

## LA REGENERACIÓ I L'HOMEÒSTASI EN LES PLANÀRIES, UN MODEL CLÀSSIC DE BIOLOGIA DEL DESENVOLUPAMENT

FRANCESC CEBRIÀ,<sup>1</sup> TERESA ADELL,<sup>1</sup> JOSEP FRANCESC ABRIL I EMILI SALÓ

*Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona*

Adreça per a la correspondència: Emili Saló. Departament de Genètica,  
Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona. Av. Diagonal, 645. 08028 Barcelona.  
Tel.: 934 035 977. Adreça electrònica: [esalo@ub.edu](mailto:esalo@ub.edu).

### RESUM

La regeneració és la capacitat d'un organisme de reemplaçar fragments perduts a causa d'una amputació traumàtica o degeneració. La regeneració de les noves estructures té lloc bé a partir de proliferació cel·lular i formació *de novo*, bé per remodelació dels teixits preexistents. Les planàries poden regenerar un nou organisme sencer a partir de petits fragments del seu cos. Aquest fet ha atret l'interès dels científics al llarg de la història. El 1814, Dalyell conclou que les planàries «es poden considerar immortals sota la fulla d'una navalla». La regeneració en les planàries requereix la generació de teixit nou en el lloc de la ferida mitjançant proliferació cel·lular, que produeix un teixit nou indiferenciat, el blastema, i el remodelatge dels teixits preexistents per recuperar les proporcions del nou organisme regenerat. Una altra propietat espectacular de les planàries és la capacitat de créixer i decreixer segons la ingesta d'aliment. En tot moment, però, al llarg d'aquest creixement/decreixement es mantenen les proporcions corporals i funcions correctes, gràcies al control homeostàtic. Tota aquesta plasticitat és deguda, a escala cel·lular, a la presència de cèl·lules mare totipotents en un alt percentatge (entre el 20-30 % del total cel·lular en un organisme adult). Una altra propietat fonamental és la contínua activitat dels mecanismes morfogenètics, que normalment apareixen una sola vegada en el desenvolupament de la resta dels altres organismes. L'aplicació de noves metodologies a escala cel·lular, molecular i genètica en l'era postgenòmica ens ha permès estudiar funcionalment vies i gens del desenvolupament en un nou escenari, la regeneració de planàries.

**Paraules clau:** planària, regeneració, homeòstasi, cèl·lula mare, formació del patró.

---

<sup>1</sup> Aquests autors han contribuït de la mateixa manera en aquest treball.

## PLANARIAN REGENERATION AND HOMEOSTASIS, A CLASSIC DEVELOPMENTAL BIOLOGY MODEL

### SUMMARY

Regeneration is the ability of the fully developed organism to replace fragments lost by traumatic amputation or degeneration. Regeneration of the new structures is achieved either by cell proliferation and *de novo* formation, or by remodelling of the pre-existing tissues. Planarians, which can regenerate a whole new organism from a small piece of their body, have attracted the interest of scientists throughout history. In 1814, Dalyell concluded that planarians could “almost be called immortal under the edge of the knife”. Planarian regeneration involves the generation of new tissue at the wound site via cell proliferation, producing a new undifferentiated tissue or blastema, and the remodelling of pre-existing tissues to restore proportions. Another astonishing property of planarians is their capacity to grow and shrink depending on food availability and temperature. Remarkably, during the whole growth/degrowth process planarians keep normal body proportions and functions, thanks to a homeostatic control. All that plasticity is based, at the cellular level, upon the presence of totipotent stem cells in a high proportion (20-30% of total cell number in an adult organism). Another basic property is the continuous activity of the morphogenetic mechanisms that usually appear only once during the development of other model systems. The application of new methodologies at the cellular, molecular and genetic level in the postgenomics era allows us to functionally analyse the universal developmental pathways and genes in a new scenario, planarian regeneration.

**Key words:** planarian, regeneration, homeostasis, stem cell, pattern formation.

### INTRODUCCIÓ

La planària és un organisme simple però tan plàstic que es pot considerar un adult amb característiques embrionàries, molt accessible a l'estudi de fenòmens de determinació i manteniment del patró, control de cèl·lules mare, homeòstasi i formació d'òrgans. Tots aquests processos són presents en el desenvolupament de tots els organismes i estan molt conservats en el món animal. Si tenim un accident i perdem qualsevol part de les nostres extremitats no la podrem recuperar. En canvi, una planària es pot trossejar en centenars de petits fragments i en dues setmanes regeneraran centenars d'organismes sencers, ben proporcionats i totalment funcionals. Quines

són les diferències entre nosaltres i elles? Per què hi ha organismes amb una gran capacitat d'autoregenerar-se, mentre que altres no en tenen? La planària és un dels organismes amb una capacitat més alta de regeneració. Certament, ja que els fragments regenerats poden créixer de nou i produeixen organismes de la mateixa mida que la inicial, però més joves, ja que han estat reconstituïts per noves cèl·lules. Quines són les característiques que permeten regenerar tan eficientment les planàries? Un dels punts clau és l'existència en l'organisme adult d'una població de cèl·lules mare pluripotents, anomenades *neoblasts*, que proliferen contínuament i es diferencien en tots els tipus cel·lulars de l'organisme. Alhora, aquest organisme presenta

una plasticitat morfològica impressionant; atès que hi ha un recanvi celular constant, no té una mida fixa, i depenent de la ingesta d'aliment va modificant la seva grandària mantenint sempre la seva forma i funcionalitat. Això requereix mecanismes de manteniment del patró i de les proporcions que estiguin contínuament activats. Aquesta propietat és exclusiva de les planàries en tot el món animal i, per tant, l'estudi de la regeneració en les planàries representa una oportunitat única per a l'estudi de l'homeòstasi i la regeneració. Per contra, altres models biològics considerats clàssics en el camp del desenvolupament, com ara *Drosophila*, *Caenorhabditis elegans*, amfibis, el peix zebra, el pollet i el ratolí, presenten un model de desenvolupament canònic i terminal; és a dir, l'organisme es desenvolupa una sola vegada, en arribar a la fase adulta presenta tots els seus òrgans formats i és incapaç de repetir qualsevol procés de desenvolupament o regeneració total, tot i que algun d'aquests, com els amfibis, poden regenerar parts del cos com les extremitats, la mandíbula, la lent i la retina de l'ull. D'altra banda, el peix zebra pot regenerar els extrems de les aletes i la part distal del cor. Pel que fa als mamífers, la possibilitat de regenerar es limita a ossos fracturats, el fetge parcialment seccionat o estructures molt especialitzades, com és el cas del recanvi anual de les banyes dels cérvols mascles. Aquesta gran diversitat en la capacitat regenerativa, independent de la complexitat dels organismes, obre grans qüestions com ara: quins són els elements clau que permeten que hi hagi organismes capaços de regenerar-se i altres no? Com i què inicia el procés de regeneració? Quin és l'origen de les cèl·lules regeneratives? Com s'estableix el patró a les regions regenerades i com s'ajusta el teixit antic a les noves proporcions per restituir un nou organisme funcional? Són els mateixos meca-

nismes geneticomoleculars del desenvolupament actuant en un nou entorn? És possible reactivar aquests processos en organismes que no presenten capacitat regenerativa de manera natural i assolir així els reptes plantejats en l'anomenada medicina regenerativa? La quantitat de preguntes que es plantegen al voltant d'aquest tema és immens i el potencial de les respostes per a futures aplicacions mostra que la regeneració de les planàries permet afrontar reptes biològics no accessibles en altres models menys plàstics. Per intentar entendre el procés de regeneració, en el Departament de Genètica de la Universitat de Barcelona fa prop de quaranta anys es va iniciar una línia de recerca adreçada a l'estudi de la regeneració de les planàries. Actualment, dintre del que s'anomena l'era postgenòmica, les noves metodologies de la biologia molecular i de la nanotecnologia ens permeten rastrejar el genoma, transcriptoma i proteoma de les planàries en diverses condicions genètiques. Això ha permès caracteritzar funcionalment gens i vies del desenvolupament durant la regeneració d'aquests animals.

## EL MODEL

Les planàries són cucs plans de vida lliure que representen un subgrup dels plati-helminths. Encara que n'hi ha d'adaptats a la vida terrestre i marina, els del nostre estudi són d'aigües dolces. Les planàries són organismes tous, sense teixit esquelètic i aplanats dorsoventralment, no presenten sistema circulatori i l'oxigen dels teixits s'obté per difusió de l'exterior. Presenten una clara cefalització, amb un cervell anterior i, normalment, un parell d'ulls (vegeu la figura 1). El sistema digestiu consisteix en una faringe, en una posició central en l'animal, que connecta amb un intestí cec

sense anus i altament ramificat (vegeu la figura 1a). Entre el sistema digestiu i l'epidermis apareix un teixit parenquimàtic desorganitzat on es troben diferents tipus cel·lulars diferenciats i un d'indiferenciat, els neoblasts, els quals representen el 20-30 % de les cèl·lules totals d'un organisme adult. Els neoblasts són els únics tipus cel·lulars amb capacitat proliferativa i de diferenciar-se en tots els tipus cel·lulars de la planària adulta, incloent-hi la línia germinal (Saló, 2006; Handberg-Thorsager *et al.*, 2008). Les dades de filogenia molecular els situen dins dels lofotrocozoous, estretament emparentats amb els anèl·lids i mol·luscs, grup germà dels ecdisozoous, i conjuntament defineixen el grup de protostomats. En algunes espècies s'han desenvolupat estratègies de reproducció asexual per escissió, i es produeixen organismes clònics a partir de cues autoseccionades per estirament de l'organisme adult mateix. La regeneració posterior produeix planàries completes que ràpidament creixen i es tornen a dividir. D'aquesta manera, en el laboratori hem pogut establir línies clonals de milers d'organismes, generades a partir d'un únic individu, a força de facilitar-ne el creixement al màxim subministrant aliment de manera regular (fragments de fetge de vedella orgànica).

### La regeneració de les planàries

Després de l'amputació d'un organisme adult, la primera reacció és la cicatrització. Aquesta té lloc gràcies a la contracció immediata dels músculs de la zona de la ferida, que permeten el contacte entre l'epidermis antiga dorsal i ventral, de manera que en els primers 15 min la ferida ja està recoberta per una fina capa de cèl·lules epidèrmiques totalment estirades provinents de l'epidermis més propera (vegeu la figura

2). Es considera que aquesta interacció epitelio-mesènquima que es produeix durant la cicatrització podria ser la iniciadora de la resposta regenerativa. De fet, les concentracions elevades de magnesi en el medi, que inhibeixen la contracció muscular, impossibiliten la cicatrització i també la regeneració. Un cop cicatritzada la ferida, s'inicia una ràpida i elevada resposta mitòtica dels neoblasts, especialment els situats propers a la zona de la ferida (uns 500 µm), en l'anomenat *postblastema* (Saló i Bagaña, 1984). No s'han observat processos de desdiferenciació, de manera que la producció de teixit nou inicialment indiferenciat i conseqüentment despigmentat de regeneració, anomenat *blastema* (vegeu la figura 2), es produeix exclusivament per l'aportació local dels nous neoblasts que proliferen en el *postblastema*. Els neoblasts situats lluny de la ferida, tot i que mostren un increment de l'activitat mitòtica, no participen en el creixement del *blastema*. Si la regió per regenerar és el cap, el *blastema* es diferencia en la regió distal perduda; en aquest cas es diferencien els ganglis cefàlics i aquests indueixen la diferenciació dels ulls i altres sensors del cap (vegeu la figura 2). Paral·lelament, la resta de l'organisme s'ajusta a les noves proporcions i hi ha un seguit de fenòmens de mort cel·lular, autofàgia (González-Estévez *et al.*, 2007) i remodelació dels teixits preexistents, que permetran reajustar l'organisme a les noves proporcions axials.

### Les noves tecnologies aplicades a la planària

L'aplicació de noves tecnologies a la planària en la darrera dècada ha obert noves perspectives en l'estudi de la regeneració. Les hibridacions *in situ* permeten visualitzar l'expressió, en l'espai i temps, de gens

relacionats amb la regeneració. D'altra banda, l'accessibilitat de la genètica inversa en la planària per interferència de RNA (iRNA), mitjançant alimentació o injecció de RNA de doble cadena, ens permet interferir en l'expressió gènica i generar per primer cop fenotips mutants (Pineda *et al.*, 2000). Finalment, la producció d'organismes transgènics per electroporació ens ha permès produir els primers organismes transgènics en l'espècie *Girardia tigrina* (González-Estévez *et al.*, 2003), completant així el ventall de modificacions genètiques bàsiques per a l'estudi de qualsevol procés biològic a escala cel·lular, molecular i genètica.

En els darrers anys, gràcies al treball del Centre de Seqüenciació Genòmica de la Universitat de Washington, a Saint Louis (EUA), hi ha accessibles més de catorze milions de traces de la seqüència genòmica de l'espècie objecte del nostre estudi, *Schmidtea mediterranea*. En aquests moments els primers esborranys del genoma de la planària ja han estat assemblats, malgrat que, a causa de les propietats intrínseques a escala de seqüència d'aquesta espècie, bàsicament el baix contingut de guanina-citosina i les característiques de les seqüències repetitives, aquests assemblatges estan força fragmentats. Per exemple, la versió 3.1 està formada per uns 90.000 còntigs, o per 45.000 còntigs si es te-

nen en compte un conjunt recent de traces aparellades (*paired-end reads*) (Robb *et al.*, 2008). Aquest coneixement genòmic, però, juntament amb la informació existent de més de 10.000 *unigenes* (obtinguts per l'NCBI a partir de la clusterització d'un conjunt de 75.000 seqüències d'EST) i un projecte recentment dut a terme pel nostre laboratori per obtenir el transcriptoma (basat en les noves tecnologies de la piroseqüenciació 454) (Abril *et al.*, 2010), permet afrontar la recerca de gens del desenvolup-



FIGURA 1. Planària d'aigua dolça *Schmidtea mediterranea*. a) Imatge de camp clar d'una planària lliscant al fons d'una càpsula de Petri. A la part anterior s'observen les taques oculars o ulls. A la part central, la faringe (f). b) Immunotinció contra la sinapsina (3C11), que ens permet observar els dos ganglis cefàlics (gc) connectats amb dos cordons nerviosos ventrals (cn). Barra: 1 mm.



FIGURA 2. Regeneració cefàlica del mateix organisme de la figura 1 en diversos temps. El blastema és el teixit no pigmentat. Els nombres fan referència a dies després de la decapitació. Després del tall (0) hi ha una contracció muscular i cicatrització, seguida d'una ràpida resposta mitòtica dels neoblasts propers a la ferida (1). Posteriorment, el nou teixit inicialment indiferenciat, i per tant despigmentat, va creixent (3). Tot seguit, s'inicia la diferenciació amb l'aparició de la pigmentació de l'epidermis i la diferenciació de les taques oculars (5-10). Finalment, l'organisme modifica el teixit antic per tal d'ajustar-se a les noves proporcions (14). Barra: 1 mm.

pament *in silico*. Aquesta cerca computacional es basa en la similitud de les seqüències dels gens del desenvolupament, ja que aquests es troben altament conservats en tota l'escala filogenètica animal. Les anàlisis preliminars dels resultats a escala d'expressió, obtinguts a partir de microxips de DNA amb sondes per a oligonucleòtids específics de planària que es van hibridar amb el transcriptoma de regenerants anteriors i regenerants posteriors, també ens ha permès localitzar gens candidats de les vies de senyalització en la formació de les estructures relacionades amb els ulls. D'altra banda, hem produït un conjunt de bases de dades de pèptids traduïts a partir de les seqüències dels còntigs de l'assemblatge i dels EST, per tal de facilitar la detecció i selecció de noves seqüències funcionals a escala de proteòmica (Fernandez-Taboada *et al.*, 2011). Finalment, en disposar d'un catàleg més acurat dels transcrits de planària, s'han iniciat estudis d'expressió a escala de tot el transcriptoma, mitjançant anàlisis comparatives entre biblioteques DGE (*digital gene expression*) específiques de diferents tipus de mostres, com per exemple neoblasts i cèl·lules diferenciades. Aquesta plèthora de noves metodologies moleculars i tecnologies de seqüenciament massiva ens permet explorar les oportunitats biològiques d'aquest sistema únic per a estudis de regeneració, manteniment del patró, homeòstasi i, especialment, el control de les cèl·lules mare en qualsevol circumstància biològica.

## RESULTATS

Anem a veure alguns dels temes actuals de més interès que presenta la regeneració de les planàries i la seva possible repercussió en el coneixement de mecanismes moleculars comuns amb altres espècies.

### Els neoblasts, les cèl·lules mare totipotents de planària

En planàries intactes els neoblasts mostren un nivell proliferatiu basal per mantenir el recanvi cel·lular de tots els tipus cel·lulars diferenciats. Durant la regeneració, aquestes cèl·lules incrementen la taxa proliferativa per tal de produir el nou teixit de regeneració, o blastema, i permetre així la remodelació dels fragments regenerats a les noves proporcions. El coneixement dels mecanismes cel·lulars que controlen els fluxos de diferenciació i alhora permeten el manteniment d'un estoc estable de cèl·lules indiferenciades, així com el control proliferatiu per evitar la producció de tumors, o bé els diferents fluxos de diferenciació envers els diferents tipus cel·lulars per mantenir l'homeòstasi d'organismes que canvien contínuament de mida i de proporcions de tipus cel·lulars diferenciats, són algunes de les qüestions d'especial interès per la seva repercussió en altres models, com les cèl·lules mare de vertebrats. La comprensió del funcionament i la regulació dels neoblasts requereix un coneixement previ dels elements genètics específics que hi participen. En aquest sentit hem desenvolupat una estratègia de proteòmica de neoblasts. Aquesta consisteix a obtenir el proteoma d'organismes normals i confrontar-lo amb un segon proteoma provinent d'organismes que han perdut la població de neoblasts gràcies a la irradiació amb raigs X. Com que els neoblasts són l'únic tipus cel·lular proliferatiu, la irradiació ionitzant provoca delecions i duplicacions en el seu genoma, cosa que fa que les cèl·lules esdevinguin inviables i acabin morint. L'estudi del proteoma de les dues poblacions proteòmiques i la comparació dels perfils peptídics amb els perfils calculats *in silico* sobre una base de dades de proteïnes traduïdes a partir de les diferents anotacions gèniques

sobre el genoma de planària, ens ha permès caracteritzar proteïnes relacionades amb la proliferació cel·lular, reparació del DNA, proteïnes d'estrès cel·lular com les HSP (proteïnes de xoc tèrmic) i proteïnes de la biosíntesi de RNA (Fernandez-Taboada *et al.*, 2010, 2011), així com unes 6.000 seqüències candidates més que cal validar (treball en curs). En el nostre estudi, a més, l'aproximació proteòmica permet descartar l'excés de transcrits silenciats que s'acumulen en uns orgànuls cel·lulars, anomenats *coscos cromatoides*, que són específics dels neoblasts.

### El manteniment i la reformació del patró

Un altre dels temes clau per resoldre en regeneració és entendre com es manté el patró axial, tant anteroposterior (AP) com dorsoventral (DV), així com l'establiment de la comunicació entre eixos per tal de regenerar un organisme totalment proporcionat. Sabem que qualsevol fragment de planària tallat transversalment, longitudinalment o diagonalment regenerarà un nou cap a l'extrem anterior i la cua al posterior, i recuperarà molt ràpidament la simetria bilateral. Per entendre com té lloc aquest restabliment dels principals eixos corporals hem estudiat les vies senyalitzadores de la  $\beta$ -catenina/Wnt i de les BMP (*bone morphogenetic proteins*), que tenen un paper bàsic en l'establiment dels eixos AP i DV durant el desenvolupament embrionari en altres models. En efecte, hem observat que les interferències de la via Wnt produeixen organismes que perden la capacitat de reconèixer la polaritat AP i regeneren caps en ambdós extrems, mentre que quan interferim la via BMP hi ha una ventralització de la regió dorsal, i apareixen organismes doblement ventrals enganxats per la regió central com si fossin siamesos.

En tots els models, tant en embrions com en adults, la via Wnt regula un ampli ventall de processos, com el manteniment de cèl·lules mare, l'especificació de tipus cel·lulars, la determinació de la polaritat cel·lular i la migració (Logan i Nusse, 2004). Cal remarcar, però, que la via Wnt té una funció evolutivament conservada durant el desenvolupament inicial, en l'establiment de la primera asimetria en l'embrió, i, en estadis del desenvolupament més tardans, és essencial per conferir la identitat posterior (cua) enfront de l'anterior (cap) (Niehrs, 1999). En els darrers anys, juntament amb altres laboratoris, hem caracteritzat la funció de la via Wnt en el manteniment i restitució de la polaritat AP en planàries intactes i en fragments regenerants. Les primeres indicacions del seu paper en l'establiment de l'eix AP van aparèixer en caracteritzar funcionalment els gens *GSK-3*, un dels components del complex de destrucció de la  $\beta$ -catenina, que és l'element intercel·lular clau de la via. La seva interferència, que impedeix la destrucció de la  $\beta$ -catenina i induïx la superactivació de la via, alterava la regeneració d'estructures anteriors, mentre que la regeneració posterior era normal (Adell *et al.*, 2008). Ara bé, quan es va interferir directament la  $\beta$ -catenina-1 es van obtenir fenotips sorprenentment explícits: planàries totalment hipercefalitzades, en les quals només la identitat anterior podia diferenciar-se, amb un gran gangli cefàlic circular que induïa la diferenciació d'ulls a tota la vora de l'organisme (Gurley *et al.*, 2008; Pettersen i Reddien, 2008; Iglesias *et al.*, 2008) (vegeu la figura 3a). Cal remarcar que la polaritat DV no queda afectada. Aquests organismes, doncs, mantenen un sol eix de simetria, el DV, i per tant, han perdut la simetria bilateral, generada per la confrontació perpendicular dels dos eixos AP i DV, i han adquirit una simetria radial. Aquest fenotip és

únic i no s'havia observat mai en cap bilateral, ja que la manca de funció d'un gen essencial com la  $\beta$ -catenina, en altres models, menys plàstics que les planàries, causa letalitat.

La superactivació de la via, mitjançant la interferència en la funció d'altres elements del complex de destrucció de la  $\beta$ -catenina, com els gens *APC* i les axines, a diferència del descrit amb *GSK-3*, van generar fenotips més evidents: planàries bicaudades, en les quals la diferenciació anterior està inhibida i, per això, en el blastema anterior es forma una cua. Més recentment hem caracteritzat la família de Wnt, els elements secretats i, per tant, els morfògens de la via. Del genoma de *S. mediterranea* hem pogut aïllar nou Wnt, dels quals quatre s'expressen a la part posterior de l'organisme, amb la qual cosa serien bons candidats per ser els activadors directes de la  $\beta$ -catenina-1 en aquesta zona. Els estudis funcionals mitjançant iRNA demostren que, en efecte, almenys dos d'aquests Wnt (WntP-1 i Wnt11-2) estan implicats en la diferenciació posterior, ja que la inhibició d'aquests genera planàries sense cua o amb cap en comptes de cua (Adell *et al.*, 2009). La resta

de Wnt presenten patrons d'expressió molt específics en diferents teixits o estructures. Per exemple, el WntA s'expressa només en la part més posterior dels ganglis cefàlics, i el WntP-3, en la base de la faringe, fet que suggereix que seria el senyal integrat de tots els Wnt el responsable de generar el patró correcte tot al llarg de l'eix AP de la planària. D'altra banda, altres laboratoris han demostrat que l'activació dels Wnt seria responsabilitat de la via Hedgehog (Hh) (Rink *et al.*, 2009), ja que Hh, l'element secretat, es presentaria en gradient continu en sentit AP, i es podria difondre pel sistema nerviós central (Yazawa *et al.*, 2009) o a través d'unions gap (Oviedo *et al.*, 2009).

Més recentment hem estudiat la funció de l'homòleg de *dishevelled*, element intercel·lular comú a totes les branques de la via Wnt, tant dependent com independent de la  $\beta$ -catenina. La inhibició genera planàries totalment hipercefalitzades, com calia esperar, però amb defectes afegits, no observats en animals inhibits per  $\beta$ -catenina (Almuedo-Castillo *et al.*, 2011). L'estudi d'aquests fenotips demostra que *Dishevelled*, a través del Wnt no canònic Wnt5, és essencial per a la connexió correcta del siste-



FIGURA 3. Alteracions dels eixos axials. a) Planària de 19 dies de regeneració després d'haver inhibit el gen de la  $\beta$ -catenina-1. Aquest organisme manté l'eix DV, però ha perdut l'eix AP, i presenta una simetria radial amb l'aparició d'ulls al llarg de la vora DV. Imatge cedida gentilmente per Marta Iglesias. b) Organisme de 21 dies de regeneració ventralitzat. La zona dorsal central s'ha transformat en regió ventral despigmentada gràcies a la interferència de BMP. També es produeix una duplicació de la vora DV (sagetes) i la inducció d'ulls ectòpics per part dels ganglis cefàlics dorsals. Imatge cedida gentilmente per Maria Dolores Molina. Barra: 1 mm.



ma nerviós, i que, juntament amb Van Gogh i Diversina, proteïnes de la xarxa conservada de *planar cell polarity* (PCP), és necessari per a l'ancoratge apical correcte dels cilis.

En definitiva, la funcionalitat de la via Wnt canònica en l'establiment de l'eix AP, i de la via Wnt independent de la  $\beta$ -catenina durant la connexió neuronal i en el posicionament dels cilis epitelials, recapitula mecanismes paral·lels als observats en models embrionaris establerts, com els de *Drosophila* o *Xenopus*.

La via BMP en embrions de vertebrats especifica el territori ventral. Les mutacions en els gens de la via BMP produeixen fenotips dorsalitzants, mentre que les mutacions en els gens antagonistes de la via, com *noggin* o *chordin*, produeixen fenotips ventralitzants. En els invertebrats hi ha una inversió d'aquest eix i la via BMP especifica la part dorsal. En el nostre laboratori vam iniciar la recerca dels gens de la via BMP, com el *BMP* mateix, *Smad-1* i *noggin* (Molina *et al.*, 2007). El silenciament mitjançant iRNA de *BMP* o *Smad-1* produeix una alteració de l'eix DV tant en organismes regenerants com en intactes. La regió dorsal perd l'expressió de marcadors moleculars dorsals i alhora apareixen marcadors ventrals ectòpics. Aquesta ventralització parcial de la regió dorsal està refermada per l'aparició ectòpica d'un segon sistema nerviós central (SNC) en la regió dorsal (Molina *et al.*, 2007) i una duplicació del marge DV (vegeu la figura 3b). Pel que fa als antagonistes de la via BMP, hem identificat un elevat nombre de gens *noggin* (Molina *et al.*, 2009). Mentre que en la majoria d'animals s'han identificat entre dos i quatre gens *noggin*, la planària en té deu (Molina *et al.*, 2009). Aquests es poden dividir en dos grups: dos gens *noggin*, *Smed-nog1* i *Smed-nog2*, i vuit gens *noggin-like* (*Smed-nlg1* a *nlg8*), que contenen una inserció de

llargada variable entre la 5a i 6a cisteïna del domini *noggin*. Alguns estudis funcionals recents han determinat que el gen *Smed-nlg8* no actua com a inhibidor de la via BMP sinó més aviat com un agonista. Els gens *noggin-like* han estat conservats al llarg de l'evolució i, de fet, l'homòleg dels gens *noggin-like* en *Xenopus* també té una funció agonista, cosa que significa que aquests nous gens poden tenir un paper important en l'establiment de l'eix dorsoventral en els animals (Molina *et al.*, 2011).

### Les planàries com a model per estudiar la regeneració del sistema nerviós

A diferència de la majoria d'animals les planàries poden regenerar *de novo* un sistema nerviós central (SNC) en molts pocs dies —per a una revisió vegeu Cebrià (2007). L'SNC de les planàries està constituït per un cervell anterior format per dos ganglis cefàlics connectats, normalment, per una comissura anterior, i dos cordons nerviosos ventrals que s'estenen tot al llarg de l'animal (vegeu la figura 1b). Aquest SNC conté diverses subpoblacions neuronals ben definides (Cebrià, 2008). A escala molecular s'han identificat dotzenes de gens que s'expressen específicament en l'SNC de la planària (Míneta *et al.*, 2003), amb un elevat grau de conservació amb els seus homòlegs en vertebrats, i que poden associar-se a processos com: neurotransmissió, guiatge d'axons, morfogènesi del cervell, diferenciació neuronal i sistemes sensorials. Això vol dir que podem utilitzar les planàries per estudiar la funció d'aquests gens durant la regeneració i intentar correlacionar els resultats obtinguts amb la funció dels seus homòlegs durant el desenvolupament embrionari en vertebrats.

Malgrat els avenços recents encara hi ha preguntes importants que cal respondre,

com ara: com es determinen els neoblasts al llinatge neural? Què passa just després de l'amputació de l'SNC a escala cel·lular i molecular? Quins factors estimulen la regeneració neural? No hi ha dubte que, atesa l'elevada incidència de malalties neurodegeneratives com l'Alzheimer o el Parkinson, així com de traumatismes en la medulla espinal que es tradueixen en la pèrdua de mobilitat total o parcial de les persones afectades, qualsevol avenç a l'hora d'entendre com es regenera l'SNC d'altres organismes model pot tenir una gran rellevància i impacte social en la nostra societat.

### **Gens necessaris per a la reconstrucció de xarxes neurals**

De manera conceptual la regeneració de l'SNC de planària es pot dividir en tres estadis principals: *a*) formació del primordi del cervell, *b*) creixement del nou cervell i dels cordons nerviosos truncats, que resulta en la formació de noves xarxes neurals, i *c*) recuperació final de totes les funcions pròpies d'aquest SNC (Cebrià *et al.*, 2002a; Agata i Umesono, 2008). En cadascun d'aquests estadis s'expressen diferents grups de gens, cosa que suggereix una relació entre l'expressió d'aquests gens i els processos cel·lulars i moleculars que hi tenen lloc.

Un aspecte important en el desenvolupament del sistema nerviós és entendre com els axons són capaços de viatjar distàncies, de vegades, força considerables, fins a trobar les seves cèl·lules diana. Les principals famílies de molècules implicades en el guiatge d'axons són: netrines, *slit*, efrines i semaforines. Algunes d'aquestes molècules actuen com a senyals atractius, guiant els axons cap a territoris permissius; altres senyals actuen com a repulsius, evitant que els axons es dirigeixin cap a regions no

permissives. Mentre que aquestes molècules tenen un paper molt important durant el desenvolupament embrionari, menys coneguda és la seva funció durant la regeneració neuronal. Així doncs, les planàries són un bon model en què es pot estudiar la funció d'aquestes molècules durant la reconstrucció de les xarxes neuronals.

Les netrines van ser inicialment identificades com a molècules secretades amb funció atractiva en *Drosophila*, *C. elegans* i vertebrats, i duen a terme la seva funció a través de dues famílies de receptors: UNC-5 i DCC (*deleted in colorectal cancer*). En la planària, les netrines i el seu receptor són necessaris tant per a la regeneració del seu SNC, com per al manteniment i la renovació d'aquest en animals no regenerants (Cebrià i Newmark, 2005). Sense l'acció d'aquests gens les planàries regeneren uns ganglis cefàlics anormals, més petits i amples del normal i connectats per una commissura anterior engruixida. A més, els cordons nerviosos truncats es regeneren i donen lloc a un entramat completament desorganitzat de projeccions axonals. Les netrines i el seu receptor són també necessaris perquè els axons de les cèl·lules fotosensitives dels ulls es projectin cap a la regió del cervell corresponent (Cebrià i Newmark, 2005).

### **El gen *nou-darake* restringeix el cervell en la regió cefàlica**

La regeneració de nous teixits i òrgans requereix una regulació molt precisa de la mida i la posició. El gen *nou-darake* (*ndk*) exemplifica com aquesta restricció espacial és regulada durant la regeneració de l'SNC (Cebrià *et al.*, 2002b). El nou cervell creix en una regió anterior que s'està també formant al mateix temps. D'alguna manera els creixements del cervell i la regió anterior

han d'estar altament coordinats, de manera que el cervell ocuparà finalment la major part d'aquesta regió. La pèrdua de funció de *ndk* implica que en lloc de quedar restringit anteriorment, el nou cervell s'expandeix posteriorment al llarg de pràcticament tot l'animal (Cebrià *et al.*, 2002b). *ndk* s'expressa específicament en la regió anterior de les planàries i codifica un receptor transmembrana semblant als receptors de FGF (*fibroblast growth factor*). NDK, però, manca del domini tirosina-cinasa característic d'aquesta família de receptors. A partir de diferents observacions s'ha postulat que NDK podria actuar com un regulador negatiu dels receptors de FGF (Cebrià *et al.*, 2002b; Agata i Umesono, 2008). Un possible model d'actuació de NDK seria que aquest d'alguna manera restringiria la difusió d'un lligand de tipus FGF, que actuaria com a activador de la diferenciació del cervell en la planària. En absència de NDK aquest activador es podria difondre lliurement cap a regions més posteriors i induir-hi la diferenciació de cervell (Cebrià *et al.*, 2002b; Agata i Umesono, 2008).

### Els ulls de les planàries i la universalitat dels circuits genètics que els generen i regeneren

Charles Darwin, en el seu llibre sobre l'origen de les espècies, va dedicar un capítol sencer a l'origen de la visió, en el qual proposava que a partir d'un ull simple prototípic es van generar les diverses formes actuals. Aquest ull prototípic seria molt similar als ulls de les planàries (vegeu la figura 4). Aquest fet, més l'estreta col·laboració des de fa vint-i-cinc anys amb el grup de Walter Gehring, del Departament de Biologia Cel·lular del Biozentrum de la Universitat de Basilea (Suïssa), que va caracteritzar els elements genètics responsables de la determinació de la visió, va facilitar-nos una caracterització dels circuits genètics responsables de la determinació dels ulls durant la regeneració de les planàries (Pineda *et al.*, 2000, 2002; Mannini *et al.*, 2004).

Les taques oculars (així és com s'anomenen els ulls simples de les planàries) estan formades per dos tipus cel·lulars: les cèl·lules fotoreceptores i les cèl·lules pigmentades, que protegeixen les primeres d'un excés de llum. Les fotoreceptores són neurones bipolars i els seus axons es pro-

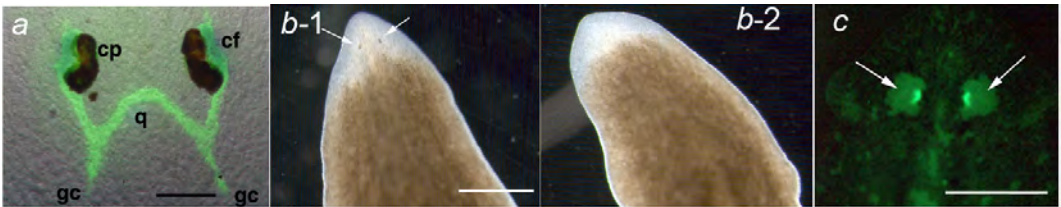


FIGURA 4. Detalls de les taques oculars de les planàries. *a*) Amb les cèl·lules fotoreceptores (cf) de color verd (reconegudes per un anticòs contra arrestina, molècula relacionada amb la visió) i les cèl·lules pigmentades (cp) de color marró que protegeixen de l'excés de llum les cèl·lules fotoreceptores. L'anticòs permet observar la connexió de les cèl·lules fotoreceptores sobre els ganglis cefàlics (gc) i el quiasma òptic parcial (q). Imatge cedida gentilmente per Kay Eckelt. Barra: 150  $\mu$ m. *b*) Imatges en camp clar d'un organisme normal (*b-1*), amb els ulls diferenciats, i un mutant amb fenotip sense ulls (*b-2*), per pèrdua de funció mitjançant iRNA del gen *six-1*. *c*) Imatges de fluorescència d'un organisme transgènic que mostra l'expressió de la GFP en les cèl·lules fotoreceptores. Les sagetes indiquen els ulls. Imatge cedida gentilmente per Cristina González-Estévez. Barra: 1 mm.

jecten bé ipsolateralment cap a la regió dorsomedial dels ganglis cefàlics, bé contralateralment travessant la línia mitjana i formant un quiasma òptic. D'aquesta manera els senyals fotosensibles de cada taca ocular són integrats pels ganglis cefàlics. D'altra banda, les extremitats dendrítiques de les cèl·lules fotoreceptores formen estructures rabdomèriques, un microvilli regular i ordenat on s'acumula l'opsina, el pigment fotosensible. El segon tipus cel·lular dels ulls de planària, les cèl·lules pigmentades, s'agrupen formant una estructura de copa invertida que protegeix en el seu interior els rabdomers (vegeu la figura 4a). La determinació i diferenciació dels ulls està controlada per una xarxa gènica molt conservada en el món animal que s'inicia amb els gens *Pax-6*, *sine oculis* i *eye absent*. En el nostre laboratori hem caracteritzat aquests elements genètics en la planària, i hem produït pèrdues de funció d'alguns d'aquests gens mitjançant iRNA, que han generat fenotips sense ulls i, per tant, organismes cecs que no reaccionen a la llum (vegeu la figura 4b). També hem produït organismes transgènics amb una construcció que conté el promotor de l'opsina (el fotopigment universal dels ulls) amb un gen marcador de proteïna fluorescent, la GFP (*green fluorescent protein*) (González-Estévez *et al.*, 2003) (vegeu la figura 4c). Actualment, estem duent a terme cerques *in silico* de gens candidats d'ulls ja caracteritzats en altres models ben coneguts com el peix zebra, el ratolí o *Drosophila*. A més, estem estenent les cerques utilitzant les seqüències obtingudes a partir de les anàlisis proteòmiques (Fernandez-Tafoada *et al.*, 2011), així com les seqüències obtingudes en el projecte de seqüenciació massiva basada en la tecnologia del 454 (Abril *et al.*, 2010), totes dues descrites anteriorment.

A tall de cloenda podríem afirmar que l'extrema plasticitat morfològica de les planàries ens recorda un organisme adult que manté les propietats plàstiques d'un embrió. La presència d'un elevat percentatge de cèl·lules mare pluripotents en les planàries adultes es considera una sinapomorfia d'aquest «clade» entre tots els organismes bilaterals. Mitjançant iRNA es pot interferir, amb un elevat percentatge de penetrància, en qualsevol gen important del desenvolupament, cosa que ens permet visualitzar fenotips de morfogènesi i polaritat mai observats en altres models. En un futur proper, un cop es puguin establir quins són els diferents llinatges que porten els neoblasts a la diferenciació de tots els tipus cel·lulars, les planàries poden convertir-se en un model òptim per caracteritzar els diversos circuits genètics implicats en el manteniment i la diferenciació de les cèl·lules mare.

## AGRAÏMENTS

Els autors volen agrair a tots aquells estudiants de doctorat que, treballant durant els darrers anys en les seves tesis doctorals en el Departament de Genètica de la Universitat de Barcelona, han contribuït als resultats mencionats en aquesta revisió.

## BIBLIOGRAFIA

- ABRIL, J. F.; CEBRIÀ, F.; RODRÍGUEZ-ESTEBAN, G.; FRAGUAS, S.; HORN, T.; CALVO, B.; BARTSCHERER, K.; SALÓ, E. (2010). «Smed454 dataset: unravelling the transcriptome of *Schmidtea mediterranea*». *BMC genomics*, 11: 731.
- ADELL, T.; MARSAL, M.; SALO, E. (2008). «Planarian GSK3s are involved in neural regeneration». *Dev. Genes Evol.*, 218: 89-103.
- ADELL, T.; SALO, E.; BOUTROS, M.; BARTSCHERER, K. (2009). «Smed-Evi/Wntless is required for beta-

- catenin-dependent and -independent processes during planarian regeneration». *Development*, 136: 905-910.
- AGATA, K.; UMESONO, Y. (2008). «Brain regeneration from pluripotent stem cells in planarian». *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 363: 2071-2078.
- ALMUEDO-CASTILLO, M.; SALÓ, E.; ADELL, T. (2011). «Dishevelled is essential for neural connectivity and planar cell polarity in planarians». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108: 2813-2818.
- CEBRIÀ, F. (2007). «Regenerating the central nervous system: how easy for planarians!» *Dev. Genes Evol.*, 217: 733-748.
- (2008). «Organization of the nervous system in the model planarian *Schmidtea mediterranea*: an immunocytochemical study». *Neurosci. Res.*, 61: 375-384.
- CEBRIÀ, F.; KOBAYASHI, C.; UMESONO, Y.; NAKAZAWA, M.; MINETA, K.; IKEO, K.; GOJOBORI, T.; ITOH, M.; TAIRA, M.; SANCHEZ ALVARADO, A. (2002b). «FGFR-related gene *nou-darake* restricts brain tissues to the head region of planarians». *Nature*, 419: 620-4.
- CEBRIÀ, F.; NAKAZAWA, M.; MINETA, K.; IKEO, K.; GOJOBORI, T.; AGATA, K. (2002a). «Dissecting planarian central nervous system regeneration by the expression of neural-specific genes». *Development Growth Differ.*, 44: 135-146.
- CEBRIÀ, F.; NEWMARK, P. A. (2005). «Planarian homologs of netrin and netrin receptor are required for proper regeneration of the central nervous system and the maintenance of nervous system architecture». *Development*, 132: 3691-3703.
- FERNANDEZ-TABOADA, E.; MORITZ, S.; ZEUSCHNER, D.; STEHLING, M.; SCHOLER, H. R.; SALÓ, E.; GENTILE, L. (2010). «Smed-SmB, a member of the LSm protein superfamily, is essential for chromatoid body organization and planarian stem cell proliferation». *Development*, 137: 1055-1065.
- FERNANDEZ-TABOADA, E.; RODRÍGUEZ-ESTEBAN, G.; SALÓ, E.; ABRIL, J. F. (2011). «A proteomics approach to decipher the molecular nature of planarian stem cells». *BMC genomics*, 12: 133.
- GONZALEZ-ESTEVEZ, C.; FELIX, D. A.; ABOOBAKER, A.; SALÓ, E. (2007). «Gtdap-1 promotes autophagy and is required for planarian remodeling during regeneration and starvation». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104: 13373-13378.
- GONZALEZ-ESTEVEZ, C.; MOMOSE, T.; GEHRING, W. J.; SALÓ, E. (2003). «Transgenic planarian lines obtained by electroporation using transposon-derived vectors and an eye-specific GFP marker». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100: 14046-14051.
- GURLEY, K. A.; RINK, J. C.; SANCHEZ ALVARADO, A. (2008). «Beta-catenin defines head versus tail identity during planarian regeneration and homeostasis». *Science*, 319: 323-327.
- HANDBERG-THORSAGER, M.; FERNANDEZ, E.; SALÓ, E. (2008). «Stem cells and regeneration in planarians». *Front. Biosci.*, 13: 6374-6394.
- IGLESIAS, M.; GOMEZ-SKARMETA, J. L.; SALÓ, E.; ADELL, T. (2008). «Silencing of Smed-betacatenin1 generates radial-like hypercephalized planarians». *Development*, 135: 1215-1221.
- LOGAN, C. Y.; NUSSE, R. (2004). «The Wnt signaling pathway in development and disease». *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 20: 781-810.
- MANNINI, L.; ROSSI, L.; DERI, P.; GREMIGNI, V.; SALVETTI, A.; SALÓ, E.; BATISTONI, R. (2004). «Djeyes absent (Djeya) controls prototypic planarian eye regeneration by cooperating with the transcription factor *Djsix-1*». *Dev. Biol.*, 269: 346-359.
- MINETA, K.; NAKAZAWA, M.; CEBRIÀ, F.; IKEO, K.; AGATA, K.; GOJOBORI, T. (2003). «Origin and evolutionary process of the CNS elucidated by comparative genomics analysis of planarian ESTs». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100: 7666-7671.
- MOLINA, M. D.; NETO, A.; MAESO, I.; GÓMEZ-SKARMETA, J. L.; SALÓ, E.; CEBRIÀ, F. (2011). «Noggin, a noggin-like gene and a BMP/ADMP organizer control the regeneration of the planarian DV axis». *Current Biology*, 21: 300-305.
- MOLINA, M. D.; SALÓ, E.; CEBRIÀ, F. (2007). «The BMP pathway is essential for re-specification and maintenance of the dorsoventral axis in regenerating and intact planarians». *Dev. Biol.*, 311: 79-94.
- (2009). «Expression pattern of the expanded noggin gene family in the planarian *Schmidtea mediterranea*». *Gene Expr. Patterns*, 9: 246-253.
- NIEHRS, C. (1999). «Head in the WNT: the molecular nature of Spemann's head organizer». *Trends Genet.*, 15: 314-319.
- OVIDO, N. J.; MOROKUMA, J.; WALENTEK, P.; KEMA, I. P.; GU, M. B.; AHN, J. M.; HWANG, J. S.; GOJOBORI, T.; LEVIN, M. (2009). «Long-range neural and gap junction protein-mediated cues control polarity during planarian regeneration». *Dev. Biol.*, 339: 188-199.
- PETERSEN, C. P.; REDDIEN, P. W. (2008). «Smed-beta-catenin-1 is required for anteroposterior blastema polarity in planarian regeneration». *Science*, 319: 327-330.
- PINEDA, D.; GONZALEZ, J.; CALLAERTS, P.; IKEO, K.; GEHRING, W. J.; SALÓ, E. (2000). «Searching for the prototypic eye genetic network: *Sine oculis* is essential for eye regeneration in planarians». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 4525-4529.

- PINEDA, D.; ROSSI, L.; BATISTONI, R.; SALVETTI, A.; MARSAL, M.; GREMIGNI, V.; FALLENI, A.; GONZALEZ-LINARES, J.; DERI, P.; SALÓ, E. (2002). «The genetic network of prototypic planarian eye regeneration is Pax6 independent». *Development*, 129: 1423-1434.
- RINK, J. C.; GURLEY, K. A.; ELLIOTT, S. A.; SANCHEZ ALVARADO, A. (2009). «Planarian Hh signaling regulates regeneration polarity and links Hh pathway evolution to cilia». *Science*, 326: 1406-1410.
- ROBB, S. M.; ROSS, E.; SANCHEZ ALVARADO, A. (2008). «SmedGD: the *Schmidtea mediterranea* genome database». *Nucleic Acids Res.*, 36: D599-606.
- SALÓ, E. (2006). «The power of regeneration and the stem-cell kingdom: freshwater planarians (Platyhelminthes)». *Bioessays*, 28: 546-559.
- SALÓ, E.; BAGUNA, J. (1984). «Regeneration and pattern formation in planarians. I. The pattern of mitosis in anterior and posterior regeneration in *Dugesia* (G) *tigrina*, and a new proposal for blastema formation». *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 83: 63-80.
- YAZAWA, S.; UMESONO, Y.; HAYASHI, T.; TARUI, H.; AGATA, K. (2009). «Planarian Hedgehog/Patched establishes anterior-posterior polarity by regulating Wnt signaling». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106: 22329-22334.