

La regeneració en planàries

Un model emergent per a l'estudi de la biologia del desenvolupament

Si tenim la desgràcia de seccionar-nos un dit, no el podem recuperar; en canvi, una planària es pot esmicolar en centenars de petits fragments que en dues setmanes regeneraran organismes sencers i totalment funcionals. Quines són les diferències entre nosaltres i elles? Un dels punts clau és l'existència en la planària adulta d'una població de cèl·lules mare pluripotents capaces de proliferar

i diferenciar-se en tots els tipus cel·lulars. Alhora, des del punt de vista genètic-molecular, els mecanismes de morfogènesi i formació del patró estan sempre activats en una planària; en canvi, en d'altres organismes amb desenvolupament canònic, com vertebrats, insectes, etc., les decisions d'establiment d'un patró espacial es donen tan sols una vegada, durant el desenvolupament inicial.

Escrit per

Emili Saló

Departament de Genètica de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona

La planària és un dels organismes amb una capacitat més alta de regeneració. John Dalyell, el 1814, ja va escriure sobre les planàries el següent: “almost be called immortal under the edge of the knife”. Certament és així, perquè els fragments regenerats creixen de nou i produeixen organismes de la mateixa mida que la inicial, però, a més, aquests organismes són més joves ja que han estat reconstituïts per cèl·lules que podríem anomenar “noves”. Quines són les característiques que permeten regenerar-se tan eficientment a les planàries? Un dels punts clau és la presència en l'adult d'una població de cèl·lules mare pluripotents, els neoblasts. Els neoblasts

són les úniques cèl·lules amb capacitat proliferativa i que es diferencien en tots els tipus cel·lulars de l'organisme, inclosa la línia germinal. L'existència d'una proliferació basal i contínua dels neoblasts permet mantenir el recanvi cel·lular d'un organisme adult i alhora, en situacions especials d'estrès com és la regeneració, els mateixos neoblasts activen la seva taxa de proliferació per restituir el teixit perdut.

La planària presenta també una plasticitat morfològica impressionant. A més a més de la capacitat regenerativa, una planària adulta no té una mida fixa. Segons la freqüència d'ingesta d'aliment, va modificant la seva grandària, però

mantenint sempre la seva forma i funcionalitat, fet que requereix mecanismes de manteniment del patró i de les proporcions contínuament actius. La presència de cèl·lules pluripotents juntament amb aquesta plasticitat morfològica constant són propietats exclusives de les planàries en tot el món animal. Què podem aprendre del model de la planària? L'estudi dels mecanismes de morfogènesi durant la regeneració o el creixement i decreixement en planàries adultes representa una oportunitat única per a l'estudi de la homeòstasi, la reformació i manteniment del patró. Altres models biològics considerats clàssics en l'estudi del desenvolupament, com *Drosophila*, *C. elegans*, peix zebra, pollet i ratolí, mostren un model de desenvolupament canònic terminal, és a dir, l'organisme es desenvolupa una sola vegada i així l'adult presenta tots els seus òrgans formats però, al mateix temps, ha perdut la capacitat de repetir qualsevol procés de desenvolupament o regeneració total.

Grans qüestions de la regeneració

El fenomen de regeneració en organismes adults es pot definir com l'habilitat de restituir teixits, òrgans, apèndixs o trossos sencers per creixement i/o remodelatge del teixit preexistent. En què es diferencien els mecanismes de regeneració i el desenvolupament? Bàsicament són els mateixos elements genètics actuant en un escenari diferent; en la regeneració ja existeix una estructura adulta que ha de remodelar-se i recuperar les estructures perdudes, en canvi el desenvolupament es genera a partir del zigot que, per proliferació i diferenciació, anirà establint de nou tot l'embrió i aquest, l'adult.

Hi ha una gran diversitat de capacitat regenerativa en el món animal. Alguns són capaços de regenerar animals sencers a partir de fragments, com les estrelles de mar, les planàries (platihelminths) i les hidres (cnidaris). D'altres, com alguns insectes i artròpodes, poden regenerar apèndixs, per exemple, les potes. Dins dels vertebrats, el tritó i d'altres amfibis urodels poden regenerar la retina i la lent, així com la mandíbula i la cua; el peix zebra pot regenerar els extrems de les aletes i la part més distal del cor, mentre que en els mamífers la possibilitat de regenerar es limita a ossos fracturats, fetge parcialment seccionat o estructures molt especialitzades, com és el cas del recanvi anual de les banyes en els cérvols mascles. Aquesta gran

diversitat en la capacitat regenerativa independent de la complexitat dels organismes planteja grans qüestions com: de què depèn la capacitat regenerativa? Si els mecanismes depenen d'unes cèl·lules específiques, quin és el seu origen? Com s'estableix el patró en les regions regenerades i com s'ajusta el teixit antic a les noves proporcions per restituir un nou organisme funcional? Quins són els mecanismes genètics moleculars de la regeneració i quines similituds comparteixen amb els processos de desenvolupament? Finalment, és possible reactivar aquests processos en organismes que no presenten capacitat regenerativa de forma natural i així assolir els reptes plantejats en l'anomenada medicina regenerativa? L'allau de preguntes que es plantejen al voltant d'aquest tema és immens, com també ho és el potencial de les seves respostes en obrir nous camins en el camp de la biologia del desenvolupament, i confirma l'accessibilitat de les planàries en afrontar reptes no abordables en d'altres models menys plàstics.

Característiques de les planàries

Les planàries, o cucs plans, són organismes de vida lliure que representen un subgrup dels platihelminths, majoritàriament paràsits. Els de vida lliure estan adaptats a tots els mitjans, tan terrestres com aquàtics; els del nostre estudi són d'aigües dolces. Aquest model va ser introduït l'any 1967 pel prof. Jaume Baguña al Departament de Genètica de la Universitat de Barcelona. Les planàries són organismes tous, sense teixit esquelètic i aplanats dorsoventralment; presenten una clara cefalització amb la presència de dues taques oculars i dos ganglis cefàlics que continuen en el dors amb dos cordons nerviosos ventrals, mentre que l'intestí s'ha simplificat i presenta una faringe única central que desemboca en un intestí cec sense anus (Fig. 1). Entre el sistema digestiu i l'epidermis, apareix un teixit desorganitzat on es troben diferents tipus cel·lulars diferenciats i un d'indiferenciat, els neoblasts, que representen el 20-30% de les cèl·lules d'un organisme adult. Les dades de filogènia molecular situen les planàries dins dels lofotrocozoous, estretament emparentades amb els anèlids i mol·luscs, grup germà dels ecdisozoous, i que conjuntament defineixen el grup de protostomats.

Les planàries són conegudes per la seva gran capacitat regenerativa; així, petits fragments,



Figura 1. Planària d'aigua dolça *Schmidtea mediterranea*. A la part anterior s'observen les taques oculars o ulls, així com la faringe (f).



Figura 2. Canvis de mida segons la freqüència d'alimentació.

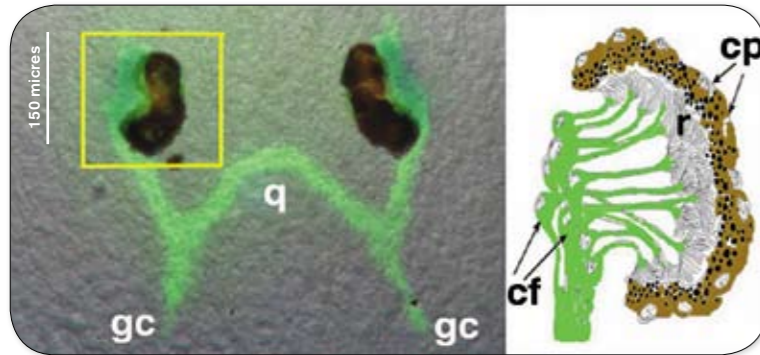


Figura 4. Detalls de les taques oculars de les planàries amb les cèl·lules fotoreceptores (cf) de color verd (reconegudes per un anticòs contra arretina, molècula relacionada amb la visió) i les cèl·lules pigmentades (cp) de color marró que protegeixen de l'excés de llum la regió dels rabdòmers (r) de les cèl·lules fotoreceptores. L'anticòs permet observar la connexió de les cèl·lules fotoreceptores sobre els ganglis cefàlics (gc) amb un quiasma parcial (q).

a partir d'unes 10.000 cèl·lules, poden regenerar un organisme sencer en dues setmanes (Thomas Hunt Morgan, un dels fundadors de la genètica de *Drosophila* i guardonat amb el premi Nobel de medicina o fisiologia l'any 1933, va aconseguir el rècord Guinness l'any 1898, en tallar una planària en 279 fragments, tots els quals van regenerar un organisme sencer). Una altra qualitat espectacular és la seva plasticitat morfològica o homeòstasi: un organisme dejunat durant mesos, que ha reduït la seva mida a l'equivalent a un individu juvenil que va néixer d'un ou poliembrionari o *cocoon*, en tornar a alimentar-se pot recuperar la mida i les propietats cel·lulars d'un organisme més jove, ja que

la major part de les cèl·lules diferenciades són de nova formació (Fig. 2). Algunes espècies han desenvolupat estratègies de reproducció asexual per escissió, produint organismes clònics a partir de cues autoseccionades per estirament del propi animal adult, regeneració que genera planàries completes que ràpidament creixen i es tornen a dividir. Gràcies a aquesta propietat de autoseccionar-se i regenerar, en el laboratori hem pogut establir línies clonals de milers d'organismes generades a partir d'un individu en menys d'un any, a força de facilitar el seu creixement al màxim, subministrant aliment (fragments de fetge de vedella alimentada sense antibiòtics) tres vegades per setmana.

El procés de regeneració

Així doncs, com és el procés de regeneració de les planàries? Després de la secció mitjançant una fulla d'afaitar o qualsevol altre estri esmolat, la primera reacció és la cicatrització, que es produeix gràcies a la contracció immediata dels músculs de la zona de la ferida que permeten el contacte entre l'epidermis antiga dorsal i ventral, de manera que en els primers 15 minuts la ferida ja està recoberta per una fina capa de cèl·lules epidèrmiques totalment estirades provinents de l'epidermis diferenciada de la regió veïna a la secció (Fig. 3C). Es considera que aquesta interacció epiteli-mesènquima generada en la cicatrització podria ser la iniciadora de la resposta regenerativa. De fet, concentracions elevades de magnesi en el medi, inhibidores de la contracció muscular, impossibiliten la cicatrització i també la regeneració. Una vegada cicatritzada la ferida, s'inicia una ràpida i elevada resposta mitòtica dels neoblasts propers a la zona (al voltant d'unes 500 micres). No s'ha observat processos de desdiferenciació ni de grans migracions cel·lulars. Així, la producció de teixit nou inicialment indiferenciat i consegüentment despigmentat de regeneració, anomenat blastema (Fig. 3), es produeix exclusivament per l'aportació cel·lular local a causa de l'alta activitat mitòtica dels neoblasts de la zona propera a la ferida del parènquima anomenada postblastema. Si la regió a regenerar és el cap, el blastema es diferencia en la regió distal perduda; en aquest cas, es diferencien els ganglis cefàlics i aquests indueixen la diferenciació dels ulls i d'altres sensors del cap (Fig. 3). Paral·lelament, la resta de l'organisme s'ajusta a les noves proporcions i hi ha un seguit de fenòmens de mort cel·lular, autofàgia i proliferació que permetran reajustar el teixit a les noves proporcions axials, és l'anomenada morfolaxi.

Sistemes d'estudi

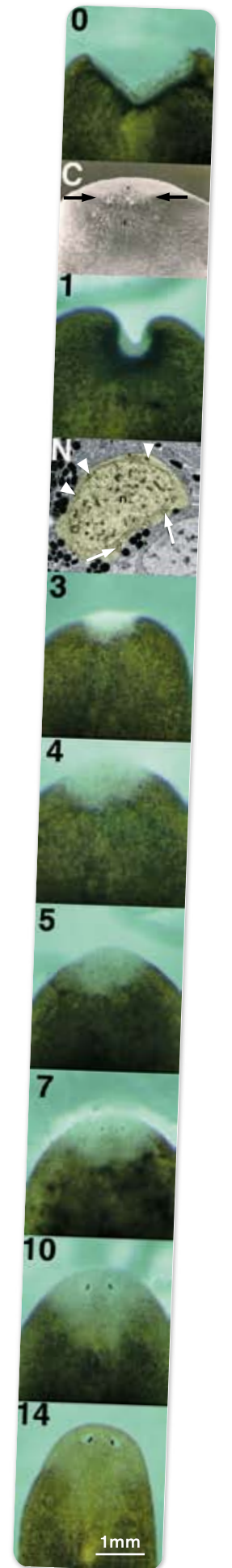
L'aplicació de noves metodologies de biologia molecular i cel·lular en la darrera dècada ha obert noves perspectives en l'estudi de la regeneració de la planària. Les tècniques d'hibridació *in situ* i d'immunologia d'organismes sencers permeten visualitzar l'expressió en l'espai i el temps de gens relacionats en la regeneració. Alhora, l'accessibilitat de la genètica inversa de la planària per interferència de RNA mitjançant alimentació de RNA de doble cadena ens permet interferir en l'expressió gènica i generar per primer cop fenotips mutants. Finalment, la producció d'organismes transgènics per electroporació d'adults sencers ens ha permès produir els primers organismes transgènics, completant així el ventall de modificacions genètiques bàsiques per a l'estudi de qualsevol procés biològic cel·lular, molecular i genètic. En els darrers anys, gràcies al treball del centre de seqüenciació genòmica de la Universitat de Washington, Sant Louis (EUA), es pot accedir a més de 16 milions de fragments genòmics seqüenciats a l'atzar de l'espècie objecte del nostre estudi, *Schmidtea mediterranea*, en aquests moments agrupats en uns 90.000 *contigs* o fragments genòmics mes llargs. Emprant el servei de supercomputació del Mare Nostrum (Barcelona Super Computing Center) estem intentant establir l'engalament final dels *contigs*. Aquest coneixement genòmic, i la informació existent de més de 11.000 EST únics (fragments expressats del genoma), ens permet afrontar la recerca de gens del desenvolupament *in silico*, partint de la similitud de seqüències que presenten els gens del desenvolupament, altament conservats en tota l'escala filogenètica animal. També ens permet generar una base de dades genòmica amb la qual es poden dissenyar xips que continguin tots els gens de la planària, o bé fer estudis de proteòmica. Aquesta plèthora de noves metodologies i facilitats moleculars ens ha de permetre explorar les oportunitats biològiques d'aquest sistema únic per a estudis d'homeòstasi, de regeneració i, especialment, del control de les cèl·lules mare en qualsevol circumstància (vegeu ref.1, per a una revisió recent).

Línies de recerca

Seguidament exposo les línies de recerca de més interès en les quals actualment estem treballant i que són: **1)** estudi del circuit genètic regulador de la morfogènesi dels ulls; **2)** estudi proteòmic dels neoblasts; **3)** caracterització de sistemes de senyalització pel manteniment de la polaritat durant la regeneració.

1) La planària té pocs marcadors externs per seguir la seva regeneració. Un dels pocs que hi ha són els ulls o taques oculars. Charles Darwin, en el seu llibre sobre l'origen de les espècies, va dedicar un capítol sencer a l'origen de la visió, en què proposa que a partir d'un ull simple prototípic es van generar les diverses formes actuals, i aquest ull prototípic és molt similar a les taques oculars presents en les planàries (Fig. 4). Això ens va animar a caracteritzar els elements genètics responsables de la seva regeneració. Les planàries decapitades poden regenerar el cap en dues setmanes: entre el dia 2 i 5 regeneren els ganglis cefàlics i coetàniament les taques oculars. Aquestes estan formades per dos tipus cel·lulars, les cèl·lules fotoreceptores i les cèl·lules pigmentades que protegeixen a les primeres d'un excés de llum. Les fotoreceptores es connecten directament als ganglis cefàlics i d'aquesta manera les planàries poden defugir la llum. La determinació i diferenciació dels ulls està controlada per una xarxa gènica molt conservada en el món animal que s'inicia pels gens *Pax-6*, *sine oculis* i *eye absent*. En el nostre laboratori hem caracteritzat aquests elements genètics en la planària, produint pèrdues de funció d'alguns d'aquests gens mitjançant RNAi que han generat fenotips sense ulls i, per tant, organismes cecs que no reaccionen a la llum (Fig. 5A, B) (Ref.2.). També hem produït organismes transgènics a partir d'una construcció que conté el promotor del gen de l'opsina (el fotopigment universal dels ulls) regulant un gen *reporter* (informador) de proteïna fluorescent, la *Green Fluorescent Protein*. Aquesta construcció està flanquejada per elements dels transposons PiggyBac o Hermes que permeten la seva integració al genoma de l'hoste en coin-

Figura 3. Regeneració cefàlica del mateix organisme a diversos temps. (C) Imatge de microscòpia electrònica d'escaneig a les 6 hores de regeneració on es pot veure la ferida totalment cicatritzada. (N) Imatge de microscòpia electrònica d'un neoblast ressaltat de la resta amb color groc; els caps de sagetes indiquen els cossos cromatoïdes al voltant de la membrana nuclear, on s'acumulen gran quantitat de transcrits silenciats. Les sagetes indiquen mitocondris presents en l'estreta franja del citoplasma. En la resta d'imatges els números indiquen els dies després de la decapitació. El blastema és el teixit no pigmentat.



jectar-la amb una segona construcció que conté els elements que codifiquen per la transposasa (l'anomenat *helper*). Els animals transformats mitjançant la injecció d'aquests DNA, seguida d'una electroporació de l'organisme sencer per permetre la seva interiorització al nucli, generen organismes mosaic on alguns neoblasts transformats que es diferencien cap a ulls mostren la coloració verd fluorescent. A la següent generació, i quan algun dels neoblasts transformats es diferencien cap a cèl·lules germinals, apareixen organismes juvenils amb els ulls completament fluorescents. Ja tenim un organisme transgènic! (Fig. 5C) (Ref.3). En l'actualitat estem produint xips on estan representats els més de 10.000 EST del genoma de la planària *Schmidtea mediterranea*, per hibridar-los amb cDNA d'organismes control i organismes amb el fenotip sense ulls. El resultat d'aquest estudi diferencial ens

revelarà els gens candidats a estar implicats en la determinació d'ulls. Posteriorment, aquests gens candidats seran confrontats amb d'altres col·leccions obtingudes en estudis del desenvolupament d'ulls de *Drosophila* o de peix zebra.

2) En planàries intactes, els neoblasts mostren un nivell proliferatiu basal per mantenir el recanvi cel·lular de tots els tipus cel·lulars. Durant la regeneració, aquestes cèl·lules incrementen la taxa proliferativa per tal de produir el nou teixit de regeneració o blastema i permetre la remodelació dels fragments regenerats a les noves proporcions. El coneixement dels mecanismes cel·lulars que controlen els fluxos de diferenciació i alhora permeten el manteniment d'un estoc estable de cèl·lules indiferenciades, així com el seu control proliferatiu que evita la producció de tumors, o bé els diferents fluxos de

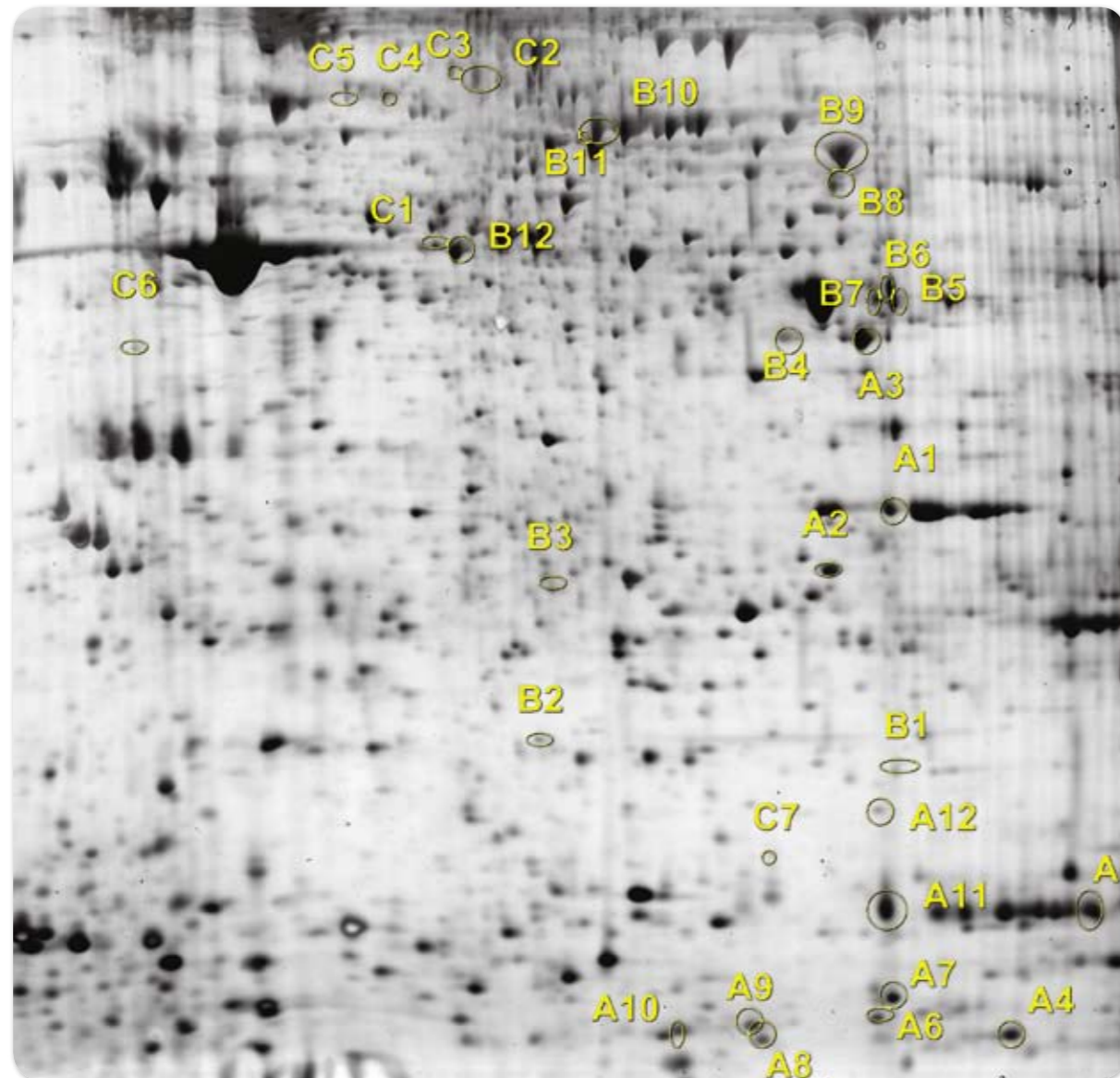


Figura 6. Gel bidimensional d'acrilamida on hi ha marcades les taques específiques que podran correspondre a proteïnes de neoblasts. Imatge cedida gentilmente per Kike Fernàndez-Taboada.

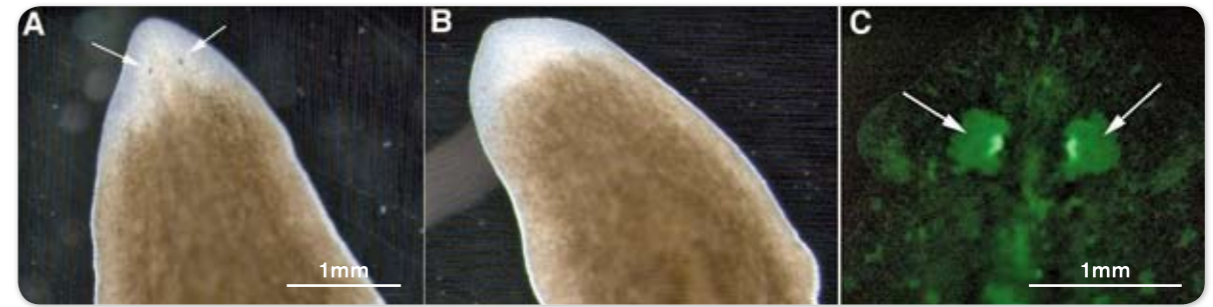


Figura 5. (A-B) Imatges en camp clar d'un organisme normal amb els ulls diferenciats (A) i un mutant amb el fenotip sense ulls (B) per pèrdua de funció mitjançant RNAi del gen *six-1*. (C) Imatges de fluorescència d'un organisme transgènic mostrant l'expressió de la GFP en les cèl·lules fotoreceptores. Les sagetes indiquen els ulls.

diferenciació vers els diferents tipus cel·lulars per mantenir l'homeòstasi d'organismes que canvien contínuament de mida i de proporcions de tipus cel·lulars diferenciats són algunes de les qüestions d'especial interès per la seva repercussió en d'altres models, com les cèl·lules mare de vertebrats. La comprensió del funcionament i la regulació d'aquest sistema dels neoblasts requereix d'un coneixement previ dels elements genètics específics que hi participen. Els neoblasts presenten una gran quantitat de transcrits silenciats acumulats al voltant del nucli, són els anomenats cossos cromatoides (Fig. 3N), preparats per respondre ràpidament a qualsevol contingència, la qual cosa inhabilita l'estratègia genòmica. Per aquesta raó, estem desenvolupant una estratègia de proteòmica de neoblasts que consisteix en obtenir el proteoma mitjançant gels bidimensionals d'extractes proteics d'organismes sencers i confrontar-lo amb un segon proteoma d'organismes que han perdut la població de neoblasts gràcies a la interferència de RNA del gen *piwi*. *Piwi* és un gen implicat en l'activitat enzimàtica del complex RISC relacionat amb la maduració dels microRNA. La pèrdua de funció d'aquest gen comporta la desaparició de tots els neoblasts de la planària. La confrontació de les dues poblacions proteiques permetrà discriminar en els gels bidimensionals els punts que corresponen a proteïnes específiques de neoblasts presents en l'extracte control envers el grup d'organismes sense neoblasts (Fig. 6). La caracterització de la composició peptídica d'aquests punts presents en els gels bidimensionals requereix d'una anàlisi per espectroscòpia de masses i una posterior comparació dels perfils peptídics obtinguts amb una base de dades peptídica dels diferents gens deduïts en el genoma de la planària. Un estudi

preliminar ens ha permès caracteritzar proteïnes relacionades amb la proliferació cel·lular, reparació del DNA i proteïnes d'estrès cel·lular com les HSP (*Heat Shock Proteins*).

3) Un altre dels temes importants a resoldre en regeneració és com es manté el patró axial, tan anteroposterior com dorsiventral; és a dir, com s'organitza un fragment de planària per regenerar el cap a l'extrem anterior i la cua al posterior; i com regenera la part dorsal i la ventral correctament. Per respondre aquestes qüestions ens cal caracteritzar mecanismes de comunicació cel·lular, ja que en d'altres models de desenvolupament aquestes decisions les prenen proteïnes senyalitzadores disposades en forma de gradient que activen vies de transducció de senyal, com la via *wnt* i la *BMP*. Certament, hem observat que la interferència de la via *wnt* produeix organismes que perden la capacitat de reconèixer la polaritat anteroposterior i regeneren caps en ambdós extrems, mentre que quan interferim la via *BMP* no es determina la regió dorsal i apareixen organismes doble ventrals enganxats per la regió central com si fossin bessons siamesos.

La planària és un organisme simplificat i tan plàstic que es pot considerar un adult amb característiques embrionàries. També és un model molt accessible per a l'estudi de fenòmens de determinació i manteniment del patró, de control de cèl·lules mare, d'homeòstasi i de formació d'òrgans. Tots aquests processos són presents en el desenvolupament de tots els organismes i estan molt conservats en el món animal. El seu coneixement pot representar una via d'entrada en la comprensió d'aquests processos en sistemes més complexos i molt especialment en el control de les cèl·lules mare de vertebrats. |

Referències

- (1) Saló, E. (2006). The power of regeneration and the stem cells kingdom: The freshwater planarian *Schmidtea mediterranea* (Platyhelminth). *Bioessays*, 28(5): 546-559.
- (2) Saló, E. [et al.] (2002). Eye genetic network in Platyhelminthes: Expression and functional analysis of some players during planarian regeneration. *Gene.*, 287; 67-74.
- (3) Gonzalez-Estevéz, C. [et al.] (2003). Planarian transgenic lines obtained by electroporation using transposon-derived vectors and eye-specific GFP marker. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 100; no 24; 14046-14051.

Emili Saló i Boix



És doctor en ciències biològiques per la Universitat de Barcelona (1984). Professor titular des de l'any 1986 i catedràtic des de l'any 2003

de l'àrea de genètica. Cap del Departament de Genètica de la Universitat de Barcelona des del 2004 fins a l'actualitat. L'any 1986, després d'una estada postdoctoral en el Biozentrum, Universitat de Basilea, Suïssa, va iniciar un grup de recerca de Biologia del Desenvolupament aplicat a l'estudi de la regeneració de planàries a nivell genètic, cel·lular i molecular, grup que continua liderant fins a l'actualitat en el Departament de Genètica de la Universitat de Barcelona. Ha publicat més de 40 treballs científics en revistes i llibres internacionals i és coautor de més de 80 comunicacions en congressos internacionals.