

Variació del patró d'expressió de l'antígen de zona central TCEN-49Ag detectat mitjançant l'anticòs monoclonal TCEN-49 durant la regeneració a la planària *Dugesia(G)tigrina*.

Bueno, D.; Espinosa, Ll.; Soriano, MA.; Batlle, E.; Baguñà, J. i Romero, R
Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Diagonal 645, 08071 Barcelona

RESUM

A partir de l'obtenció d'anticossos monoclonals (mAbs) contra la planària *Dugesia(G)tigrina*, vàrem aïllar el mAb TCEN-49 específic de la zona central del cos de *D.tigrina*. Durant la regeneració, el patró d'expressió de l'antígen que reconeix (TCEN-49Ag) varia en funció del nivell d'amputació, responant ràpidament a senyals posicionals implicades d'alguna manera en la determinació del patró.

INTRODUCCIO

Les planàries d'aigua dolça (Platihelminths, Turbellaris, Triclàdides) són organismes amb una extraordinària capacitat de regeneració. Aquest fenomen comprén dos aspectes bàsics: 1) mantenir la polaritat anteroposterior original del fragment regenerant; 2) determinar i diferenciar en l'ordre (temps i posició) correcte les estructures que manquen (formació del patró). Els mecanismes proposats per explicar ambdós processos són molt diversos (Veure Baguñà i col, 1990, per a una revisió general), tot i que els podem agrupar en dues classes principals: els que postulen la presència de gradients de morfògens (Meinhardt, 1982) que, des de fora, donarien informació posicional a les cèl.lules; i els que suggereixen que el patró es refà des de dins per interaccions cèl.lula-cèl.lula (Maden, 1977). Per esbrinar quin d'aquests models és més vàlid, és necessari saber quan i on es determinen cada una de les regions a regenerar abans que siguin morfològicament visibles. Es a dir, necessitem marcadors moleculars del procés de determinació. Una estratègia eficaç per obtenir aquests marcadors ha estat la producció d'anticossos monoclonals.

A partir d'una col·lecció de monoclonals obtinguts contra antígens de la planària *Dugesia(G)tigrina*, s'ha aïllat l'anticòs monoclonal TCEN-49 (Bueno i col, 1992) que reconeix un antígen, TCEN-49Ag, present únicament en la zona central del cos. Aquest anticòs pot ser útil com a marcador de determinació durant la regeneració i el creixement/decreixement. Durant la regeneració, TCEN-49Ag presenta un patró d'expressió característic depenent del nivell de l'amputació. Els seus patrons d'expressió s'analitzaran i discutiran en relació als dos tipus de models proposats.

MATERIAL I METODES

a) Obtenció de l'anticòs monoclonal

S'ha seguit una modificació (Bueno i col, 1992) del protocol descrit per Harlow i Lane (1988). L'immunògen utilitzat ha estat extracte protèic de neoblasts (cèl.lules indiferenciades) enriquit per filtració en malles de niló i pre-absorvit amb anticossos policlonals contra cèl.lules secretores units en fase sòlida per tal d'eliminar els antígens més immunogènics. Els immunògens restants són injectats en ratolins Balb/C.

b) Immunotinció de seccions en parafina

S'ha seguit el protocol descrit per Bueno i col. (1992) per a organismes intactes (de 5mm, 7mm, 9mm i 11mm de llargada) i en regeneració.

c) Obtenció de regenerants

Els regenerants s'han obtingut tallant organismes a diferents nivells antero-posteriors (cefàlic-caudals; Saló, 1984). Un cop tallats, els regenerants es

mantenien en solució salina a 21°C (± 1) en presència de 50 $\mu\text{gr/ml}$ de sulfat de gentamicina.

Els temps de regeneració van de les 0 hores als 10 dies amb intervals de 12 a 24 hores segons els casos.

RESULTATS

El marcatge amb l'anticòs TCEN-49 (i per tant la presència de TCEN-49Ag) pot ser utilitzat per definir tres zones en sentit anteroposterior a la planària intacta: una zona cefàlica, des del nivell anterior del marcatge per TCEN-49 fins l'extrem anterior de l'organisme; una zona central, ocupada per TCEN-49Ag; i una zona caudal, des del nivell posterior del marcatge per TCEN-49 fins l'extrem posterior de l'organisme (Fig. 1). Hem observat que la relació entre el volum d'aquestes tres zones durant el creixement/decreixement dels organismes segueix una alometria negativa pel que respecta la zona cefàlica, positiva per la caudal i lleugerament negativa per la zona central (Fig. 2).

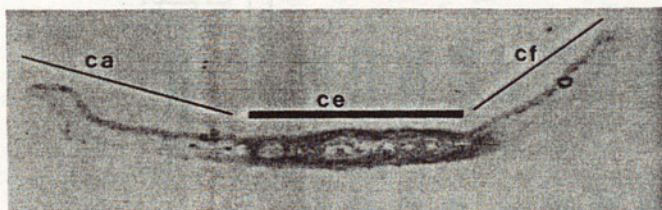
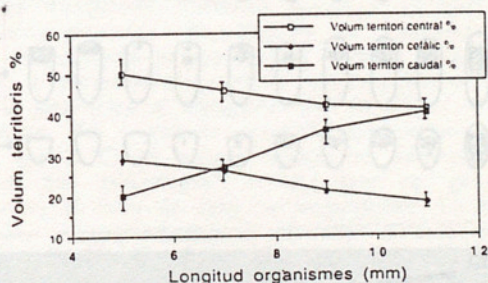


Fig.1 Patró d'immunotinció del mAb TCEN-49 on s'observen les tres regions que ens defineix. (x20) cf: regió cefàlica; ce: regió central; ca: regió caudal.

Fig.2 Relació entre la longitud dels organismes i el volum territorial relatiu.



En un organisme intacte, el marcatge es produeix bàsicament a nivell de la membrana plasmàtica dels diversos tipus cel·lulars de la zona central, excepte en algunes poques cèl·lules que presenten un fort marcatge en el seu citoplasma (o orgànuls citoplasmàtics). Aquests tipus cel·lulars que presenten marcatge citoplasmàtic semblen correspondre morfològicament a cèl·lules de tipus secretor cianòfil (per a la descripció de tipus cel·lulars, veure Baguñà i Romero, 1981).

El patró d'expressió de TCEN-49Ag i el desenvolupament d'aquest patró en el temps depenen del nivell de tall (Fig. 3). En els casos en que es manté el marcatge regional (C, C') aquest és com el descrit al paràgraf anterior (Fig. 4). En canvi, quan el marcatge es veu reduït (D) o bé ha d'aparèixer de nou (A', A, E), aquest es produeix inicialment sols en el citoplasma d'unes poques cèl·lules (Fig. 5). Quan s'amplia el nombre de cèl·lules marcades i s'assoleix el marcatge regional, aquest és novament del mateix tipus que en organismes intactes.

Dels patrons d'expressió observats durant la regeneració (Fig. 3) es dedueix que el patró varia en funció de: 1) el troç de zona central que conservi el regenerant; 2) la presència, o no, de regió cefàlica; i 3) la proximitat del tall a la regió cefàlica. D'aquest comportament se'n poden derivar diferents modalitats d'expressió corresponents als diversos nivells de tall (Fig. 3).

Fig.3 Evolució temporal del patró d'expressió de TCEN-49Ag durant la regeneració en els diferents nivells de tall, detectat amb el mAb TCEN-49.

▨ Marcatge cel.lular
▩ Marcatge regional

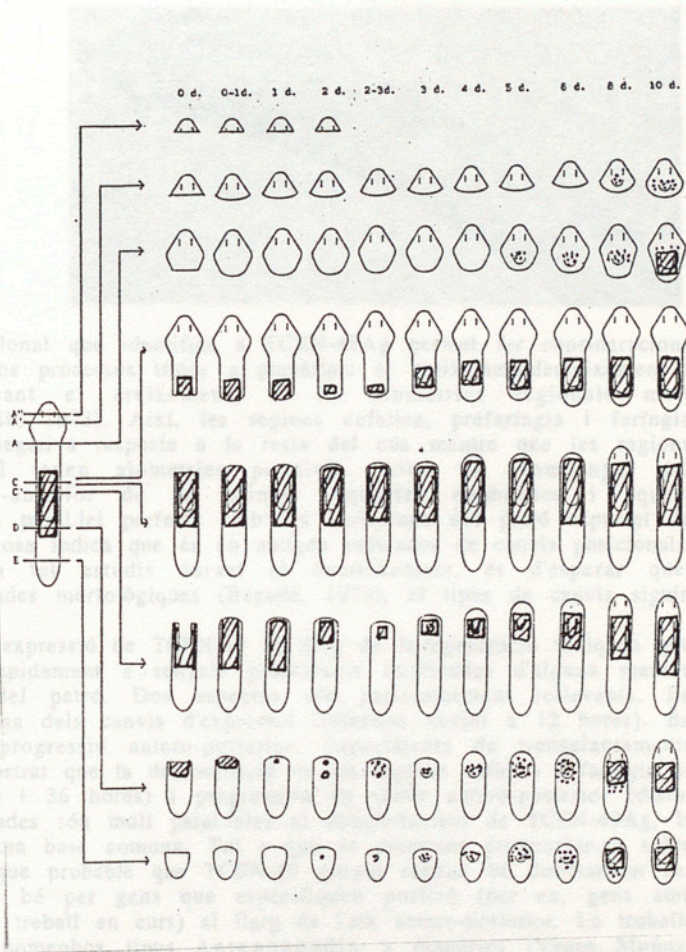


Fig.4 Marcatge amb TCEN-49 d'una planària regenerant de 3 dies al nivell de tall C (regenerant cefàlic) (x80). —> Marcatge regional; —> Marcatge cel.lular; Fg: faringe; cf: regió cefàlica; ce: regió central; ca regió caudal.

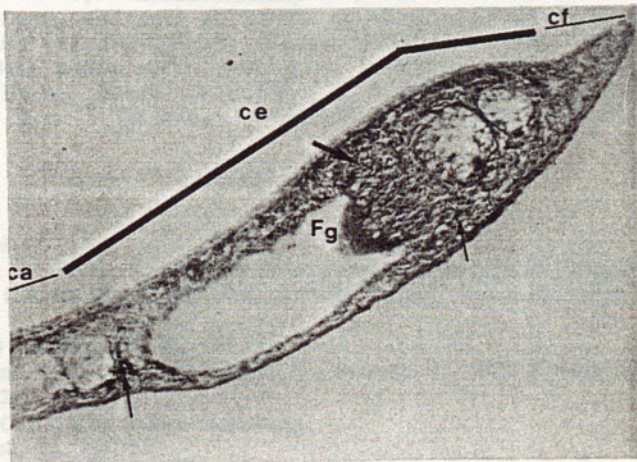
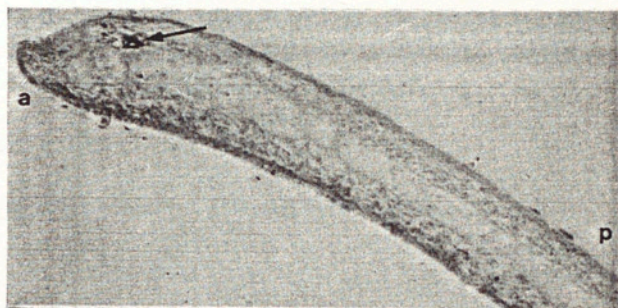


Fig.5. Marcatge amb TCEN-49 d'una planària regenerant de 1 dia al nivell de tall D (x80). —> Marcatge cel.lular; a: anterior (cefàlic); p: posterior (caudal)



DISCUSSIO

L'anticòs monoclonal que identifica a TCEN-49Ag permet fer consideracions d'interès respecte a dos processos típics a planàries: el creixement/decreixement i la regeneració. Durant el creixement, hi ha alometries regionals molt característiques (Baguñà, 1973). Així, les regions cefàlica, prefaríngia i faríngia tenen una alometria negativa respecte a la resta del còs, mentre que les regions postfaríngia i caudal tenen alometries positives. Això va acompanyat del desplaçament postero-anterior de la faringe. Aquestes alometries i aquest desplaçament tenen un paral·lel perfecte amb les variacions del patró espacial de TCEN-49Ag, la qual cosa indica que és un antígen indicador de canvis posicionals. Tot i que no s'han fet estudis durant el decreixement, és d'esperar que, semblantment a les dades morfològiques (Baguñà, 1973), el tipus de canvis siguin inversos.

Els canvis en l'expressió de TCEN-49 al llarg de la regeneració indiquen que TCEN-49Ag respon ràpidament a senyals posicionals implicades d'alguna manera en la determinació del patró. Dos aspectes són particularment rellevants. En primer lloc la rapidesa dels canvis d'expressió (inferiors sovint a 12 hores). En segon lloc la seva progressió antero-posterior. Experiments de transplantaments (Saló, 1984) han demostrat que la determinació de les regions cefàlica i faríngia és molt inicial (entre 12 i 36 hores) i progressiva en sentit antero-posterior (disto-proximal). Aquestes dades són molt paral·leles al comportament de TCEN-49Ag, la qual cosa suggereix una base comuna. Tot i que és prematur pronunciar-se sobre aquest punt, és més que probable que TCEN-49 estigui regulat bé directament per morfògens posicionals, bé per gens que especifiquen posició (per ex. gens amb homeobox; Saló i col, treball en curs) al llarg de l'eix antero-posterior. La troballa recent de gens amb homeobox tipus *Antennapedia* a planàries (Veure Muñoz-Mármol i col, aquest Seminari), així com els canvis en valor posicional antero-posterior a planàries induïts per diacilglicerol (Bueno, treball en curs) i TPA (Prats, dades no publicades) poden ésser molt útils, juntament amb la seva caracterització molecular (Bueno, treball en curs) i, a la llarga genètica, per comprendre el paper que juga TCEN-49Ag en especificar la regió central a planàries.

BIBLIOGRAFIA

- Baguñà, J. (1973) Tesi Doctoral.
- Baguñà, J.; Romero, R.; Saló, E.; Collet, J.; Auladell, MC.; Ribas, M.; Riutort, M.; García-Fernández, J.; Burgaya, F. i Bueno, D., (1990). *Exp. Embriol. Aquatic Plants and Animal Org.* 129-162.
- Baguñà, J. i Romero, R. (1981) *Hydrobiologia*, **84**, 181-194.
- Bueno, D.; Espinosa, LI.; Soriano, MA.; Batlle, E.; Baguñà, J. i Romero, R. (1992) *Biologia del Desenvolupament*, **10**, 71-82.
- Harlow, E. i Lane, D. (1988). Cold Spring Harbour Laboratory.
- Maden, M. (1977) *J. Theor. Biol.*, **69**, 735-753.
- Meinhardt, H. (1982) Academic Press Inc.
- Saló, E. (1984). Tesi Doctoral.