

Efecte diferencial de la injecció de neoblasts i cèl.lules diferenciades a planàries irradiades. El paper del neoblast com a cèl.lula-soca i de regeneració.

E. Saló , M.C. Auladell i J. Baguñà.

Dept. Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Diagonal 637-647, Barcelona 28.

Abstract

The differential potentialities of neoblasts and differentiated cells injected into irradiated planarians. Evidence for the role of neoblasts as stem and regenerative cells.

The origin of blastema cells is still one of the unsolved questions of planarian regeneration. Two main theories have been put forward: 1) blastema cells come from a permanent population of undifferentiated cells (neoblasts), and 2) blastema cells come from differentiated cell types through cell dedifferentiation.

To clarify this problem, we have tested the regenerative and stem-cell capabilities of purified neoblasts and differentiated cells when introduced into an irradiated organism (host). Neoblast and differentiated cells were purified by serial filtration through Nylon meshes and discontinuous density gradients respectively. The purity of both fractions were over 95%. That injected differentiated cells survived within the irradiated host was assessed using fluorescence latex beads.

The results show that when total cells and purified neoblasts are introduced into the irradiated host, mitotic activity recovers leading to a long survival, and blastema formation does occur. Instead, injection of differentiated cells do not lead to mitotic recovery and blastema formation. It is concluded, that, under this experimental conditions, dedifferentiation does not play any role in organismal recovery and regeneration, and that neoblasts appear to be true stem-cells and the only cell type leading to blastema formation.

Introducció

La capacitat regenerativa de les planàries es manifesta externament, als pocs dies, amb l'aparició davant de la ferida d'un teixit despigmentat format majoritàriament per cèl.lules indiferenciades, el "blastema". Donat que durant tot el procés regeneratiu aquest no presenta mai mitosis (Saló & Baguñà, 1984) el seu creixement és resultat de l'aportació contínua de cèl.lules de darreta de la ferida. Aquest seria un procés local (Saló & Baguñà, 1983a; b; 1984), és a dir només les cèl.lules dels teixits que estan a menys de 500 μm de la ferida poden participar en la formació del blastema. Un altre punt a dilucidar és el de l'origen de les cèl.lules del blastema: són exclusivament neoblasts de les regions veïnes?; són exclusivament cèl.lules diferenciades de les mateixes regions prèviament desdiferenciades?; o són els dos processos alhora els responsables de la formació del blastema?. Aquest és un dels aspectes més actuals i conflictius de la regeneració a planàries (Slack, 1980) (Baguñà, 1981).

Des de mitjans de segle han anat sortint diferents models hipotètics basats, la major part d'ells, en resultats indirectes que han provocat l'enfrontament entre diferents autors i l'aparició de 2 tendències principals: la de l'Escola Francesa (Wolff, 1964; Lender, 1965) que en base als resultats obtinguts amb irradiacions parcials, consideren la formació del blastema com a resultat de la intervenció exclusiva dels neoblasts (cèl.lules indiferenciades), aquests s'acumularien en la ferida i s'amplificarien mitjançant una alta taxa mitòtica. L'altra tendència és la sostinguda per la majoria d'autors americans (Flickinger, 1959; Hyman & Hay, 1968; Coward, 1975; Chandebais, 1976), aquests consideren la formació del blastema com el resultat d'una desdiferenciació de les cèl.lules diferenciades situades darrera de la ferida, amb posterior proliferació d'aquestes un cop desdiferenciades. Aquesta teoria es basa principalment en estudis a nivell de microscòpia òptica, electrònica i mesura d'activitats fosfatàsiques (vegeu, Saló, 1984, per a revisió general). Finalment, és interessant esmentar, per la novetat de la tècnica, els recents treballs de Gremigni i col. (1980;1982) en una espècie triploide amb la línia germinal masculina diploide i la femenina hexaploide. Quan sotmetia aquesta espècie a unes condicions extremes de regeneració, observava a n'el blastema l'existència de cèl.lules somàtiques diploides i hexaploides, d'aquí va concloure que durant la regeneració hi ha processos de desdiferenciació, i que la formació del blastema s'assoliria pels dos processos alhora: acumulació de neoblasts i cèl.lules desdiferenciades. Ara bé, aquests resultats presenten certes dificultats d'interpretació: a) en primer lloc, no mostren l'existència de desdiferenciació somàtica, tan sols germinal; b) durant la determinació o diferenciació d'un neoblast cap a cèl.lula germinal, aquest no perd cap de les seves totipotencialitats, per tant en condicions extremes de regeneració no és d'estrenyar que les cèl.lules germinals puguin re-determinarse cap a neoblasts; c) finalment, i potser el punt clau és el saber si la pèrdua d'un complement haploide o la duplicació del genoma impliquen una determinació real. En aquest sentit, cal assenyalar que sols les espermatogònies i oogònies són capaces de "transdiferenciar-se" (sensu Gremigni). Sembla, doncs, que aquests resultats abonen més l'existència d'una desdeterminació que no pas l'existència d'una desdiferenciació.

Amb la intenció d'obtenir uns resultats més concloents amb els quals poder dilucidar definitivament l'existència o no de desdiferenciació durant la regeneració a planàries, vàrem injectar cèl.lules de planària intactes, prèviament separades en neoblasts i cèl.lules diferenciades segons el mètode de Auladell i Collet (1984), a l'interior d'organismes irradiats (raigs X). S'observà quin tipus cel.lular injectat era capaç de restituir les potencialitats

regeneratives i de recanvi cel.lular a l'organisme irradiat.

Material i Mètodes

1) Organismes: Els organismes emprats per aquest estudi pertanyen a l'espècie asexual de Dugesia(G)tigrina. Els organismes irradiats amb raigs X eren sotmesos a una dosi total de 8.000rads (1.000rads/minut) amb un tub housing HT-100 (Philips) del Dep. de Dermatologia, Hosp. Clínic de Barcelona, a 100Kv, 8mA. amb un filtre d'alumini de 1'7mm de gruix.

Els organismes suministradors de cèl.lules diferenciades marcades amb boles de latex fluorescents, eren alimentats amb una papilla artificial que constava (comunicació personal R. Romero):

- 0.2 gr d'homogenitzat de fetge
- 10 mgr d'agar de baix punt de gelificació (15°C) Sea Prep15/45 (FMC Rockland)
- 2 ml d'H₂O dest.
- 40λ de solució mare (2'5%; 4.55x10¹⁰ boles/ml) de boles de latex fluorescents (màxim d'absorció 169nm) de 1±0.03 μm de ø (Polysciences, inc.)

Al cap de 24 hores d'injecció de la papilla erendissociades, s'obtenia una suspensió cel.lular amb un 20% de les cèl.lules diferenciades marcades amb boles de latex fluorescents, aquestes es mantenen estables durant més d'un mes.

2) Separació de neoblasts i cèl.lules diferenciades: primerament s'obtenia un dissociat cel.lular d'organismes prèviament trossejats en CMF (solució salina sense calci i magnesi) (Saló 1984; Auladell, 1983).

El mètode de millor rendiment en l'obtenció de neoblasts purs era el de filtració diferencial, mentre que les cèl.lules diferenciades s'obtenien o bé a partir de dissociats de faringes, òrgans formats completament per cèl.lules diferenciades (Baguñà, 1976a), o bé per gradients de Ficoll (Saló, 1984; Auladell i Collet, 1984). Totes aquestes suspensions cel.lulars presentaven les cèl.lules en bon estat.

3) Introducció de dissociats cel.lulars purificats en organismes irradiats:

La suspensió cel.lular total o purificada es centrifuga a 400g 30' i es resuspen en un volum mínim de CMF. Planàries hoste irradiades es deixen sota un binocular i sobre una placa de gel, per immobilitzar-les el màxim possible. Aleshores, i amb trossets de fulla d'afaitar de 1mm d'amplada es fan tres incissions, formant un triangle (Saló, 1984). Seguidament s'introdueix a través de les incissions la punta d'un tub d'hematòcrit estirat a la flama, i amb l'ajut d'un cargol micromètric acoblat a una xeringa hamilton s'introdueixen dins l'hoste uns 7 μl de suspensió cel.lular. A continuació es recobreix l'organisme amb paper de fumar, i es deixa 12h a 4°C i 24h a 12°C dins d'una càpsula de petri negra amb paper Whatman n°1 humit amb solució salina estèril (fig. 1). Finalment els organismes injectats i els controls no injectats, es

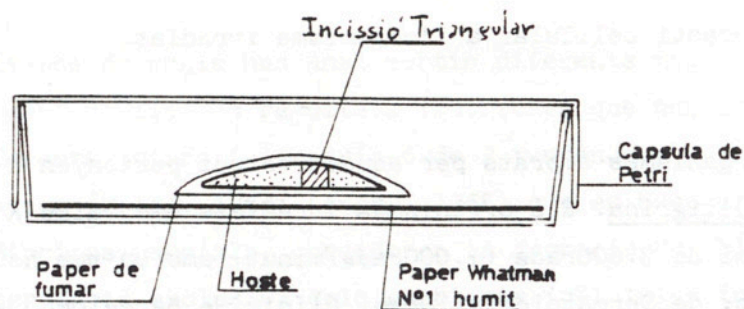


Figura 1.

deixen en solució estèril a 21°C amb canvis diaris, per a observar la corba de supervivència.

4) Control de la supervivència de les cèl·lules diferenciades injectades en hostes irradiats: Suspensions de cèl·lules diferenciades marcades amb boles de làtex fluorescents obtingudes per purificació de dissociats d'organismes alimentats amb papilla artificial (mètode 1) eren injectades (Mètode 3) dins d'hostes irradiats. A diferents temps després de la injecció, els organismes eren macerats i amb l'ajut d'un hemocitòmetra i un microscopi Zeiss amb equip de fluorescència, es quantificava el nombre de cèl·lules diferenciades en bon estat marcades amb boles de làtex fluorescents. Els resultats s'expressen en percentatges respecte al nombre total de cèl·lules de l'hoste.

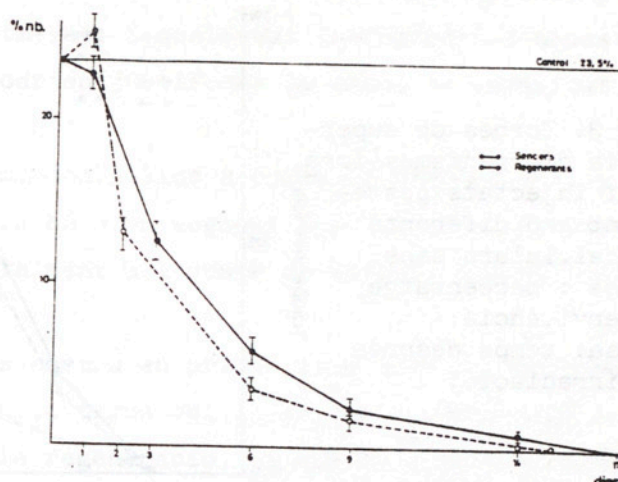
5) Quantificació de l'activitat mitòtica: La quantificació de l'activitat mitòtica d'hostes irradiats i injectats amb diferents suspensions cel·lulars, es va realitzar incubant els organismes amb Cochicina 0.05% durant 4h a 22°C, seguit d'una tinció amb orceïna segons el mètode de Gomory modificat (Saló, 1978).

6) Quantificació del nombre de neoblasts en organismes irradiats: Organismes control irradiats, eren macerats segons el mètode de (Baguñà & Romero, 1981) a diferents temps post-irradiació, i amb l'ajut d'un hemocitòmetre i un microscopi de contrast de fase, es quantificava el nombre de neoblasts del macerat. Els resultats venen expressats en % respecte al nombre total de cèl·lules.

Resultats

1) Efecte dels raigs X: Els organismes irradiats mostren a partir d'una dosi total de 4.000rads la desaparició de l'activitat mitòtica. Això provoca un decreixement de la població de neoblasts (23'5%), així als 3 dies després de la irradiació aquesta ha disminuït un 50% (12%), i queda reduïda a un valor insignificant a les dues setmanes, tant en organismes sencers com regenerant (fig. 2). La manca de neoblasts impedeix el recanvi cel·lular i provoca la lisi de l'organisme als 21 dies.

Figura 2. Percentatge de neoblasts presents en organismes irradiats. Abscissa: temps en dies després de la irradiació. (o----o) organismes irradiats regenerant; (●—●) organismes irradiats sencers.



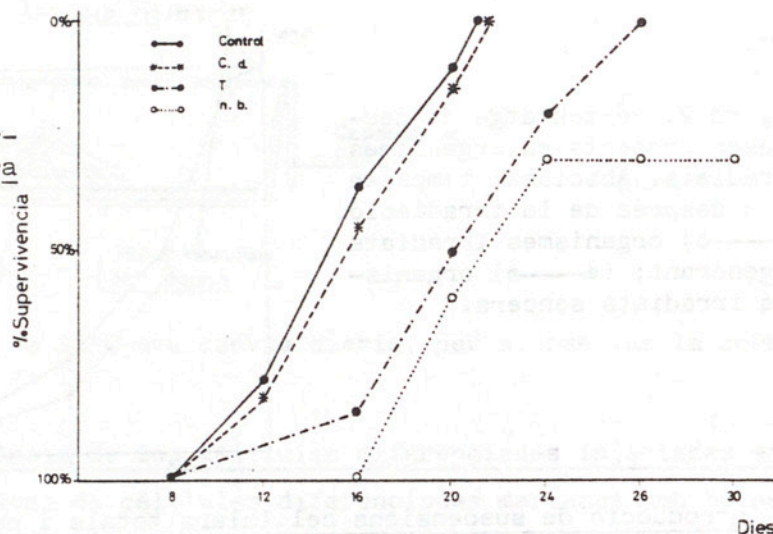
2) Introducció de suspensions cel.lulars totals i purificades a organismes irradiats: Els resultats d'aquests experiments s'exposen en la Taula I, mentre que les corbes de supervivència dels diferents hosts es presenten en la Fig 3.

2.1.) Introducció de dissociats de cèl.lules totals: La introducció d'una suspensió cel.lular total a l'interior d'un hoste irradiat, sencer o regenerant provoca, als 15 dies a 22°C, l'aparició de densitats altes de mitosis (Taula I) en regions puntuals de l'organisme. Aquestes, però, són insuficients per a repoblar tot l'organisme, i aquest mort, encara que té un temps mitjà de supervivència lleugerament més llarg (26d) que els controls.

2.2.) Introducció de dissociats de neoblasts purs: La introducció d'una suspensió de neoblasts (90% puresa) a l'interior d'un hoste irradiat, sencer o regenerant provoca, als 15 dies a 22°C, l'aparició de mitosis distribuïdes, no uniformement, en clapes d'alta densitat (superior a l'observada en injeccions de dissociats totals). Tot i així, no tots els organismes injectats recuperen amb el temps necessari el nombre suficient de neoblasts per a sobreviure a la irradiació, i a la llarga moren, si bé amb un temps mitjà de supervivència significativament més llarg que tots els altres grups (30 dies). Solament el 20% d'organismes injectats amb neoblasts sobreviuen a l'efecte letal de la irradiació, i presenten un comportament normal, amb formació del blastema si són tallats i reproducció per fisió si els neoblasts injectats eren d'organismes de reproducció asexual.

2.3.) Introducció de dissociats de cèl.lules diferenciades: La introducció de dissociats de cèl.lules diferenciades intactes i pures (95% de puresa) a l'interior d'un organisme irradiat, sencer o regenerant, no provoca cap canvi a cap nivell en l'hoste irradiat. No s'observen mai mitosis inclús al cap de períodes llargs després de la injecció (més de 15d), el temps mitjà de supervivència d'aquests és el mateix que els controls (fig. 3).

Figura 3. Corbes de supervivència d'organismes irradiats i injectats posteriorment amb diferents tipus cel.lulars sans. Ordinada : percentatge de supervivència; Abscissa: temps després de la irradiació.



	Temps mitjà supervivència	Nombre organismes estudiat	% organismes amb mitosis	Index mitòtic
Control	21d.	41	0%	0
total	26d.	34	96%	0.337±0.112
Cèl. dif.	21½d.	35	0%	0
Neoblasts	30d.-∞	32	97%	0.780±0.202

Taula I. Temps mitjà de supervivència, percentatges d'organismes que presenten mitosis, i índex mitòtic a organismes irradiats (controls) o injectats amb dissociats de cèl.lules totals o prèviament purificades de neoblasts o cèl.lules diferenciades.

Els controls realitzats amb suspensions de cèl.lules diferenciades marcades amb boles de làtex fluorescents (Taula II), mostra que el percentatge de cèl.lules injectades, marcades i en bon estat es manté durant tot el període que resta viu l'hoste, descartant per tant qualsevol inadaptació i lisi de les cèl.lules diferenciades dins el nou ambient del teixit irradiat. La alta variabilitat en els percentatges es deguda a la impossibilitat de controlar perfectament el nombre de cèl.lules injectades en cada organisme.

Od	2d	5d	10d	15d	20d
4.416±2.823	6.500±3.400	2.708±980	5.200±2.102	4.800±1.041	5208±1202
0.48%	0.32%	0.29%	0.68%	0.57%	0.69%

Taula II. Nombre i percentatge de cèl.lules sanes marcades amb boles de làtex fluorescents, a diferents temps post-injecció.

Discussió

La introducció de cèl.lules intactes prèviament purificades a l'interior d'hostes irradiats, sencers o regenerant, mostra:

- 1) que en aquestes condicions, les cèl.lules diferenciades introduïdes no proliferen, la qual cosa impedeix la supervivència de l'hoste irradiat, i consegüentment deuen ésser incapaces de desdiferenciar-se. Per altre banda, els controls realitzats amb cèl.lules marcades amb boles de làtex fluores-

cents, descarten qualsevol alteració de les cèl.lules diferenciades per la manipulació a què han estat sotmeses, i qualsevol inadaptació d'aquestes en el teixit irradiat, fets que podrien justificar la manca de capacitat desdiferenciadora.

2) Que els neoblasts introduïts, donen lloc a zones (o clapes) d'alta densitat mitòtica, i a la llarga duen bé a un augment del temps de supervivència de l'hoste, o bé a "salvar" totalment a l'hoste de la mort i restituir-li la capacitat regenerativa.

El conjunt d'aquestes dades ens mostra en primer lloc que, en les condicions emprades, el neoblast seria l'únic tipus cel.lular que donaria lloc a les cèl.lules del blastema durant la regeneració, ja que la simple introducció de neoblasts sans dins l'hoste irradiat, li permeten formar un blastema de les mateixes característiques del que forma un organisme control no-irradiat, mentre que la introducció de cèl.lules diferenciades sanes, al no desdiferenciarse són incapaces de formar un blastema de regeneració.

En segon lloc, el fet que tan sols la introducció de neoblasts sans permetin la supervivència i restitució de totes les potencialitats de l'hoste irradiat, confirma al neoblast com l'autèntica cèl.lula soca, capaç de donar lloc a tots els tipus cel.lulars i per tant de retituir el "turnover" de tots els teixits. En aquest sentit, (Saló, 1984) observa que la introducció d'un transplant intacte d'una espècie o raça diferent a la de l'hoste irradiat, provoca la supervivència d'aquest i el canvi de raça o espècie segons l'origen del transplant. Donat que el neoblast és l'única cèl.lula amb capacitat proliferativa i migratòria local, aquests resultats ens confirmen al neoblast com l'autèntica cèl.lula soca general, i ens mostren que inclús es poden desenvolupar en un camp morfogenètic d'una altra raça o espècie, interpretant els seus senyals morfogenètics i provocant a la llarga el canvi de comportament en funció de la seva informació genètica. Tot aixó duu al seu torn a suggerir que la desdiferenciació cel.lular, si es que realment es dona a planàries, té un paper poc rellevant en el mecanisme de formació i creixement del blastema, i en el procés diari de recanvi cel.lular.

Bibliografia

- AULADELL M.C. (1983). Separació dels diferents tipus cel.lulars a planària. aïllament de neoblasts. Biologia del Desenvolupament 1, 235-242.
- AULADELL M.C. & COLLET J. (1984). Marcadors proteics específics per a neoblasts i cèl.lules diferenciades de la planària Dugesia(G)tigrina. Biologia del Desenvolupament 2 .
- BAGUÑA J. (1976a). Mitosis in the intact and regenerating planarian Dugesia mediterranea n. sp. I. Mitotic studies during growth, feeding and starvation. J. Exp. Zool. 195, 53-64
- BAGUÑA J. (1981). Planarian neoblasts. Nature 290, 14-15.

BAGUÑA J. & ROMERO R. (1981). Quantitative analysis of cell types during growth, degrowth and regeneration in the planarian Dugesia mediterranea and Dugesia tigrina. Hidrobiologia 84, 181-194.

CHANDEBOIS R. (1976). Monographs in developmental biology, t,11 S. Karger Basel (A. Wolsky Ed.).

COWARD S.J., BENNETT C.E. & HAZLEHURST B.L. (1974). Lysosomes and lysosomal activity in the regenerating planarian; evidence in support of dedifferentiation. J. Exp. Zool. 189, 133-146.

FLICKINGER R.A. (1959). A gradient of protein synthesis in planaria and reversal of axial polarity of regenerates. Growth 23, 251-271.

GREMIGNI V. & MICELI C. (1980). Cytophotometric evidence for cell "transdifferentiation" in planarian regeneration. Wilhelm Roux' Arch. 188, 107-113.

GREMIGNI V., NIGRO M. & PUCCINELLI I. (1982). Evidence of male germ cell redifferentiation into female germ cells in planarian regeneration. J. Embryol. Exp. Morphol. 70, 29-36.

HAY E.D. (1968). "Dedifferentiation and metaplasia in vertebrate and invertebrate regeneration". In: The stability of the differentiated state. H. Ursprung, ed. Springer-Verlag, New York, pp. 83-108.

LENDER TH. & GABRIEL A. (1965). Les néoblastes marqués par l'uridine tritiées migrent et édifient le blastème de régénération des planaires d'eau douce. C. R. Acad. Sc. 260, 4095-7.

SALÓ E. & BAGUÑA J. (1983a) El paper de la migració cel.lular durant la formació del blastema a planàries. Biologia del Desenvolupament 1 221-228.

SALÓ E. & BAGUÑA J. (1983b). Blastema cell kinetics in unirradiated and irradiated planarians. The role of cell proliferation and cell migration. Arch. Anat. Microsc. Morph. Exper. 72, 241.

SALÓ E. (1984). Formació del blastema i re-especificació del patró durant la regeneració de les planàries Dugesia(S)mediterranea i Dugesia(G)tigrina: anàlisi morfològic, cel.lular i bioquímic. Tesi Doctoral Univ. Barcelona.

SALÓ E. (1978). Gradients axials de regeneració a planàries: relacions amb la proliferació i la formació del sistema nerviós. Tesina de llicenciatura Univ. Barcelona.

SALÓ E. & BAGUÑA J. (1984a). 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. (en prensa).

SALÓ E. & BAGUÑA J. (1984b). Regeneration and pattern formation in planarians. II. The extent and role of cell migration in blastema formation. J. Embryol. Exp. Morphol. (en prensa).

SLACK J.M.W. (1980). The source of cells for regeneration. Nature 286, 760.

WOLFF E., LENDER TH. & ZILLER-SENGEL C. (1964). Le rôle de facteurs auto-inhibiteurs dans la régénération des planaires. Rev Suisse Zool. 71, 75-89.