

Formació del patró durant la regeneració a planàries: Temps de determinació i independència de la grandària del blastema.

E. Saló i J. Baguñà

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

Abstract

Determinative Events and size-independence of pattern formation during planarian regeneration.

It has been known for a long time that grafted heads inhibit the formation of a new head when the host is cut near the graft. This inhibition is a temperature-dependent process appearing to be related to distance between graft and cut, and the interval of time between grafting and cutting. Using this inhibitory test we have studied the time of determination of head and pharynx during regeneration.

We found that determinative processes are extremely rapid and temperature dependent, 3-12 hours being needed for head determination and 6-24 hours for pharynx determination. Since at 3-24 hours of regeneration blastema is barely distinguishable we suggest that determination takes place in a very narrow piece of distal stump tissue behind the wound. Moreover, X-ray irradiated organisms which do not have mitotic activity make blastemas of different sizes (down to a value of 13% of controls) that differentiate head and pharynx as an un-irradiated blastema and stump. This suggests that determination and pattern formation in planarians are size-independent processes.

The rapid determination and the size-independence of pattern formation suggest that pattern first appears by morphallaxis within a small region of distal tissue, being amplified later on by an epimorphic process that includes cell division and cell migration.

Introducció

La formació del patró durant la regeneració animal ha estat entesa des de Morgan (1901) segons dos mecanismes considerats sovint excloents: 1) la morfolaxi, que implica la transformació de part del regenerant en les estructures que manquen, i en la que la proliferació no seria necessària; 2) l'epimorfosi, que implica l'aparició d'una zona de creixement prop de la ferida (el blastema) de la que deriven les parts que manquen. En termes de proliferació cel·lular, l'epimorfosi implica necessàriament divisió cel·lular; la morfolaxi, no.

Una conseqüència important de la no necessitat de proliferació en els sistemes morfolàctics (Hydra, Dictyostelium,...) és que el patró d'estructures que es forma és independent de la grandària del regenerant; és a dir, sigui quina sigui la grandària del regenerant, el patró es forma igual. D'aquí, la producció de Hidres, Dictyosteliums,... de grandària molt diversa segons sigui la grandària del teixit que roman. D'aquest comportament se'n diu

formació del patró independent de la grandària ("size-independent pattern"). Per contra, els sistemes epimòrfics clàssics (extremitats d'Amfibis i Insectes) presentarien un comportament oposat anomenat formació del patró dependent de la grandària ("size-dependent pattern"). En aquest cas, la grandària de les estructures o elements que es formen és sempre igual; és a dir, és independent de la mida que tingui el regenerant. Aixó és degut que en aquests sistemes és necessari abans la presència d'una determinada quantitat de nou teixit, perquè el patró es determini. D'ací es pot postular que si el blastema és més gran del normal, es formaran més elements del patró; si és més petit, s'en formaran menys.

Donat que presenten blastema, les planàries han estat considerades clàssicament com a sistemes epimòrfics. Aquesta concepció ha de sotmetre's, però, a revisió. En primer lloc, és conegut de fa temps que alguns elements del patró es formen dins del regenerant i no a partir del blastema, cosa que implica un cert comportament morfolàctic. En segon lloc, estudis recents (Saló i Baguñà, 1984a) mostren que, malgrat créixer contínuament, el blastema no presenta activitat mitòtica, fet insòlit des d'un prisma epimòrfic. Finalment, hi ha dades que assenyalen que els organismes irradiats, que no presenten proliferació, formen un petit blastema del que deriva un patró correcte d'estructures, si bé a menor escala (Chandebois, 1976; Saló, 1984). Tot aixó fa suposar que la formació del patró d'estructures durant la regeneració a planàries, malgrat la presència de blastema, seria independent de la grandària d'aquest, és a dir, seria de tipus morfolàctic. Consideracions semblants han estat fetes per a d'altres sistemes, abans considerats com a purament epimòrfics, com l'extremitat d'Amfibis (Maden, 1981) i les extremitats d'Insectes (Truby, 1983). D'ací és suggereix cada cop amb més insistència que als sistemes epimòrfics el patró es formaria inicialment per morfolaxi en un petit territori (blastema o regenerant) prop de la ferida per a ésser després amplificat per proliferació.

Un aspecte clau en aquesta discussió és saber quan es determina el patró d'estructures durant la regeneració, és a dir, saber en quin moment d'aquest procés els territoris que donaran lloc a les diferents estructures queden ja definitivament determinats. D'altra banda, és molt important saber si aquest fet depèn de la presència prèvia d'una quantitat determinada de nou teixit (blastema) o no; és a dir, saber si hi ha formació del patró dependent o no de la grandària del blastema.

Per a respondre aquestes qüestions s'han fet dos tipus d'experiments. El primer és mesurar, pel conegut test d'inhibició de la regeneració cefàlica deguda a la presència d'un nou cap empeltat prop del cap original (Ansevin,

1969), quin és el temps de determinació de dues estructures clau en la regeneració anterior: cap i faringe. El segon tipus d'experiment tracta de mesurar quantitativament la formació o no del patró en organismes irradiats que no presenten proliferació, i que formen sols un blastema molt petit.

Els resultats d'aquests experiments mostren que la determinació d'estructures és un fenomen molt precoç que es dona quan a penes hi ha blastema, i que la diferenciació d'estructures és independent de la grandària del blastema. Ambdós resultats abonen la idea que la regeneració a planàries, és, almenys en les primeres etapes, de tipus morfolàctic.

Material i Mètodes

1) Mesura del temps de determinació d'estructures cefàliques

Des de els estudis inicials de transplantaments cefàlics heteròlegs a planàries, és sabut que l'implantació de la regió cefàlica d'un donador prop de la regió cefàlica d'un hoste impedeix la regeneració d'aquesta quan és seccionada (Veure Brønsted, 1969, per a referències generals). Aixó s'ha interpretat en el sentit que el cap empeltat emet algú inhibidor (substància) o propietat inhibidora difusible que impedeix la formació d'un nou cap per part de l'hoste quan aquest és tallat. Tenint en compte aquesta propietat, s'ha pogut mesurar la velocitat de difusió del senyal o propietat inhibidora. Els valors obtinguts per a *Dugesia(G)tigrina* són aproximadament de 100 $\mu\text{m}/\text{h}$. a 17°C i de 300 $\mu\text{m}/\text{hora}$ a 24°C (Saló, 1984).

El càlcul previ de la velocitat de difusió del senyal permet al seu torn calcular el temps de determinació d'un nou cap. Per a fer-ho seguim el procediment experimental de la Figura 1, en el que s'empelta un cap a un hoste a diferents temps: abans (-12 hores), o després (0, 4, 6, 9, 12 i 24 hores) de tallar el cap de l'hoste. La distància entre empelt i nivell de tall es manté constant ($\approx 1.4\text{mm}$) per tal de fer més homogenis els resultats.

Tenint en compte que la senyal inhibidora trigarà unes 14 hores a 17°C i unes 5 hores a 24°C en transcorrer la distància entre empelt i ferida (temps t_1), i tenint en compte l'interval de temps entre el moment de l'empelt i el moment del tall (temps t_2), es pot quantificar el temps de determinació (T_d) com a : $T_d = t_1 + t_2$, quan un 50% de hostes presentin inhibició cefàlica (determinació reversible o làbil), o quan no presentin inhibició (determinació irreversible). Tenint en compte que a una determinada temperatura, t_1 és constant, és d'esperar que l'augment de t_2 impedirà progressivament l'inhibició cefàlica de l'hoste per part de l'empelt.

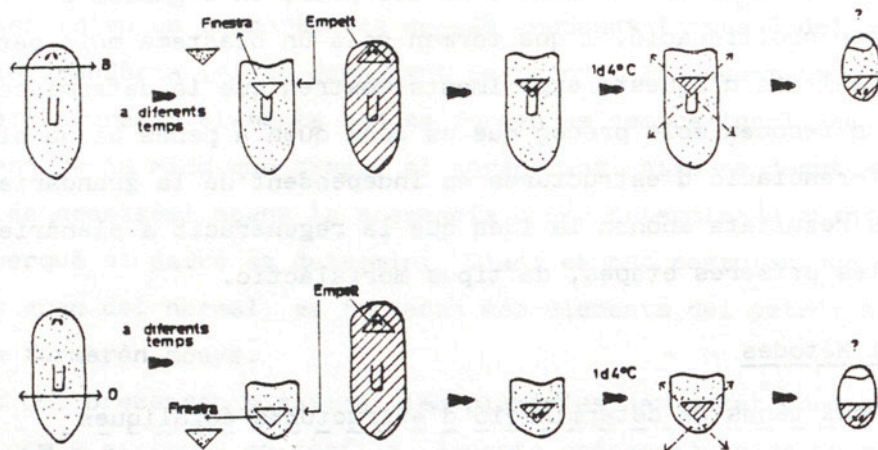


Figura 1. Esquema de la metodologia emprada per a mesurar el temps de determinació d'estructures cefàliques a nivells B i D, mitjançant l'introducció d'un empelt cefàlic a diferents temps de regeneració de l'hoste.

2) Mesura del temps de determinació de la faringe.

El criteri emprat per a mesurar la determinació de la faringe va ésser el temps que té que estar un empelt cefàlic en contacte amb l'hoste regenerant per alterar la posició de la faringe respecte a un control (determinació inicial o làbil) o per inhibir la seva formació (determinació irreversible) (Ansevin, 1969).

Per assolir això es va emprar l'esquema representat a la Figura 2 en la que s'introdueix un cap en polaritat invertida a la regió postfaríngea de un hoste que ha estat tallat just abans. La distància empelt-tall es manté a uns 2mm. A diferents temps després d'empeltar (12 hores, 1, 2, 3, 5 i 7 dies) es treu el cap empeltat i es deixa regenerar l'hoste, observant-se al cap d'uns dies la presència/absència i el posicionament de la faringe respecte a un control sense empelt.

Considerem com a temps de determinació de la faringe el període que va des de que s'observen alteracions en el seu posicionament fins al moment en que queda totalment inhibida.

3) Efecte dels raigs X sobre la determinació i diferenciació del patró.

Dubois (1949) i Chandebois (1976, per a referències generals) foren uns dels primers a observar que els organismes irradiats, pesi a no presentar proliferació cel.lular, formaven un blastema que a la llarga regredia. La

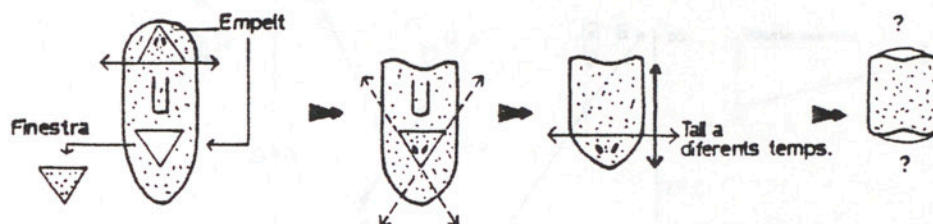


Figura 2. Esquema de la metodologia emprada per a mesurar l'efecte d'un cap empeltat durant diferents períodes de temps sobre el posicionament i línhibició de la faringe de l'hoste.

grandària del blastema semblava ésser inversament proporcional al temps escolat entre l'irradiació i el tall; és a dir, era més petit com més gran era aquest interval.

Per tal de comprovar quantitativament aquestes observacions i per a seguir amb més detall la dinàmica de formació del blastema i la diferenciació d'estructures en organismes irradiats, es varen irradiar planàries amb 8000 rads (1000 rads/min) emprant un aparell Philips HT-100 (100Kv, 8mA, amb filtre d'alumini de 1.7mm de gruix. Distància d'irradiació: 10cm) del Departament de Dermatologia de l'Hospital Clínic i Provincial de Barcelona.

Els organismes irradiats eren tallats postfaríngement a 0, 1, 2, 3, 6, 7 i 9 dies després de l'irradiació, i es mesurà el nombre total (N) de cèl.lules del blastema emprant la tècnica de maceració descrita per Baguñà i Romero (1981). Per altra banda, es mesurà seguint idèntic procediment el percentatge de cèl.lules diferenciades en blastemes de 3, 6, 10, 14 i 21 dies d'organismes control (no irradiats) i d'organismes irradiats tallats a 0 i 3 dies després de l'irradiació.

Resultats

1) Temps de determinació d'estructures cefàliques

Seguint el mètode exposat a la Figura 1 es mesurà el temps de determinació de regions cefàliques per a dos nivells al llarg de l'eix cefàlic-caudal (B: pre-faringi; D: post-faringi), i a dos temperatures de cultiu: 17°i 24°C.

La Figura 3 mostra el percentatge d'inhibició cefàlica obtingut per a diferents temps en que es realitza l'unió hoste-empelt. Tenint en compte (vegeu Mètodes, 1) que el senyal inhibidor triga unes 14 hores a 17°C i 5 hores a 24°C en travessar la distància empelt-ferida, el fet que a 17°C i a 0 hores dongui un 50% d'inhibició i a 12 hores un 0% (no inhibició) significa

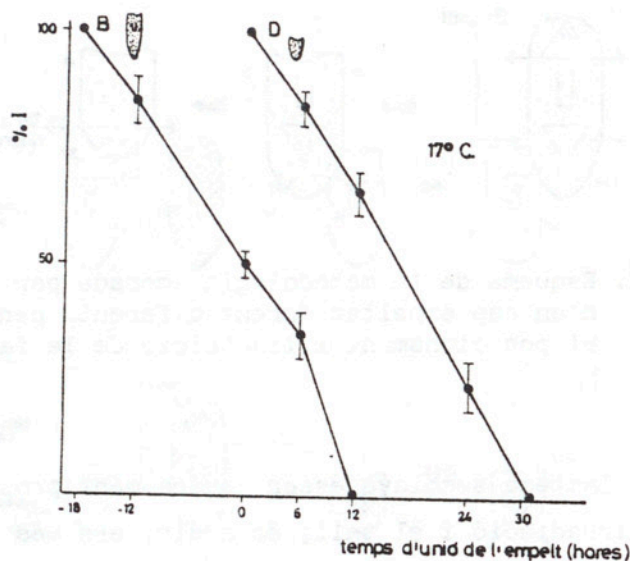


Figura 3. Percentatge d'inhibicions cefàliques en hostes tallats a nivell B o D degut a l'implantació d'un cap abans o després del tall. Ordinada: percentatge d'inhibició cefàlica; Abscissa: temps (en hores) en que es realitzà l'empelt abans de tallar.

que la determinació d'estructures cefàliques s'acut entre les 12 i les 24 hores de regeneració a 17°C. Càlculs semblants per al nivell D (post-farínge) dona valors entre 32 i 44 hores, lo que indica la presència d'un gradient axial de determinació en sentit cefàlic-caudal, gradient ja demostrat per a d'altres paràmetres (Saló, 1978).

El mateix tipus d'experiments realitzats a 24°C dona valors per a B i D de entre 3-5 hores i 10-19 hores respectivament.

En conjunt, aquestes dades mostren amb claredat que la determinació d'estructures cefàliques és molt precoç, succeint dins de les primeres 24 hores quan el blastema és pràcticament inexistent.

2) Temps de determinació d'estructures faríngees

Els resultats de les Figures 4 i 5 mostren que a les 12 hores existeix ja un desplaçament significatiu de la faringe cap a posicions més anteriors. Tenint en compte que la faringe es forma dins del regenerant en una posició quelcom més posterior al blastema cefàlic, i tenint en compte que el senyal inhibitor procedent de l'empelt trigarà unes 10-12 hores a 17°C en travessar l'espai entre empelt i zona faríngea, això indica que la determinació s'iniciaria dins d'aquest període essent doncs també molt precoç. És interessant assenyalar que junt al desplaçament de la faringe s'observa un 50% de casos en que hi ha inhibició cefàlica.

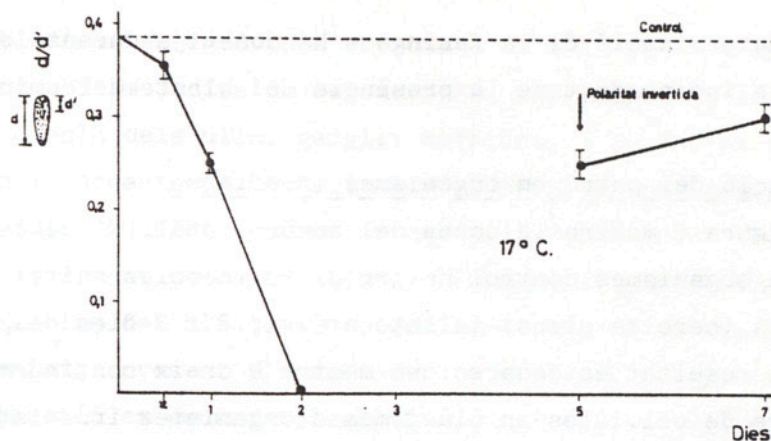


Figura 4. Quantificació del posicionament de la faringe regenerada en hostes inhibits per un empelt cefàlic que es manté en contacte amb l'hoste per a diferents intervals de temps. Ordinada: posició relativa de la faringe regenerada; Abscissa: interval de temps en que s'ha mantingut l'unió hoste-empelt. Traç discontinu: posició relativa de la faringe en un control regenerant a 17°C.

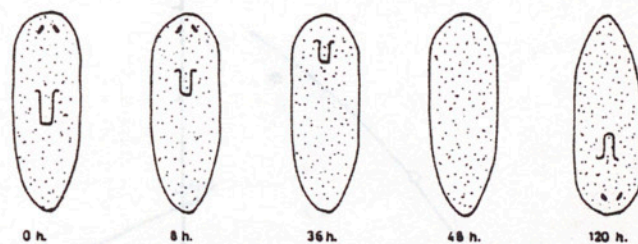


Figura 5. Esquema del diferent posicionament, inhibició i inducció amb polaritat invertida de faringes d'hostes regenerant en presència d'un cap que es manté unit a l'hoste per a diferents intervals de temps.

Per altra banda, als 2 dies de contacte entre empelt i l'hoste, la faringe ja no es forma i la regió cefàlica tampoc, apareixent una planària acèfala i afaríngia. Si el contacte arriba o supera els 5 dies, es dona una inversió completa del regenerant amb aparició d'una faringe amb polaritat invertida (Figura 5).

D'ací es pot deduir que la determinació de la regió faríngia es tanmateix molt precoç, abastant des de les 10-12 hores a les 48 hores de regeneració per a organismes a 17°C i entre 6 i 24 hores per a organismes regenerant a 24°C.

Una prova adicional (resultats no presentats en aquest treball) de que la determinació faríngia es molt inicial prové d'experiments en que es talla repetidament la regió anterior de segments postfaringis normals. A 17°C el tall continuat de la regió de la ferida cada 24 hores impedeix la formació del cap però no impedeix que la faringe es formi en idèntica posició i a idèntic moment respecte a un control sense tallar. Això indica clarament

que la determinació de la faringe s'ha donat ja durant les primeres 24 hores essent ja independent de la presència del blastema terminal.

3) Formació del patró en organismes irradiats

La Figura 6 mostra la corba del nombre total (N) de cèl.lules del blastema per a organismes control no irradiats (cercles buits) i per a organismes irradiats (cercles plens) tallats a 0, 1, 2 i 3 dies després de l'irradiació. Del resultat es desprèn que mentre N creix continuament per als controls, el nombre de cèl.lules en blastemes d'organismes irradiats és molt inferior, essent tan més petit com més temps s'escola entre irradiació i tall. Per altre banda, als irradiats hi ha un màxim de cèl.lules als 3 dies de regeneració, nombre que decreix des d'aleshores fins a desaparèixer cap als 10-15 dies després d'un llarg període de necrosi i lisi cel.lular.

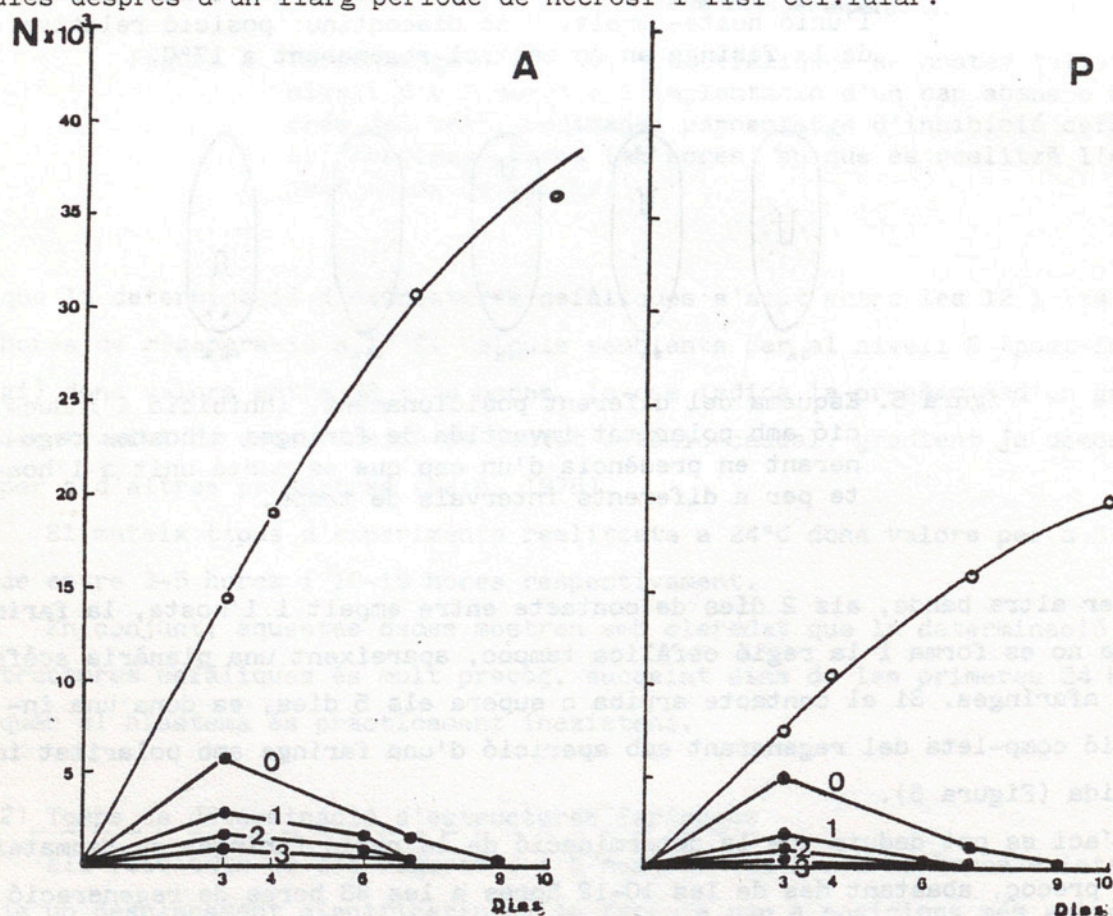


Figura 6. Corbes de creixement del blastema anterior (A) i posterior (P) de individus no irradiats (cercles buits) i irradiats (cercles plens) tallats als 0,1,2 i 3 dies de l'irradiació (8000 rads). Ordinada: nombre total ($N \times 10^3$) de cèl.lules del blastema; Abscissa: temps de regeneració (en dies).

Malgrat que el blastema en individus irradiats és molt petit d'inici, i menor encare a partir dels 3 dies de regeneració, els individus irradiats mostren la diferenciació dels ulls, ganglis cefàlics, i aurícules a temps molt similars al dels organismes control. Això indica, d'una banda, que la diferenciació cel.lular i d'estructures no queda afectada per l'irradiació. Aquest fet queda palesament demostrat quan es compara el percentatge de cèl.lules diferenciades dins del blastema d'organismes control no irradiats (Figura 7) i el percentatge present al blastema d'organismes irradiats (Figura 8). D'aquesta comparació es dedueix clarament que la taxa d'increment del percentatge de cèl.lules diferenciades en ambdós tipus d'organismes és molt semblant, el que fa pensar en ritmes de diferenciació semblants. Aquest fenomen està força d'acord, i es paral.lel, al fet que el "tempo" d'aparició dels ulls, ganglis cefàlics i aurícules sigui semblant en ambdós grups si bé el blastema dels irradiats als 7-8 dies sigui equivalent al blastema de 1½ dies de un control no irradiat.

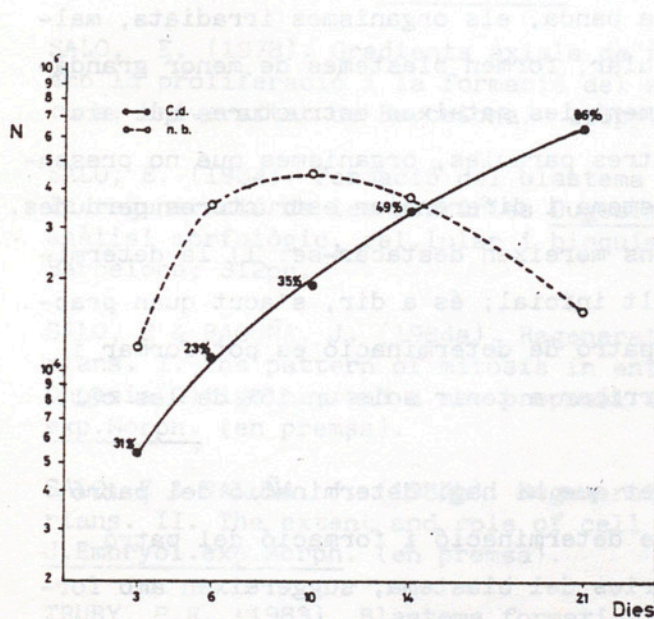


Figura 7. Percentatge dels diferents tipus cel·lulars (neoblasts (o); i cèl·lules diferenciades (●) en blastemes d'individus control no irradiats. Ordinada: nombre de cèl·lules; Abscissa: temps de regeneració.

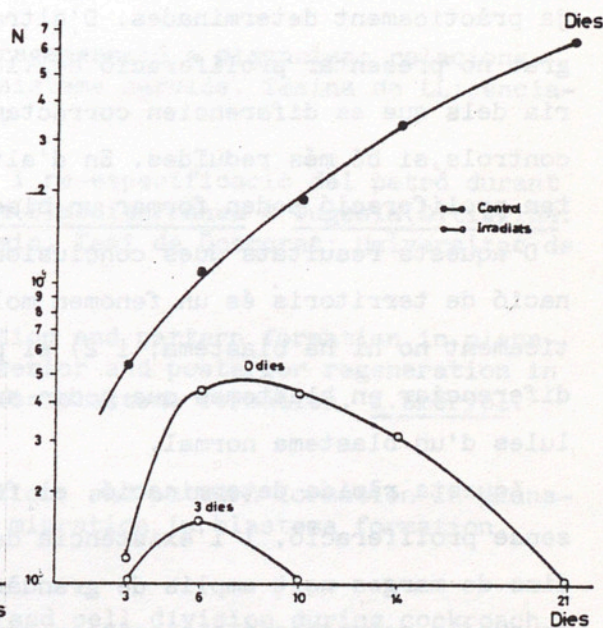


Figura 8. Nombre (N) de cèl·lules diferenciades en blastemes d'individus control no irradiats (●), i en blastemes d'individus irradiats (o) tallats a 0 i 3 dies després de l'irradiació. Ordinada: nombre de cèl·lules; Abscissa: temps de regeneració (en dies).

Aquest darrer fet ens duu a una conseqüència molt interessant: la diferenciació d'estructures és independent de la mida del blastema, essent possible a partir d'un nombre molt reduït de cèl.lules. Es pot calcular aproximadament que el blastema d'organismes irradiats en el que té lloc la determinació i diferenciació d'estructures semblants, si bé a menor escala, que les del control, pot tenir sols el 13% de les cèl.lules d'un blastema control.

Discussió

El blastema a planàries es forma per un procés epimorfic de migració i acumulació de cèl.lules indiferenciades prop de la ferida (Saló i Baguñà, 1984 a,b). A un dia de regeneració, el blastema però es tot just una petita zona de cèl.lules indiferenciades que s'insinúa damunt del nivell del tall.

Malgrat que a 1 dia de regeneració el blastema és encare extremadament petit, els resultats obtinguts sobre determinació de regions cefàliques i faríngees mostren que entre les 5 i les 24 hores ambdues estructures estarien ja pràcticament determinades. D'altra banda, els organismes irradiats, malgrat no presentar proliferació cel.lular, formen blastemes de menor grandària dels que es diferencien correctament les mateixes estructures que als controls, si bé més reduïdes. En d'altres paraules, organismes que no presenten proliferació poden formar un blastema i diferenciar estructures perdudes.

D'aquests resultats dues conclusions mereixen destacar-se: 1) la determinació de territoris és un fenomen molt inicial; és a dir, s'acut quan pràcticament no hi ha blastema; i 2) el patró de determinació es pot formar i diferenciar en blastemes que poden arribar a tenir sols un 13% de les cèl.lules d'un blastema normal.

Aquesta ràpida determinació, el fet que hi hagi determinació del patró sense proliferació, i l'existència de determinació i formació del patró dins de marges molt amplis de grandàries del blastema, suggereixen amb força que la regeneració a planàries seria inicialment de tipus morfolàctic donant lloc a un patró d'estructures que després seria amplificat per proliferació en la fase ja epimòrfica de la regeneració.

Conclusions relativament semblants han estat formulades recentment per Maden (1981) als Amfibis i per Truby (1983) als Insectes, tot suggerint que els sistemes abans qualificats de "purament" epimorfics tindrien una primera fase morfolàctica de determinació del patró; patró que seria amplificat posteriorment per proliferació.

Bibliografia

- ANSEVIN, K.D. (1969). The influence of a head graft on regeneration of the isolated postpharyngeal body section of Dugesia tigrina. J.Exp.Zool. 171, 235-248
- BAGUÑA, J & ROMERO, R. (1981). Quantitative analysis of cell types during growth, degrowth, and regeneration in the planarians Dugesia mediterranea and Dugesia tigrina. Hidrobiologia 84,181-194.
- BRØNSTED, H.V. (1969). Planarian Regeneration. Pergamon Press Ltd (London).
- CHANDEBOIS, R. (1976). Histogenesis and Morphogenesis in Planarian Regeneration. S.Karger (Basel).
- DUBOIS, F. (1949). Contribution a l'etude de la régénération chez les planaires dulcicoles. Bull.Biol., 83,213-283.
- MADEN, M. (1981). Morphallaxis in an epimorphic system: size, growth control and pattern formation during amphibian limb regeneration. J.Embryol. exp.Morph. 65(suppl),89-101.
- MORGAN, T.H. (1901). Regeneration. MacMillan ed.
- SALO, E. (1978). Gradients axials de regeneració a planàries: relacions amb la proliferació i la formació del sistema nerviós. Tesina de LLicenciatura; Universitat de Barcelona. 111pp.
- SALO, 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 de Doctorat; Universitat de Barcelona; 312pp.
- SALO, 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.Morph. (en premsa).
- SALO, E & BAGUÑA, J. (1984b). Regeneration and pattern formation in planarians. II. The extent and role of cell migration in blastema formation. J.Embryol.exp.Morph. (en premsa).
- TRUBY, P.R. (1983). Blastema formation and cell division during cockroach limb regeneration. J.Embryol.exp.Morph. 75,151-164.