

ACTIVITAT GÈNICA EN EL DESENVOLUPAMENT PRIMERENC DE PHYSA ACUTA
J.A. Vela.

Dept. Genètica, Fac. Biologia, Univ. Barcelona, Diagonal 637-647. Barcelona-28.

Introducció : Normalment es pensa que el desenvolupament i la morfogènesi estan sota el control del genoma. Tanmateix, solament uns pocs sistemes embrionaris han estat susceptibles d'una anàlisi genètica (p.e. Drosophila o Caenorhabditis). Quan un sistema embrionari no es pot estudiar genèticament amb facilitat s'acostuma a utilitzar l'actinomicina-D (AMD) (p.mol. = 1.255) com a bloquejador de la transcripció. Dins dels moluscs, l'AMD ha estat utilitzada per Collier (1966) per a estudiar l'activitat genètica en el desenvolupament primerenc del pro-sobranqui Ilyanassa. Collier va emprar concentracions moderades d'AMD (25-50 µgr/ml) i períodes curts de tractament (6 h.).

Només es coneix ara com ara un sol article sobre l'efecte de l'AMD en embrions de pulmonats (Morrill, 1965). Aquest autor va treballar amb Lymnaea i va haver d'utilitzar concentracions d'AMD molt grans (100 µgr/ml) i durades molt llargues de tractament (48 h.), per a aconseguir més resultats poc conclouents. Bride i Stocker (1976) van demostrar un efecte cooperatiu de la concentració i la durada de tractament per a la inhibició per AMD de la diferenciació en Xenopus, i també que hi ha una concentració i una durada crítiques per a qualsevol sistema embrionari. Segons això, la metodologia de Morrill sembla sospitosament inadequada.

Nosaltres van tractar primer d'usar AMD per a inhibir la transcripció a Physa acuta, però van haver de concloure que, en els embrions dels pulmonats, l'us de l'AMD es veu dificultat per l'efecte de garbell (aprox. 500 daltons) de la seva membrana capsular (Vela, 1981). Així doncs, l'estudi de l'activitat genètica en aquests gasteròpodes ha de fer-se utilitzant inhibidors de baix pes molecular (<500 daltons).

En aquest estudi hem utilitzat sulfat de proflavina (p.mol. = 307) com inhibidor de la transcripció. Ja que aquest compost forma un complex molt estable amb l'ADN (Balis, 1968) cal revertir els seus efectes amb competidors per l'ADN, p.e. poliamines (Kay, 1959). Amb aquesta tècnica, hem pogut distingir tres períodes morfogenètics principals en el desenvolupament primerenc de Physa acuta. Aquests resultats concorden prou bé amb els trobats per Verdonk (1973) a Lymnaea stagnalis utilitzant factors letals induïts per raigs X.

Materials i metodologia: Els materials sempre han estat embrions de Physa acuta. Els especimens procedien de diferents indrets de Catalunya i foren mantinguts en aquaris amb aigua de l'aixeta, d'on es collien periodicament les postes.

Les capsules foren alliberades del mucus fent-les rodolar sobre paper de filtre humit. Després es varen posar en sulfat de proflavina (25 µgr/ml) durant 6 hores (de vegades 4 h.) a

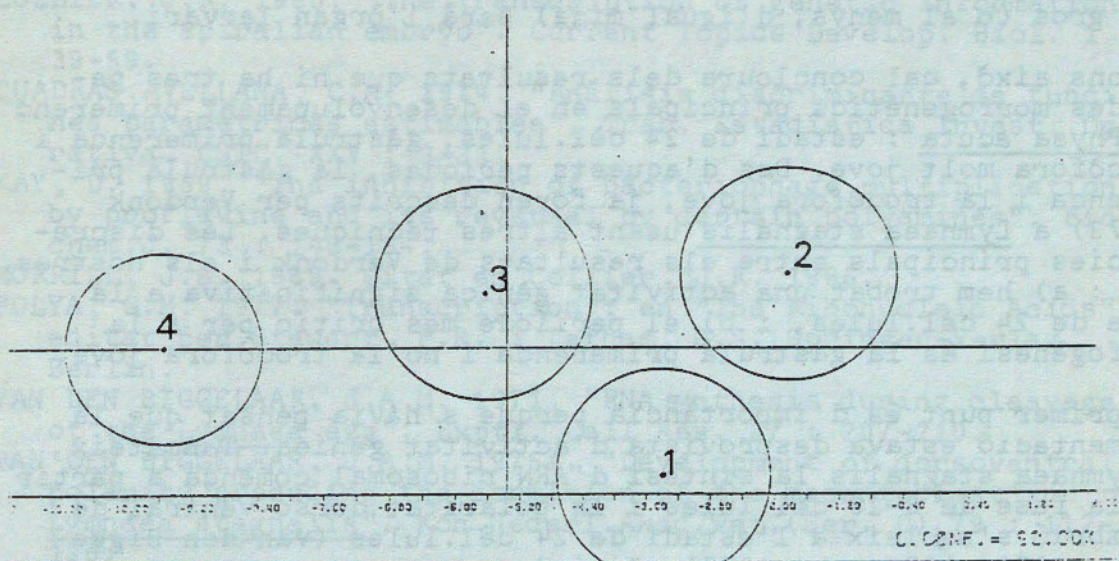
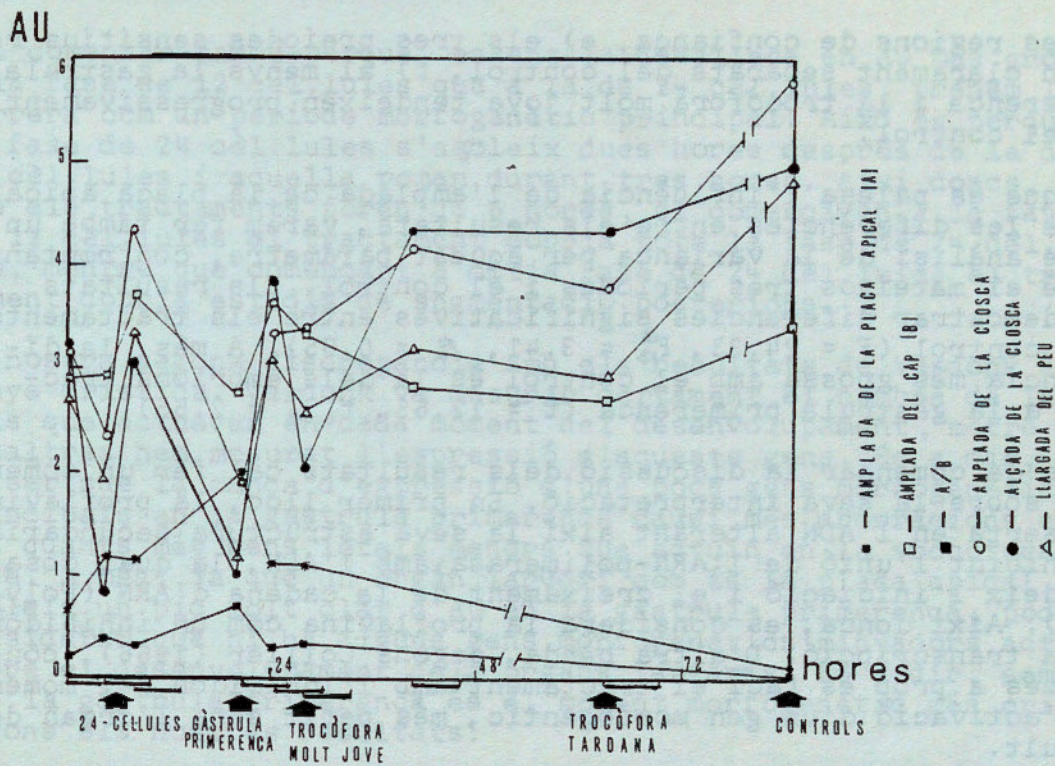
diferents estadis del desenvolupament. Ja que la proflavina pot actuar com a mutàgen en presència de llum, tot el tractament es va fer a la foscor. Per a revertir els efectes de la proflavina varem fer un postractament amb diclorur de putrescina (p.mol., = 161) (25 mM) durant una hora a la foscor. La proflavina i la putrescina foren eliminades exhaustivament mitjançant diferents rentats amb aigua de l'aixeta. Els embrions es van deixar desenvolupar després en aigua de l'aixeta fins que els controls assoliren l'estadi de predesclosa.

Els embrions tractats i els controls en predesclosa foren des-capsulats amb unes pinces de rellotger i es tenyiren amb im-pregnació argèntica (Vela, 1980). Els embrions tenyits foren dibuixats amb l'ajut d'una càmera lúcida. Després es van fer mesures de diferents parts de l'embrió, que es varen donar en unitats arbitràries (AU) i van ésser confrontades respecte al moment del desenvolupament on es va fer el tractament amb pro-flavina. Alguns embrions foren fixats amb Zenker, enclosos en parafina, tallats a 5 μ m i tenyits amb hematoxilina de Heidenhein per tal d'estudiar les malformacions internes.

Es va fer una anàlisi multivariant de la varianza i una anàlisi canònica per a discriminar les funcions paramètriques estimades (Cuadras, 1974) dels resultats utilitzant un programa CANG. Aquestes anàlisis foren fetes confrontant solament els estadis amb una resposta màxima a la proflavina i els controls. Es va fer un altre anàlisi de la variança per el paràmetre amplada de la placa apical, confrontant els mateixos estadis de desenvolupament i els controls.

Resultats i discussió : Les mesures fetes sobre els dibuixos foren: amplada de la placa apical, amplada del cap, amplada de la closca, alçada de la closca i llargada del peu. Els resultats estan donats a la Fig. 1. Aquesta figura mostra fortes devallades generals dels valors en AU als estadis de 24 cèl.lules, gàstrula primerenca i trocòfora molt jove. Tanmateix, un òrgan larvari com és la placa apical mostra un pic molt clar a la gàstrula primerenca. Les series histològiques van demostrar també els mateixos tres períodes crítics per a les malformacions internes. També, els embrions tractats a la gàstrula primerenca mostren les aberracions més grosses dels òrgans interns.

L'anàlisi multivariant de la variança de les mesures, confrontant embrions tractats a l'estadi de 12 cèl.lules, gàstrula primerenca i trocòfora molt jove i els controls, va demostrar diferències significatives entre ells ($F = 5.36$, $F_{1,15}^5 = 2.09$, $\epsilon = 0.05$). L'anàlisi canònica (Fig. 2) va demostrar que: a) el primer eix canònic està correlacionat amb l'amplada de la placa apical i l'alçada de la closca ($r_x = 0.535$, i $r_x = 0.386$) b) el segon eix canònic està correlacionat positivament amb l'amplada de la placa apical i negativament amb l'alçada de la closca i la llargada del peu ($r_x = 0.663$, $r_x = -0.740$, $r_x = -0.818$), c) els tres períodes més sensitius i el control estan situats seguint el segon eix canònic, d) no hi ha ensolapament



de les regions de confiança, e) els tres períodes sensitius romanen clarament separats del control, f) al menys la gàstrula primerenca i la trocòfora molt jove tendeixen progressivament cap al control.

Com que és palesa l'influència de l'amplada de la placa apical sobre les diferències entre els resultats, varem fer també un altre anàlisi de la variança per aquest paràmetre, confrontant també el mateixos tres períodes i el control. Els resultats van demostrar diferències significatives entre els tractaments i el control ($F = 24.33$, $F_{3} = 3.41$, $\epsilon = 0.05$). A més, la diferència més grossa amb el control és la dels embrions tractats a la gàstrula primerenca ($t = 12.65$, $t_{0.05} = 2.65$).

Avans de començar la discussió dels resultats cal fer un comentari sobre la seva interpretació. En primer lloc, la proflavina s'inserta en l'ADN alterant així la seva estructura secundària i inhibint l'unió de l'ARN-polimerasa amb l'ADN, la qual cosa impideix l'iniciació i el creixement de la cadena d'ARN (Polya, 1977). Així doncs, es considera la proflavina com un inhibidor de la transcripció. D'altra banda, segons Collier (1966), contra més a prop es faci el tractament amb l'inhibidor del moment de l'activació d'un gen morfogenètic, més petit serà l'òrgan de l'adult.

Tanmateix, cal un altre interpretació per als òrgans larvaris. Aquests òrgans minven progressivament i desapareixen avans de la desclosa. Podem suposar que la seva minva en un moment donat del desenvolupament depend de l'activació prèvia d'algun gen morfogenètic minvador. Així doncs, cal esperar que contra més a prop es faci el tractament de l'activació del gen minvador, més gros (ò al menys, d'igual mida) serà l'òrgan larvari.

Segons això, cal concloure dels resultats que hi ha tres períodes morfogenètics principals en el desenvolupament primerenc de Physa acuta: estadi de 24 cèl.lules, gàstrula primerenca i trocòfora molt jove. Dos d'aquests períodes, la gàstrula primerenca i la trocòfora jove, ja foren descrits per Verdonk (1973) a Lymnaea stagnalis usant altres tècniques. Les discrepàncies principals entre els resultats de Verdonk i els nostres són: a) hem trobat una activitat gènica significativa a la fase de 24 cèl.lules, i b) el període més crític per a la morfogènesi és la gàstrula primerenca i no la trocòfora jove.

El primer punt és d'importància perquè s'havia pensat que la segmentació estava desprovista d'activitat gènica. Tanmateix, a Lymnaea stagnalis la síntesi d'ARN ribosomal comença a partir de la fase de 8-16 cèl.lules i la polaritat dorso-ventral de l'embrió s'aspleix a l'estadi de 24 cèl.lules (van den Biggelaar, 1971, 1976 a-b, 1977). Així doncs, respecte aquest estadi, les nostres dades confirmen els resultats trobats a Lymnaea tot suggerint que la síntesi d'ARN ribosomal al voltant de la fase de 24 cèl.lules és important en la morfogènesi dels pulmonats.

Cal comentar també perquè, essent la devallada en AU més grossa a la fase de 12 cèl.lules que a la de 24 cèl.lules, prenem la darrera com un període morfogènètic principal. Això és perquè la fase de 24 cèl.lules s'asoleix dues hores després de la de 12 cèl.lules i aquella roman durant tres hores. Així doncs, ja que els tractaments foren de 6 hores, si començaven a la fase de 12 cèl.lules el tractament cobria tota la fase de 24 cèl.lules, mentre que començant a mitja fase de 24 cèl.lules el tractament cobria estadis de segmentació posteriors.

La nostra segona discrepància amb els resultats de Verdonk és menys crística. Verdonk va mesurar certament el nombre de letals que actuaven en cada moment del desenvolupament, metre que nosaltres hem mesurat l'expressió d'aquests gens. És a dir, potser que la manca d'expressió d'uns pocs gens morfogènètics principals en la gàstrula primerenca causi més aberracions que uns quants més gens letals menors que actuen en la trocòfora jove. A més, ja que un òrgan larvari com és la placa apical asoleix un pic molt clar d'AU en la gàstrula primerenca, podem considerar que hi ha alguns gens morfogènètics minvadors actuant sobre el desenvolupament dels òrgans larvaris. És a dir, sembla que la gàstrula primerenca és el moment morfogènètic més crític segons els nostres resultats.

Bibliografia :

- BALIS, M.E. 1968. "Antagonists and nucleic acids". North-Holland Amsterdam.
- BRIDE, M. i STOCKER, S. 1976. "Influence de l'AMD sur la différenciation cardiaque de Xénope en culture organotypique". C. R. Acad. Sci. Paris. (Ser. D) 283 : 259-262.
- COLLIER, J.R. 1966. "The transcription of genetic information in the spiralian embryo". Current Topics Develop. Biol. 1 : 39-59.
- CUADRAS AVELLANA, C.M. 1974. "Análisis discriminante de funciones paramétricas estimables". Trab. Estadística Invest. Operativa. CSIC. XXV : 3-31.
- KAY, D. 1959. "The inhibition of bacteriophage multiplication by proflavine and its reversal by certain polyamines". Biochem.J. 73 : 149-154.
- MORRILL, J.B. 1965. Citat en Collier, J.R. 1966.
- POLYA, G.M. 1977. "Transcription"; en "The Ribonucleic Acids", editat per Stewart, P.R. i Letham, D.S. Springer-Verlag. Berlin.
- VAN DEN BIGGELAAR, J.A.M. 1971. "RNA synthesis during cleavage of the *Lymnaea* egg". Exptl. Cell Res. 67 : 207-210.
- VAN DEN BIGGELAAR, J.A.M. 1976a. "Development of dorsoventral polarity preceding the formation of the mesentoblast in *Lymnaea stagnalis*". Kon.Nederl.Akad.Wet.(Ser. C) 79 : 112-126.
- VAN DEN BIGGELAAR, J.A.M. 1976b. "The fate of maternal RNA containing ectosomes in relation to the appearance of dorsoventrality in the pond snail, *Lymnaea stagnalis*". Kon.Nederl. Akad.Wet. (Ser. C) 79 : 421-426.
- VAN DEN BIGGELAAR, J.A.M. 1977. "Significance of cellular in-

- teractions for the differentiation of the macromeres prior to the formation of the mesentoblast in Lymnaea stagnalis". Kon.Nederl.Akad.Wet. (Ser. C) 80 : 1-12.
- VELA, J.A. 1980. "Notes sobre el desenvolupament embrionari dels cargols d'aigua dolça Physa acuta i P. fontinalis". Butll.Inst.Cat.Hist.Nat., 45 (Sec. Zool., 3) 37-46.
- VELA, J.A. 1981. "Estudis sobre reproducció i desenvolupament en gasteropodes d'aigua dolça dels generes Physa i Lymnaea". Tesi Doctoral. Univ. Barcelona.
- VERDONK, N.H. 1973. "Gene expression in early development of Lymnaea stagnalis". Develop. Biol. 35 : 29-35.