

Anàlisi citofotomètric del cicle cel.lular durant la regeneració de la planària *Dugesia (S) polychroa*.

J. Prats., R. Romero., i J. Baguñà.

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

Abstract

Cytophotometric analysis of the cell cycle during regeneration in the planarian *Dugesia (S) polychroa*.

Using Hoechst 33342 stained cell nuclei, phase contrast microscopy, and quantitative cytophotometric, we have analyzed the variations in the percentage of undifferentiated (neoblasts) and differentiated cells in the various phases of the cell cycle in the blastema, regions near the cut (postblastema), and regions far from it (rest) during regeneration of the planarian *Dugesia (S) polychroa*.

We show here that transection is followed by important changes in the cell compartments in regions near then wound, and by lesser ones in regions far from it, suggesting the presence of a pre-existing population of undifferentiated G₂ cells in the intact worm that would explain the early mitotic maximum. Besides, blastema cells always remain at the G₀-G₁ compartment, a result that agrees with the reported absence of mitosis in this region. Finally, it is shown that only undifferentiated cells cycle while differentiated cells always remain at the G₀-G₁ compartment.

These results are discussed in the terms of the extant theories of the blastema formation and the origin of blastema cells in planarians, as well as with data gathered on blastema cell kinetics and DNA, RNA and protein synthesis.

Introducció

A la majoria d'exemples de regeneració al Regne Animal, un dels processos més importants és la formació del blastema de regeneració. A planàries aquesta estructura és externament visible a 1 - 2 dies de regeneració, estant formada, tal com demostren els estudis fins de microscòpia òptica i els estudis ultraestructurals, per l'acumulació de petites cèl·lules indiferenciades.

L'origen de les cèl·lules del blastema: 1) per desdiferenciació de cèl·lules diferenciades prop de la ferida (Hay and Coward, 1975; Gremigni et al, 1980), semblantment al que passa a la majoria de Vertebrats i Invertebrats superiors; o 2) a partir de cèl·lules indiferenciades pre-existents a l'adult (neoblasts) (Wolff, 1962; Baguñà, 1976; Saló i Baguñà, 1984) com s'ha postulat també per als Nemertins i d'altres Invertebrats

inferiors ha estat un punt de debat molt intens. Recentment, la demostració que solament els neoblasts, que no les cèl.lules diferenciades, un cop injectats a un hoste irradiat, són capaços de rescatar a aquest de la mort i fer-lo regenerar (Saló i Baguñà, 1984) han suposat un argument important a favor de la segona alternativa.

Sigui quin sigui l'origen de les cèl.lules del blastema, la majoria d'autors han suggerit que la pròpia amputació estimularia l'activació, la proliferació i la ulterior diferenciació de les cèl.lules indiferenciades prop de la superfície del tall. No hi ha però acord unànim en certs aspectes temporals d'aquest procés. Mentre que per certs autors la proliferació cel.lular s'esdevé a partir de 1 dia de regeneració, estudis menats al nostre laboratori per espai de diversos anys i en diferents espècies (Dugesia (S) mediterranea, Dugesia (S) polychroa, Dugesia (G) tigrina, Dugesia (D) subtentaculata) han demostrat clarament la presència d'un màxim inicial a les 4 - 8 hores de regeneració, màxim que seria degut a l'entrada en mitosi de cèl.lules pre-existents en l'adult a l'estadi G_2 del cicle cel.lular (Saló i Baguñà, 1984). Més tard (2-3 dies) un segon màxim mitòtic s'esdevé; entre ambdós, hi ha un pic de síntesi de DNA (8-18 hores), un de RNA (16-24 hores) i més tard, un de síntesi proteica (1-2 dies) (Collet, dades no publicades.)

Malauradament, les relacions entre aquests canvis i la cinètica que segueixen les cèl.lules del blastema i del postblastema no ha estat gaire aprofundida, bàsicament degut al fet que, per raons encara molt poc conegudes, les planàries d'aigües dolces no incorporen timidina, la qual cosa ha dificultat extraordinàriament una anàlisi cel.lular coherent. En demés, això ha impedit el conèixer paràmetres tant importants com la llargada del cicle cel.lular (en especial la fase S), i la fracció de cèl.lules en creixement, entre d'altres.

Un estudi alternatiu el representa l'ús de mètodes citològics analítics com són la citofotometria i la citofluorimetria. Emprant aquesta aproximació, juntament amb un processament computeritzat d'anàlisi d'imatges, Brugal et al., (1985) varen publicar la primera anàlisi cel.lular sintètica del procés de regeneració a la planària Polycelis nigra. Els resultats obtinguts, si bé d'interès, presenten nombroses contradiccions i són d'interpretació difícil (pujades i baixades no correlatives de les fases del cicle cel.lular durant les primeres 24 hores de regeneració, necessitat de migracions massives de cèl.lules durant les prime-

res 48 hores, etc . . .)

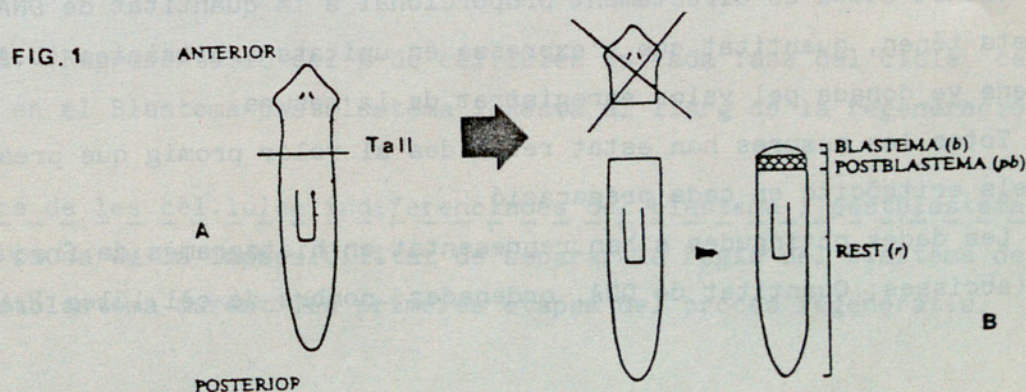
Per tractar d'omplir els buits existents i validar o no els resultats d'en Brugal et al. a Polycelis nigra hem realitzat, mitjançant tin amb Hoechst 33342 i citofotometria, una anàlisi de la cinètica cel.lular durant la regeneració de la planària Dugesia (S) polychroa. Més concretament hem atès els següents punts: 1) estima dels canvis del percentatge de cèl.lules indiferenciades (neoblasts) i diferenciades en les diferents fases del cicle cel.lular durant la regeneració, específicament durant les primeres 24 hores, a regions aprop (blastema i postblastema) i lluny (resta) de la ferida; 2) determinació de les fases del cicle cel.lular existents a les cèl.lules que formen el blastema propiament dit (des de 3 dies de regeneració); i 3) relacions d'aquests canvis amb dades ja conegudes sobre cinètica mitòtica al postblastema i regions lluny de la ferida, absència de mitosi al blastema, origen de les cèl.lules del blastema, i patrons de síntesi de DNA, RNA i proteïnes.

Material i Mètodes

Per a la realització d'aquest treball s'han utilitzat planàries de l'espècie Dugesia (S) polychroa (biotip B-C) recollides al llac de la localitat francesa de Vilanova de la Raó. La llargada dels animals emprats oscil.lava entre 5 i 7 mm; (~ 500.000 cèl.lules / individu, Baguñà i Romero, 1981; Romero, 1987). Es varen mantenir al laboratori, a 17°C i a la foscor. Tots els experiments han estat realitzats a aquesta temperatura.

Procediment Experimental

Animals dejunats d'una setmana van ésser decapitats a nivell prefa- ringeal (fig. 1A) i la regió cefàlica va ser eliminada. Tot seguit se'ls va deixar regenerar durant diferents períodes de temps (des de 2 hores fins a 11 dies). Després, diferents zones del cos - blastema, postblastema i resta - (fig. 1B) van ésser analitzades.



L'anàlisi de les mostres va consistir inicialment en la maceració dels individus (Baguñà i Romero, 1981) amb una solució que contenia glicerol, Ac. acètic, metanol i aigua destil.lada (7:5:12:76) durant 30 minuts a 37°C. A la suspensió cel.lular obtinguda s'hi varen afegir eritròcits de pollastre, els quals varen ser utilitzats com a control intern, i després es varen fer extensions sobre portes, deixant-se assecar durant tota la nit. Un cop seques, les extensions es varen rentar amb aigua destil.lada i es varen tenyir amb el colorant fluorescent Hoechst 33342 (Boehringer) durant 30 minuts a 23°C i a una concentració de 10 g/ml en aigua destil.lada. Les preparacions així tenyides es varen montar amb un tampó 0.16 M de fosfat sòdic - 0.04 M citrat sòdic (Cowell, J.K. i Franks, L.M.; 1980), es van sellar i tot seguit es varen fer les mesures.

Mesures

Les mesures han estat realitzades amb un microscopi Leitz Dialux 20, el qual té incorporat un microespectrofotòmetre (MPV Compact Leitz)

El colorant fluorescent Hoechst 33342 presenta un màxim d'excitació a 350 nm i un màxim d'emissió a 450 nm (Shapiro, 1985) El bloc de filtres utilitzat per fer les mesures ha estat el G 513416 de la casa Leitz.

Les cèl.lules analitzades han estat les indiferenciades per una banda i les difernciades per l'altra, segons els tipus cel.lulars descrits a planària (Baguñà i Romero, 1981) Un cop caracteritzada cada cèl.lula amb el C.F. (100 X) s'ha enquadrat el nucli amb el diafragma de mesura, després s'ha tret la font de llum normal i s'ha excitat el nucli amb llum U.V. (bombeta de mercuri) enregistrant-se el valor de la mesuramés alta.

Tractament de les dades.

La intensitat de fluorescència que presenten els nuclis tenyits amb Hoechst 33342 és directament proporcional a la quantitat de DNA que aquests ténen, quantitat que s'expressa en unitats arbitràries (U.A.) i que ens ve donada pel valor enregistrat de la mesura.

Totes les mesures han estat referides al valor promig que presentàven els eritròcits en cada preparació.

Les dades obtingudes s'han representat en histogrames de freqüències (abscisses: Quantitat de DNA, ordenades: nombre de cèl.lules). A par

tir d'aquests histogrames (Fig. 3) s'ha calculat el tant per cent de cèl.lules que hi ha en cada fase del cicle cel.lular (Taula I) en funció de la quantitat de DNA que presentaven.

Resultats

Caracterització de les fases del cicle cel.lular. Cinètica.

Per a caracteritzar bé les diferents fases del cicle cel.lular cal l'anàlisi d'un elevat nombre de nuclis, cosa relativament inviable en aquest estudi si tenim en compte la seva magnitud. Malgrat tot però, hom pot analitzar, encara que provisionalment, la cinètica que segueixen les cèl.lules indiferenciades de planària durant el procés de la regeneració, cinètica que ve recolzada per d'altres dades ja esmentades (Baguñà, 1976; Saló i Baguñà, 1984).

En la Taula I es mostren els % de cèl.lules que hi ha en cada compartiment del cicle cel.lular al llarg del procés regeneratiu.

<u>Blastema i Postblastema</u>				<u>Resta</u>			
Temps	G ₁	S	G ₂	Temps	G ₁	S	G ₂
0 hores	69.3	14.6	16.1	0 hores	71.2	15.1	13.7
2 hores	70.1	14.2	15.7	2 hores	70.9	15.3	13.8
5 hores	72.9	13.6	13.5	5 hores	70.1	16.6	13.3
8 hores	62.1	24.4	13.5	8 hores	73.6	12.3	14.1
16 hores	58.9	28.3	12.8	16 hores	58.9	23.5	17.6
1 dia	60.0	20.0	20.0	1 dia	59.5	21.8	18.7
2 dies	57.5	22.5	20.0	2 dies	65.7	16.3	18.3
3 dies	64.3	21.5	14.2	3 dies	70.9	16.6	12.5
5 dies	75.6	14.4	10.0	5 dies	73.2	14.6	12.2
7 dies	63.1	16.9	20.0	7 dies	70.9	12.9	16.2
11 dies	69.8	15.1	15.1	11 dies	75.7	12.2	12.1

Taula I. Representació del % de cèl.lules en cada fase del cicle cel.lular, en el Blastema-postblastema i Resta al llarg de la regeneració.

Cinètica de les cèl.lules indiferenciades del blastema i postblastema.

A causa de la impossibilitat de separar la regió del blastema de la del postblastema durant les primeres etapes del procés regeneratiu, a-

questes dues regions han estat analitzades conjuntament els 3 primers dies de regeneració.

En la Gràfica 1, es mostra la cinètica que segueixen les cèl.lules indiferenciades del blastema i postblastema en els diferents compartiments del cicle cel.lular. Podem observar que poc temps després de fer la decapitació, les cèl.lules que es trobaven en G_2 entren ràpidament en mitosi donant lloc a una primera onada mitòtica (Baguñà, 1976; Saló i Baguñà, 1984) la qual explica la baixada del nombre de cèl.lules en G_2 que s'esdevé a partir de les dues primeres hores després del tall així com l'increment de cèl.lules en G_1 cap a les cinc hores. Altrament, a partir de les 8 hores comença a activar-se la fase S disminuint aleshores el nombre de cèl.lules que es trobaven en el compartiment G_1 . Aquesta activació de la fase S permet explicar la segona onada mitòtica que s'esdevé entre 2 i 3 dies després de la decapitació (Baguñà, 1976; Saló i Baguñà, 1984) i de la qual n'és un reflex el progressiu augment de cèl.lules que s'observa en el compartiment G_2 a partir de les 16 hores i fins al segon dia.

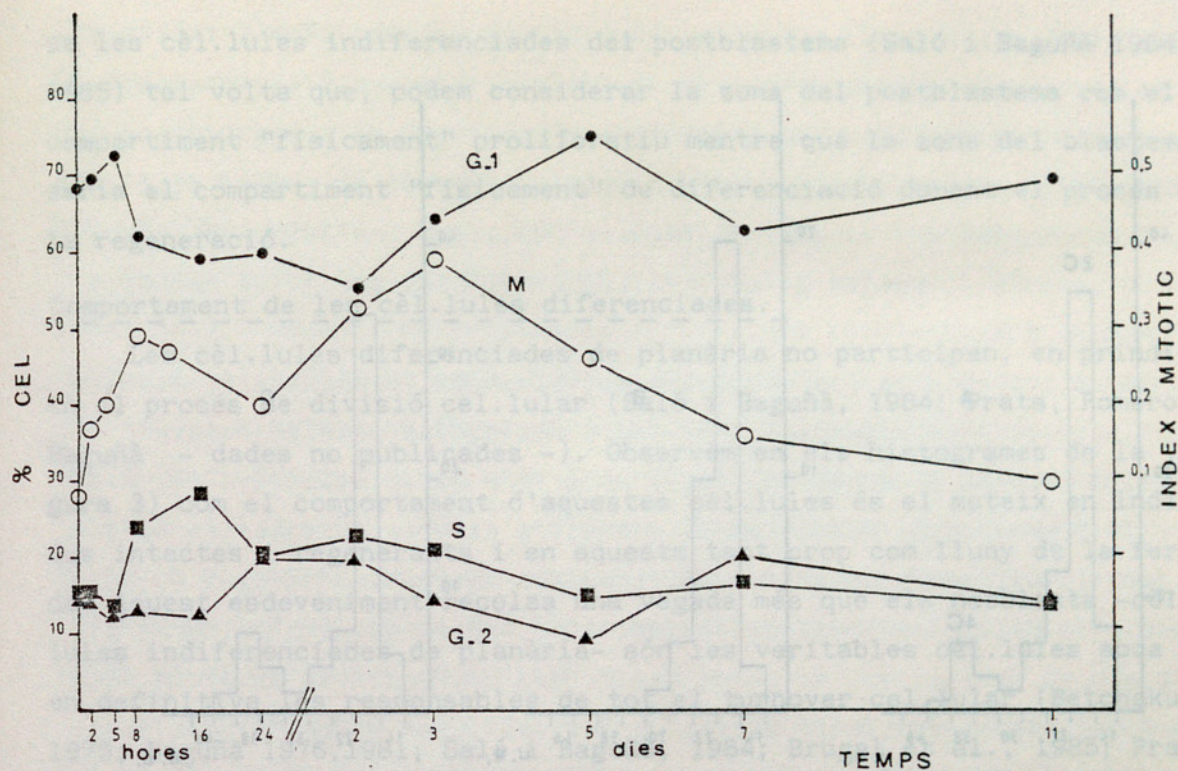
A partir del tercer dia el sistema comença a estabilitzar-se retornant cap als 5 - 7 dies als valors normals.

Cinètica de les cèl.lules indiferenciades del Resta

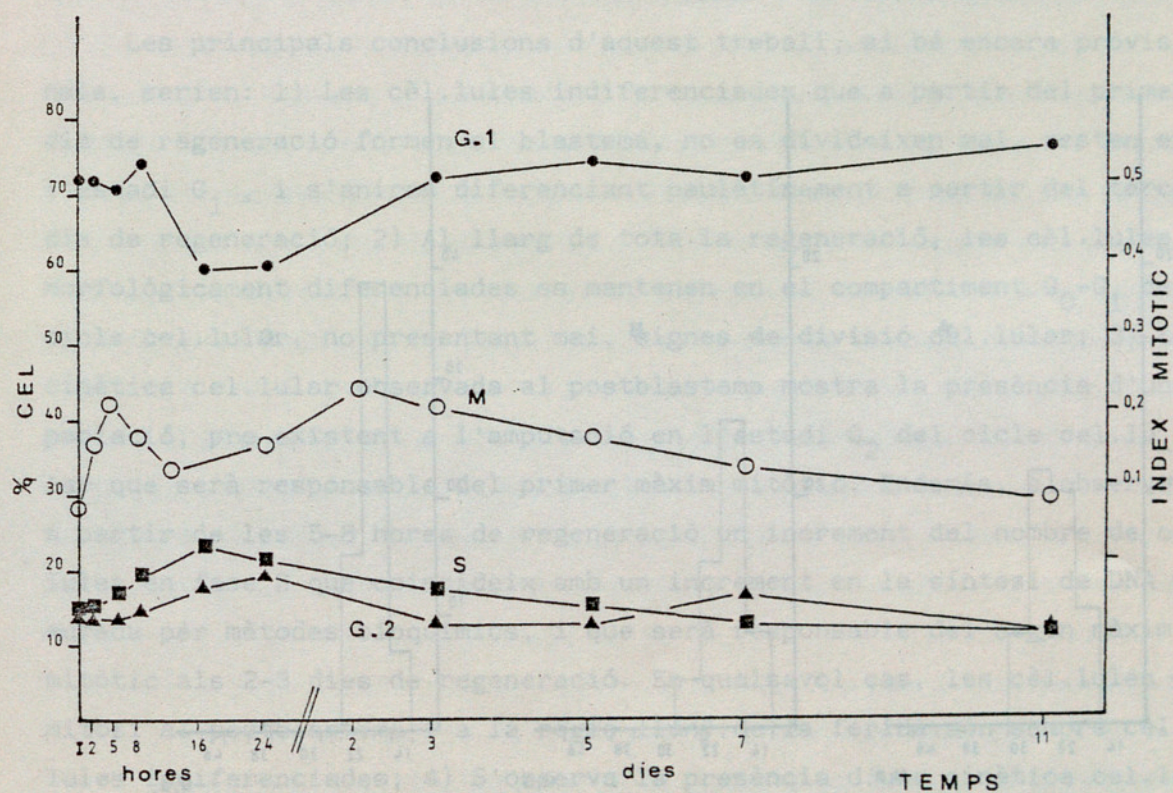
La cinètica que segueixen les cèl.lules indiferenciades en la resta del cos de l'animal, és a dir lluny de la ferida, és un reflex del que s'esdevé en la zona del postblastema (al costat de la ferida) encara que les variacions són allí més petites, podriem dir que aquest comportament cinètic és més esmorteït, talment com si s'hagués diluït (Gràfica 2). Segurament l'activació del sistema que comporta l'estat regeneratiu va disminuint en forma de gradient al llarg de l'animal, activació que fora màxima prop la ferida.

Comportament de les cèl.lules indiferenciades del blastema.

En tots els blastemes analitzats (5, 7 i 11 dies després de la decapitació de l'animal) no s'han trobat mai cèl.lules amb una quantitat de DNA superior a 3C (Figura 2A) de manera que podem considerar que totes aquestes cèl.lules estan en la fase G_1-G_0 del cicle cel.lular. Això explica el fet de l'absència total de mitosis observada en aquesta zona (Morita i Best, 1984; Saló i Baguñà, 1984). Així cal considerar que les cèl.lules indiferenciades del blastema resulten de la migració cap aquest



Gràfica 1 . Distribució de cèl·lules indiferenciades del Blastema-Postblastema en les diferents fases del Cicle Cel·lular al llarg del procés de regeneració.



Gràfica 2 . Distribució de cèl·lules indiferenciades del Resta en les diferents fases del Cicle Cel·lular al llarg de la regeneració.

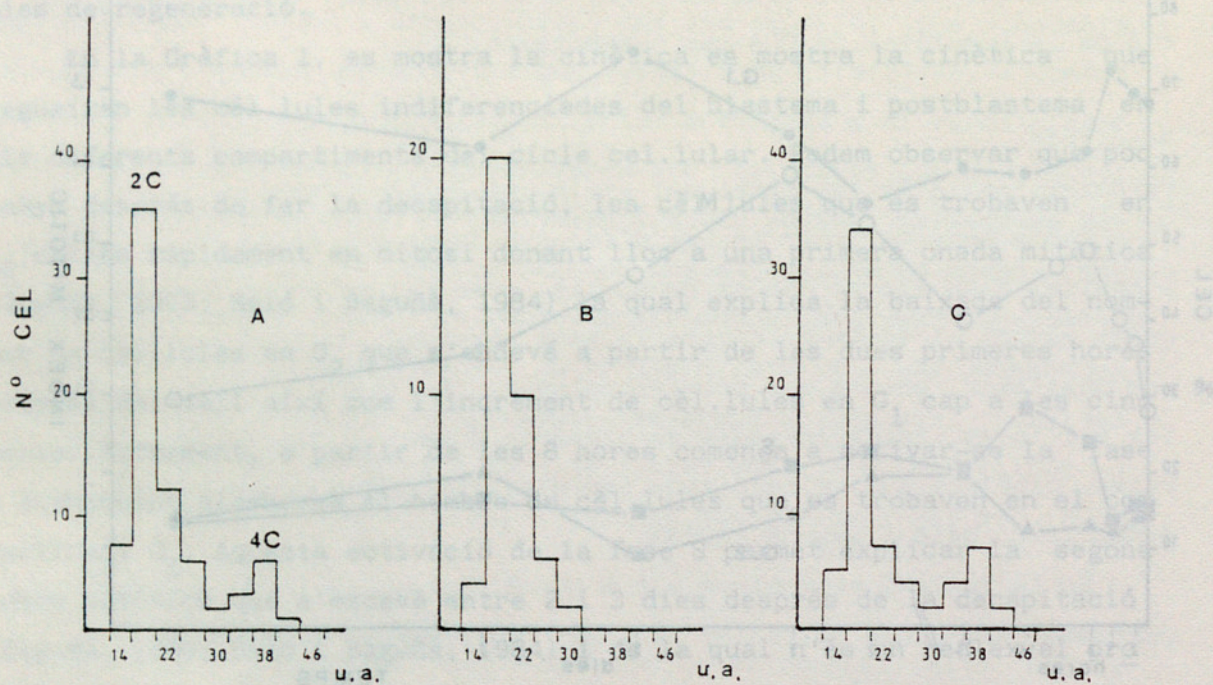


Figura 2. Distribució de la Quantitat de DNA (en unitats arbitràries) en cèl.lules indiferenciades d'individus intactes (A), del blastema (B) i del Postblastema (C) de 7 dies.

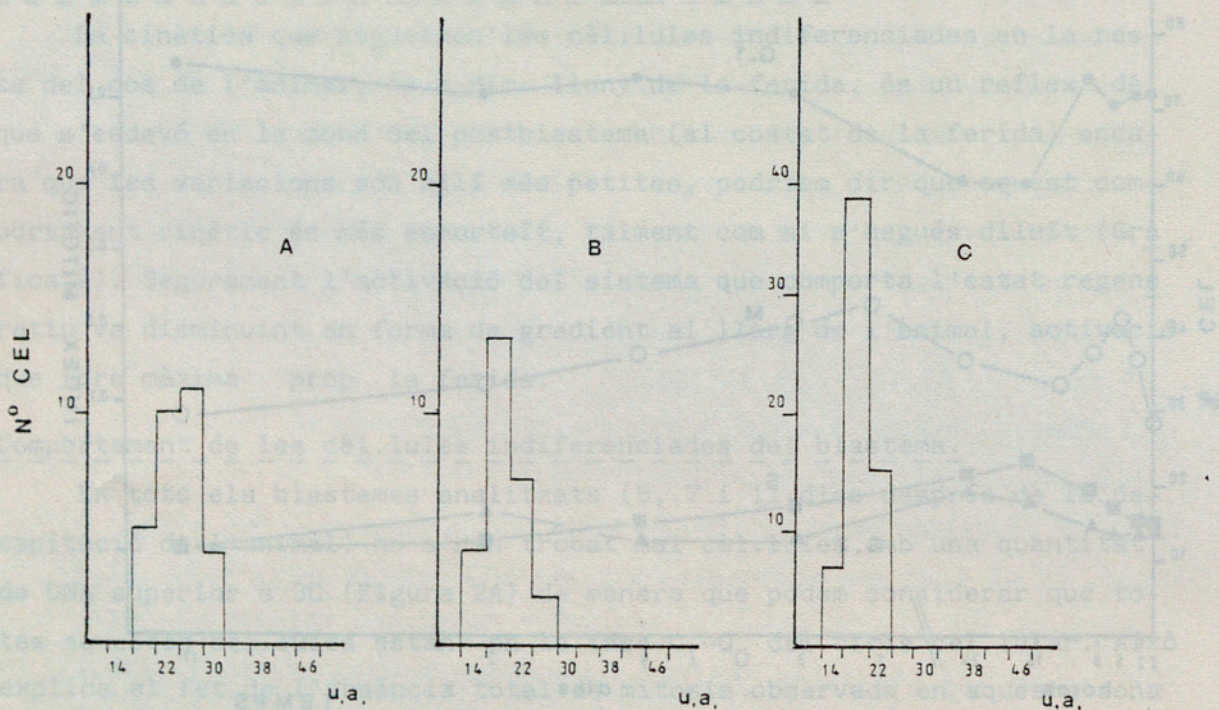


Figura 3. Distribució de la Quantitat de DNA (en unitats arbitràries) en cèl.lules diferenciades d'individus intactes (A), del blastema (B) i del postblastema (C) de 7 dies.

de les cèl.lules indiferenciades del postblastema (Saló i Baguñà 1984, 1985) tal volta que, podem considerar la zona del postblastema com el compartiment "físicament" proliferatiu mentre que la zona del blastema seria el compartiment "físicament" de diferenciació durant el procés de la regeneració.

Comportament de les cèl.lules diferenciades.

Les cèl.lules diferenciades de planària no participen, en principi, en el procés de divisió cel.lular (Saló i Baguñà, 1984; Prats, Romero i Baguñà - dades no publicades -). Observem en els histogrames de la (Figura 3) com el comportament d'aquestes cèl.lules és el mateix en individus intactes i regenerants i en aquests tant prop com lluny de la ferida. Aquest esdeveniment recolza una vegada més que els neoblasts -cèl.lules indiferenciades de planària- són les veritables cèl.lules soca i en definitiva les responsables de tot el turnover cel.lular (Betchaku, 1975; Baguñà 1976, 1981; Saló i Baguñà, 1984; Brugal et al., 1985; Prats Romero i Baguñà -resultats no publicats-)

DISCUSSIO

Les principals conclusions d'aquest treball, si bé encara provisionals, serien: 1) Les cèl.lules indiferenciades que a partir del primer dia de regeneració formen el blastema, no es divideixen mai, resten en l'estadi G_1 , i s'aniran diferenciant paulatinament a partir del tercer dia de regeneració; 2) Al llarg de tota la regeneració, les cèl.lules morfològicament diferenciades es mantenen en el compartiment G_0-G_1 del cicle cel.lular, no presentant mai, signes de divisió cel.lular; 3) La cinètica cel.lular observada al postblastema mostra la presència d'una població, pre-existent a l'amputació en l'estadi G_2 del cicle cel.lular que serà responsable del primer màxim mitòtic. Endemés, s'observa a partir de les 5-8 hores de regeneració un increment del nombre de cèl.lules en fase S que coincideix amb un increment en la síntesi de DNA mesurada per mètodes bioquímics, i que serà responsable del segon màxim mitòtic als 2-3 dies de regeneració. En qualsevol cas, les cèl.lules en mitosi al postblastema i a la regió lluny de la ferida són sempre cèl.lules indiferenciades; 4) S'observa la presència d'una cinètica cel.lular molt semblant, si bé força més esmorteïda respecte al postblastema,

en regions llunyanes de la ferida. Això indica que els canvis cinètics durant la regeneració no estan circumscriu al blastema i postblastema sino que són generalitzables a tot l'organisme, la qual cosa implica mecanismes (desconeguts però) de transmissió de l'estat de regeneració a totes les regions de l'organisme. Aquest resultat incideixen en dos punts d'interès: l'origen de les cèl.lules del blastema, i la mecànica de formació d'aquest.

Sobre l'origen de les cèl.lules del blastema (neoblasts vs desdiferenciació; veure Introducció), les dades obtingudes semblen recolzar clarament la primera alternativa. Així, el primer màxim mitòtic a les 4-8 hores de regeneració, demostrat palesament a diferents espècies és coetani amb la baixada i pujada respectiva dels compartiments G_2 i G_1 de la població de cèl.lules indiferenciades. Això indica que les primeres cèl.lules que es divideixen, no poden venir, com han postulat diversos autors d'una desdiferenciació previa de les cèl.lules diferenciades prop de la ferida, doncs, a part de la manca de dades ultraestructurals i experimentals a favor d'aquest fenomen a planàries, l'increment mitòtic es dona en un període de temps excessivament curt per generar un procés d'aquest tipus que implica la desdiferenciació morfològica previa, l'inici i trànsit a través de la fase S (que a la majoria d'organismes adults implica de 8 a 12 hores), el pas a G_2 i l'entrada a mitosi. Un altre argument a favor de la hipòtesi dels neoblasts seria l'increment en les 5-8 hores de cèl.lules indiferenciades en la fase S. En aquest cas, i semblantment als arguments anteriors, els processos de desdiferenciació morfològica descrits per la majoria de Vertebrats i Invertebrats que regeneren seguint aquesta modalitat avasten temps notablement superiors a les 5-8 hores.

Així doncs, aquest resultat, junt a d'altres ja esmentats a l'introducció, recolzen fortament la hipòtesi dels neoblasts (cèl.lules preexistents a l'adult) com a base principal de les cèl.lules que formen el blastema. Un punt però incert, i de suma importància, rau en saber si les cèl.lules en fase S a l'inici de la regeneració (5-8 hores) provenen de cèl.lules que s'han dividit en el primer màxim mitòtic i que han passat a la fase S amb una fase G_1 nul.la o gairebé nul.la, o bé si són cèl.lules ja en G_1 des de l'inici de la regeneració que entren més o menys sincrònicament a la fase S.

L'altre problema d'interès radica en la mecànica de formació i crei

xement del blastema de regeneració a planàries. El punt clau que distingeix la formació, i més especialment el creixement del blastema a planàries respecte a la resta d'organismes formadors de blastema, és l'absència de mitosi en les cèl.lules del blastema pròpiament dit (Saló i Baguñà, 1984; Morita i Best, 1984). Malgrat tot, el blastema creix en nombre de cèl.lules tal com demostren els estudis estagmocinètics (Saló, 1984; Saló i Baguñà, en preparació); resultats semblants, els trobem Brugal et al (1985). La conclusió que es desprèn d'això és que el creixement del blastema es faria per l'alliberació continuada de cèl.lules indiferenciades des de la zona prop de la ferida cap a la base del blastema (Saló i Baguñà, 1985). Les dades obtingudes en aquest treball corroboren plenament les dades obtingudes pels autors esmentats ja que en tot moment les cèl.lules del blastema, diferenciades i indiferenciades, estan en el període G_1 del cicle cel.lular

El problema obert doncs, és saber la mecànica cel.lular d'acumulació de cèl.lules del blastema capaç d'explicar la cinètica d'acumulació trobada. En aquest sentit, Brugal et al. (1985) constatant que la cinètica d'increment del nombre de cèl.lules del blastema és força superior al nombre de cèl.lules generades per mitosi prop de la ferida durant les 48 primeres hores de regeneració, suposa que hi hauria una migració massiva de cèl.lules indiferenciades durant aquest període. Contràriament a aquesta interpretació, les dades de Saló (1984) indiquen que el nombre de mitosis acumulades en una franja de 300 micres al voltant de la ferida és més que suficient per explicar, suposant que dels dos productes de la divisió un migra i l'altre roman en el lloc inicial, l'acumulació progressiva de cèl.lules del blastema. En aquest sentit, Saló i Baguñà (1985) ja demostraren que les suposades migracions en regions lluny de la ferida eren perfectament explicables per la dispersió estocàstica de les dues cèl.lules filles (amb una distància final mitja entre elles de 30 a 50 micres) deguda a la pròpia divisió cel.lular. Simulacions en computadors d'aquest procés corroboren plenament aquestes dades (Vicente, Baguñà i Ocaña, treball en curs)

A les regions prop de la ferida el problema però que planteja aquest fenomen estocàstic de dispersió degut a la pròpia proliferació cel.lular són les constriccions de tipus mecànic i fisiològic que hi ha en aquesta zona. Així, cal tenir molt en compte, en primer lloc, que si bé en regions allunyades de la ferida el pla de divisió sembla ésser a l'atzar,

en regions prop de la ferida hi ha una orientació preferencial en sentit anteroposterior degut a la contracció epitelial i muscular prop de la ferida que imposa línies de tensió que obliguen o "afavoreixen" que les cèl.lules s'orientin en aquest sentit. A més, i a part del gran increment mitòtic que hi ha en aquesta zona, hem de tenir molt present - els fenòmens de lisi cel.lular que generen espais buits molt considerables on les cèl.lules poden fluir, especialment aquelles que es divideixen, amb molta més facilitat que en un teixit sòlid, intacte. Tot això afavoriria sens dubte una acumulació de neoblasts en les zones prop de la ferida. Malgrat tot, i tenint en compte la complexitat i les nombroses variables que intervenen, el millor camí per desentrellar si existeix una veritable migració cel.lular durant la regeneració seria - realitzar simulacions en computador d'aquest procés (projecte actualment en curs; Vicente, Baguñà i Ocaña).

Un darrer aspecte d'interès és el preguntar-se perquè les cèl.lules del blastema no proliferen. En aquest sentit, hi malgrat no haver de moment cap explicació raonada i convincent, és possible especular que les cèl.lules indiferenciades alliberin factors inhibidors que autocrinament controlin la proliferació depenent de la densitat cel.lular de les seves pròpies cèl.lules (Saló i Baguñà, 1985). Una explicació alternativa seria que el contacte físic entre els propis neoblasts inhibís, potser a través de la membrana cel.lular, els processos proliferatius.

Finalment, és molt interessant constatar, dins d'un enfoc evolutiu - del procés de regeneració, la posició intermedia que presenten les planàries dins del Regne Animal. Així de les dues modalitats de regeneració: morfàlaxi i epimorfosi, la primera sense divisió cel.lular i sense formació del blastema i la segona amb divisió cel.lular i formació del blastema, la primera la presenten organismes de tipus molt primitiu com són - els Cnidaris i certs Turbelaris inferiors. La segona modalitat, es pot dividir, pels coneixements acumulats ja avui en dia, en dos mecanismes bàsics: formació del blastema per acumulació de cèl.lules indiferenciades sense divisió cel.lular al blastema, i formació del blastema per desdiferenciació i divisió cel.lular dins del blastema. El primer el presenten - les planàries, organismes de complexitat estructural baixa, sense teixits ni òrgans molt estructurats, i en un estat de recanvi cel.lular continu (Romero, 1987); el segon, present des de Anèlids fins a Vertebrats, es -

dona en organismes amb teixits i òrgans ben definits i estructurats, amb varis teixits post-mitòtics, i amb fenòmens de recanvi cel.lular poc importants (llevat dels teixits de renovament, que, curiosament, presenten cèl.lules basals indiferenciades pròpies amb un estat determinat definit i no indefinit i totipotent com els neoblasts de planàries).

Es doncs molt interessant assenyalar aquesta connexió filètica tenint en compte les dades moleculars més recents sobre filogènia que indiquen un polifiletisme molt clar pels Metazous amb una radiació molt inicial pels Cnidaris, una més tardança (a partir de Protozous diferents) pels Platihelminths, d'on, per un procés de radiació final haurien derivat tots els Metazous superiors (Raff, Pace, Field i Riutort, treball en curs).

Bibliografia

- BAGUÑA, J. (1976 b). Mitosis in the intact and regenerating planarian Dugesia mediterranea n sp. II Mitotic studies during regeneration and a possible mechanism of blastema formation. J. Exp. Zool. 195: 65-80.
- BAGUÑA, J. (1981). Planarian neoblasts. Nature, 290, 14-15.
- BAGUÑA, J. i ROMERO, R. (1981). Quantitative analysis of cell types during growth, degrowth and regeneration in the planarians Dugesia mediterranea and Dugesia tigrina. Hydrobiologia 84:181-194.
- BETCHAKU, T. (1975). Evidence favors that planarian neoblasts are true reserve cells. J. Cell. Biol. 67, 31a.
- BRUGAL, G. GIROUD, F. i GABRIEL, A. (1985) Analysis of the cell kinetics - during planarian regeneration by means of SAMBA 200 cell image processor. Roux's Archv. Dev. Biol. 194:148-154.
- COWELL, J.K. i FRANKS, L.M. (1980) A rapid method for accurate DNA measurements in single cells in situ using a simple microfluorimeter and Hoechst 33258 as a quantitative fluorochrome. The Journal of histochemistry and cytochemistry. Vol. 28 N° 3 pp. 206-210.
- GREMIGNI, V. MICELI, C. i PICANO, E. (1980 b) II Cytophotometric analysis of the nuclear Feulgen-DNA content in somatic regenerated tissues. J. Embryol. Exp. Morphol., 55:65-76
- HAY, E.D. i COWARD, S.J. (1975). Fine structure studies on the planarian Dugesia. I Nature of the "neoblast" and other cell types in non-injured worms. J. Ultras. Res., 50:1-21.

- MORITA, M. i BEST, J.B. (1984) Electron microscopic studies of planarian regeneration. IV Cell division of neoblasts in Dugesia dorotocephala. J. Exp. Zool. 229:425-436.
- ROMERO, R. (1987). Anàlisi cel.lular quantitatiu del creixement i de la reproducció a diferents espècies de planàries. Tesi Doctoral. Universitat de Barcelona.
- 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. Universitat de Barcelona.
- SALÓ, E. i BAGUÑA, 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. Morphol. 83:63-80.
- SALÓ, E. i BAGUÑA, J. (1985). Cell movement in intact and regenerating planarians. Quantitation using chromosomal, nuclear and cytoplasmic markers. J. Embryol. Exp. Morph. 89,57-70.
- SHAPIRO, H.M. (1985). Practical flow cytometry. Alan R, Liss, INC.
- TAYLOR, I.W. (1980). A rapid single step staining technique for DNA analysis by flow microfluorimetry. The Journal of histochemistry and cytochemistry. Vol. 28 N° 9, pp. 1021-1024.
- WOLFF, E. (1962). Recent researches on the regeneration of planaria. In: Regeneration 20th Growth Symposium, The Ronald Press Co., pp 53-84.