

Efecte de barreres permeables i impermeables en la inducció d'estructures supernumeràries a planàries.

M. Ribas, E. Saló i J. Baguñà

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

Abstract

Induction of supernumerary structures in planarians after barrier insertions

How pattern is formed and maintained along the Antero-Posterior (A-P) axis during planarian regeneration is still an unsolved problem. Up to now four main models have been put forward to explain it: 1) the existence of A-P polarized structures; 2) decreasing gradients of morphogens along the A-P axis giving positional information; 3) mechanisms of cell-cell interaction which "heal" discontinuities and keep the continuum of positional values; and 4) the sequential induction of proximo-distal positional values from regions near the wound.

One way of testing these models is to cut-off the continuity of the A-P axis with permeable and impermeable barriers, and see the percentage and types of duplicated (supernumerary) structures formed. To do that, planarians were embedded in agar and barriers of tungsten foil and 0.22 μ m millipore filters introduced dorso-ventrally in the pre-pharyngeal area.

The results obtained are assessed in terms of the models proposed; and it is tentatively concluded that epithelio-mesenchymal interactions is probably at the base of mechanisms of pattern formation and maintenance.

Introducció

Com es genera i manté el patró d'estructures al llarg dels eixos ortogonals de planàries durant la regeneració és un problema encara no resolt. Per a la regeneració terminal (cefàlica o caudal), s'han proposat diferents hipòtesis o models: 1) els basats en un substrat o suport estructural polaritzat, com podria ésser el Sistema Nerviós o algun tipus de polarització desconeguda a nivell de cèl.lules o grups de cèl.lules; 2) els basats en l'existència de gradients metabòlics (Child, 1911) o de substàncies (morfògens) de diferent tipus (inhibidors cefàlics, Wolff, 1962; gradients dinàmics de reacció-difusió, Meinhardt, 1982) que decreixen al llarg de l'eix Anterior-Posterior (A-P) i que actuarien bé inhibint a les regions veïnes, bé sumministrant informació posicional; 3) els que suposen l'existència d'estats, caràcters, o valors intrínsecs diferents, no difusibles, al llarg dels eixos ortogonals; i 4) els que postulen que hi han programes autònoms que generen la seqüència d'estats o territoris que manquen a partir de l'estat veí més proper (Meinhardt, 1982; Slack, 1982).

Deixant a part el primer model, ja que no sembla del tot factible, el segon tipus de models suposaria que la regeneració es deu bàsicament a l'absència temporal dels inhibidors produïts en un extrem de l'eix A-P (generalment el cap), permetent així que les regions veïnes (post-cefàliques o pre-caudals) donin

lloc a aquelles (cap o cua). D'acord al tercer model, la regeneració (terminal i intercalar) es deuria a la confrontació de territoris amb valors posicionals diferents que induirien la proliferació cel.lular i "l'ompliment" dels territoris que manquen. En el cas concret de la regeneració terminal, s'ha proposat (Maden, 1977; Chandebois, 1980; Saló, 1984) que l'epidermis de cicatrització presentaria els valors posicionals extrems, i la regeneració (cefàlica o caudal) seria deguda a l'intercalació de valors A-P entre l'epidermis (valor extrem) i el valor posicional A-P del parènquima de la zona del tall. Finalment, el darrer tipus de model suggereix que la regeneració seria un procés seqüencial proximo-distal en què les cèl.lules prop de la ferida representarien el valor existent més proximal a partir del qual es generen en seqüència les estructures més distals.

Una de les maneres de comprovar la validesa i l'ajust d'aquests models és tractar d'interrompre un dels eixos ortogonals (generalment l'eix A-P) per medi de barreres permeables i/o impermeables. Si el model de gradients fos el correcte i si la barrera fos impermeable, hauríem d'esperar l'aparició d'estructures supernumeràries (duplicades) en la regió posterior de la barrera, mentre que si aquesta fos permeable no s'hauria de duplicar res. Si la regeneració fos deguda a l'intercalació de valors entre epidermis i mesènquima (tercer model) esperaríem duplicació d'estructures a banda i banda de la barrera, tant permeable com impermeable, sempre i quan hi hagués cicatrització. Finalment, si la regeneració fos un fenomen autònom, l'aïllament provocat per la barrera (tant permeable com impermeable) hauria de dur a la formació de duplicacions a banda i banda d'aquesta.

Per assolir això hem posat a punt una tècnica d'englobament de planàries en ió-agar que permet mantenir-les immobilitzades per temps força raonables. L'implantació de barreres, fins aleshores impracticable, és ara de fàcil execució. Els resultats obtinguts s'han contrastat amb el que caldria esperar en cada un dels models exposats. D'ells es dedueix tentativament, que són el tercer tipus de models, els de intercalació epidermis-mesènquima, el més ajustats als resultats.

Material i Mètodes

- Ió-agar nº2 Oxoid (punt de gelificació 38-39°C)
- Sulfat de nicotina (Sigma nº 4.001)
- Filtres Millipore de 0.22 µm de porus.
- Fulls de tungstè (Koch-Light)
- Planàries Dugesia(G)tigrina 7 dies de dejuni, mantingudes 24h en solució sa línia estèril que conté 5 µgr/ml de sulfat de kanamicina.

Englobació amb iò-agar

S'anestesien planàries en solució de sulfat de nicotina al 0.01% durant 15' a temperatura ambient;

Es prepara una solució d'iò-agar al 3% diluït amb solució salina esteril;

Es deixen les planàries a englobar, en una càpsula de Petri sobre glaç i tot seguit es decanta la solució d'iò-agar a una temperatura \approx 40-41°C. Amb un pinzell es col.loquen les planàries en posició com més plana millor;

Un cop l'iò-agar s'ha solidificat es talla en petits blocs cada un dels quals inclou una planària.

Introducció de barreres

Es col.loca el bloc d'iò-agar amb la planària englobada en una càpsula de Petri sobre el glaç;

Amb pinces de precisió s'agafa un full de tungsté de \approx 0.5mm d'amplada o un filtre Millipore de la mateixa amplada, i s'introdueix amb molta cura a través de l'iò-agar i la planària;

Els blocs es deixen en solució estèril amb antibiòtic durant 3 dies a 17°C.

Estudi histològic de la ferida

Al cap de 3 dies a 17°C, es treuen amb cura les barreres;

Es desengloben les planàries;

Es maten amb ClH 1N;

Fixació (solució fixadora: glutaraldehyd, Merck, al 3% amb tampó cacodilat, Sigma, 0.1 M pH= 7.4), durant 4h a 4°C;

Es renta x3 amb tampó cacodilat a 4°C;

Deshidratació amb la serie d'alcohols a temperatura ambient;

Inclusió amb parafina (Merck, punt de fusió 51-53°C);

Es fan talls sagitals de 5 μ m de gruix;

Es tenyeix amb hematoxilina-eosina.

Resultats

Freqüència d'inducció d'estructures supernumeràries

Les planàries englobades i punxades amb fulls de tungsté i filtres Millipore a nivell pre-faringi es desengloben de l'iò-agar i es deixen en solució salina durant 12-15 dies a 17°C.

En la taula següent es pot veure que tant els fulls de tungsté com els filtres Millipore indueixen estructures supernumeràries. Encara que el nombre d'organismes estudiats no és molt elevat, podem veure que la inducció es dona aproximadament en una freqüència del 35%.

Les estructures duplicades observades han sigut: ulls (Fig. 1); faringe (Fig. 2); i excrescències dorsals, que posteriorment es diferencien a cap, o ventrals que romanen indiferenciades (cua).

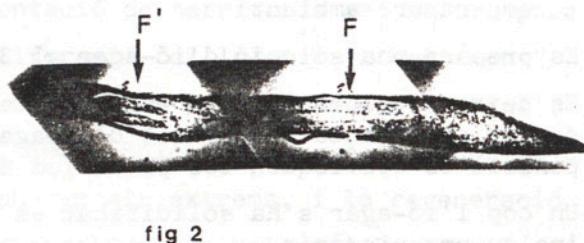
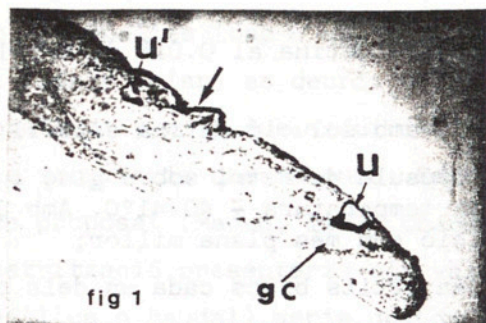


Figura 1. Tall histològic on es pot apreciar perfectament l'ull induït (u') per la introducció d'una barrera artificial (sageta gruixuda), darrera de l'ull inicial (u); gc: gangli cefàlic.

Figura 2. Tall histològic on s'observa l'aparició d'una faringe suplementària (F'); F: faringe inicial.

	n	normal	duplicat	estructura duplicada
Full	28	19	9 (32.1%)	cap (4) ulls (3) cua (2)
Filtre	10	6	4 (40%)	cap (2) ulls (2) faringe (1)

Taula I. Nombre d'organismes estudiats i freqüència i tipus d'estructures duplicades, per introducció de barreres artificials.

Estudi histològic de la ferida provocada per les barreres

Per tal de veure l'estat de la ferida i més concretament l'epidermis a nivell de la ferida, algunes planàries han estat fixades i tallades sagitalment en el moment de treure'ls la barrera i desenglobar-les. En aquest moment, presenten externament una ferida més o menys circular al voltant de la qual es troba una acumulació de pigment.

En els talls observats, alguns organismes a nivell de la ferida presenten l'epidermis trencada sense que s'hagi produït cap mena de cicatrització (Fig. 3). En altres es pot observar en alguns talls, cicatrització de la regió anterior (Fig. 4), posterior, o les dues alhora (Fig. 5). Ara bé, la cicatrització no ha estat mai completa a nivell de tota la ferida.



Fig. 3



Fig. 4



Fig. 5

Figures 3,4 i 5. Diferents estats de l'epidermis cicatritcial a nivell de la ferida. Fig.3 sense cicatrització; Fig.4 amb cicatrització de la regió anterior; Fig.5 amb cicatrització de les dues regions. (x 126)
A: regió anterior; P: regió posterior; V: ventral; D: dorsal; cn: cordó nervios.

Discussió

L'examen dels models sobre formació i manteniment del patró proposats a la Introducció, i els resultats assolits emprant barreres artificials, suggereixen que el model que els explica més coherentment, és el d'interacció cel·lular, i més concretament, el d'interacció epiteli-parènquima, inicialment proposat per Maden (1977) a Amfibis, i més tard, amb modificacions, per Chandebois (1980) i Saló (1984) a planàries.

Així, si suposéssim que determinades estructures polaritzades (particularment el Sistema Nerviós) fossin les responsables del manteniment del patró, esperariem que el lloc concret on s'inserta la barrera, tingués una clara influència en els resultats. Observacions histològiques que permeten observar si els cordons nerviosos han estat o no seccionats, no demostren que això sigui particularment decisiu.

Per altra banda, si els gradients de substàncies (morfògens), bé de caire inhibitor (Wolff, 1962), bé com a determinants d'informació posicional (Meinhardt, 1982), en fossin els responsables, caldria esperar que es formessin estructures supernumeràries en la cara posterior a la barrera en gaire bé un 100% de casos si la barrera fos impermeable, i en cap cas si fos permeable. Els resultats assolits mostren un percentatge de casos positius molt inferior

al 100%, i molt semblant en un i altre tipus de barrera. Aixó contradiu clarament allò que hom esperaria si fossin els gradients els responsables del manteniment del patró.

Finalment, si suposéssim que la re-formació del patró fos deguda a la gènesi, en seqüència proximo-distal dels territoris que manquen, a partir del territori més proximal prop de la ferida, esperaríem que la implanatació de les barreres dugués, en ambdós casos (permeables i impermeables), a un 100% de duplicacions en ambdues cares de la barrera. Els resultats obtinguts contradiuen també clarament aquestes expectatives.

Resta, doncs, com a darrer model dels esmentats a la Introducció, el basat en interaccions cel·lulars, i més particularment, en interaccions entre l'epiteli de cicatrització i les cèl·lules del paremquima. En aquest cas, esperaríem que el percentatge de casos positius depengués del percentatge de casos en què hi ha hagut un bon recobriment cicatricial a banda i banda de la barrera. Per altra banda, caldria esperar també que el percentatge fos en principi semblant tant per barreres permeables com impermeables.

Els resultats trobats mostren en primer lloc que el percentatge de duplicacions assolit en ambdós tipus de barreres és molt semblant, la qual cosa està d'acord, en principi, amb allò que esperaríem del model. Ara bé, el percentatge de casos positius queda força lluny del 100% que, en principi, caldria suposar. Davant d'aixó, hi ha dues sortides: 1) els resultats han d'explicar-se per altres mecanismes, encara desconeguts o no considerats en aquest treball; i 2) els casos positius serien aquells en què hi ha hagut bona cicatrització, mentre que els negatius serien aquells en què aquesta no s'ha donat o ha restat incompleta.

Per tal de confirmar aquesta segona interpretació es va realitzar l'estudi histològic esmentat als Resultats, i mostrat en part a les Figures 3,4 i 5. D'ells es desprèn que el nombre de casos en què aparentment no hi ha cicatrització és força elevat; i que quan aquesta és present, molt rarament hi ha cicatrització doble, i més correntment, cicatritzacions simples, bé anteriors, bè posteriors. I. si bé el nombre de casos estudiats no és encara estadísticament significatiu, el fet que el percentatge de casos en què hi ha cicatrització sigui relativament semblant al percentatge de casos en què es presenten estructures supernumeràries, fa pensar que, efectivament, la interacció epitel·li de cicatrització- cèl·lules del parènquima jugaria un paper clau en la gènesi i manteniment del patró.

Una darrera qüestió d'interès que cal plantejar és perquè el percentatge de cicatritzacions en organismes amb barreres és inferior al 100% que, en principi, caldria esperar, mentre que en els exemples de regeneració terminal

clàssica, el percentatge és sempre del 100%. Una possible raó d'aixó podria raure en què en els casos d'inserció amb barreres hi hauria certs impediments de tipus mecànic per a una perfecta cicatrització. Així, mentre que en la regeneració terminal el recobriment epidèrmic està àmpliament afavorit per la contracció de la musculatura circular que escurça fins a una cinquena part la distància entre epidermis dorsal i ventral, en la cicatrització per implantació de barreres, aqueste distància és pràcticament idèntica a la de l'organisme normal, fet que en d'altres paraules implica una distància cinc vegades superior a la que ha de migrar l'epiteli en la regeneració terminal normal. Aixó impediria probablement que en un bon nombre de casos la cicatrització es portes a terme correctament, fet que queda corroborat per nombrosos exemples en què sagitalment s'observen regions amb cicatrització gairebé total al costat de regions amb cicatrització gairebé nul·la o molt incompleta.

Bibliografia

- CHANDEBOIS R. (1980) "II. Distalization". Develop., Growth and Differ. 22(4) 693-704.
- CHILD C.M. (1911). Experimental control of morphogenesis in the regulation of planaria. Biol. Bull. 20,309-331
- MADEN M. (1977). The regeneration of positional information in the amphibian limb. J. Theor. Biol. 69, 735-753.
- MEINHARDT H. (1982). Models of biological pattern formation. Academic Press Inc. (London) Ltd.
- 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 Doctoral, Universitat de Barcelona.
- SLACK J.W. (1982). Regeneration and the second anatomy of animals. A: Developmental order: Its origin and regulation. (Subtenly, S i Green P.B., eds.). Alan R. Liss Inc., New York pp 423-438.
- WOLFF E. (1962). Recent researches on the regeneration of planaria. In: Regeneration 20th Growth Symposium, The Ronald Press Co., pp. 53-84.