re-expression of the development gene Pax-2 during experimental acute tubular necrosis in mice. *Kidney Int* 56: 1423-1431, 1999.
- Safirstein R: Renal regeneration: reiterating a developmental paradigm. *Kidney Int* 56: 1599-1600, 1999.
- Terada Y, Tanaka H, Okado T, Shimamura H, Inoshita S, Kuwahara M, Sasaki S: Expression and function of the developmental gene Wnt-4 during experimental acute renal failure in rats. *J Am Soc Nephrol* 14: 1223-1233, 2003.
- Bateson W. *Materials for the study of variation*. London: McMillan and Co. 1894.
- Bridges, Morgan: The third chromosome group of mutant characters of *Drosophila melanogaster*. *Carnegie Inst Wash* 327: 93, 1923.
- Lewis EB: A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* 276: 565-570, 1978.
- Duboule D. *Guidebook to the Homeobox Genes*. Oxford: Oxford University Press, 1994.
- Lonai P, Arman E, Czosnek H, Ruddle FH, Blatt C: New murine homeoboxes: structure, chromosomal assignment, and differential expression in adult erythropoiesis. *DNA* 6: 409-418, 1987.
- Kongsuwan K, Webb E, Housiaux P, Adams JM: Expression of multiple homeobox genes within diverse mammalian hemopoietic lineages. *EMBO J* 7: 2131-2138, 1988.
- Shen WF, Largman C, Lowney P, Corral JC, Detmer K, Hauser CA, Simonitch TA, Hack FM, Lawrence HJ: Lineage-restricted expression of homeobox-containing genes in human hemopoietic cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 8536-8540, 1989.
- Patel CV, Gorski DH, LePage DF, Lincecum J, Walsh K: Molecular cloning of a homeobox transcription factor from adult aortic smooth muscle. *J Biol Chem* 267: 26085, 1992.
- Gorski DH, LePage DF, Walsh K: Cloning and sequence analysis of homeobox transcription factor cDNAs with an inosine-containing probe. *Biotechniques* 16: 856, 1994.
- Miano JM, Firulli AB, Olson EN, Hara P, Giachelli CM, Schwartz SM: Restricted expression of homeobox genes distinguishes fetal from adult human smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 900-905, 1996.
- Bruhl T, Urbich C, Aicher D, Acker-Palmer A, Zeiher AM, Dimmeler S: Homeobox A9 transcriptionally regulates the EphB4 receptor to modulate endothelial cell migration and tube formation. *Circ Res* 94: 743, 2004.
- Suenobu S, Takakura N, Inada T, Yamada Y, Yuasa H, Zhang XQ, Sakano S, Oike Y, Suda T: A role of EphB4 receptor and its ligand, ephrin-B2, in erythropoiesis. *Biochem Biophys Res Commun* 293: 1124-1131, 2002.
- Steinle JJ, Meininger CJ, Forough R, Wu G, Wu MH, Granger HJ: EphB4 receptor signaling mediates endothelial cell migration and proliferation via the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Biol Chem* 277: 43830-43835, 2002.
- Andrés AC, Munarini N, Djonov V, Bruneau S, Zuercher G, Loercher S, Rohrbach V, Ziemiecki A: EphB4 receptor tyrosine kinase transgenic mice develop glomerulopathies reminiscent of aglomerular vascular shunts. *Mech Dev* 120: 511, 2003.
- Patel CV, Sharangpani R, Bandyopadhyay S, DiCorleto PE: Endothelial cells express a novel, tumor necrosis factor- $\alpha$ -regulated variant of HOXA9. *J Biol Chem* 274: 1412-1422, 1999.
- Patel CV, Sharangpani R, Bandyopadhyay S, DiCorleto PE: Endothelial cells express a novel, Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ -regulated variant of HoxA9. *J Biol Chem* 274: 1415-1422, 1999.
- Boudreau N, Andrews C, Srebrow A, Ravanpay A, Cheresh DA: Induction of angiogenic phenotype by HoxD3. *J Cell Biol* 139: 257, 1997.
- Myers C, Charboneau A, Boudreau N: Homeobox B3 promotes capillary morphogenesis and angiogenesis. *J Cell Biol* 148: 343-351, 2000.
- Wu Y, Moser M, Bautch VL, Patterson C: HoxB5 is an upstream transcriptional switch for differentiation of the vascular endothelium from precursor cells. *Mol Cell Biol* 23: 5680-5691, 2003.
- Care A, Silvani A, Meccia E, Mattia G, Stoppacciaro A, Parmiani G, Peschle C, Colombo MP: HoxB7 constitutively activates basic fibroblast growth factor in melanomas. *Mol Cell Biol* 16: 4842, 1996.
- Care A, Silvani A, Meccia E, Mattia G, Peschle C, Colombo MP: Transduction of the SkBr3 breast carcinoma cell line with the HoxB7 gene induces bFGF expression, increases cell proliferation and reduces growth factor dependence. *Oncogene* 16: 3285, 1998.
- Care A, Felicetti F, Meccia E, Bottero L, Parenza M, Stoppacciaro A, Peschle C, Colombo MP: HoxB7: A key factor for tumor-associated angiogenic switch. *Cancer Res* 61: 6532, 2001.
- Bostrom K, Tintut Y, Kao SC, Stanford WP, Demer LL: HoxB7 over-expression promotes differentiation of C3H10T1/2 cells to smooth muscle cells. *J Cell Biochem* 78: 210, 2000.
- Myers C, Charboneau A, Cheung I, Hanks D, Boudreau N: Sustained expression of homeobox D10 inhibits angiogenesis. *Am J Pathol* 161: 2099-2109, 2002.

29. Patterson LT, Pembaur M, Potter SS: Hoxa11 and Hoxd11 regulate branching morphogenesis of the uretic bud in the developing kidney. *Development* 128: 2153-2161, 2001.
30. Wellik DM, Hawkes PJ, Capecchi MR: Hox11 paralogous genes are essential for metanephric kidney induction. *Gen Dev* 16: 1423-1432, 2002.
31. Valerius MT, Patterson LT, Feng Y, Potter SS: HoxA11 is a upstream of integrin Alpha-8 expression in the developing kidney. *Proc Nat Acad Sci USA* 99: 8090-8095, 2002.
32. Bodmer R, Barbel S, Sheperd S, Jack JW, Jan LY, Jan YN: Transformation of sensory organs by mutations of the cut locus of *Drosophila melanogaster*. *Cell* 51: 293, 1987.
33. Liu S, McLeod E, Jack J: Four distinct regulatory regions of the cut locus and their effect on cell type specification in *Drosophila*. *Genetics* 127: 151-159, 1990.
34. Vanden Heuvel GB, Bodmer R, McConnel KR, Nagami GT, Igarashi P: Expression of a cut-related gene in developing and polycystic mouse kidney. *Kidney Int* 50: 453-461, 1996.
35. McCright B: Notch signaling in kidney development. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 12: 5-10, 2003.
36. Sharma M, Fopma A, Brantley JG, Vanden Heuvel GB: Co-expression of Cux-1 and Notch signaling pathway components during kidney development. *Dev Dyn* 231: 828-838, 2004.
37. Shankland SJ, Hugo C, Coats SR, Nangaku M, Pichler RH, Gordon KL, Pippin J, Roberts JM, Couser WG, Johnson RJ: Changes in cell-cycle protein expression during experimental mesangial proliferative glomerulonephritis. *Kidney Int* 50: 1230-1239, 1996.
38. Wolf G, Shankland SJ: Cell cycle control in glomerular disease. *Prog Cell Cycle Res* 5: 71-79, 2003.
39. Fero ML, Rivkin M, Tasch M, Porter P, Carow CE, Firpo E, Polyak K, Tsai LH, Broudy V, Perlmutter RM, y cols.: A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27(Kip1)-deficient mice. *Cell* 85: 733, 1996.
40. Kiyokawa H, Kineman RD, Manova-Todorova KO, Soares VC, Hoffman ES, Ono M, Khanam D, Hayday AC, Frohman LA, Koff A: Enhanced growth of mice lacking the cyclin-dependent kinase inhibitor function of p27(Kip1). *Cell* 85: 721-732, 1996.
41. Nakayama K, Ishida N, Shirane M, Inomata A, Inoue T, Shishido N, Horii I, Loh DY, Nakayama K: Mice lacking p27(Kip1) display increased size body, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors. *Cell* 85: 707-720, 1996.
42. Ledford AW, Brantley JG, Kemeny G, Foreman TL, Quaggin SE, Igarashi P, Oberhaus SM, Rodova M, Calvet JP, Vanden Heuvel GB: Deregulated expression of the homeobox gene Cux-1 in transgenic mice results in downregulation of p27kip1 expression during nephrogenesis, glomerular abnormalities, and multiorgan hyperplasia. *Dev Biol* 245: 157-171, 2002.
43. Brantley JG, Sharma M, Alcalay NI, Heuvel GB: Cux-1 transgenic mice develop glomerulosclerosis and interstitial fibrosis. *Kidney Int* 63: 1240, 2003.
44. Coqueret O, Berube G, Nepveu A: The mammalian Cut homeodomain protein functions as a cell-cycle-dependent transcriptional repressor which downmodulates p21WAF1/CIP1/SDI1 in S phase. *Embo J* 17: 4680-4694, 1998.
45. Sharma M, Brantley JG, Alcalay NI, Zhou J, Heystek E, Maser RL, Vanden Heuvel GB: Differential expression of Cux-1 and p21 in polycystic kidneys from Pkd1 null and cpk mice. *Kidney Int* 67: 432-442, 2005.
46. Quaggin SE, Yeger H, Igarashi P: Antisense oligonucleotides to Cux-1, a Cut-related Homeobox gene, cause increased apoptosis in mouse embryonic kidney culture. *J Clin Invest* 99: 718-724, 1997.
47. Thompson CB: Apoptosis in the pathogenesis and treatment of diseases. *Science* 267: 1456-1462, 1995.
48. Gorski DH, LePage DF, Patel CV, Copeland NG, Jenkins NA, Walsh K: Molecular cloning of a diverged homeobox gene that is rapidly down-regulated during the G0/G1 transition in vascular smooth muscle cells. *Mol Cell Biol* 13: 3722-3733, 1993.
49. Skopicki HA, Lyons GE, Schatteman G, Smith RC, Andrés V, Schirm S, Isner J, Walsh K: Embryonic expression of the Gax homeodomain protein in cardiac, smooth, and skeletal muscle. *Circ Res* 80: 604-606, 1997.
50. Suzuki E, Guo K, Kolman M, Yu Y, Walsh K: Serum induction of MEF2/RSRF expression in vascular myocytes is mediated at the level of translation. *Mol Cell Biol* 15: 3415-3423, 1995.
51. Andrés V, Fisher S, Wearsch P, Walsh K: Regulation of Gax homeobox gene transcription by a combination of positive factors including MEF2. *Mol Cell Biol* 15: 4272-4281, 1995.
52. Yamashita J, Itoh H, Ogawa Y, Tamura N, Takaya K, Igaki T, Doi K, Chun TH, Inoue M, Masatsugu K, y cols.: Opposite regulation of gax homeobox expression by angiotensin II and C-type natriuretic peptide. *Hypertension* 29: 381-387, 1997.
53. Weir L, Chen D, Pastore C, Isner JM, Walsh K: Expression of gax, a growth arrest gene, is rapidly downregulated in the rat carotid artery during the proliferative response to balloon injury. *J Biol Chem* 270: 5457-5461, 1995.
54. Smith RC, Branellec D, Gorski DH, Guo K, Perlman H, Dedieu JF, Pastore C, Mahfoudi A, Deneffe P, Isner JM, y cols.: p21CIP1-mediated inhibition of cell proliferation by overexpression of the Gax homeodomain gene. *Genes Dev* 11: 1674-1689, 1997.
55. Gorski DH, Walsh K: Control of vascular cell differentiation by homeobox transcription factor. *Trends Cardiovasc Med* 13: 213-220, 2003.
56. Witzgenbichler B, Kureishi Y, Luo Z, Le Roux A, Branellec D, Walsh K: Regulation of smooth muscle cell migration and integrin expression by the Gax transcription factor. *J Clin Invest* 104: 1469-1480, 1999.
57. Mankoo BS, Collins NS, Ashby P, Grigorieva E, Pevny LH, Candia A, Wright CV, Rigby PW, Pachnis V: Mox2 is a component of the genetic hierarchy controlling limb muscle development. *Nature* 400: 69-73, 1999.
58. Perlman H, Sata M, Le Roux A, Sedlak TW, Branellec D, Walsh K: Bax-mediated cell death by the Gax homeoprotein requires mitogen activation but is independent of cell cycle activity. *Embo J* 17: 3576-3586, 1998.
59. Zhang Z, Lapolla SM, Annis MG, Truscott M, Roberts GJ, Miao Y, Shao Y, Tan C, Peng J, Johnson AE, y cols.: Bcl-2 homodimerization involves two distinct binding surfaces, a topographic arrangement that provide an effective mechanism for Bcl-2 to capture activated Bax. *J Biol Chem* 279: 43920-43928, 2004.
60. Patel S, Leal AD, Gorski DH: The homeobox gene Gax inhibits angiogenesis through inhibition of Nuclear Factor-KappaB-dependent endothelial cell gene expression. *Cancer Res* 65: 1414-1424, 2005.
61. Crompton MR, Bartlett TJ, MacGregor AD, Manfioletti G, Buratti E, Giancotti V, Goodwin GH: Identification of a novel vertebrate homeobox gene expressed in haematopoietic cells. *Nucleic Acids Res* 20: 5661, 1992.
62. Hromas R, Radich J, Collins S: PCR cloning of an orphan homeobox gene (PRH) preferentially expressed in myeloid and liver cells. *Biochem Biophys Res Commun* 195: 976-983, 1993.
63. Harrison SM, Dunwoodie SL, Arkell RM, Lehrach H, Beddington RS: Isolation of novel tissue-specific genes from cDNA libraries representing the individual tissue constituents of the gastrulating mouse embryo. *Development* 121: 2479, 1995.

64. Brickman JM, Jones CM, Clements M, Smith JC, Beddington RS: Hex is a transcriptional repressor that contributes to anterior identity and suppresses Spermann organizer function. *Development* 127: 2303, 2000.
65. Thomas PQ, Brown A, Beddington RS: Hex: a homeobox gene revealing peri-implantation asymmetry in the mouse embryo and an early transient marker of endothelial cell precursors. *Development* 125: 85-94, 1998.
66. Lawrence HJ, Sauvageau G, Humphries RK, Largman C: The role of Hox homeobox genes in normal and leukemic hematopoiesis. *Stem Cells* 14: 281-291, 1996.
67. Owens BM, Hawley RG: Hox and non-Hox homeobox genes in leukemic hematopoiesis. *Stem Cells* 20: 364-374, 2002.
68. Sekiguchi K, Kurabayashi M, Oyama Y, Aihara Y, Tanaka T, Sakamoto H, Hoshino Y, Kanda T, Yokoyama T, Shimomura Y, y cols.: Homeobox protein Hex induces Smemb/Nonmuscle myosin Heavy Chain-B gene expression through the cAMP-responsive element. *Circ Res* 88: 52-58, 2001.
69. Nakagawa T, Abe M, Yamazaki T, Miyashita H, Niwa H, Kokubun S, Sato Y: Hex acts as a negative regulator of angiogenesis by modulating the expression of angiogenesis-related gene in endothelial cells *in vitro*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 231-237, 2003.
70. Minami T, Murakami T, Horiuchi K, Miura M, Noguchi T, Miyazaki J, Hamakubo T, Aird WC, Kodama T: Interaction between Hex and GATA transcription factor in vascular endothelial cells inhibits flk-1/KDR-mediated Vascular Endothelial Growth Factor signaling. *J Biol Chem* 279: 20626-20635, 2004.
71. Zhang W, Yatskevich TA, Cao X, Antin PB: Regulation of Hex gene expression by smads-dependent signalling pathway. *J Biol Chem* 227: 45435-45441, 2002.
72. Topisirovic I, Culjkovic B, Cohen N, Pérez JM, Skrabanek L, Borden KL: The proline-rich homeodomain protein, PRH, is a tissue-specific inhibitor of eIF4E-dependent cyclin D1 mRNA transport and growth. *EMBO J* 22: 689-703, 2003.
73. Feliars D, Duraisamy S, Barnes JL, Ghosh-Choudhury G, Kasinath BS: Translational regulation of vascular endothelial growth factor expression in renal epithelial cells by angiotensin II. *Am J Renal Physiol* 288: F521-529, 2005.
74. Topisirovic I, Kentsis A, Pérez JM, Guzmán ML, Jordan CT, Borden KL: Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E activity is modulated by HoxA9 at multiple levels. *Mol Cellular Biol* 25: 1100-1112, 2005.
75. Schaefer LK, Wang S, Schaefer TS: Functional interaction of Jun and Homeodomain proteins. *J Biol Chem* 276: 43074-43082, 2001.
76. Martínez-Barberá JP, Clements M, Thomas P, Rodríguez T, Meloy D, Kioussis D, Beddington RS: The homeobox gene hex is required in definitive endodermal tissues for normal forebrain, liver and thyroid formation. *Development* 127: 2433-2445, 2000.
77. Hallaq H, Pinter E, Enciso J, McGrath J, Zeiss C, Brueckner M, Madri J, Jacobs HC, Wilson CM, Vasavada H, y cols.: A null mutation of Hhex results in abnormal cardiac development, defective vasculogenesis and elevated Vegfa levels. *Development* 131: 5197-5207, 2004.
78. Kern MJ, Witte DP, Valerius MT, BJ A, Potter SS: A novel murine homeobox gene isolated by a tissue specific PCR cloning strategy. *Nucleic Acids Research* 20: 5189-5195, 1992.
79. Cserjesi P, Lilly B, Bryson L, Wang Y, Sassoon DA, Olson EN: Mhox: a mesodermally restricted homeodomain protein that binds an essential site in the muscle creatine kinase enhancer. *Development* 115: 1087, 1992.
80. Hautmann MB, Thompson MM, Swartz EA, Olson EN, Owens GK: Angiotensin-II induced stimulation of smooth muscle alpha-actin expression by serum response factor and the homeodomain transcription factor Mhox. *Circ Res* 81: 600-610, 1997.
81. Yoshida T, Hoofnagle GK, Owens GK: Myocardin and Prx1 contribute to angiotensin II-induced expression of smooth muscle alpha-actin. *Circ Res* 94: 1075-1082, 2004.
82. Jones SJ, Meech R, Edelman DB, Oakey RJ, Jones PL: Prx1 controls vascular smooth muscle cell proliferation and Tensin-C expression and is upregulated with Prx2 in pulmonary vascular disease. *Circ Res* 89: 131-138, 2001.
83. Bergwerff M, Gittenberger-de Groot AC, Wisse LJ, DeRuiter MC, Wessels A, Martin JF, Olson EN, Kern MJ: Loss of function of the Prx1 and Prx2 homeobox genes alters architecture of the great elastic arteries and ductus arteriosus. *Virchows Arch* 436: 12, 2000.
84. Martin P, Parkhurst SM: Parallels between tissue repair and embryo morphogenesis. *Development* 131: 3021-3034, 2004.
85. Bacallao R, Fine LG: Molecular events in the organization of renal tubular epithelium: from nephrogenesis to regeneration. *Am J Physiol* 257: F913-924, 1989.
86. Shimizu A, Yamanaka N: Apoptosis and cell desquamation in repair process of ischemic tubular necrosis. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 64: 171-180, 1993.
87. Safirstein R, Price PM, Saggi SJ, Harris RC: Changes in gene expression after temporary renal ischemia. *Kidney Int* 37: 1515, 1990.
88. Koseki C, Herzlinger D, al-Awqati Q: Apoptosis in metanephric development. *J Cell Biol* 119: 1327-1333, 1992.
89. Price PM, Megyesi J, Saggi S, Safirstein RL: Regulation of transcription by the rat EGF gene promoter in normal and ischemic murine kidney cells. *Am J Physiol* 268: F664-670, 1995.
90. José PA, Fildes RD, Gómez RA, Chevalier RL, Robillard JE: Neonatal renal function and physiology. *Curr Opin Pediatr* 6: 172-177, 1994.
91. Sherr CJ, Roberts J: CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13: 1501, 1999.
92. Shankland SJ, Wolf G: Cell cycle regulatory proteins in renal disease: role in hypertrophy, proliferation and apoptosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 278: F515-529, 2000.
93. Pippin JW, Qu Q, Meijer L, Shankland SJ: Direct *in vivo* inhibition of the nuclear cell cycle cascade in experimental mesangial proliferative glomerulonephritis with Roscovite, a novel cyclin-dependent kinase antagonist. *J Clin Invest* 100: 2512-2520, 1997.
94. Gherardi D, D'Agati V, Chu TH, Barnett A, Gianella-Borradori A, Gelman IH, Nelson PJ: Reversal of collapsing glomerulopathy in mice with the cyclin-dependent kinase inhibitor CYC202. *J Am Soc Nephrol* 15: 1212-1222, 2004.
95. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN: The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif* 36: 131-149, 2003.