

Planària com a model experimental per a estudis de regeneració, creixement i decreixement.

J. Baguñà, E. Saló, R. Romero, J. Collet i M.C. Auladell

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

L'organisme

Els organismes objecte d'estudi: les planàries, són triblàstics acelomats del filum Plathelminths, classe Turbellaria. Són generalment de petit tamany (5-30 mm) i la seva morfologia, llevat de l'aparell reproductor, és relativament simple. Tenen un epiteli extern monoestratificat que reposa sobre una membrana basal de 2-5 micres de gruix. Internament, l'aparell digestiu forma també un epiteli monoestratificat, cec i ramificat, format per 2 tipus de cèl.lules sense cap especialització espacial; s'inicia i es tanca en una faringe tubular. Entre l'epidermis i el digestiu es troba el parénquima o mesénquima, compost per 5-6 tipus cel.lulars entre els que destaca per el seu interès les cèl.lules indiferenciades o neoblastes. Immers en el parénquima hi ha el sistema nerviós, els plexes nerviosos (Baguñà i Ballester, 1978), el sistema excretor, el sistema muscular, i, en aquells organismes en estat reproductiu, el sistema reproductor i l'aparell copulador. En conjunt, el nombre de tipus cel.lulars bàsics (si exceptuem els propis de la faringe i de l'aparell reproductor) és de 12-15 (Baguñà i Romero, 1981), trobant-se en proporcions característiques segons la regió del cos i la llargada de l'individu.

Les planàries són organismes sotmesos a un recanvi cel.lular constant que afecta a tots els tipus cel.lulars. Diferents estudis han demostrat que les cèl.lules diferenciades són postmitòtiques i de vida relativament curta, essent reemplaçades per noves cèl.lules diferenciades que provenen de la diferenciació a partir dels neoblastes (Baguñà, 1981). Aquestes darreres doncs, representen l'únic tipus cel.lular proliferatiu, si bé és molt factible que en la realitat siguin una població heterogènia de cèl.lules.

La reproducció és asexual per fisió a nivell postfaringi, o sexual per reproducció creuada, anfigònica o pseudogàmica. El desenvolupament és directe, si bé molt modificat, i l'organisme a la desclosa de l'ou mesura

2-3mm ( $2-3 \times 10^4$  cèl.lules) i té la morfologia de l'adult. A temperatura i nodriment adequats, el creixement és sigmoidal atenent llargades de fins a 20-30mm ( $2-4 \times 10^6$  cèl.lules). En les espècies de reproducció sexuada, l'adult esdevé capaç de reproduir-se quan ateny els 9-10mm. En les de reproducció asexuada, la fisió s'inicia quan l'organisme té una llargada de 7-8mm i la seva freqüència depen de la temperatura.

Dues són les característiques que han fet de planària un bon material d'estudi en Biologia del Desenvolupament: 1) la seva enorme capacitat de regenerar un nou individu, fins i tot a partir de fragments molt petits de l'organisme original; i 2) la seva extraordinària capacitat de créixer i decreixer repetidament segons la temperatura ambiental i la freqüència de nodriment. La primera característica ha estat d'interès per a tractar de respondre al com un organisme pot restituir el patró complet d'estructures a partir d'un fragment (sovint petit) del cos. En d'altres paraules, es tractaria de respondre a la vella qüestió que trobem formulada encare més dramàticament en el desenvolupament embrionari: com generar una estructura complexa a partir d'una estructura inicial més simple. La segona característica, té interès per a entendre els mecanismes generals de recanvi cel·lular, per a veure quina lògica de decisions de llinatge cel·lular es segueix, per a estudiar la remodelació de teixits i òrgans durant el decreixement, i per a esbrinar l'importància que pot tenir el recanvi cel·lular o la manca d'ell per a explicar l'envelliment i les diferents estratègies reproductives de diferents espècies.

Tant el fenomen de regeneració com la capacitat de créixer i decreixer han dut a nombrosos estudis que han tractat de desvetllar la base cel·lular i molecular d'aquests fenòmens. Els apartats següents tracten de donar un breu resum dels coneixements actuals i dels grans problemes que encare resten per resoldre.

#### Com es forma el blastema de regeneració?

Quan una planària perd un fragment del cos, la ferida es contrau ràpidament per acció de la musculatura circular, i en menor grau de la longitudinal. Al cap de 4-6 hores, una fina pel·lícula epitelial, procedent del corrimment de l'antiga epidermis, clou completament la ferida. A diferència d'altres sistemes, l'epiteli cicatritzial no prolifera, i l'increment vist en el nombre d'aquestes cèl.lules al llarg de la regeneració es deu a l'entrada o

intercalació de noves cèl.lules epitelials procedents del parénquima (Morita i Best, 1974; Hori, 1978).

Coetàniament al fenomen de recobriment epidermic, el parénquima presenta una onada proliferativa visible ja a 1-2 hores de regeneració. En tots els casos estudiats, les cèl.lules proliferatives són neoblastes. Aquesta onada proliferativa ateny un màxim a les 6-12 hores per decreixer relativament al voltant de les 24 hores i donar un segon màxim, més gran i perllongat, als 2-4 dies de regeneració (Baguñà, 1976b). Estudis citoespectrofotomètrics i l'acció d'inhibidors de la fase S com l'hidroxiurea i la fluorodeoxiuridina mostren que el primer màxim és fruit de l'entrada en mitosi de cèl.lules previament en G<sub>2</sub>, mentre que el segon màxim prové de cèl.lules que han pasat per la fase S des de l'inici de la regeneració. Un estudi més aprofundit de la cinètica de la proliferació no ha estat possible per la manca d'incorporació de precursors marcats del DNA a planàries (Collet, aquest volum).

La resultant d'aquest procés proliferatiu és que als 2-3 dies de regeneració una regió no pigmentada apareix en front de la ferida: el blastema de regeneració. Fonamentalment es compon de petites cèl.lules indiferenciades de estructura molt semblant al neoblast de l'organisme intacte. Durant la regeneració, el blastema creix sigmoidalment per increment del nombre de cèl.lules. Tot semblaria indicar doncs que aquest creixement seria degut a la proliferació cel.lular dins del blastema tal com passa en altres organismes com els Anèlids i els Amfibis (Wallace, 1981).

Estudis recents realitzats en diferents espècies de planàries mostren però que el blastema no presenta activitat mitòtica al llarg de tota la regeneració (Saló i Baguñà, 1983). En conseqüència, l'increment del nombre de cèl.lules del blastema no és fruit de la proliferació dins d'ell sinó de la incorporació contínua de cèl.lules a la base del blastema. D'on vénen aquestes cèl.lules?. Dades recents (Saló, aquest volum) revelen importants moviments migratoris en la zona prop de la ferida. Endemés, organismes irradiats amb raigs-X (8000 rads), tot i no presentant proliferació, formen un petit blastema a causa de la migració de cèl.lules cap a la ferida, tal com s'ha posat de manifest per medi de marcadors cromosòmics (Saló, aquest volum).

Aquest conjunt de dades fan pensar doncs que el blastema de regeneració es formaria pel concurs de dos fenòmens: proliferació en regions prop de la

ferida i migració de cèl.lules indiferenciades cap a la base del blastema. Aquesta modalitat de formació i creixement del blastema es força diferent de la que presenten la majoria d'organismes que regeneren epimòrficament.

Tot i haver clarificat alguns punts respecte a la modalitat de formació del blastema a planàries, resten encara alguns punts importants que cal esmentar:

- 1) té l'epiteli cicatricial algun paper en l'activació mitòtica i la migració cel.lular?,
- 2) quin és el mecanisme d'activació de la proliferació cel.lular?. Es deguda a molècules específiques o a l'acció sistèmica de molècules trivials?
- 3) les cèl.lules que donen el segon màxim, són filles de les del primer màxim o no?,
- 4) què estimula a les cèl.lules a migrar?. Quelcom d'específic, o la mera presència de més espai extracel.lular degut a la lisi cel.lular prop de la ferida?.

#### Quin és l'origen de les cèl.lules del blastema?

En la majoria d'organismes que regeneren, el blastema està format per cèl.lules indiferenciades procedents de la desdiferenciació de cèl.lules diferenciades prop de la ferida. A planàries hi ha dues teories contraposades respecte a l'origen d'aquestes cèl.lules: 1) la teoria dels neoblastes que suposa que les cèl.lules del blastema són cèl.lules indiferenciades de l'adult que han proliferat i migrat cap a la ferida; 2) la teoria de la desdiferenciació que suposa que, semblantment al que passa a la resta d'organismes, la totalitat o bona part de les cèl.lules del blastema vénen de la desdiferenciació de cèl.lules diferenciades.

Ambdues teories es basen en proves circumstancials. La primera es basa d'una banda en que cèl.lules pràcticament idèntiques a les que formen el blastema es troben en l'adult en nombre molt apreciable (aprox. 20-25%) on tenen funció de cèl.lules-soca, i d'altre banda en els experiments ja clàssics de Wolff, Dubois i l'Escola Francesa (Wolff, 1962) emprant empelts d'organismes no irradiats a hostes irradiats. Endemés, esmenten com a prova adicional el no haver observat per Microscòpia Electrònica cap signe de desdiferenciació cel.lular durant la regeneració. La teoria de la desdiferenciació es basa per contra en proves al ME de desdiferenciació cel.lu-

lar. Endemés, tot i acceptar l'existència de neoblastes en l'adult intacte, suposen que les cèl.lules del blastema vénen de la desdiferenciació de cèl.lules diferenciades. Més recentment, Gremigni i Miceli (1980) han aduït l'existència de fenòmens de "transdiferenciació" entre cèl.lules germinals i somàtiques utilitzant planàries mosaic, com a prova a favor de la desdiferenciació. Aquest darrer punt, sens dubte el més sòlid de la teoria, és d'interpretació encara dubtosa (Baguñà, 1981).

En resum doncs, l'origen de les cèl.lules del blastema a planàries és encara incert. El fet que els neoblastes de l'adult siguin les úniques cèl.lules capaces de dividir-se, i al temps siguin les cèl.lules-soca de tots els tipus cel.lulars diferenciats, sembla fet exprés per a poder marcar-les amb timidina tritiada i seguir el seu destí al llarg de la diferenciació cap a la resta de tipus cel.lulars. Malauradament, ningú ha estat capaç encara de fer incorporar timidina a aquests organismes (Veure Collet, aquest volum, per a una discussió en detall del problema). Tenint en compte aquestes dificultats, dues vies semblen factibles per a tractar de donar una resposta a aquest problema:

- 1) aïllar i purificar neoblastes i cèl.lules diferenciades i injectar cada una d'elles a hostes irradiats en regeneració per a veure quina fracció cel.lular és capaç de formar un blastema;
- 2) aconseguir marcar selectivament els neoblastes (marcadors fluorescents específics, anticossos monoclonals,..) i seguir el seu destí durant la regeneració.

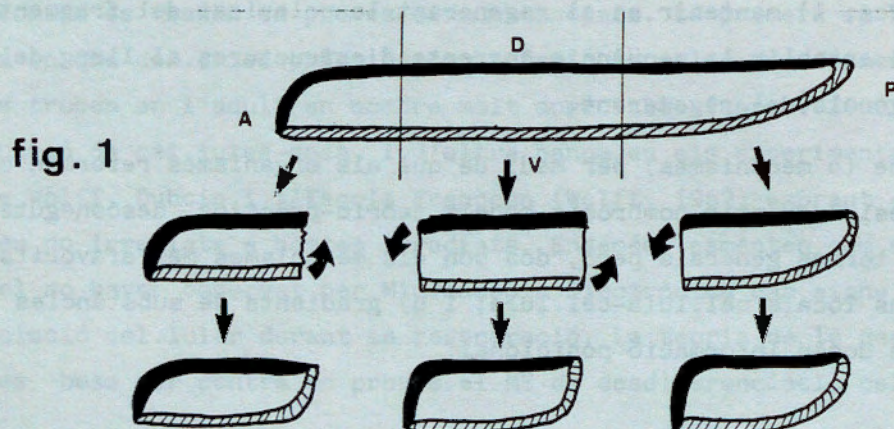
#### Com es reforma el patró?

Aquest és sens dubte el problema central de la regeneració. Comprèn dos aspectes bàsics: 1) mantenir en el regenerant la polaritat del fragment original, i 2) establir la seqüència correcta d'estructures al llarg dels eixos ortogonals del regenerant.

El mecanisme (o mecanismes) per medi de què els organismes reformen el patró són, pesi a existir nombrosos models teòric-pràctics, desconeguts avui en dia. En termes generals però, dos són els mecanismes més afavorits: a) interaccions locals cèl.lula-cèl.lula; i b) gradients de substàncies (morfògens) que donen informació posicional.

Com es manté la polaritat a planàries?. El fet que la part més anterior (en relació a la part més anterior de l'organisme original) doni sempre la regió cefàlica, i la part més posterior doni la regió caudal, s'ha interpretat segons diferents models: a) la part més anterior té una activitat metabòlica i sintètica superior a la més posterior, i, "dominant" a aquesta darrera, forma ella el cap (Child, 1941); b) d'acord amb els models de reacció-difusió de Gierer-Meinhardt (Meinhardt, 1982) les regions més anteriors presenten valors superiors de molècules activadores i inhibidores que per reaccions d'autocatàlisi i difusió determinen que el cap es formi a la part més anterior al temps que inhibeixen la formació d'un altre cap a la regió més posterior (que donarà doncs cua); i c) establiment de regions-límit ("boundary"), anterior i posterior respectivament, i intercalació de valors posicionals entre el regenerant i la regió-límit per interaccions locals (Maden, 1977).

Les dades existents a planàries no permeten triar cap d'aquests models ni suggerir-ne de moment cap de nou. Val a dir, que el primer model és poc factible. En referència al segon, no s'ha detectat ara per ara cap substància que tingui les propietats dels activadors i inhibidors, i pel moment és més realista tractar de fer simulacions amb ordinador i veure si el model s'ajusta als resultats experimentals (Ribas, Ocaña, Baguñà i Saló, treball en curs). Finalment, en referència al tercer model, dades recents de Chandebois (1980) afavoreixen la idea que en la regeneració anterior l'epidermis dorsal és la que recobreix la ferida mentre que a la regeneració posterior és la epidermis ventral. Si això fos així (estem actualment fent diferents experiments per a comprovar-ho; Saló i Baguñà, experiments en curs), podriem pensar que l'epidermis és la regió límit i que el manteniment de la polaritat vindria donat pel tipus de recobriment epidermic (Figura 1).



Com s'estableix a planàries la seqüència correcta d'estructures durant la regeneració?. Tampoc hi ha ací una resposta clara. Tres models o propostes s'han formulat: a) per establiment (o re-establiment) de gradients de morfògens dins del territori regenerant; b) per establiment d'una regió-límit distal a l'extrem del blastema i una zona proximal a la base d'aquest seguit de l'intercalació de valors posicionals; i c) per establiment d'una regió-límit distal (per exemple, la regió cefàlica a la regeneració anterior) i inducció disto-proximal de la seqüència d'estructures per medi de substàncies activadores i inhibidores (Wolff, 1962).

Els resultats existents hores d'ara a planàries semblarien afavorir el tercer model, si bé en honor a la veritat s'ha de dir que presenta aspectes encara molt incerts. Manca encara força treball experimental i s'ha de respondre abans a tres aspectes-clau:

- 1) quin és el temps de determinació de les diferents estructures o regions durant la regeneració?,
- 2) l'aparició o determinació de cada estructura depèn realment de una determinació prèvia, o hi ha una determinació general seguida de creixement?,
- 3) quin és el grau de morfolaxi que hi ha en el fragment original durant la regeneració i quin mecanisme podria explicar-ho?.

#### Anàlisi bioquímica de la regeneració

Els estudis bioquímics durant la regeneració a planàries han estat centrats en l'anàlisi dels canvis temporals dels nivells de ADN, ARN i proteïnes, i en l'estudi bioquímic de les primeres fases de la regeneració (fase d'activació). Altres estudis, han tractat dels canvis existents en diferents tipus de metabolits (enzims, neurotransmisors, nucleòtids, poliamines,...).

Els canvis en la síntesi de ADN, ARN i proteïnes es mostren a la Figura 2. Cal afegir que els canvis a nivell de l'ADN són paral·lels a canvis en la timidina kinasa i DNases (àcida i alcalina). Respecte al ARN és interessant senyalar que el primer pic està compost fonamentalment de ARNr i ARN de pes molecular baix mentre que el segon pic ho es de ARN polidispers (Martelly, 1980), just al revés del que passa a la regeneració als Anèlids (Coulon i Marilley, 1978). Endemés, en espècies de planàries que no regeneren, el primer pic es dona però no el segon (Bautz, 1983).

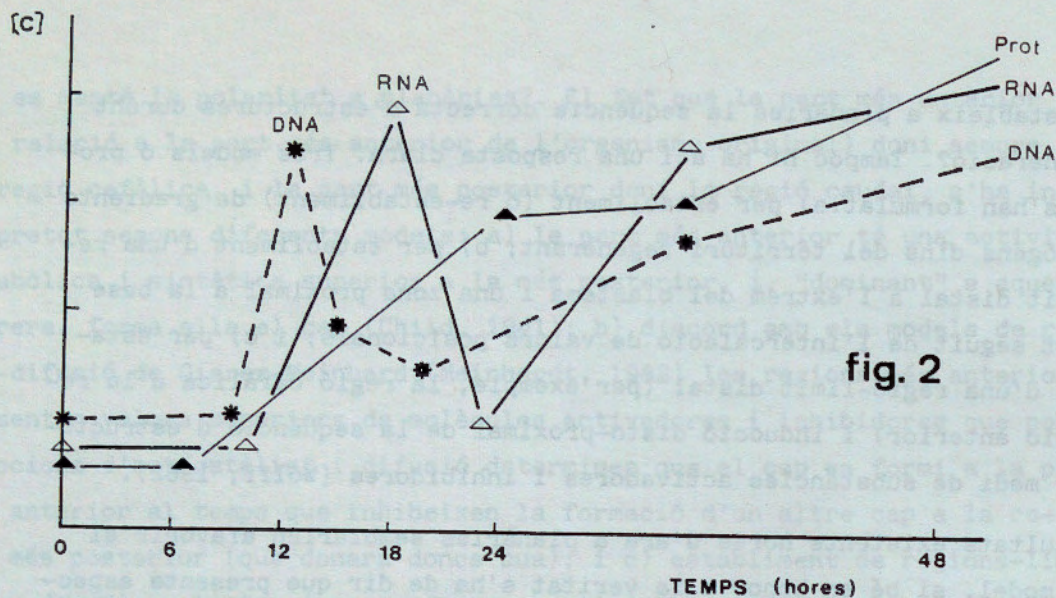


fig. 2

El conjunt d'aquestes dades ha fet pensar que a planàries la regeneració es pot dividir en dues etapes: a) la fase d'activació (0-24 hores) que culminarà en l'inici del segon pic mitòtic, i b) la fase de diferenciació (24 hores en endavant) que duu a la síntesi de ARNs i proteïnes específiques i a l'aparició dels primers signes de diferenciació morfològica, tot acompanyat d'un increment en el nombre de cèl.lules per mitosi.

L'interès de la fase d'activació, ha fet que nombrosos autors l'hagin estudiada a fons (Veure Franquinet, 1979, 1981; i Martelly, 1980, per a resums generals). Els resultats obtinguts es resumeixen en la Figura 3 i a la Taula 1.

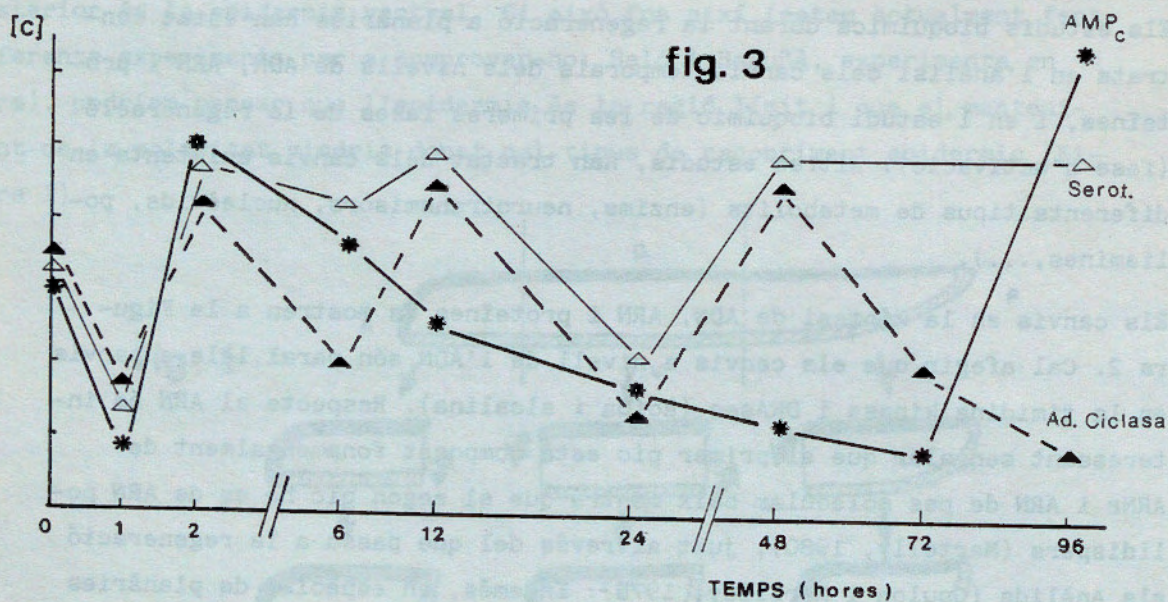
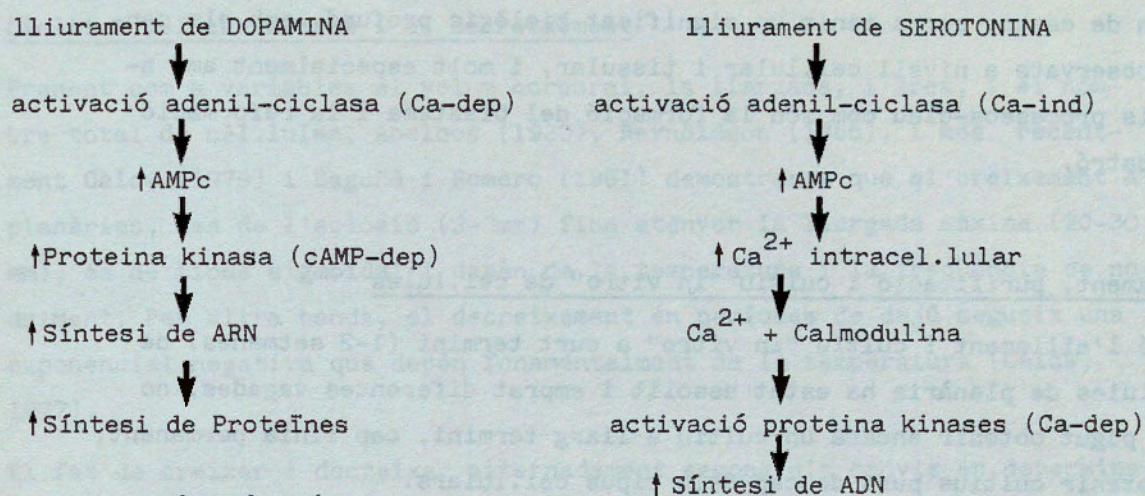


fig. 3





**taula 1**

De tot això es conclou que hi ha una probable seqüència causal "neurotransmissors-adenil ciclasa-AMPc-proteïna kinasa-ADN-ARN", semblant a la descrita en d'altres sistemes. Tot i això, cal senyalar que aquests estudis s'han fet sobre extractes totals i que es desconeix quin (o quins) tipus cel·lulars intervenen i com interactuen entre ells. Endemés, cal veure si l'inici d'aquesta cadena de reaccions (és a dir, el lliurament de neurotransmissors) és realment l'inici o és la resposta a l'aparició d'algun producte més específic. Així, Friedel i Webb (1979) han aïllat per DEAE-25 un pèptid que estimula x7 la síntesi de ARN i dobla el nombre de mitosi en les primeres 24 hores. Per altra banda, fragments de planàries que gaire bé no tenen sistema nerviós regeneren semblantment a zones riques en ell. Finalment, cal destacar que d'altres substàncies poden tenir també un paper clau en aquesta fase. Així per exemple, s'han detectat al blastema i post-blastema, canvis importants dels nivells de les poliamines putrescina, espermidina i espermina. La primera té un paper important en estimular la proliferació mentre que les dues darreres semblen més lligades a processos de diferenciació (Saló, 1982; Collet i Saló, 1983).

Pel que respecte al patró de proteïnes sintetitzat al llarg de la regeneració i a les seves variacions, i pesi a l'interès que té per a l'etapa diferenciativa, no hi han pràcticament dades rellevants. D'ací que haguem iniciat recentment l'estudi d'aquests canvis per electroforesi bidimensional (Collet, treball en curs) amb l'objectiu de determinar els canvis essencials del patró proteic i la identificació de possibles marcadors específics de cada etapa.

Un punt final que mereix un comentari és que les dades de caire bioquímic

s'han de casar, per a tenir un significat biològic profund, amb els canvis observats a nivell cel.lular i tissular, i molt especialment amb aquells processos-clau com són la formació del blastema i la reformació del patró.

#### Aïllament, purificació i cultiu "in vitro" de cèl.lules

Si bé l'aïllament i cultiu "in vitro" a curt termini (1-2 setmanes) de cèl.lules de planària ha estat assolit i emprat diferents vegades, no s'ha pogut obtenir encara un cultiu a llarg termini, cap línia permanent, ni obtenir cultius purs de cap dels tipus cel.lulars.

En espera d'obtenir cultius permanents, un aspecte d'interès rau en la possibilitat d'aïllar i purificar les cèl.lules indiferenciades (neoblastes) de la resta de cèl.lules (diferenciades) de l'organisme. Els avantatges que això suposaria són: 1) poder estudiar la seva diferenciació "in vitro" així com fer estudis sobre la seva cinètica de proliferació; 2) estudiar la capacitat clonogènica d'aquestes cèl.lules (per injecció a hostes irradiats o per introducció en agregats de cèl.lules totals), i veure les diferències segons la llargada de l'organisme, l'edat, la regió del cos on venen,... i 3) estudiar les seves capacitats morfogenètiques estimulant la seva agregació "in vitro" i veient si són capaces de donar lloc, tal com passa amb els arqueòcits de les esponges, a un nou organisme. Per altra banda, si junt a la separació dels neoblastes es poguessin aïllar i purificar cèl.lules diferenciades, serien factibles estudis sobre estructura i funció "in vitro" dels diferents tipus cel.lulars a planàries.

Un primer pas en aquesta direcció ha estat l'aïllament i enriquiment de fraccions de neoblastes i cèl.lules diferenciades en gradients discontinus de Ficoll i utilitzant un protocol de filtració (Veure, C. Auladell, aquest volum). Si bé la puresa de les fraccions (85-90%) no és encara l'òptima i el rendiment (30-40%) no del tot satisfactori, creiem que és un pas important per assolir cultius gaire bé purs. Per altra banda, estem contemplant poder utilitzar els mètodes sofisticats de separació cel.lular per citometria de fluxe aprofitant-nos del fet que els neoblastes són les úniques cèl.lules que es divideixen.

### Cinètica del creixement i el decreixement

Prenent com a variables el volum corporal, la llargada, l'àrea, i el nombre total de cèl.lules, Abeloos (1930), Reynoldson (1966), i més recentment Calow (1979) i Baguñà i Romero (1981) demostraren que el creixement a planàries, des de l'eclosió (2-3mm) fins atènyer la llargada màxima (20-30 mm), és de tipus sigmoidal i depèn de la temperatura i la freqüència de nodriment. Per altra banda, el decreixement en períodes de dejú segueix una exponencial negativa que depèn fonamentalment de la temperatura (Calow, 1977).

El fet de créixer i decreixer alternadament segons els canvis en determinades variables ambientals fa suposar que les planàries són organismes en un estat de recanvi cel.lular total i constant. Estudis fets al nostre laboratori així ho confirmen (Baguñà i Romero, 1981). Per altra banda, i des d'un punt de vista funcional, les cèl.lules a planària es poden dividir en dos compartiments: el proliferatiu, format pels neoblasts; i el funcional o diferenciat, format per els diferents tipus cel.lulars diferenciats. Donat que el creixement ( $K_G$ ) i el decreixement ( $K_{DG}$ ) poden expressar-se com a canvis en el nombre total de cèl.lules ( $N$ ) per unitat de temps, i tenint en compte que aquest canvi és la diferencial entre el nombre de cèl.lules noves (taxa proliferativa,  $K_B$ ) i el nombre de cèl.lules mortes (taxa de mort cel.lular,  $K_L$ ) per unitat de temps, és interessant comprovar el paper de cada un d'aquests components ( $K_B$  i  $K_L$ ) en la cinètica general del creixement i el decreixement en condicions ambientals diverses.

Breuement, els resultats trobats fins ara (Veure Romero, aquest volum) són: 1) existeix una taxa basal de proliferació, fins i tot en estadis perllongats de dejú, que depèn de la temperatura; 2) en condicions normals de temperatura i freqüència de nodriment, la taxa de proliferació és directament proporcional a aquestes; 3) la taxa de mort cel.lular es desglosa en dos components: a) una taxa basal, funció de  $N$  i la temperatura, i b) una taxa extra, inversament proporcional a la freqüència de nodriment; i 4) en termes generals, tots aquests paràmetres varien de manera predible al llarg del creixement d'un individu fins atènyer un valor màxim de  $N$  en què  $K_B$  es fa igual a  $K_L$  per a condicions òptimes de creixement.

Quin interès adicional poden tenir aquests estudis de creixement i decreixement?. En primer lloc, és interessant averiguar les diferents estratègies de la  $K_B$  i  $K_L$  que han seguit diferents espècies per a optimitzar la seva

biomassa. En segon lloc, és interessant veure com els canvis alomètrics observats al llarg del creixement (Baguñà, 1973) estan condicionats per canvis en la  $K_B$  i  $K_L$  dels diferents teixits. Finalment, fóra també interessant estudiar els mecanismes moleculars a la base del fenòmen de mort cel.lular en les seves dues components: la deguda al recanvi diari i la deguda al "stress" provocat per la manca d'aliment.

#### Estratègies reproductives, recanvi cel.lular i envelliment

El creixement somàtic és l'estratègia de desenvolupament que els organismes adopten per atènyer l'estat reproductiu. Ja que el creixement depèn bàsicament de l'entrada d'energia i dels mecanismes endògens de distribució d'aquesta energia cap al metabolisme general, l'augment del nombre de cèl.lules (creixement somàtic), la renovació tissular, l'emmagatzematge de reserves, i la reproducció (formació de gàmetes i estructures accesòries), no és estrany que aquesta distribució estigui influida per la selecció natural per tal que cada organisme (genotip) incrementi la seva representació dins la població en les generacions properes.

En general, quan l'organisme ateny una grandària determinada, s'inicia el període de reproducció. L'optimització de l'estratègia reproductora ha dut a que, en la majoria d'espècies, el període reproductor coincideix amb aquella grandària o període en què la diferència entre l'entrada i la sortida d'energia és màxima. Això és, però, el cas ideal; en la realitat multitud de factors (molt complexos d'analitzar ara) han dut als organismes a adoptar estratègies diferents. Tot i això, i en sentit global i simplificador, hi ha dues estratègies generals que han estat adoptades: a) la de produir el màxim nombre de descendents, fins i tot en condicions precàries (estratègia  $r$ ), i b) el produir menys descendents si bé generalment més preparats per a sobreviure (estratègia  $K$ ). La primera coincideix generalment amb organismes de vida curta i que es reproduïxen un cop i moren (organismes semèlpars); la segona és més pròpia d'organismes de vida més llarga que es reproduïxen repetidament (organismes iteròpars).

Ja que la reproducció no es fa sovint en condicions de màxima entrada d'energia, i tenint en compte (especialment en organismes d'estratègia  $r$ ), que l'energia que es consumeix en reproduir-se no es disposarà per al creixement i el recanvi cel.lular (imprescindible per a mantenir a l'individu en estat òptim), es pot predir que el recanvi cel.lular somàtic estarà sota mínims

en aquells organismes que adoptin una estratègia  $r$ , cosa que no passarà en organismes d'estratègia  $K$  en els que l'energia esmerçada en reproduir-se és menor per unitat de temps. D'ací podem predir que els primers tindran taxes d'envelliment i mortalitat superiors als segons.

En resum doncs, hauriem d'esperar que les espècies anuals, que ponen un gran nombre d'ous, ho fessin a expenses del recanvi cel.lular somàtic, fet que, a la llarga, produeix una acceleració de l'envelliment, i tot seguit la mort, tal com així passa. Per contra, en aquells organismes que es reproduïxen repetidament al llarg del cicle vital, no esperarem que presentin alteracions en els mecanismes de recanvi, fet que es traduirà en taxes més lentes d'envelliment i longevitats majors.

Aplicant aquests criteris a planàries, estem realitzant actualment (Romeo i Baguñà, treball en curs) mesures del recanvi cel.lular somàtic en espècies anuals (Dendrocoelum lacteum), perennes sexuades (Dugesia lugubris) i perennes sexuades (Dugesia mediterranea) en condicions d'"stress reproductiu" i "stress ambiental" per a confirmar aquesta hipòtesi. Per altra banda, està en projecte estudiar els canvis en la capacitat clonogènica dels neoblasts en espècies anuals i en aquelles espècies perennes asexuades potencialment immortals.

#### Limitacions actuals dels estudis de regeneració

L'objectiu final de la Biologia i la Genètica del Desenvolupament és el trobar, dins de la galaxia de solucions diverses que els diferents grups d'animals i plantes han utilitzat per a desenvoluparse, aquelles propietats invariants generals a tots els organismes.

La Biologia i la Genètica del Desenvolupament ha emprat desde els seus inicis, gaire bé fa 100 anys, una metodologia reduccionista, que històricament podem desgranar en tres estadis: 1) l'etapa anomenada del "blastema i el camp embrionari", iniciada per Roux (1888), que dugué als conceptes de determinació (temps), regulació dins del camp (espai) i interacció tissular (comunicació). L'inconvenient o limitació més gran d'aquests conceptes és que no es pogueren definir en termes d'unitats (cèl.lules); 2) l'etapa de la "genètica cel.lular" iniciada per Stern (1936) a Drosophila, que dugué als conceptes d'autonomia cel.lular, restriccions clonals, anàlisi de mosaics, compartiments, i gens i camins de desenvolupament (1960-1975).

El paradigma d'aquesta etapa són Drosophila, més recentment el nemàtode Caenorhabditis elegans, i en un grau molt menor el ratolí; i 3) l'etapa de "la biologia molecular del desenvolupament" iniciada per diversos autors fa 5-6 anys emprant tècniques d'enginyeria genètica i que pretén, tot aïllant gens clau del desenvolupament (identificats previament per tècniques genètiques), obtenir el producte gènic, i a partir d'ell veure com actúa a nivell cel.lular i a la llarga com afecta al fenotip de l'organisme. No cal dir que aquesta etapa, si bé molt atractiva, és plena de problemes, dels que el principal és l'extrema complexitat d'interaccions gèniques i cel.lulars que cada cop més resulta al analitzar processos qualificats a-bans de simples.

Què cal fer doncs en Biologia i Genètica del Desenvolupament?. Autors molt rellevants com Brenner, García-Bellido, Jacob, Crick i d'altres, senyalen que actualment el pas a fer és el d'invertir la seqüència reduccionista i a partir d'un producte gènic a cel.lular i a organismic. Més concretament, aquests autors diuen que cal produir alteracions o paradoxes a nivell genètic i comprovar aquesta alteració a nivell molecular per després explicar-ho a nivell organismic.

I els estudis de regeneració, a quin nivell estàn?. En termes generals, i donat que ni Drosophila, ni C.elegans, ni el ratolí regeneren, estem encare en el primer estadi, encare que embellit amb certes pincellades moleculars (que cal dir són moleculars sensu stricto i no genètic-moleculars). A nivell genètic, el panorama és desolador i cal qualificar-lo de tràgic; no hi ha pràcticament res, i lo poc que hi ha, ha estat miòpicament ignorat.

Què cal fer doncs en regeneració?. En primer lloc, una possible solució fora l'iniciar, en aquells organismes que regeneren i que a la vegada són susceptibles d'anàlisi genètic convencional, un programa de mutagènesi per tal d'aïllar mutants que d'alguna manera afectin al procés regeneratiu. En segon lloc, i molt especialment en aquells organismes refractaris a un anàlisi genètic, es podria connectar l'estadi primer (blastema+camp morfo-genètic) i el tercer (biologia molecular del desenvolupament) establint un banc genòmic emprant tècniques de clonatge i estudiar les variacions en l'expressió gènica durant la regeneració, i fins i tot identificant els gens principals de la regeneració permedi del sondatge del banc de gens amb els mRNAs dels diferents estadis. Un cop obtinguts aquests gens, es po-

dria obtenir els productes i entrar dins de l'anàlisi molecular per a establir la seqüència "gen-producte gènic-receptor cel.lular-efecte fenotípic".

Aquest és un programa viable que es pot fer, i, més important encare, que cal fer, per a que els estudis de regeneració es pssin a l'alçada dels estudis de Genètica del Desenvolupament d'avui en dia.

#### BIBLIOGRAFIA

- ABELOOS, M. (1930). Recherches expérimentales sur la croissance et la régénération chez les planaires. Bull.Biol.Fr.Belg. 64,1-130.
- BAGUÑA, J. (1973). Tesi Doctoral, Universitat de Barcelona.
- BAGUÑA, J. (1976b). Mitosis in the intact and regenerating planarian *Dugesia mediterranea* n.sp. II. Mitotic studies during regeneration and a possible mechanism of blastema formation. J.Exp.Zool. 195,65-80.
- BAGUÑA, J. (1981). Planarian neoblasts. Nature 290,14-15.
- BAGUÑA, J i BALLESTER, R. (1978). The nervous system in planarians: peripheral and gastrodermal plexuses, pharynx innervation and the relationship between central nervous system structure and the acoelomate organization. J.Morphol. 155,237-252.
- BAGUÑA, J i ROMERO, R. (1981). Quantitative analysis of cell types during growth, degrowth and regeneration in the planarians *Dugesia mediterranea* and *Dugesia tigrina*. Hydrobiologia 84,181-194.
- BAUTZ, A. (1983). Caracterisation des synthèses d'ARN au cours de la régénération céphalique normale ou abortive chez la planaire *Dendrocoelum lacteum*. Colloque Regeneration S.F.B.D. Marsella. Abstracts:28
- CALOW, P. (1977). The joint effect of temperature and starvation on the metabolism of triclads. Oikos 29,87-92.
- CALOW, P. (1978). Life Cycles. Chapman & Hall, London.
- CHANDEBOIS, R. (1980). The dynamics of wound closure and its role in the programming of planarian regeneration. II. Distalization. Develop, Growth and Differ. 22,693-704
- COLLET, J i SALO, E. (1983). Polyamine changes during planarian regeneration: regional content, and the effect of polyamine inhibitors on polyamine biosynthesis and blastema growth and differentiation. Colloque Regeneration S.F.D.B. Marseille. Abstracts.
- COULON, J i MARILLEY, M. (1978). Fluctuations of adenylate cyclase activity during anterior regeneration in *Owenia fusiformis*. J.Embryol. exp.Morph. 48,73-78.

- FRANQUINET, R. (1979). Rôle de la sérotonine et des catécholamines dans la régénération de la planaire *Polycelis tenuis*. *J.Embryol.exp.Morph.* 51,85-95.
- FRANQUINET, R i LE MOIGNE, A. (1979). Relation entre les variations des taux de sérotonine et d'AMP cyclique au cours de la régénération d'une planaire. *Biol.Cell.* 34,71-76.
- FRIEDEL, T i WEBB, R.A. (1979). Stimulation of mitosis in *Dugesia tigrina* by a neurosecretory fraction. *Can.J.Zool.* 57,1818-1819.
- GREMIGNI, V i MICELI, C. (1980). Cytophotometric evidence for cell "transdifferentiation" in planarian regeneration. *Wilhelm Roux's Archives* 188,107-113.
- HAY, E.D. i COWARD, S.J. (1975). Fine structure studies on the planarian *Dugesia*. I. Nature of the "neoblast" and other cell types in noninjured worms. *J.Ultr.Res.* 50,1-21.
- HORI, I. (1978). Possible role of rhabdite-forming cells in cellular succession of the planarian epidermis. *J.Electron Microsc.* 27,89-102.
- MADEN, M. (1977). The regeneration of positional information in the amphibian limb. *J.theor.Biol.* 69,735-753.
- MARTELLY, I. (1980). Variations des synthèses d'ADN et des activités déoxyribonucléases acide et alcaline au cours de la régénération des planaires (*Polycelis*). *C.R.Acad.Sci.Paris.* 290,1571-1574.
- MARTELLY, I i LE MOIGNE, A. (1980). Ribonucleic acid metabolism during planarian regeneration. *Reprod.Nutr.Dévelop.* 20,1527-1537.
- REYNOLDS, T.B. (1966). Preliminary laboratory experiments on recruitment and mortality in tricladpopulations. *Verh.int.Ver.Limnol.* 49, 1621-1631.
- SALÓ, E. (1982). Polyamine changes during regeneration in the planarian *Dugesia(G)tigrina* and its role on blastema differentiation. XVth EDBO Int.Embr.Conf. Strasbourg. Abstracts:166.
- SALÓ, E i BAGUÑA, J. (1983). Blastema cell kinetics in unirradiated and irradiated planarians. The role of cell proliferation and cell migration. Colloque Regeneration, Marseille. Abstracts.
- WALLACE, H. (1981). *Vertebrate Limb Regeneration*. John Wiley & Sons, New York.
- WOLFF, E. (1962). Recent researches on the regeneration of planaria. In: *Regeneration*. 20th Growth Symposium, The Ronald Press Co., pp 53-84.