

La formació del patró durant la regeneració animal: cap a un model unitari?.

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

Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Diagonal 645, 08028 Barcelona.

Abstract

Pattern formation in animal regeneration: towards a unified general model?

Since Morgan (1901), animal regeneration has been understood under two main modalities: 1) morphallaxis, where pattern is restored in the old regenerant without cell proliferation, and 2) epimorphosis, where proliferation at the cut surface gives rise to a blastema which precedes the development of new parts. Moreover, morphallactic systems show size-independent pattern formation whereas epimorphosis is considered to be a size-dependent pattern formation mechanism.

However, recent data obtained in several systems (amphibian limbs, Maden, 1981; insect legs, Truby, 1983; insect imaginal discs, Adler, 1984; regenerating planarians, Saló and Baguñà, 1984) call for a revision of this rather artificial dichotomy. Thus, it is considered that most of the so-called "epimorphic systems" show too size-independent pattern formation, and that pattern is formed morphallactically (by re-specification of cells with little or no cell proliferation) during the early phases of regeneration, followed by a later epimorphic process of growth through cell proliferation.

What is needed now is to know how during the early phases of regeneration mesenchymal cells change positional values to conceal the discontinuities created by cutting. Although models based on activator-inhibitor diffusion gradients (Gierer and Meinhardt, 1972; Meinhardt, 1982) have been applied in the past to explain these phenomena, later results fit better with models of gradients of cell-cell adhesivity or gradients of concentration of membrane-bound elements, with epidermis playing the role of stop signal boundary. This focus attention on the importance of molecular studies of blastema cell surfaces for the future understanding of regeneration and morphogenesis.

Els models clàssics de formació de patró durant la regeneració

El problema central de la regeneració és com a partir del regenerant es reforma correctament el patró d'estructures perdut. D'ençà Morgan (1901), s'han proposat dos mecanismes principals, sovint excloents: 1) la morfàlaxi, en la qual les parts perdudes apareixen mitjançant la reorganització del regenerant, i en la que la proliferació i el creixement no són necessaris; i 2) l'epimorfosi, que duu a la formació d'una estructura transitòria damunt del regenerant (l'anomenat blastema de regeneració), a partir del qual s'origina el patró d'estructures que manca. En aquest darrer cas, la proliferació, i en conseqüència el creixement, semblen ésser imprescindibles.

Exemples de morfalaxi serien Hydra (Cummings i Bode, 1984), el fong mucós Dictyostelium (MacWilliams i Bonner, 1979), i el embrions de Xenopus (Cooke, 1973). En tots ells ha estat demostrada la reformació del patró, i fins i tot l'inversió de la polaritat axial (hidres), sense mitosi i sense síntesi d'ADN. Això implica que en aquests sistemes, una cèl.lula pot canviar el seu estat de desenvolupament sense ciclar ni replicar l'ADN. Per altra banda, la determinació de les noves estructures a formar és extremadament ràpida (3-6 hores després del tall a hidres) i independent també del cicle cel.lular i la síntesi d'ADN. Com a possibles models per a explicar aquesta gènesi tan ràpida del patró s'han postulat mecanismes d'activació-inhibició seguint els models cinètics de Meinhardt (1982) i McWilliams (1983) derivats de la idea de informació posicional de Wolpert (1969). Aquests models, si bé força explicatius, no han estat encare validats del tot, especialment a nivell molecular, i en alguns casos s'han mostrat contraris a certes dades experimentals.

L'epimorfosi es dona a la majoria d'organismes triblastics que poden regenerar (de Plathelminths amunt), essent els exemples més coneguts les planàries, els anèlids, els insectes i els amfibis. En aquests casos, s'accepta que el blastema de regeneració es forma per acumulació i posterior proliferació de cèl.lules indiferenciades damunt el plà d'amputació i un cop l'epidermis ha recobert la ferida. El blastema es considera una entitat autònoma i independent d'on surt el patró d'estructures perdut. Com a model general més acceptat (almenys fins ara) per a explicar la reformació del patró a sistemes epimorfics cal esmentar el model de coordenades polars (French et al, 1976; Bryant et al, 1981) que suposa que el blastema es forma i creix paulatinament per proliferació local de les cèl.lules prop de la ferida, determinant-se paulatinament el patró d'estructures dins del blastema seguint una seqüència proximo-distal.

Dificultats de la dicotomia clàssica morfalaxi/epimorfosi.

1) Morfalaxis a sistemes epimorfics.

Malgrat l'aspecte unitari del model epimorfic i l'èxit assolit pel model de coordenades polars, hi ha forces excepcions que relativitzen molt aquesta unitat. En primer lloc, hi ha exemples molt clars de morfalaxi a organismes triblastics. Així, el plathelminth rhabdocel Microstomum lineare regenera sense formar blastema (Palmberg i Reuter, 1984), mentre que a planàries part de les estructures a regenerar es formen dins del regenerant i el blastema, malgrat augmentar en nombre de cèl.lules, no presenta mai mitosi (Saló i Baguñà, 1984). Per altra banda, exemples considerats

com a clàssics de l'epimorfosi, com la regeneració d'extremitats als Insectes, presenten una primera fase morfallàctica clara (Truby, 1983), la qual cosa és clarament contrària al model de coordenades polars. A més, Adler (1984) ha demostrat en un altre model clàssic epimorfic, els discs imaginals de Drosophila, que la primera fase de regeneració pot considerar-se morfallàctica ja que poden haver-hi canvis ràpids de destí cel.lular que menen a la restauració dels valors posicionals dins d'una regió molt petita aprop de la ferida. A aquest procés, seguiria una fase de creixement epimorfic per proliferació dins d'aquesta zona, creixement provocat en part pel nou gradient posicional ara de pendent més acusada.

2) Regeneració "epimòrfica" sense divisió cel.lular.

Als sistemes morfalàctics, la manca de divisió cel.lular duu a que el patró es forma independentment de la grandària del regenerant; és a dir, sigui quina sigui la mida del regenerant, el patró complert es forma igual, si bé de mides diverses (formació del patró independent de la mida, o "size-independent pattern formation"). Per contra, els sistemes epimorfics han estat considerats com a sistemes on la formació del patró és dependent de la mida del regenerant ("size-dependent pattern formation"), és a dir, que el patró sols es determinarà quan el blastema assoleixi una certa mida.

Anàlisi acurats a nivell morfològic i cel.lular als Amfibis (Maden, 1981), han demostrat contràriament un comportament típic de independència de la mida per a formar un patró. D'altra banda, la implantació ectòpica de blastemes denervats (de mida força més petita que blastemes control) duen a la formació de patrons complerts si bé en miniatura (Maden, 1981; Stocum, 1984). D'ací es podria deduir que seria fins i tot possible aconseguir regeneració amb formació del patró complert sense divisió cel.lular als sistemes epimorfics. Si així fos, aquests sistemes serien formalment homòlegs als sistemes morfalàctics.

Que això és així ha estat demostrat als discs imaginals de Drosophila per Adler (1984) al observar que un % notable de cèl.lules aprop de la ferida reespecifiquen el seu valor posicional sense replicació de l'ADN i divisió cel.lular. A planàries d'altra banda, Saló i Baguñà (1984) han demostrat que els individus irradiats (raigs X; 8000 rads), tot i no presentar mitosi, formen un blastema molt més petit que els normals del que deriva un patró complert en miniatura.

De tot això es pot suggerir que els sistemes epimorfics presenten, almenys inicialment, un comportament independent de la mida del regenerant

per a formar el patró d'estructures, la qual cosa implica una determinació molt inicial del patró (probablement de tipus morfolàctic, és a dir, sense necessitat de divisió cel.lular) seguida d'un procés epimorfic d'amplificació per proliferació cel.lular.

3) Quan es determinen les estructures?

En referència als sistemes morfolàctics (per ex. hidres) hem esmentat que la determinació es fa extremadament depressa i independentment de la replicació de l'ADN i de la divisió cel.lular. Què passa en els sistemes epimorfics?.

Si d'acord a lo esmentat a l'anterior apartat, els sistemes epimorfics tenen inicialment un comportament morfolàctic, hauriem d'esperar certament una determinació ràpida de les estructures. A planàries, diferents resultats obtinguts així ho confirmen. La determinació de la regió cefàlica i la regió faríngea succeeix de les 3 a 12 hores per la primera i de les 6 a les 24 hores de regeneració per a la segona quan el blastema es inexistent o just formant-se (Saló, 1984; Saló i Baguñà, 1984). A més, organismes irradiats (sense divisió cel.lular) tenen temps de determinació semblants (Saló, resultats no publicats). El mateix podem dir dels discs imaginals d'Insectes on la determinació s'acut durant les primeres 24 hores de regeneració, i fins i tot en absència de síntesi d'ADN i divisió cel.lular. En sistemes adults més complexos, com són les extremitats d'Insectes i d'Amfibis, les dades són més difícils d'assolir, si bé a Periplaneta Truby (1983) ha demostrat que el blastema de regeneració es determina al llarg dels dos primers dies de regeneració a partir de l'epidermis distal del regenerant i quan la divisió cel.lular no ha assolit de lluny els valors màxims.

El conjunt d'aquestes dades abona l'idea que la determinació inicial del patró és, semblantment als models morfolàctics, extremadament ràpida en els sistemes epimorfics.

4) Què és un blastema de regeneració?. Quins són els seus límits?.

Als sistemes epimorfics, el blastema de regeneració ha estat considerat com l'estructura que es forma distalment al plà d'amputació. Això ha estat assumit de temps en tots els sistemes i apoiat en tots els models (especialment en el model de coordenades polars). La qüestió que cal plantejar-se és fins a quin punt això és cert o no.

Estudis recents de Truby (1983) a Insectes i de Stocum (1984) a Amfibis han fet variar substancialment aquesta concepció. A Periplaneta, Truby ha

trobat que el blastema es forma per desdiferenciació de bona part de l'epidermis distal del regenerant durant el que ell anomena fase d'activació (0-3 dies). Acabada aquesta fase, s'inicia una fase de proliferació activa a la zona desdiferenciada o blastema inicial que durà lloc al blastema propiament dit del que sortirà el patró final d'estructures. Durant la fase d'activació doncs, bona part de les cèl.lules distals del regenerant reespecifiquen la seva posició seguint una seqüència disto-proximal. El blastema s'originarà i creixerà a partir d'elles, i no, com es postulava fins ara, a partir de la proliferació cel.lular de les regions distals de la ferida i del propi blastema.

Als Amfibis, Stocum (1984) ha demostrat també que el blastema inicial prové de la desdiferenciació de la regió distal del regenerant durant els primers dies de regeneració, en els quals es dona versemblantment la determinació inicial del patró. Més tard, hi ha un increment notable de la proliferació donant lloc al blastema propiament dit. En el cas de planàries, hem ja esmentat (Saló i Baguñà, 1984) que mai hi ha mitosi, i que el seu creixement es deu bàsicament a la incorporació, per migració local o per moviments al atzar fruit de la pròpia proliferació o de tensions mecàniques i canvis volumètrics, de neoblasts des de el postblastema a la base d'aquest.

Tenint en compte que la majoria de dades abans esmentades sobre determinació d'estructures suggereixen que en els sistemes epimorfics aquesta es dona molt precoçment (abans de l'aparició del blastema propiament dit), és interessant preguntar-se quina diferència hi ha entre la zona d'activació o de desdiferenciació de les extremitats de Insectes i Amfibis o el postblastema de planàries, i la zona distal del regenerant dels sistemes morfolàctics on es dona la restauració del patró. Al nostre entendre, la diferència és solsament formal. En el cas de sistemes morfolàctics com les hidres, s'accepta que la regió distal on es dona la reformació o restauració del patró és un % petit del total del regenerant; en d'altres paraules, i en un sentit merament mètric, la zona de morfolaxis de hidres és equivalent a la zona de desdiferenciació inicial de Insectes i Amfibis o a les regions distals de planàries on es dona la proliferació inicial.

En resum doncs, som del parer que el blastema dels sistemes epimorfics s'origina a partir d'un petit territori distal del regenerant on el patró es determina, ràpidament, per primer cop. Aquest petit territori, al que podríem anomenar pre-blastema, és homòleg a les regions distals del regenerant d'organismes de regeneració morfolàctica.

Cap a un model unitari?

Les consideracions fetes fins ara acosten considerablement els models epimorfic i morfalàctic, fins al punt que podem considerar que tota regeneració tindria una etapa inicial morfalàctica en la que es determinaria ràpidament el patró inicial. Si bé això és una conclusió satisfactòria, bàsicament perquè és integradora, és al temps desconcertant doncs suggereix que podria existir un mecanisme comú de regeneració en organismes de morfologia, sistema cel.lular i complexitat tan diversa com hidres, planàries, insectes o vertebrats. I això és, pel cap baix, difícil d'imaginar. Malgrat tot, és possible postular un mecanisme unitari comú a tots els organismes que regeneren?.

1- L'espai posicional tridimensional

La major part de models de formació del patró durant la regeneració s'han basat en el marc conceptual de la informació posicional (Wolpert, 1969). Segons aquest concepte, cada cèl.lula o territori d'una estructura adulta reté algú tipus de informació (codi?) sobre la posició que ocupa dins d'aquesta estructura. La prova més convincent d'això és el fenomen de regeneració intercalar que succeeix en alguns organismes quan cèl.lules de diferents nivells al llarg d'un eix (A-P; Pr-Ds;..) es posen experimentalment en contacte. El resultat és la regeneració dels nivells intermitjos, ni un més ni un menys. Això implica que cada cèl.lula té una memòria posicional del seu nivell d'origen.

Com es mantenen aquests nivells posicionals en l'organisme adult?. I més important encare, perquè mantenir-los si l'estructura és feta i estable?.

En organismes d'estructura simple i en renovació cel.lular constant com hidres i planàries, mantenir un codi posicional sembla important per tal que les noves cèl.lules que vagin reemplaçant a les perdudes per mort cel.lular donguin lloc a les estructures i tipus cel.lulars propis del nivell axial corresponent. En aquest sentit es desconeix si les cèl.lules indiferenciades tenen elles mateixes el codi posicional passant-lo a la descendència a cada divisió, o bé no el tenen i l'adquireixen (probablement per interaccions cèl.lula-cèl.lula amb cèl.lules diferenciades) a mesura que es van diferenciant. Un mecanisme altern per adquirir i mantenir aquests valors seria la presència continuada de gradients de substàncies que, difonent des de un (o ambdós) extrems dels eixos axials, donen, segons la concentració, el valor posicional de cada nivell.

En els organismes d'estructura més complexe (per exemple, d'Anèlids en amunt), i molt especialment en els Vertebrats, presentant una estabilitat cel.lular i tissular més gran i una taxa de renovació cel.lular molt inferior (o nula en certs teixits), és necessari preguntar-se quin sentit té mantenir (si es què realment ho fan) valors de posició. El fet que molts organismes superiors no regenerin, i en particular no presentin regeneració intercalar, fa suposar que la memòria posicional es perd durant el desenvolupament, potser perquè no els serà necessària (argument circular). En aquells que regeneren, hem de convenir però que aquesta memòria posicional es manté. Si és així, en forma de què?. Postular a organismes superiors (alguns de considerable mida) un manteniment posicional basat en gradients de substàncies que difonen al llarg d'un eix (Pr-Ds, per exemple) és absolutament fantasiós. Més raonable és suposar que la memòria estaria en forma d'activitats diferencials gèniques o transcripcionals, o potser més raonablement encara, en forma de gradients estàtics (creixents o decreixents) de concentració de determinades molècules de superfície (glicoproteïnes) o en forma de gradients d'afinitat cel.lular. D'aquesta manera, l'unió de cèl.lules de valors posicionals diferents estimularia la desdiferenciació i la proliferació d'aquestes cèl.lules i la intercalació dels valors intermitjos fins a restaurar la continuïtat axial.

Si s'accepta aquest marc conceptual global, és fàcil imaginar-se qualsevol estructura (per ex. una extremitat), o fins i tot un organisme simple sencer, com un espai (representable en forma de mapa) tridimensional on cada cèl.lula té valors o memòria posicional en sentit angular, radial i ortogonal. Des d'aquest punt de vista, la regeneració no seria més (ni menys) què la restitució dels valors posicionals perduts via morfalaxis o formació de blastema i ulterior creixement.

2- Com refer l'espai tridimensional perdut?. Models, models, models,...

Acceptant que morfalaxi i epimorfosi tenen una fase inicial, morfalàctica, comuna, i que el patró a regenerar es forma inicial i ràpidament en una petita zona distal, o pre-blastema, del regenerant, quin mecanisme opera per adquirir els valors posicionals perduts que, lògicament, no són ara enlloc?.

Als sistemes morfalàctics "sensu stricto" (per exemple, sistemes embrionaris, hidres, Dictyostelium,..), diblàstics, de mida petita, poc complexes, i sovint en renovació constant, s'ha postulat la presència perma-

nent d'activadors i inhibidors de pes molecular baix (< 1.000 daltons) que d'acord a la cinètica no lineal de reacció-difusió dels models de Gierer i Meinhardt (1972) es disposarien en forma de gradient (creixent o decreixent) especificant els valors posicionals. La cinètica d'aquests models permet reconstruir el gradient perdut, i conseqüentment reconstituïr els valors posicionals que manquen. Des de un punt de vista molecular, el punt clau seria ara demostrar la presència d'aquests factors (algun d'ells aïllats ja a hidres i Dictyostelium), comprovar que es distribuïen d'acord als models, i determinar curosament que són ells realment els portadors d'informació posicional a aquests sistemes.

Als sistemes típicament epimorfics, triblàstics, de mida més gran, d'estructura més complexa, i amb taxes menors de renovació, la presència de hipotètics gradients permanents de morfògens, si bé postulada i acollida en no pocs models, no sembla en principi gaire factible. Al seu lloc, s'han formulat models basats en mecanismes d'interacció cèl.lula-cèl.lula capaços de restituir tots els valors perduts.

Tenint en compte però el gran nombre de models formulats fins ara, el més operatiu és fer-ne una classificació general, tot comentant-los breument.

a) Regeneració terminal

a.1. Models d'interacció cel.lular.

Malgrat la seva diversitat, aquests models postulen en termes generals que les cèl.lules, al interactuar entre sí, són capaces de "detectar" diferències en alguna propietat cel.lular que varia lineal o no-linealment al llarg dels eixos ortogonals, desencadenant mecanismes que duen a omplir els valors que manquen.

Ara bé, amb quines cèl.lules interactuen les cèl.lules de la part distal del regenerant en una regeneració terminal?. Hi ha un grup de models que suggereixen una interacció entre l'epiteli de cicatrització i les cèl.lules distals del mesènquima del regenerant. Entre aquests cal esmentar els de Maden (1977) i Stocum (1984) als Amfibis, que suposen que l'epidermis té un valor posicional únic, estable i límit, mentre que el mesènquima varia de valor al llarg dels eixos Pr-Ds, A-P i D-V. Un cop interactuen, els valors intermitjos s'asoleixen per un sistema de promig (Maden) o serialment (Stocum).

Un altre grup de models s'ha formulat particularment pels Insectes ja que la part més important de la reformació del patró s'acut a l'epidermis i on l'interacció epiteli-mesènquima no sembla ésser tan important com als Amfibis. En aquest cas, l'aparició dels valors que manquen vindria donada per interaccions entre les pròpies cèl.lules epidèrmiques donant lloc, serialment (és adir, en seqüència Pr \rightarrow Ds), als valors distals que manquen. Entre aquests models hi ha el famós de coordenades polars (French et al, 1976). A aquest grup podriem afegir-hi

un dels proposats per Meinhardt (1983), l'anomenat d'activació mútua d'estats locals excloents. Tant aquest model com el de coordenades polars suggereixen una regeneració distal, molt localitzada, fets que contradiuen les observacions recents de Truby (1983) i Stocum (1984) a Insectes i Amfibis respectivament.

a.2. Models de formació de minigradients transitoris

Malgrat considerar improbable la presència de gradients permanents en estructures adultes, és factible imaginar la presència de gradients transitoris durant la regeneració terminal. Això és el que proposa Meinhardt (1983) en el seu model de regeneració terminal per cooperació de compartiments. Segons aquest model, la interacció entre territoris diferentment determinats (o compartiments en la terminologia de Genètica del desenvolupament a *Drosophila*; Garcia-Bellido et al, 1979) generaria durant el desenvolupament, i transitòriament durant la regeneració, gradients de substàncies (morfògens) des de les regions més distals del regenerant cap a les més proximals, subministrant així informació posicional. Les cèl.lules que quedarien sota la influència del gradient estarien en front de concentracions que podrien ésser més elevades que les corresponents al seu valor posicional. D'aquesta manera, les cèl.lules d'aquestes regions distals, recentment desdiferenciades, podrien canviar de valor posicional i determinar-se novament d'acord amb ell. En aquestes condicions, la determinació inicial del patró es donaria en una petita zona distal del regenerant i sense divisió cel.lular obligada.

Els avantatges d'aquest model són bàsicament el incorporar el concepte de compartiment o territori determinat en la gènesi de informació posicional, i els aspectes clarament morfolàctics que presenta. En contraposició, introdueix de nou, i el que és més important i intrigant a l'hora, en un adult, la presència de gradients, amb tots els inconvenients que això presenta.

b) Regeneració intercalar.

A la regeneració intercalar, el concepte de gradients difusibles és, per moltes raons, difícilment aplicable. Per contra, models basats en la interacció cel.lular, sigui entre cèl.lules mesenquimàtiques o entre cèl.lules ectodèrmiques, han estat molt més considerats. Amb variants, així expliquen la regeneració intercalar els models de Maden (1977), Slack (1980), Meinhardt (1983), i Stocum (1984), així com el model de coordenades polars (French et al, 1976). Segons el sistema, es postula que la interacció es dona entre cèl.lules ectodèrmiques que presentarien valors posicionals diferents (extremitats d'Insectes; discs imaginals de *Drosophila*,..), o bé entre cèl.lules mesenquimàtiques (extremitats d'Amfibis; regeneració intercalar a planàries,..) de valors posicionals diferents, tenint les cèl.lules ectodèrmiques en aquest cas valors únics.

Un problema interessant a la regeneració intercalar és la direcció en que es fa: Pr → Ds; Ds → Pr, o en ambdues direccions. L'ús de marcadors cel.lulars, nuclears i cromosòmics, ha mostrat que es dona una o altre modalitat depenent del sistema. Així, Bohn (1971) troba a les extremitats d'Insectes que la regeneració es faria en sentit Ds → Pr, mentre que Maden (1981) i Stocum (1984) als Amfibis

observen intercalacions en sentit Pr→Ds. Finalment, a planàries, Saló i Baguñà (1985) demostren que la intercalació es fa en ambdues direccions, fet no gens estrany tenint en compte que són organismes de regeneració bidireccional. El primer i el darrer resultat són interessants ja que invaliden, almenys a nivell de regeneració intercalar, una de les regles més antigues i acceptades de la regeneració: la regla de la transformació distal (Rose, 1962), segons la qual la regeneració sols és possible en sentit Pr→Ds.

c) Resum general.

Malgrat l'aparent diversitat de models, dos són els mecanismes generals proposats per reformar el patró de valors posicionals: interaccions cel·lulars, i creació de minigradients transitoris de morfògens. En ambdós casos, el patró es reformaria inicialment en un petit territori distal del regenerant (morfalaxis) per a ésser ampliat més tard, si cal, per proliferació cel·lular (epimorfosi).

Endemés, la creació de minigradients pot considerar-se un problema d'interaccions cel·lulars doncs cal la interacció o cooperació entre diferents territoris determinats (o compartiments) per a generar-los. D'aquesta manera, i malgrat la creació d'un gradient d'una substància que difon és una variant prou important respecta a la pura interacció cel·lular, la reformació del patró dependria bàsicament de fenòmens d'interacció cel·lular, fenòmens que cal esperar succeeixin a nivell de la membrana cel·lular.

L'aproximació molecular a la formació del patró durant la regeneració

Es evident que el problema més important avui en dia de la formació del patró és entendre la base molecular de l'especificació posicional. Wolpert (1984) ha assenyalat que, a nivell fenomenològic, la formació del patró ha assolit un estat en què difícilment es pot anar més enllà. És a dir, coneixem regles d'interacció i models plausibles de comportament de sistemes en regeneració (formulats tots ells a nivell tissular i cel·lular), però no podem deduir d'ells, si més no amb garanties, la seva base molecular.

El concepte de codi posicional al llarg d'un eix implica que hi ha una entitat molecular que varia d'acord a la posició de les cèl·lules al llarg d'aquell. Als sistemes adults hem considerat ja que aquest codi posicional és dubtós que es mantingui com a resposta a gradients permanents de morfògens, cosa per altre banda prou probable a hidres o durant la creació de minigradients transitoris d'acord al model de Meinhardt (1983). Més aviat es creu en la presència d'alguna propietat cel·lular, expressada a nivell molecular a la membrana cel·lular, que variaria al llarg dels eixos ortogonals, i que seria responsable de regenerar el patró quan es possessin cèl·lules de diferent valor posicional en contacte.

Ara bé, quina és la naturalesa d'aquests senyals o ens moleculars que expresen posició?

1) Identificació de morfògens difusibles

L'existència de morfògens difusibles especificant posició ha estat postulada a diferents sistemes com hidres i a l'eix A-P de l'extremitat de l'embrió de pollet i d'altres Vertebrats. En cap cas però hi ha proves satisfactòries de la seva existència, malgrat forces resultats poden explicar-se a través de la seva acció.

Un problema important en aquest cas és establir quins criteris haurien de complir-se per saber que un morfògen ha estat identificat. En principi, dos serien els bàsics: 1) que la substància o morfògen en qüestió alterés de manera predible el patró; i 2) que la seva distribució espacial fos la requerida pel model postulat. En un dels casos aparentment més clars: els morfògens activadors i inhibidors de la regeneració a hidres (Schaller, 1976), inicialment força d'acord amb lo prescrit als models de Gierer i Meinhardt (1972) i Meinhardt (1982), s'ha vist més tard que la distribució espacial real dels presumptes morfògens no s'adiu amb lo previst al model, i que organismes sense els tipus cel.lulars productors dels morfògens poden regenerar normalment. En un altre sistema clàssic: la determinació de l'eix A-P de l'extremitat del pollet i d'altres Vertebrats, mai s'ha pogut aïllar, malgrat intensos esforços, el presumpte morfògen responsable, tot i que molts dels resultats experimentals assolits són explicables per l'acció d'algun factor que difongués en sentit P → A.

Sembla doncs, que la identificació real d'un morfògen, i molt especialment en aquells casos d'hipotètics minigradients transitoris, requerirà una considerable habilitat experimental i disposar de sistemes d'assaig "in vitro" dels codis posicionals. Fins que això darrer no sigui factible ((la qual cosa vol dir saber abans el que és el codi posicional), la identificació d'aquests factors serà certament molt difícil.

2) On és el codi posicional?. A la membrana cel.lular?

Si la major part de fenòmens regeneratius poden entendre's com a fenòmens d'interacció cel.lular, és raonable que el codi posicional sigui a la membrana cel.lular i que les cèl.lules siguin capaces, al interactuar, de "detectar" o "llegir" diferències en aquest codi. Si això fos així, esperariem també que aquesta "lectura" es traduís en un canvi de determinació cel.lular de les cèl.lules desdiferenciades durant la fase morfolàctica, i en una estimulació ulterior de la proliferació durant la fase epimórfica.

Les moléculas específiques de la membrana cel.lular implicades en la formació del patró durant el desenvolupament i la regeneració no han estat encara identificades, si bé diverses glicoproteïnes que se sap tenen un paper en l'adhesivitat i en les interaccions i reconeixement cèl.lula-cèl.lula i cèl.lula-substrat, poden ésser-ne candidates. Estudis menats a determinar diferències a nivell de proteïnes cel.lulars generals al llarg dels eixos del blastema, o del regenerant, emprant electroforesi bidimensional d'alta resolució (Slack, 1982) no donaren cap mena de resultat diferencial, probablement degut a que seria més interessant estudiar les proteïnes de membrana i no les generals. Així, estudis recents sobre proteïnes de membrana detectades per anticossos monoclonals han assenyalat variacions quantitatives al llarg de la retina del pollet (Trisler et al, 1981) i en el cervell del ratolí (Edelman, 1983). Per altra banda, Bullière (1984) emprant també anticossos monoclonals troba que hi ha diferències qualitatives, i al temps quantitatives, entre els segments de les extremitats d'Insectes, i entre les regions externa i interna i Pr i Ds de cada un d'ells, diferències que curiosament (o no) són pròpies també de la musculatura i del sistema nerviós corresponent.

Més específicament, Edelman (1983) ha trobat en el desenvolupament del cervellet del ratolí una glicoproteïna que passa del 26% en contingut d'àcid siàlic a l'embrió a un 9% en l'adult, i que alteracions d'aquest canvi afecten, com en el cas del conegut mutant staggerer, l'histologia d'aquest organ. D'ací, l'autor ha suggerit que es podrien generar diferències morfogèniques significatives a nivell de la membrana cel.lular per creació i modulació de l'heterogeneïtat de les cadenes glucídiques d'unes quantes glicoproteïnes. Semblantment, Bullière (1984) ha detectat per immunoblot que els antígens específics de l'epidermis de l'extremitat d'Insectes abans esmentats pertanyen a una família de proteïnes molt semblants, probablement glicoproteïnes, de pes molecular entre 30 i 60.000 daltons.

Totes aquestes dades casen força bé amb el recent descobriment que els retinoids (Vitamina A i derivats) alteren els valors posicionals de les cèl.lules desdiferenciades de l'extremitat dels Amfibis en regeneració, resultant en duplicacions i alteracions més o menys profundes del patró (Maden, 1982). Donat que els retinoids alteren l'adhesivitat cel.lular, i modulen la síntesi de glicoproteïnes i glicosaminoglicans (probablement afectant a la manasil retinil fosfatasa), és possible que puguin alterar el sistema de senyals posicionals associats a la membrana cel.lular.

3) Perspectives

Dues semblen les maneres més adequades d'investigar avui en dia l'identitat molecular del codi posicional: 1) estudiar les diferències qualitatives i/o quantitatives de les proteïnes (especialment les glicoproteïnes) de la membrana cel·lular per medi d'electroforesi bidimensional d'alta resolució o mitjançant l'ús d'anticossos monoclonals que detectin diferències al llarg d'un eix; i 2) emprant retinoids (o altres substàncies que alterin el codi posicional), tractar de "pescar" aquelles molècules que reaccionen específicament amb ells per tal de poguer seguir la pista molecular que mena a un canvi en el codi posicional d'una cèl·lula. Això caldria afegir els intents d'aïllament i purificació de morfògens, molt especialment en aquells sistemes com hidres, Dictyostelium, o sistemes embrionaris, en els que és prou factible que la informació posicional estigui especificada per factors difusibles.

Un cop identificada la molècula (o molècules) responsable del codi posicional és quan es podrien formular tot un seguit de noves questions com són: 1) com afecta el codi posicional a paràmetres cel·lulars bàsics com són la divisió, el moviment i la diferenciació?; 2) per medi de quin mecanisme canvia una cèl·lula el seu codi posicional al interactuar amb altres cèl·lules de codi posicional diferent?; 3) com s'estableix el codi posicional durant el desenvolupament embrionari?; 4) si el codi posicional depen de la presència d'una o més molècules, quins gens codifiquen per elles, i com són regulats?; i 5) que significaria coneixer el codi posicional pels intents d'induir, i mantenir, la regeneració de teixits i òrgans en organismes que no ho fan?.

Certament, el notable camí fet en els darrers 10 anys i les perspectives obertes molt recentment (1984) per la troballa de seqüències gèniques invariants (l'homeobox) entre grups molt distants d'organismes (vegeu, Saló, aquest volum), han obert a molts sistemes (entre ells, planàries) vies importants d'estudi a nivell molecular. Sens dubte, no trigarem gaire en poguer dexifrar un dels darrers codis biològics que resten per coneixer: el codi posicional, responsable de l'organització tridimensional de les cèl·lules en un espai fenotípic.

Agraïments

Un dels autors (JB) voldria agrair a tots els membres del grup d'Epigenètica del Departament de Genètica de la Facultat de Biologia, l'estímul que han suposat les seves activitats (de tot tipus....) per a la gènesi d'aquest treball. En concret, vull agrair l'esperit constructiu-depresiu-crític-perseverant-cíclic de la Camama (N.S.R), l'actitud molecular-crítica dels exilats ES (H.M) i JC (H.C), la comprensió orlandesca-generacional de RR (H.P), i l'expectant, callada i reverencial actitud de JP (H.PPCC). No vull oblidar tampoc a n'en Joan Antoni Vela (JAV, H.B) i les seves sàbies disquisicions embriològiques, ni a l'ilustre matornenc a l'exili Florenci Serras (FS, H.R).

Aquest treball no hagués vist la llum a no ser per la infinita paciència i comprensió temporal d'en Mariano Monzó, a qui estaré eternament agraït. El finançament ha estat a càrrec d'un ajut de la Comisión Asesora de la Investigación Científica y Técnica (CAICYT)(REF 1108/81) a JB.

Bibliografia

- ADLER, P.N. (1984). DNA replication and pattern regulation in the imaginal disc of *Drosophila*. Devel.Biol. 102,300-308.
- BOHN, H. (1971). Interkalare regeneration und segmentale Gradienten bei den Extremitäten von *Leucophaea*-Larven (Blatteria). III. Die Herkunft des interkalaren Regenerats. Wilhelm Roux's Arch. 167, 209-221.
- BRYANT, S.V., FRENCH, V., BRYANT, P.J. (1981). Distal regeneration and symmetry. Science 212, 993-1002.
- BULLIERE, D., BULLIERE, F. (1984). Topospecific antigens in insect appendages. J.Embryol.exp.Morphol. 82(Suppl), 166.
- COOKE, J. (1973). Morphogenesis and regulation in spite of continued mitotic inhibition in *Xenopus* embryos. Nature 242, 55-57.
- CUMMINGS, S.G., BODE, H.R. (1984). Head regeneration and polarity reversal in *Hydra attenuata* can occur in the absence of DNA synthesis. Roux's Arch.Dev.Biol. 194,79-86.
- EDELMAN, G. (1983). Cell adhesion molecules. Science 219, 450-457.
- FRENCH, V., BRYANT, P.J., BRYANT, S.V. (1976). Pattern regulation in epimorphic fields. Science 193, 969-981.
- GARCIA-BELLIDO, A., LAWRENCE, P.A., MORATA, G. (1979). Compartimentos en el desarrollo animal. Inv y Ciencia. (Setembre).
- GIERER, A., MEINHARDT, H. (1972). A theory of biological pattern formation. Kybernetik 12, 30-39.
- McWILLIAMS, H.K., BONNER, J.T. (1979). The prestalk-prespore pattern in cellular slime molds. Differentiation 14, 1-22.

- McWILLIAMS, H.K. (1983). Hydra transplantation phenomena and the mechanism of Hydra head regeneration. II. Properties of head activation. Devel.Biol. 96, 239-257.
- MADEN, M. (1977). The regeneration of positional information in the amphibian limb. J.Theor.Biol. 69, 735-753.
- MADEN, M. (1981). Morphallaxis in an epimorphic system: size, growth control and pattern formation during amphibian limb regeneration. J.Embryol. exp.Morph. 65, 151-167.
- MADEN, M. (1982). Vitamin A and pattern formation in the regenerating limb. Nature 295, 672-675.
- MEINHARDT, H. (1980). Cooperation of compartments for the generation of positional information. Z.Naturforsch. 35c, 1086-1091.
- MEINHARDT, H. (1982). Models of Biological Pattern Formation. Academic Press, London.
- MEINHARDT, H. (1983). Cell determination boundaries as organizing regions for secondary embryonic fields. Devel.Biol. 96, 375-385.
- MORGAN, T.H. (1901). Regeneration. McMillan, New York.
- PALMBERG, I., REUTER, M. (1983). Asexual reproduction in *Microstomum lineare* (Turbellaria). I. An autoradiographic and ultrastructural study. Int.J.Invertebr.Reprod. 6, 197-206.
- ROSE, S.M. (1962). Tissue-arc control of regeneration in the amphibian limb. Symp.Soc.Study.Dev.Growth. 20, 153-176.
- 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., BAGUÑÀ, J. (1984). 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. 83, 63-80.
- SALÓ, E., BAGUÑÀ, J. (1985). Proximal and distal transformation during intercalary regeneration in the planarian *Dugesia(S)mediterranea*. Evidence using a chromosomal marker. Roux's.Arch.Dev.Biol. (en premsa).
- SCHALLER, H.C. (1976). Action of the head activator as a growth hormone in hydra. Cell.Differ. 5, 1-11.
- SLACK, J.M.W. (1980). A serial threshold theory of regeneration. J.Theor. Biol. 82, 105-140.
- STOCUM, D.L. (1984). The urodele limb regeneration blastema. Determination and organization of the morphogenetic field. Differentiation 27, 13-28.
- TRISLER, G.D., SCHNEIDER, M.D., NIRENBERG, M. (1981). A topographic gradient of molecules in retina can be used to identify neuron position. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 78, 2145-2149.
- TRUBY, P.R. (1983). Blastema formation and cell division during cockroach limb regeneration. J.Embryol.exp.Morph. 75, 151-164.

