

Separació dels diferents tipus cel.lulars a planària.

Aïllament de neoblastes.

M. C. Auladell

Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Diagonal 645, Barcelona 28

Introducció

La capacitat de regeneració i reorganització de les planàries (Platelmints, Turbelaris), l'existència de dos grans compartiments cel.lulars - un, format per un tipus cel.lular proliferatiu i indiferenciat (els anomenats neoblastes), i l'altre format per 12 - 15 tipus cel.lulars diferenciats no proliferatius - han fet, d'aquests organismes, un model força utilitzat per investigar problemes de tipus morfogènètic i histiogènètic.

Nombroses dades sugereixen que els neoblastes són els únics amb capacitat de divisió, Pedersen (1972), Baguña (1976); si això hi afegim que les cèl.lules diferenciades estan sotmeses a un renovament constant, tot sembla indicar que els neoblastes serien la base a partir de la que es diferenciarien els 12-15 tipus cel.lulars. Per altra banda, el fet que el blastema de regeneració sigui format, bàsicament, per neoblastes ha estat una raó de més per tractar d'esbrinar les relacions funcionals entre aquests dos tipus de poblacions cel.lulars.

Per tal d'ajudar a desxifrar els punts esmentats abans, hem posat a punt tècniques de separació i purificació de cèl.lules diferenciades i indiferenciades de planària.

Una altra aplicació immediata d'aquest treball seria el disseny de medis de cultiu idonis per establir cultius permanents de cèl.lules indiferenciades tot seguint els treballs iniciats malauradament inclomerts, de Murray (1927), Ansevin et al. (1961) i Betchaku (1967).

Material i mètodes

Material

L'espècie de planària utilitzada és la Dugesia (G) tigrina,



organisme abundant a Catalunya i fàcil de mantenir al laboratori.

#### Mètodes

Planàries, previament rentades amb solució salina, són tallades i dissociades per tripsinització (tripsina DIFCO 1:250 al 1% en solució lliure de calci i magnesi (CMF, 58 mM) que conté 1% B.S.A. i 15 mM Hepes) durant 5 hores, a 17°C. La suspensió cel.lular obtinguda es renta, dues vegades, amb CMF i es centrifuga, a 580 rpm, durant 10 minuts. El sediment cel.lular obtingut es resuspèn, de nou, en CMF. (Fig.1)

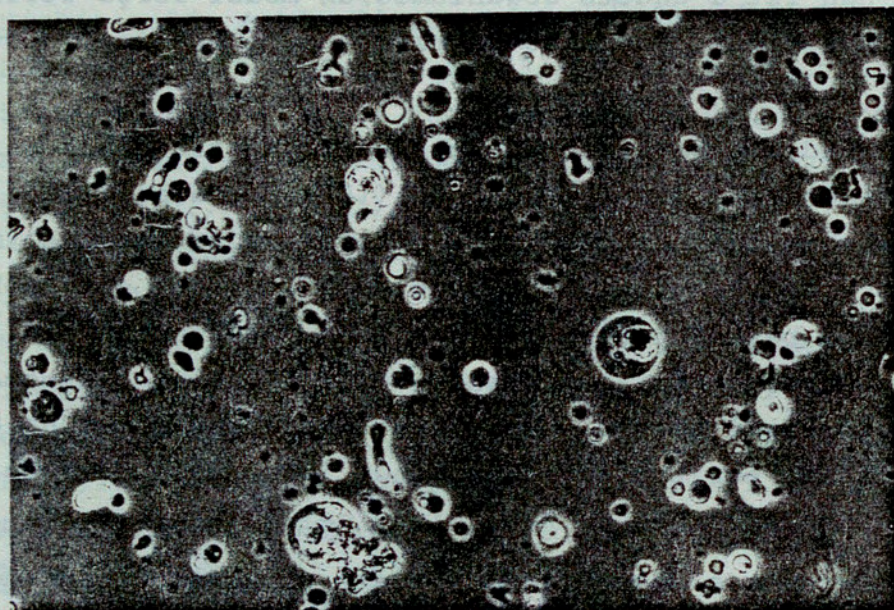


Fig.1- Dissociació cel.lular obtinguda per tripsinització i resuspensa en CMF. (Contrast de fase)

Per dur a terme la separació dels tipus cel.lulars, els dissociats es poden fraccionar seguint dos mètodes bàsics:

a) Mètode de separació cel.lular per gradients discontinus de Ficoll. De Sutter et al. (1977,1979).

El gradient consisteix en fraccions d'igual volum (0,5,1,2 o 10 ml) de Ficoll (400 Pharmacia), al 15,12,9,6 i 3% en solució CMF. Al damunt dels gradients s'afegeix 0,1 ml de suspensió cel.lular (densitat:  $4 \cdot 10^6$  cel/ml). La separació s'efectua a



4°C i a diferents velocitats de centrifugació; 1.200 rpm, 660 rpm durant 30, 60, 90 i 120 minuts, o bé a una gravetat, durant 10 hores. Assolida la separació, s'extreuen les fraccions amb pipetes Pasteur, es dilueixen 1:7 amb CMF, i es centrifuguen, de nou, a 580 rpm durant 30 minuts. El sediment es resuspèn, altra volta, en CMF i s'observa amb contrast de fase (Leitz Diavert), calculant-se el rendiment i la puresa de les fraccions (entenenent per rendiment el % de cèl.lules recuperades respecte a les inicials i per puresa, el % d'un determinat tipus cel.lular respecte al total de cèl.lules). La identificació dels tipus cel.lulars es fa segons el criteri exposat a Baguñà, Romero (1981).

#### b) Mètode de filtració.

La suspensió cel.lular ( $3 \cdot 10^6$  cel/ml) es filtra seqüencialment a través de malles de nylon de 160  $\mu$ m, 40  $\mu$ m i 20  $\mu$ m, i filtres Whatmann 43 (16  $\mu$ m). El filtrat final es centrifuga 20 minuts a 580 rpm, i el sediment obtingut es resuspèn en CMF que conté 1% de B.S.A., 15 mM Hepes i 10  $\mu$ g/ml de Kanamycine sulfate. La observació es fa amb microscopi de contrast de fase, calculant-se el rendiment i la puresa després de cada filtrat.

### Resultats

#### a) Fraccionament, en gradients discontinus de Ficoll.

Abans d'arribar a un protocol definitiu, es van estudiar els paràmetres més adients per al fraccionament. Les variables estudiades foren velocitat de centrifugació (rpm), temps de centrifugació, volum de les fases i densitat cel.lular de la mostra.

Els resultats més satisfactoris s'obtingueren amb un volum de fase de 0,5 ml, una velocitat de 1.200 rpm i centrifugacions de 2 hores de duració. (Fig. 2A) En aquestes condicions, s'obtingué una fracció de cèl.lules diferenciades a la interfase 3 - 6% del 85 - 89% de puresa. (Fig. 3) Al temps, la interfase 9-12% presentava neoblastes a una puresa del 70-75% mentre que la interfase 12-15%, la puresa dels neoblastes atanyia el 90%. El rendiment global fou del 20%.



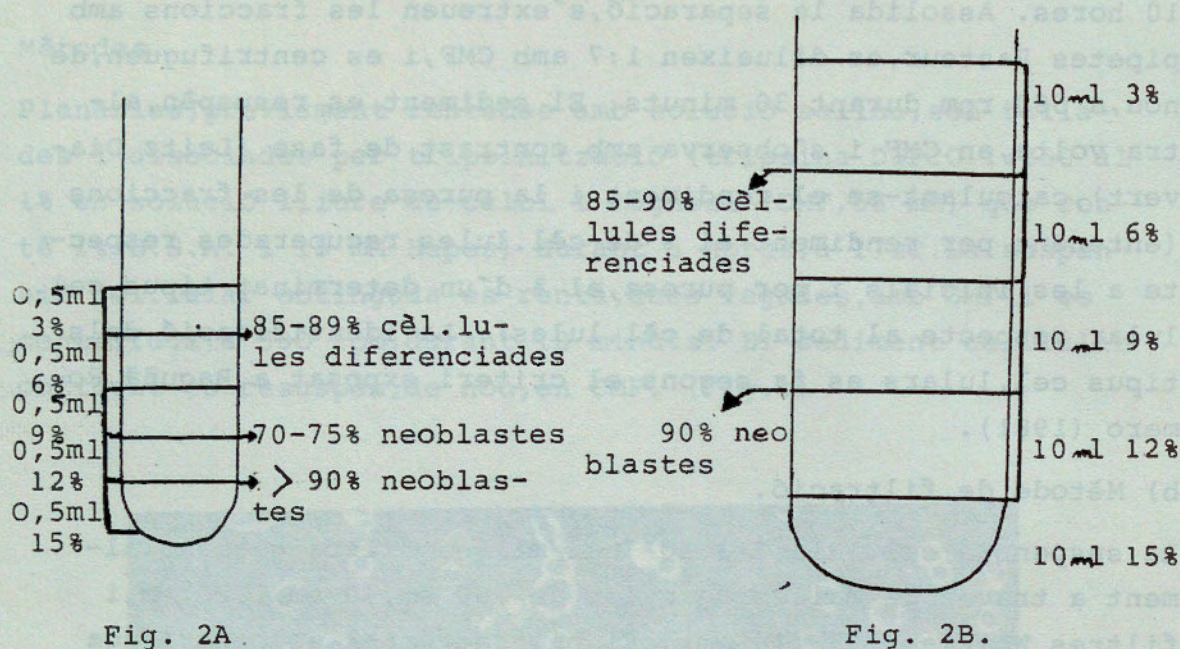


Fig. 2A.

Fig. 2B.

Fig.2- Patró de distribució de les cèl.lules a través dels gradients discontinus de Ficoll. A) després de centrifugar a 1.200 rpm 120minuts. B) Després de centrifugar a 1g,10 h.

Per tal d'incrementar el nombre total de cèl.lules fraccionades es realitzar una separació amb gradients del 15,12,9,6,i 3% de Ficoll utilitzant volums de fase de 10 ml. i centrifugació a 1 g. durant 10 hores a 12°C, El resultat obtingut (Fig. 2B) mostra, com en el cas precedent, una fracció purificada de cèl.lules diferenciades (puresa 85-90%) a la interfase 3-6 i una fracció purificada de neoblastes (puresa superior al 90%) a la interfase 9-12% (Fig.4). El rendiment global fou del 30-35%.

#### b) Fraccionament per filtració

A partir d'una suspensió cel.lular (densitat:  $2 \cdot 10^6$  cel/ml) i seguint el protocol descrit els mètodes, s'obtingueren els resultats que es mostren al quadre 1.



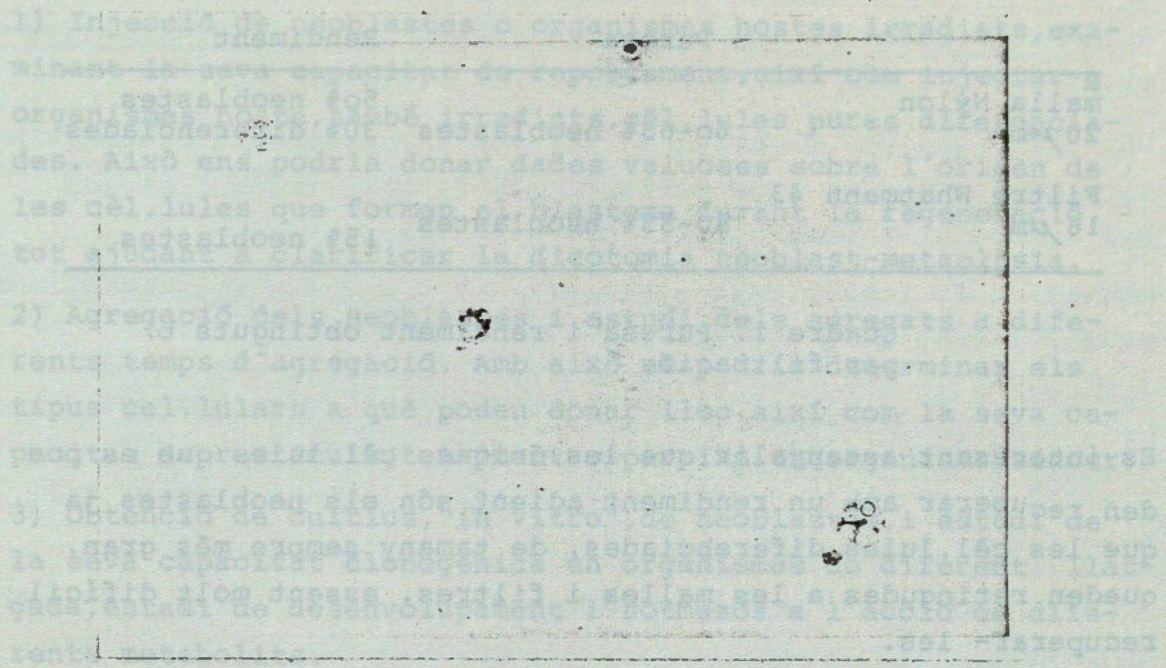


Fig.3- Fracció pura de cèl.lules diferenciades,obtinguda a la interfase 3-6%després de centrifugar els gradients de Ficoll a 1.200 rpm,120 minuts.

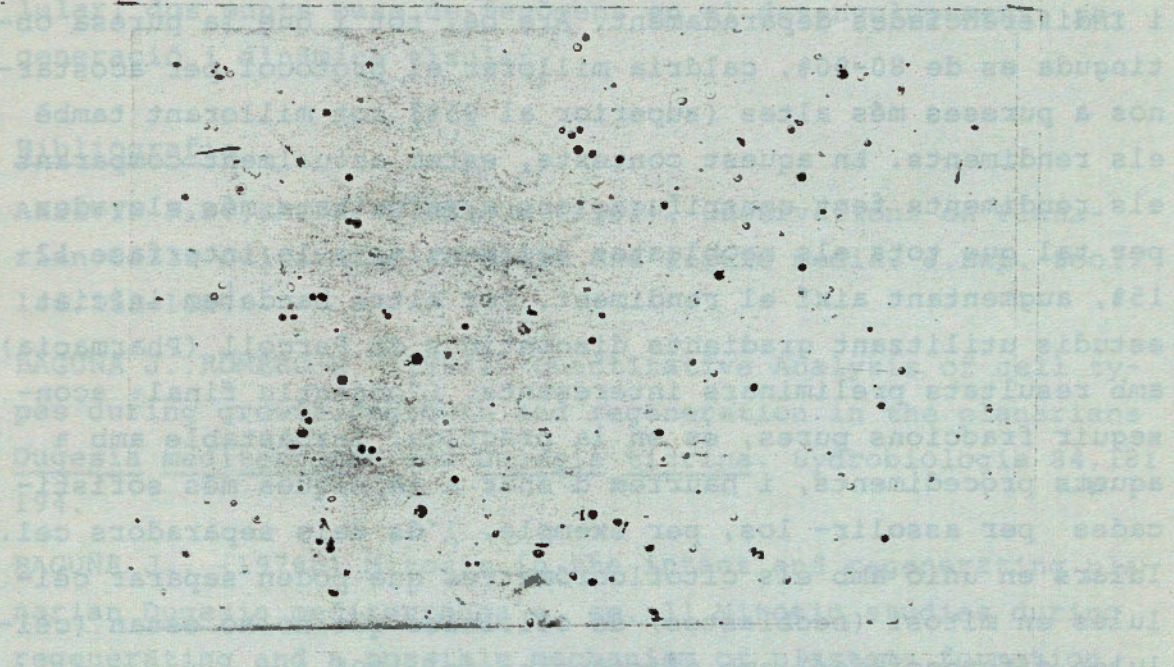


Fig.4- Fracció pura de cèl.lules indiferenciades (neoblastes) obtinguda a la interfase 9-12%,després d'haver centrifugat els gradients de Ficoll a una g, 10 hores.



|                                  | Puresa            | Rendiment                           |
|----------------------------------|-------------------|-------------------------------------|
| Malla Nylon<br>20 $\mu$ m        | 60-65% neoblastes | 50% neoblastes<br>30% diferenciades |
| Filtre Whatmann 43<br>16 $\mu$ m | 80-85% neoblastes | 15% neoblastes                      |

Quadre 1. Puresa i rendiment obtinguts per filtració.

Es interessant assenyalar que les úniques cèl.lules que es poden recuperar amb un rendiment adient són els neoblastes ja que les cèl.lules diferenciades, de tamany sempre més gran, queden retingudes a les malles i filtres, essent molt difícil recuperar-les.

#### Discussió

Els resultats obtinguts mostren l'eficiència d'ambdós mètodes de separació en obtenir fraccions de cèl.lules diferenciades i indiferenciades deparadament. Ara bé, tot i que la puresa obtinguda es de 80-90%, caldria millorar el protocol per acostar-nos a pureses més altes (superior al 95%) tot millorant també els rendiments. En aquest contexte, estem actualment comparant els rendiments fent centrifugacions a velocitats més elevades per tal que tots els neoblastes sedimentin a la interfase 12-15%, augmentant així el rendiment. Per altre banda hem iniciat estudis utilitzant gradients discontinus de Percoll (Pharmacia) amb resultats preliminars interessants. L'objectiu final: aconseguir fraccions pures, és en la pràctica, inabastable amb aquests procediments, i hauriem d'anar a tècniques més sofisticades per assolir-los, per exemple, l'ús dels separadors cel.lulars en unió amb els citofluoròmetres que poden separar cèl.lules en mitosi (neoblastes) de cèl.lules que no ho estan (cèl.lules diferenciades) amb eficiències del 100%.

#### Prespectives futures

L'assolir fraccions pures de neoblastes d'una banda i cèl.lules diferenciades de l'altra ens permetrà, en un futur proper, dur a terme els següents treballs:



- 1) Injecció de neoblastes o organismes hostes irradiats, examinant la seva capacitat de repoblament, així com injectar a organismes hostes, també irradiats, cèl.lules pures diferenciades. Això ens podria donar dades valuoses sobre l'origen de les cèl.lules que formen el blastema durant la regeneració, tot ajudant a clarificar la dicotomia neoblast-metaplàsia.
- 2) Agregació dels neoblastes i estudi dels agregats a diferents temps d'agregació. Amb això es podria determinar els tipus cel.lulars a què poden donar lloc, així com la seva capacitat de restituir, totalment o parcial, un organisme sencer.
- 3) Obtenció de cultius, "in vitro", de neoblastes, i estudi de la seva capacitat clonogènica en organismes de diferent llargada, estadi de desenvolupament i sotmesos a l'acció de diferents metabolits.

Tots aquests estudis ens poden donar dades sobre la naturalesa de la cèl.lula soca de planària. Altrament, això aportarà informació valuosa en processos de recambi i diferenciació cel·lular, dos punts base de fenòmens en el desenvolupament, regeneració i dinàmica tisular.

#### Bibliografia

- ANSEVIN K.D., RALPH BUCHSBAUM (1961). Observations on Planarian Cells cultivated in solid and liquid media. J.Exp. Zool. 146, 153-161.
- BAGUÑA J., 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.
- BAGUÑA J., (1976b) Mitosis in the intact and regenerating planarian Dugesia mediterranea n. sp. 11 Mitotic studies during regenerating and a possible mechanism of blastema formation. J. Exp.Zool 195, 65-80.
- BETCHAKU T. (1967) "Isolation of Planarian Neoblasts and their Behavior in Vitro with some Aspects of the Mechanisme of the Formation of Regeneration Blastema. J.Exp.Zool.164, 407-434.



DE SUTTER D., BUSCEMA M. (1977) Isolation of a Highly Pure Archeocyte fraction from the Fresh-water Sponge Ephydatia fluviatilis. Wilhelm Roux's Archives 183, 149-153.

DE SUTTER D. VAN DE VYVER G. (1979). Isolation and recognition properties of some definite sponge cell types. Develop and Comparative Immunology. Vol. 3, 389-397.

MURRAY; M.R. (1927) The cultivation of Planarian tissues in vitro. J.Exp. Zool., 47, 467-505.

FEDERSEN, K.J: (1972) Studies on regeneration blastemas of the planarian Dugesia tigrina with especial reference to differentiation of the muscle-connective tissue filament system. Wilhelm Roux's Archiv 169, 134-169.